



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GUSTAVO GALO MARCHEAFAVE

**EFEITOS ECOMETABOLÔMICOS DA ELEVAÇÃO DE CO<sub>2</sub>  
ATMOSFÉRICO EM GRÃOS DE *Coffea arabica***

---

Londrina  
2021

GUSTAVO GALO MARCHEAFAVE

**EFEITOS ECOMETABOLÔMICOS DA ELEVAÇÃO DE CO<sub>2</sub>  
ATMOSFÉRICO EM GRÃOS DE *Coffea arabica***

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial exigido pelo Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química – Associação ampla UEL/UEPG/Unicentro, para obtenção do título de Doutor em Química com área de concentração em Química analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio

Londrina  
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

M316e Marcheafave, Gustavo Galo.

Efeitos ecometabolômicos da elevação de CO<sub>2</sub> atmosférico em grãos de *Coffea arabica* / Gustavo Galo Marcheafave. - Londrina, 2021.  
192 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2021.  
Inclui bibliografia.

1. Mudanças climáticas - Tese. 2. Ecometabolômica - Tese. 3. Planejamento estatístico de misturas - Tese. 4. Quimiometria - Tese. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU 54

GUSTAVO GALO MARCHEAFAVE

**EFEITOS ECOMETABOLÔMICOS DA ELEVAÇÃO DE CO<sub>2</sub>  
ATMOSFÉRICO EM GRÃOS DE *Coffea arabica***

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial exigido pelo Programa de Pós-Graduação em Química, curso de Doutorado em Química – Associação ampla UEL/UEPG/Unicentro, para obtenção do título de Doutor em Química com área de concentração em Química analítica.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Audrey Alesandra Stingham Garcia  
Lonni  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Elen Julciléia Romão Sartori  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Sérgio Luis Costa Ferreira  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

---

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos  
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Londrina, 16 de julho de 2021.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a amizade, o comprometimento, o conhecimento, o incentivo e as inúmeras oportunidades e conquistas que a Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio me proporcionou nos últimos 10 anos. Minha gratidão por toda orientação e apoio.

Agradeço ao Prof. Dr. Roy Edward Bruns por toda ajuda ao longo do doutoramento. A sua generosidade e dedicação científica são admiráveis.

Agradeço à Me. Cláudia Domiciano Tormena e Dra. Elis Daiane Pauli. A leveza do doutorado foi em grande parte pelo apoio e ajuda de ambas. Obrigado.

Agradeço aos inúmeros colaboradores científicos que ao longo deste processo me ajudaram. Especialmente Dra. Miroslava Rakocevic que foi fundamental para a construção desse trabalho.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina pelo acolhimento durante esses anos de conhecimento, aprendizado, formação profissional e sobretudo a realização pessoal.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, ao Consórcio Brasileiro de Desenvolvimento do Café e CNPq pelos recursos e bolsas de pesquisas que favoreceram a execução deste trabalho.

Sem sombra de dúvidas, agradeço aos meus pais, Lucimar Galo Marcheafave e Paulo Marcheafave, e minha irmã, Juliana Galo Marcheafave. Guerreiros, companheiros, pessoas que foram responsáveis por grande parte das oportunidades até aqui atingidas. E dedico esta conquista a minha sobrinha Elisa.

Agradeço ainda a todo grupo de pesquisa LQCN, pelo presente companheirismo, respeito e compartilhamento de conhecimento prático/científico.

Agradeço também as Professoras Doutoras Audrey Alesandra Stingham Garcia Lonni e Elen Julciléia Romão Sartori e os Professores Doutores Sérgio Luis Costa Ferreira e Walter Nei Lopes dos Santos por aceitarem contribuir com a discussão do trabalho na defesa de tese.

Você precisa acreditar em alguma coisa;  
na sua coragem, no seu destino, na sua vida...

MARCHEAFAVE, Gustavo Galo. **Efeitos ecometabolômicos da elevação de CO<sub>2</sub> atmosférico em grãos de *Coffea arabica***. 2021. 192 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## RESUMO

A cafeicultura é uma atividade agrícola dependente de fatores climáticos. Como o metabolismo das plantas é regulado em resposta à fatores ambientais, a elevação dos níveis de dióxido de carbono na atmosfera associada aos diversos estresses abióticos pode influenciar e consequentemente alterar o seu metaboloma. Grãos de cafeeiros cultivados no experimento de enriquecimento de dióxido de carbono ao ar livre sob dois níveis de CO<sub>2</sub>, atual ou elevado, associados com irrigação ou cultivados em condições de água de campo (sem irrigação) foram explorados utilizando impressões digitais ecometabolômicas de UV, NIR, RMN de 1H, SWV e FT-IR. Os extratos foram obtidos a partir de um planejamento estatístico de misturas composto por etanol, diclorometano, hexano e éter etílico. A técnica NIRS mostrou que etanol puro e a mistura binária envolvendo etanol e diclorometano foram os solventes que permitiram a discriminação dos extratos de grãos de café oriundos das diferentes perturbações ambientais. Similarmente, os resultados das impressões digitais UV obtidos a partir de etanol puro e da mistura binária etanol-diclorometano mostraram as maiores discriminações metabólicas entre os níveis de CO<sub>2</sub>. A biossíntese dos principais metabólitos como ácidos clorogênicos, cafestol, caveol e cafeína foi alterada devido às condições ambientais. Maiores quantidades de ácidos clorogênicos e caveol foram observadas em grãos de plantas irrigadas cultivadas com CO<sub>2</sub> elevado e irrigadas no nível atual de CO<sub>2</sub>. A partir do ASCA, o fator CO<sub>2</sub> mostrou efeito significativo na mudança do perfil de RMN de 1H das impressões digitais. O fator considerando a disponibilidade de água no solo e a interação (CO<sub>2</sub> × água) não foram significativos. As impressões digitais de RMN de 1H com análise por ACP, ASCA e PLS-DA determinaram perfis espectrais para ácidos graxos, cafeína, trigonelina e de glicose com aumentos em grãos de CO<sub>2</sub> atual, enquanto ácido quínico/ácidos clorogênicos, ácido málico e caveol/cafestol aumentaram em grãos de café sob elevado CO<sub>2</sub>. Multi-blocos foram formados usando dados de UV, NIRS, RMN de 1H, SWV e FT-IR. ComDim possibilitou investigar todas essas diferentes impressões digitais de acordo com o solvente extrator e em virtude do aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico. Etanol e etanol-diclorometano apresentaram as melhores separações entre as impressões digitais devido ao CO<sub>2</sub> atmosférico na análise multibloco. As maiores saliências para a separação entre os grãos cultivados em atmosfera elevada de CO<sub>2</sub> foram para o RMN de 1H e SWV anódico, que indicou quercetina e ácido clorogênico como compostos importantes em grãos de café cultivados sob CO<sub>2</sub> atual e elevado, respectivamente. Os resultados indicam que a discriminação depende das propriedades intrínsecas da matriz orgânica e do tipo de solvente utilizado, neste caso etanol e etanol-diclorometano foram responsáveis por indicar as mudanças químicas nos grãos de *C. arabica* sob mudança climática.

**Palavras-chave:** mudanças climática; metabólica; planejamento estatístico de misturas; quimiometria; metabólitos.

MARCHEAFAVE, Gustavo Galo. **Ecometabolomic effects of increased atmospheric CO<sub>2</sub> on *Coffea arabica* beans**. 2021. 192 p. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

## ABSTRACT

Coffee production is an agricultural activity dependent on climatic factors. The metabolism of plants is regulated in response to environmental factors. The increase in carbon dioxide levels in the atmosphere associated with different abiotic stresses can influence and consequently alter its metabolome. Coffee plants were cultivated in Free-Air Carbon dioxide Enrichment (FACE) experiment under two CO<sub>2</sub> levels, current or elevated, supplied with irrigation or cultivated under rainfed conditions (unirrigated) were explored using ecometabolomic fingerprints of UV, NIR, <sup>1</sup>H NMR, SWV, and FT-IR. The extracts were obtained from a statistical mixture design composed of ethanol, dichloromethane, hexane and ethyl ether. The NIRS technique showed that pure ethanol and the mixture involving ethanol, and dichloromethane (1:1 v/v) were the solvents permitting the coffee beans discrimination from different environmental disturbances. Similarly, UV fingerprint results obtained from pure ethanol and binary ethanol-dichloromethane mixtures showed the largest metabolic discriminations between CO<sub>2</sub> levels. The biosynthesis of major metabolites, chlorogenic acids, cafestol, kahweol and caffeine were altered owing to environmental conditions. Higher amounts of chlorogenic acids and kahweol were observed in beans from unirrigated plants grown with enriched CO<sub>2</sub> and irrigated ones at the current CO<sub>2</sub> level. From the ASCA, the CO<sub>2</sub> factor had a significant effect on changing the <sup>1</sup>H NMR profile of fingerprints. The soil-water factor and interaction (CO<sub>2</sub> × soil-water) were not significant. <sup>1</sup>H NMR fingerprints with PCA, ASCA, and PLS-DA analysis determined spectral profiles for fatty acids, caffeine, trigonelline and glucose increases in beans from current CO<sub>2</sub>, while quinic acid/chlorogenic acids, malic acid and kahweol/cafestol increased in coffee beans from elevated CO<sub>2</sub>. Multi-blocks were formed using UV, NIRS, <sup>1</sup>H NMR, SWV, and FT-IR data. ComDim investigated all these different fingerprints according to the extractor solvent and in virtue of atmospheric CO<sub>2</sub> increase. Ethanol and ethanol-dichloromethane showed the best separations due to CO<sub>2</sub> environment in multi-block data. The greatest saliences for the separation between beans grown in elevated CO<sub>2</sub> were found for <sup>1</sup>H NMR and anodic SWV. SWV indicated quercetin and chlorogenic acid as important compounds in coffee beans cultivated under current and elevated CO<sub>2</sub>, respectively. Results indicate that discrimination depends on the intrinsic properties of the organic matrix and the type of solvent used. In this study ethanol and ethanol-dichloromethane were responsible for indicating the chemical changes in *C. arabica* beans under climate change.

**Key words:** climate changes; metabolomics; mixture design; chemometrics; metabolites.

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1** – Estrutura química dos principais metabólitos estudados no café: ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico), cafeína, cafestol, caveol e trigonelina .....27

### CAPÍTULO 1

- Figura 1** – Gráficos dos escores da primeira e segunda componentes principais das impressões digitais NIR no modo reflectância de grãos crus de *C. arabica*. Grãos colhidos de plantas cultivadas em: (Δ) CO<sub>2</sub> elevado e não irrigadas; (■) CO<sub>2</sub> atual e não irrigadas; (●) CO<sub>2</sub> atual e irrigadas e (◄) CO<sub>2</sub> elevado e irrigadas – A) plantas não irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado e atual; B) plantas irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado e atual; C) plantas irrigadas e não irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado; D) plantas irrigadas e não irrigadas sob CO<sub>2</sub> atual. .... 46
- Figura 2** – Gráficos dos escores das primeira e segunda componentes principais das impressões digitais NIR no modo transmitância de grãos crus de *C. arabica*. Grãos colhidos de plantas cultivadas em: (Δ) CO<sub>2</sub> elevado e não irrigadas; (■) CO<sub>2</sub> atual e não irrigadas; (●) CO<sub>2</sub> atual e irrigada e (◄) CO<sub>2</sub> elevado e irrigada. A) plantas não irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado e atual; B) plantas irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado e atual; C) plantas irrigadas e não irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado; D) plantas irrigadas e não irrigadas sob CO<sub>2</sub> atual..... 48
- Figura 3** – Gráfico dos escores e loadings das impressões digitais etanólicas NIR no modo transmitância para grãos crus de *C. arabica*. Grãos colhidos de plantas cultivadas em: (Δ) CO<sub>2</sub> elevado e não irrigadas; (■) CO<sub>2</sub> atual e não irrigadas; (●) CO<sub>2</sub> atual e irrigada e (◄) CO<sub>2</sub> elevado e irrigada. A-B) Escores e loadings da ACP para plantas não irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado e atual; C-D) escores e loadings da ACP para plantas irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado e atual; E-F) escores e loadings da ACP para plantas irrigadas e não irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado; G-H) escores e loadings da ACP para plantas irrigadas e não irrigadas sob CO<sub>2</sub> atual ..... 51

**Figura 4** – Gráfico dos escores e loadings das impressões digitais NIR no modo transmitância para grãos crus de *C. arabica* obtidos com a mistura binária etanol-diclorometano. Grãos colhidos de plantas cultivadas em: (Δ) CO<sub>2</sub> elevado e não irrigadas; (■) CO<sub>2</sub> atual e não irrigadas; (●) CO<sub>2</sub> atual e irrigada e (◄) CO<sub>2</sub> elevado e irrigada. A-B) Escores e loadings da ACP para plantas não irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado e atual; C-D) escores e loadings da ACP para plantas irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado e atual; E-F) escores e loadings da ACP para plantas irrigadas e não irrigadas sob CO<sub>2</sub> elevado; G-H) escores e loadings da ACP para plantas irrigadas e não irrigadas sob CO<sub>2</sub> atual..... 54

## CAPÍTULO 2

**Figura 1** – Árvore de *Coffea arabica* com frutos. Cafeeiros irrigados e não irrigados foram cultivados sob os níveis atual e elevado de CO<sub>2</sub> na instalação FACE. O perfil vertical da planta foi estratificado em quatro camadas de 50 cm de espessura. A 1<sup>a</sup> camada não possuía material reprodutivo suficiente para análises químicas e metabólicas. .... 70

**Figura 2** – Gráficos de escores da análise de componentes principais (ACP) (CP1 versus CP2) para multi-impressão digital na região UV de grãos crus de *C. arabica* cultivados sob os níveis atual e elevado de CO<sub>2</sub>. A) cafeeiros não irrigados e B) cafeeiros irrigados. Multi-impressão digital obtida pelo planejamento estatístico de misturas..... 75

**Figura 3** – Gráfico de escores e loadings da análise de componentes principais (ACP) para a impressão digital na região UV de grãos crus de *C. arabica* cultivados sob nível atual e elevado de CO<sub>2</sub>. Impressão digital obtida usando mistura binária etanol-diclorometano. A) Gráfico de escores para cafeeiro não irrigado; B) gráfico de loading da CP1 e CP2 para cafeeiros não irrigados; C) gráfico de escores para cafeeiro irrigado; D) gráfico de loading da CP1 e CP2 para cafeeiros irrigados. (■) CO<sub>2</sub> atual não irrigado; (Δ) CO<sub>2</sub> elevado não irrigado; (◄) CO<sub>2</sub> elevado irrigado; (●) CO<sub>2</sub> atual irrigado ..... 77

**Figura 4** – Gráfico de escores e loadings da análise de componentes principais (ACP) para a impressão digital na região UV de grãos crus de *C. arabica* cultivados sob nível atual e elevado de CO<sub>2</sub>. Impressão digital obtida

usando etanol puro. A) Gráfico de escores para cafeeiro não irrigado; B) gráfico de loadings da CP1 e CP3 para cafeeiros não irrigados; C) gráfico de escores de cafeeiro irrigado; D) gráfico de loadings da CP1 e CP3 de cafeeiros irrigados. (■) CO2 atual não irrigado; (△) CO2 elevado não irrigado; (◄) CO2 elevado irrigado; (●) CO2 atual irrigado ..... 79

**Figura 5** – Gráfico de escores da análise de componentes principais (ACP) para a impressão digital na região UV de grãos crus de *C. arabica* sob diferentes regimes hídricos: irrigados e não irrigados. Impressão digital obtida usando etanol puro. A) CP1 versus CP3 - CO2 atual; B) CP1 versus CP2 – CO2 elevado; C) CP1 versus CP3 - CO2 elevado. (■) CO2 atual não irrigado; (△) CO2 elevado não irrigado; (◄) CO2 elevado irrigado; (●) CO2 atual irrigado..... 81

**Figura 6** – Gráfico de loadings da ACP para a impressão digital na região UV a partir dos extratos etanólicos de grãos crus de *C. arabica* cultivados no nível de CO2 atual sob condições não irrigada e irrigada ..... 82

**Figura 7** – Gráficos de escores da análise de componentes principais para as impressões digitais na região UV de grãos crus de *C. arabica* cultivados sob dois níveis de dióxido de carbono e duas condições de regime hídrico. Impressão digital obtida usando mistura binária de etanol-diclorometano. A) CP1 versus CP2 para cafeeiros não irrigados e irrigados no nível de CO2 atual; B) CP1 versus CP3 para cafeeiros não irrigados e irrigados no nível de CO2 atual; C) CP1 versus CP2 para cafeeiros não irrigados e irrigados no nível de CO2 elevado; D) CP1 versus CP3 para cafeeiros não irrigados e irrigados no nível de CO2 elevado. (■) CO2 atual não irrigado; (△) CO2 elevado não irrigado; (◄) CO2 elevado irrigado; (●) CO2 atual irrigado ..... 83

### CAPÍTULO 3

**Figura 1** – Planejamento estatístico de mistura para etanol (E), diclorometano (D), hexano (H) e éter etílico (e) usados na extração metabólica ..... 105

**Figura 2** – Estratégia experimental e análise de dados. Efeitos dos fatores da mudança climática em grãos de *Coffea arabica* coletados de plantas cultivadas em dispositivo de Enriquecimento de Dióxido de Carbono

ao Ar Livre (FACE). Delineamento fatorial do experimento: 1-para grãos de café cultivados sob CO<sub>2</sub> atual (-) e sem irrigação (-); 2-CO<sub>2</sub> atual (-) e com irrigação (+); 3-CO<sub>2</sub> elevado (+) e sem irrigação (-); e 4-CO<sub>2</sub> elevado (+) e com irrigação (+) para extração metabólica usando planejamento estatístico de mistura com quatro componentes. Aquisição de impressões digitais por ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de <sup>1</sup>H). Análise exploratória de impressões digitais por Análise de Componentes Principais (ACP) e determinação de efeitos e interações por Análise de Variância (ANOVA) - Análise de Componentes Simultâneos (ASCA). Classificação de impressões digitais com base em efeitos significativos por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A estrutura da matriz foi baseada em um planejamento fatorial completo de dois níveis com dois fatores (22) ..... 107

**Figura 3 –** A) Gráfico de escores da análise de componente principal (ACP) de impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H de grãos de Coffea arabica obtidas de plantas cultivadas em um dispositivo de Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (FACE) delineado por um planejamento fatorial completo de dois níveis com dois fatores: níveis de CO<sub>2</sub> (elevado e atual) e duas disponibilidades de água no solo (com e sem irrigação) e B) Gráfico de loadings da CP3 ..... 113

**Figura 4 –** Análise ASCA das impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H de grãos de Coffea arabica cultivados em um dispositivo de Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (FACE) e delineada em um planejamento fatorial com dois níveis de CO<sub>2</sub> (atual e elevado) e duas disponibilidades de água no solo (com e sem irrigação). A) Gráfico de escores para o efeito da concentração de CO<sub>2</sub> com resíduos projetados e B) Gráfico de loadings da CP1..... 115

**Figura 5 –** Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A) Gráfico de escores das impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H de grãos de Coffea arabica obtidas de plantas cultivadas em um dispositivo de Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (FACE) sob dois níveis de CO<sub>2</sub> (atual e elevado); B) Gráfico de loadings para VL1 ..... 118

<b>Figura 6</b> – Inclusão de grãos de Coffea arabica coletados ao longo do perfil vertical de plantas cultivadas sob CO <sub>2</sub> atual nas previsões do modelo PLS-DA de impressões digitais de RMN de 1H e classificação dos dois grupos de amostras.....	119
---	-----

#### CAPÍTULO 4

<b>Figura 1</b> – Escores da análise ComDim para DC4 (A) e DC8 (C) para as impressões digitais das quatro classes de grãos de Coffea arabica e gráficos de loadings para os voltamogramas SW anódicos em DC4 (B) e para RMN de 1H em DC8 (D); Atual NI: CO <sub>2</sub> atual não irrigado; Atual IRR: CO <sub>2</sub> atual irrigado; Elev. NI: CO <sub>2</sub> elevado não irrigado; Elev. IRR: CO <sub>2</sub> elevado irrigado. As identificações dos escores correspondem ao meio de extração utilizado através do planejamento de misturas (Tabela 1): E = etanol; D = diclorometano; H = hexano; e = éter etílico .....	156
--	-----

#### ANEXO A

<b>Figura A1</b> – Gráficos de loadings para multi-impressão digital na região UV de grãos crus de C. arabica cultivados sob nível atual e elevado de CO <sub>2</sub> . As multi-impressões digitais foram obtidas através de um planejamento estatístico de misturas. A) Cafeeiros não irrigados; B) cafeeiros irrigados .....	177
---	-----

#### ANEXO B

<b>Figura B1</b> – Dinâmica em: A) chuvas diárias e irrigação (mm) e déficit de pressão de vapor máximo diário estimado, próximo do meio-dia (VPD <sub>max</sub> , KPa), B) CO <sub>2</sub> elevado diário (e[CO <sub>2</sub> ]) e atual (a[CO <sub>2</sub> ]) (μL CO <sub>2</sub> L <sup>-1</sup> ) registrados dentro dos octógonos do experimento FACE de janeiro de 2016 a maio de 2016. A injeção de CO <sub>2</sub> ocorreu apenas durante o dia. O período de colheita dos frutos é indicado.....	180
<b>Figura B2</b> – Importância da variável na projeção (VIP) da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) .....	181

## ANEXO C

- Figura C1** – Escores da análise ComDim para DC1 (A) e DC2 (B) para as impressões digitais das quatro classes de grãos de Coffea arabica; Atual NI = CO2 atual não irrigado; Atual IRR = CO2 atual irrigado; Elev. NI = CO2 elevado não irrigado; Elev. IRR = CO2 elevado irrigado. As identificações dos escores correspondem ao meio de extração usado a partir do planejamento de misturas (Tabela 1): E = etanol; D = diclorometano; H = hexano; e = éter etílico ..... 184
- Figura C2** – Escores da análise ComDim para DC3 (A), DC5 (B), DC6 (C) e DC7 (D) para as impressões digitais das quatro classes de grãos de Coffea arabica; Atual NI = CO2 atual não irrigado; Atual IRR = CO2 atual irrigado; Elev. NI = CO2 elevado não irrigado; Elev. IRR = CO2 elevado irrigado. As identificações dos escores correspondem ao meio de extração usado a partir do planejamento de misturas (Tabela 1): E = etanol; D = diclorometano; H = hexano; e = éter etílico ..... 185
- Figura C3** – Gráficos de loadings para a primeira dimensão comum (DC1): A) UV; B) FT-IR; C) NIRS; D) RMN de 1H; E) SWV catódico; F) SWV anódico e para a segunda dimensão comum (DC2): A) UV; B) FT-IR... 187
- Figura C4** – Voltamogramas de onda quadrada dos padrões: (A-1) ácido clorogênico, (A-2) quercetina, (A-3) ácido ferúlico, (A-4) ácido gálico, (A-5) ácido cumárico e (A-6) ácido cafeico. Perfil voltamétrico de onda quadrada do extrato etanólico (BH; linha preta) antes e (linha vermelha) após a adição dos padrões: (C) ácido clorogênico, (D) quercetina, (E) ácido ferúlico, (F) ácido gálico, (G) ácido cumarico e (H) ácido cafeico. Condições SWV:  $f = 30$  Hz,  $A = 40$  mV,  $\Delta ES = 2$  mV. Eletrólito suporte:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HClO}_4$  em metanol,  $c = 20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de cada padrão e diluição 1:10 do extrato ..... 189
- Figura C5** – Perfil voltamétrico de onda quadrada dos extratos etanólicos (linha preta) e etanol-diclorometano (linha vermelha) de grãos de Coffea arabica usando o BDDE. Condições SWV:  $f = 30$  Hz,  $A = 40$  mV,  $\Delta ES = 2$  mV. Eletrólito suporte:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HClO}_4$  em metanol..... 190

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

- Tabela 1** – Planejamento estatístico de misturas para quatro solventes: etanol, diclorometano, hexano e éter etílico com suas respectivas proporções de composição..... 43

### CAPÍTULO 2

- Tabela 1** – Planejamento estatístico de misturas para quatro solventes: etanol, diclorometano, hexano e éter etílico, com suas proporções de composição e parâmetros solvatocrômicos dos solventes puros e suas misturas (combinação linear) de acordo com o delineamento - acidez ( $\alpha$ ); dipolaridade ( $\pi$ ) e basicidade ( $\beta$ ). ..... 73

### CAPÍTULO 3

- Tabela 1** – Resultados do modelo ASCA para os efeitos de dois níveis de CO<sub>2</sub> (atual e elevado) e dois níveis de disponibilidade de água no solo (com e sem irrigação) nas impressões digitais do grão de Coffea arabica obtidas com análise espectral de RMN de <sup>1</sup>H. Valores de p < 0,05 são marcados em negrito ..... 114

### Capítulo 4

- Tabela 1** – Planejamento estatístico de misturas para quatro componentes: etanol, diclorometano, hexano e éter etílico. As proporções usadas para extração são dadas em mL ..... 145
- Tabela 2** – Blocos de dados das impressões digitais de grãos de C. arabica obtidos a partir de diferentes técnicas instrumentais para análise ComDim ..... 151
- Tabela 3** – Saliências de cada bloco instrumental e para cada dimensão comum (DC) ..... 155
- Tabela 4** – Matriz de confusão e parâmetros de desempenho de qualidade para o modelo k-NN construído a partir de voltamogramas SWV anódicos de extratos etanólicos e de mistura binária etanol-diclorometano para discriminação entre os níveis de CO<sub>2</sub> de grãos de café coletados de plantas cultivadas em diferentes ambientes. Atual: CO<sub>2</sub> atmosférico

atual; Elev.: CO2 atmosférico elevado; Sens: Sensibilidade; Espec:  
Especificidade ..... 159

**Tabela 5** – Matriz de confusão e parâmetros de desempenho de qualidade para o modelo k-NN dos voltamogramas SWV anódicos de extratos etanólicos e de mistura binária etanol-diclorometano para discriminação entre os níveis de CO2 de grãos de café coletados de plantas irrigadas e não irrigadas. Atual IRR.: CO2 atual irrigada; Atual NI: CO2 atual não irrigada; Elev. IRR.: CO2 elevado irrigado; Elev. NI: CO2 elevado não irrigado; Sens: Sensibilidade; Espec: Especificidade ..... 162

#### ANEXO A

**Tabela A1** – Resultados do teste t para os escores da análise de componentes principais comparando as diferenças de média entre as duas condições de dióxido de carbono para a multi-impressão digital obtida pelo planejamento estatístico de misturas..... 178

#### ANEXO B

**Tabela B1** – Planejamento fatorial para investigação dos efeitos das mudanças climáticas na impressão digital metabólica dos grãos de Coffea arábica ..... 181

**Tabela B2** – Grãos de Coffea arabica coletados de plantas cultivadas sob CO2 atual foram usados para confirmar a classificação correta pelo modelo de previsão PLS-DA a partir de impressões digitais de RMN. Grãos coletados de quatro camadas dos cafeeiros com 50 cm de espessura (camada 1: <50 cm, camada 2: 51 - 100 cm, camada 3: 101 - 150 cm, camada 4:> 150 cm). Solventes de extração escolhidos aleatoriamente a partir do delineamento do planejamento de misturas, E = etanol; H = hexano; D = diclorometano; e = éter etílico ..... 182

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise de componente principal
ACG	Ácido clorogênico
ANOVA	Analysis of variance
ASCA	Analysis of variance - simultaneous component analysis
ATP	Adenosina trifosfato
BBI	Broadband inverse
CCSWA	Common component and specific weights analysis
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CL-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
ComDim	Common Dimension
CP	Componente principal
DC	Dimensão Comum
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
EDDB	Eletrodo de diamante dopado com boro
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FACE	Free-Air Carbon dioxide Enrichment
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy
gs	Condutância estomática
ha	Hectare
k-NN	k-Nearest Neighbors
LDA	Linear discriminant analysis
MCC	Matthews correlation coefficient
MSC	Multiplicative Scatter Correction
NAD(P)H	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
NIR	Near Infrared
NIRS	Near-infrared spectroscopy
OSC	Orthogonal Signal Correction
PLS-DA	Partial least squares-discriminant analysis
ppm	Partes por milhão
QDA	Quadratic discriminant analysis
RFA	Radiação fotossinteticamente ativa

RMN	Ressonância magnética nuclear
RMSECV	Root mean square error of cross-validation
SIMCA	Soft independent modeling of class analogies
SNV	Standard Normal Variate
SST	Rohrschneider-Snyder solvent-selectivity triangle
SWV	Square-wave voltammetry
TMS	Tetrametilsilano
RMN	Ressonância magnética nuclear
UV-Vis	Ultravioleta/visível
VIP	Variable importance in projection
VL	Variável latente
WUE	Water use efficiency
xi	Parâmetros de seletividade
xn	Dipolaridade
xd	Acidicidade
xe	Basicidade

## SUMÁRIO

	<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	20
	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	25
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	30
	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	35
	RESUMO .....	36
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	37
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	41
2.1	COLETA DE GRÃOS DE COFFEA ARABICA .....	41
2.2	REAGENTES .....	42
2.3	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS .....	42
2.4	AQUISIÇÃO DE ESPECTROS NIR .....	43
2.4.1	Modo Reflectância – Aquisição Direta nos Grãos .....	43
2.4.2	Modo Transmitância – Aquisição nos Extratos .....	44
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA E SOFTWARE .....	44
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	57
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58
	<b>CAPÍTULO 2</b> .....	64
	RESUMO .....	65
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	66
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	69

2.1	COLETA DE GRÃOS DE COFFEA ARABICA .....	69
2.2	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS .....	71
2.3	AQUISIÇÕES DE ESPECTROS NA REGIÃO UV .....	71
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA E SOFTWARE .....	72
<b>3</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>74</b>
3.1	ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE CO <sub>2</sub> ELEVADO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS .....	74
3.2	ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS REGIMES HÍDRICOS E ALTERAÇÕES METABÓLICAS .....	79
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>90</b>
	<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>97</b>
	RESUMO .....	98
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>99</b>
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	<b>103</b>
2.1	COLETA DE GRÃOS DE CAFÉ .....	103
2.2	REAGENTES .....	104
2.3	PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS .....	104
2.4	MEDIDAS DE RMN DE 1H .....	105
2.5	PROCESSAMENTO ESPECTRAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	106
2.6	TESTE DE CAPACIDADE DE PREVISÃO DO MODELO PLS-DA .....	109
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	110
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>111</b>
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>124</b>

	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	125
	<b>CAPÍTULO 4</b> .....	137
	RESUMO .....	138
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	139
<b>2</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	143
2.1	COLETA DE GRÃOS DE CAFÉ .....	143
2.2	ESTRATÉGIA DE EXTRAÇÃO .....	144
2.2.1	Planejamento Estatístico de Misturas em Ecometabolômica .....	144
2.2.2	Triângulo de Seletividade Para Solventes em Extrações de Plantas .....	145
2.2.3	Preparação dos Extratos .....	146
2.3	AQUISIÇÕES INSTRUMENTAIS .....	147
2.3.1	Medições de Espectrofotometria Ultravioleta .....	147
2.3.2	Medições de Espectroscopia de Transmitância No Infravermelho Próximo ..	147
2.3.3	Medições de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótons	147
2.3.4	Medições de Voltametria de Onda Quadrada .....	148
2.3.5	Medições de Espectroscopia de Infravermelho Por Transformada de Fourier	149
2.4	ANÁLISE DE DADOS E SOFTWARE .....	150
2.4.1	Método Quimiométrico de Análise Por Dimensões Comuns (COMDIM) Para Análise de Dados Multibloco em Ecometabolômica .....	150
2.4.2	Método K-Vizinhos Mais Próximos em Ecometabolômica .....	151
2.4.3	Processamento de Dados .....	153
<b>3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	154
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	164
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	166
	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	172
	<b>ANEXOS</b> .....	175

ANEXO A .....	175
ANEXO B .....	180
ANEXO C .....	183

## APRESENTAÇÃO

Esta tese de doutorado é composta por uma introdução geral que dará suporte para a ideia central da tese composta de quatro capítulos que discutem os principais resultados. O primeiro capítulo aborda uma alternativa analítica para discriminação de grãos de *Coffea arabica* em sistemas controlados de cultivo para verificação de mudanças metabólicas utilizando planejamento estatístico de misturas, espectroscopia na região do infravermelho próximo e análise multivariada. Os resultados desse capítulo estão publicados na revista “*Microchemical Journal*”.

O capítulo 2 envolve o uso de multi-impressões digitais a partir do planejamento estatístico de misturas para determinar os metabólitos majoritários que sofrem modificações em grãos crus de café em virtude da perturbação do meio – CO<sub>2</sub> e água – utilizando espectroscopia na região ultravioleta e análise de componentes principais. Os resultados desse capítulo estão publicados na revista “*Talanta*”.

O capítulo 3 aborda a busca da impressão digital dos grãos sob mudanças climáticas e as alterações metabólicas utilizando espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio aliado aos métodos quimiométricos. Os resultados desse capítulo estão publicados na revista “*Science of the Total Environment*”.

O capítulo 4 aborda o uso do método ComDim com multitabelas compostas por impressões digitais obtidas pelo planejamento estatístico de misturas e diferentes métodos instrumentais, visando a busca da discriminação ecometabólica de grãos de *Coffea arabica* sob CO<sub>2</sub> elevado e baixa disponibilidade hídrica. Os resultados desse capítulo estão publicados na revista “*Food Chemistry*”.

Os capítulos estão nas normas da revista ao qual foram publicados (modelo escandinavo).

## Produção científica no período (2017-2021):

- 1) SOARES, P.K.; MARCHEAFAVE, G.G.; GOMES, A. de A.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. Mixture Design PARAFAC HPLC-DAD Metabolomic fingerprints of fractionated organic and basic extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. CHROMATOGRAPHIA, p. 1189-1200, 2018.
- 2) GUIZELLINI, F.C.; MARCHEAFAVE, G.G.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S.; SOARES, P.K. PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprint investigation of reference and crossed coffees. FOOD RESEARCH INTERNATIONAL, v. 113, p. 9-17, 2018.
- 3) HATUMURA, P.H.; OLIVEIRA, G.S.; MARCHEAFAVE, G.G.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S.; TERRILE, A.E. Chemometric analysis of <sup>1</sup>H NMR fingerprints of *Coffea arabica* green bean extracts cultivated under different planting densities. FOOD ANALYTICAL METHODS, v. 11, p. 1906-1914, 2018.
- 4) MARCHEAFAVE, G.G.; TORMENA, C.D. ; PAULI, E.D.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. MICROCHEMICAL JOURNAL, v. 146, p. 713-721, 2019.
- 5) AFONSO, S.; SILVA, F.B.; MARCHEAFAVE, G.G.; HATUMURA, P.; BRUNS, R.E. ; SCARMINIO, I.S. Influence of seasonality and sunlight effects on *Rollinia mucosa* leaves fingerprint. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY, v. 30, p. 968-977, 2019.
- 6) PASSARI, L.M.Z.G.; SCARMINIO, I.S.; MARCHEAFAVE, G.G.; BRUNS, R.E. Seasonal changes and solvent effects on fractionated functional food component yields from *Mikania laevigata* leaves. FOOD CHEMISTRY, v. 273, p. 151-158, 2019.

- 7) TORMENA, C.D.; MARCHEAFAVE, G.G. ; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds. TALANTA, v. 191, p. 382-389, 2019.
- 8) MARCHEAFAVE, G.G.; TORMENA, C.D.; AFONSO, S.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Integrated chemometric approach to optimize sample preparation for detecting metabolic changes provoked by abiotic stress in *Coffea arabica* L. leaf fingerprints. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY, v. 30, p. 2085-2094, 2019.
- 9) TORMENA, C.D.; MARCHEAFAVE, G.G.; PAULI, E.D.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Potential biomonitoring of atmospheric carbon dioxide in *Coffea arabica* leaves using near-infrared spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. ENVIRONMENTAL SCIENCE AND POLLUTION RESEARCH, v. 26, p. 30356, 2019.
- 10) MARCHEAFAVE, G.G.; PAULI, E.D.; TORMENA, C.D.; MATTOS, L.E.; ALMEIDA, A.G.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Irrigated and CO<sub>2</sub> level effects on metabolism in *Coffea arabica* beans from mixture design – near infrared fingerprints. MICROCHEMICAL JOURNAL, v. 152, p. 104276, 2020.
- 11) MARCHEAFAVE, G.G.; PAULI, E.D.; TORMENA, C.D.; ORTIZ, M. C.V.; ALMEIDA, A.G. RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. Factorial design fingerprint discrimination of *Coffea arabica* beans under elevated carbon dioxide and limited water conditions. TALANTA, v. 209, p. 120591, 2020.
- 12) MARCHEAFAVE, G.G.; TORMENA, C.D.; MATTOS, L.E.; LIBERATTI, V.R.; FERRARI, A.B.S.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S.; PAULI, E.D. The main effects of elevated CO<sub>2</sub> and soil-water deficiency on <sup>1</sup>H NMR-based metabolic fingerprints of *Coffea arabica* beans by factorial and mixture design. SCIENCE OF THE

TOTAL ENVIRONMENT, v. 749, p. 142350, 2020.

**13)** SALAMANCA-NETO, C.A.R.; MARCHEAFAVE, G.G.; SCREMIN, J.; BARBOSA, E.C.M.; CAMARGO, P.H.C.; DEKKER, R.F.H.; SCARMINIO, I.S.; BARBOSA-DEKKER, A.M.; SARTORI, E.R. Chemometric-assisted construction of a biosensing device to measure chlorogenic acid content in brewed coffee beverages to discriminate quality. FOOD CHEMISTRY, v. 315, p. 126306, 2020.

**14)** COLDIBELI, B.; CAMPOS, N.S.M.; SALAMANCA-NETO, C.A.R.; SCREMIN, J.; MATTOS, G.J.; MARCHEAFAVE, G.G.; SARTORI, E.R. Feasibility of the use of boron-doped diamond electrode coupled to electroanalytical techniques for the individual determination of pravastatin and its association with acetylsalicylic acid. JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY, v. 862, p. 113987, 2020.

**15)** SPACINO, K.; MANTOVANI, A.C.; MARCHEAFAVE, G.G.; CANESIN, E.; BORSATO, D. The catalytic action of copper ions and the rosemary extract antioxidant effect in the biodiesel oxidation reaction and the implication in arrhenius behavior. JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY, v. 31, p. 1249-1257, 2020.

**16)** SPACINO, K.; ANGILELLI, K.B.; GONÇALES, J.G.; MARCHEAFAVE, G.G.; MANTOVANI, A.C.; BORSATO, D. The effect of  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cr}^{3+}$  ions in the oxidative stability and kinetics of biodiesel oxidation reaction with and without the addition of rosemary extract. REVISTA VIRTUAL DE QUÍMICA, v. 12, p. 840-851, 2020.

**17)** ABREU, M.B.; MARCHEAFAVE, G.G.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S.; ZERAIK, M.L. Spectroscopic and chromatographic fingerprints for discrimination of specialty and traditional coffees by integrated chemometric methods. FOOD ANALYTICAL METHODS, v. 13, p. 2204-2212, 2020.

**18)** TORMENA, C.D.; PAULI, E.D.; MARCHEAFAVE, G.G.; SCHEEL, G.L.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S. FT-IR biomarkers of sexual dimorphism

in yerba-mate plants: seasonal and light accessibility effects. MICROCHEMICAL JOURNAL, v. 158, p. 105329, 2020.

**19)** SALAMANCA-NETO, C.A.R.; MARCHEAFAVE, G.G.; MATTOS, G.J.; MORAES, J.T.; SCHWARZOVÁ-PECKOVÁ, K.; SARTORI, E.R. Boron-doped diamond film and multiple linear regression-based calibration applied to the simultaneous electrochemical determination of paracetamol, phenylephrine hydrochloride, and loratadine in fixed-dose combinations. MICROCHEMICAL JOURNAL, v. 162, p. 105831, 2021.

**20)** SILVA, F.B.; TORMENA, C.D.; PAULI, E.D.; ALMEIDA, A.G.; BERG, A.B.C.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S.; MARCHEAFAVE, G.G. Time dependent berry maturation for planting density levels in *Coffea arabica* L. beans: Mixture design-fingerprinting using near-infrared transmittance spectroscopy. JOURNAL OF FOOD COMPOSITION AND ANALYSIS, v. 97, p. 103795, 2021.

**21)** MARCHEAFAVE, G.G; TORMENA, C.D.; TERRILE, A.E.; SALAMANCA-NETO, C.A.R.; SARTORI, E.R.; RAKOCEVIC, M.; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S.; PAULI, E.D. Ecometabolic mixture design-fingerprints from exploratory multi-block data analysis in *Coffea arabica* beans from climate changes: elevated carbon dioxide and reduced soil water availability. FOOD CHEMISTRY, p. 129716, 2021. Aceito

**22)** FERRARI, A.B.S; MARCHEAFAVE, G.G; MANNOCHIO-RUSSO, H; BOLZANI, V.S; ZIED, D.C; SCARMINIO, I.S; ZERAIK, M.L. Chemical composition and chromatographic fingerprint of three strains of *Agaricus subrufescens* cultivated with handmade and commercial supplements. FOOD CHEMISTRY, v. 363, p.130227, 2021.

**23)** TORMENA, C.D; CAMPOS, R.C.S; MARCHEAFAVE, G.G; BRUNS, R.E.; SCARMINIO, I.S; PAULI, E.D. Authentication of carioca common bean cultivars (*Phaseolus vulgaris* L.) using digital image processing and chemometric tools. FOOD CHEMISTRY, p. 130349, 2021. Aceito

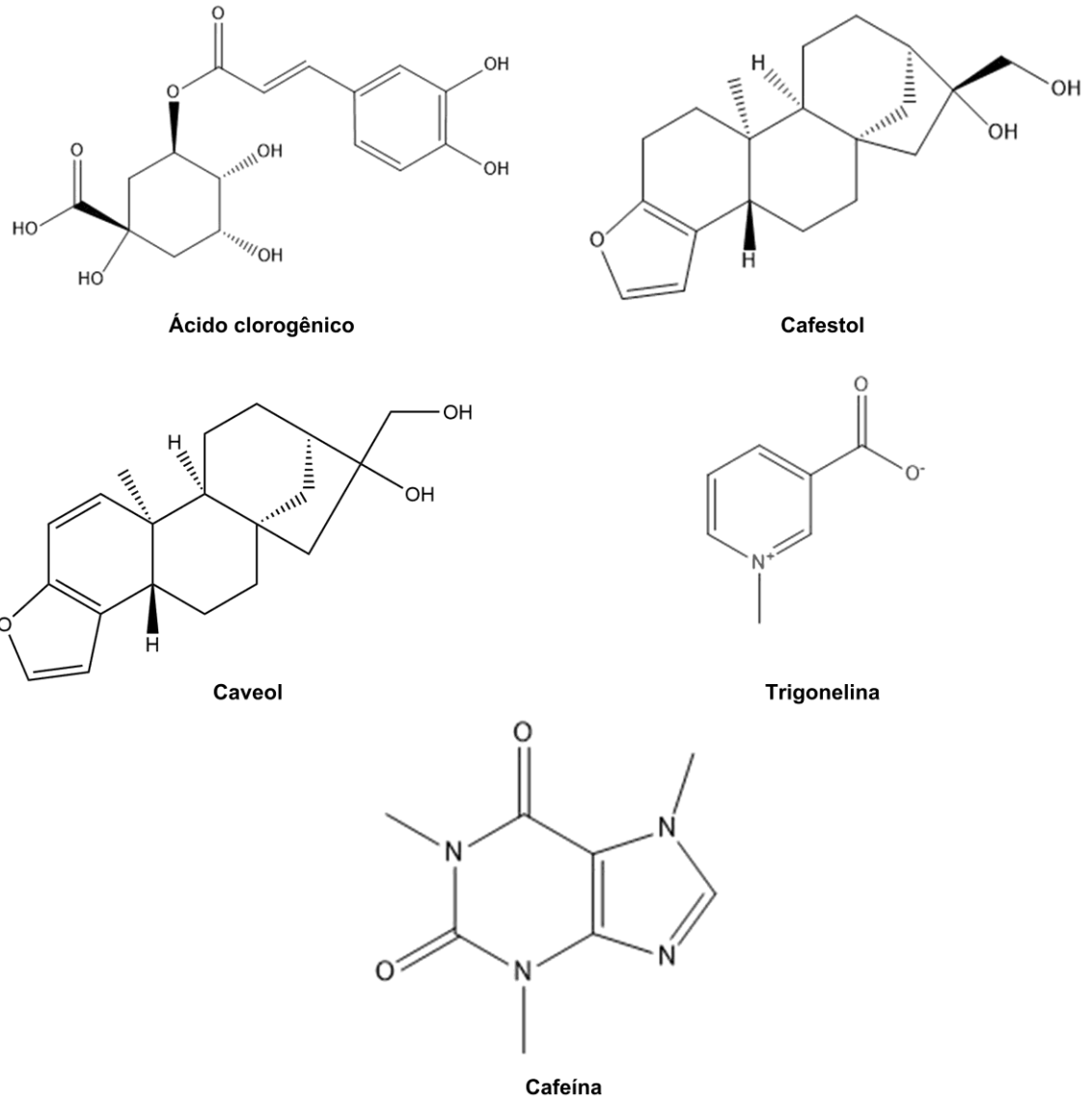
## INTRODUÇÃO GERAL

A emissão de dióxido de carbono e outros gases de efeito estufa tem agravado nas últimas décadas o aquecimento global (Rehman et al., 2021). As mudanças globais ocasionadas por essas alterações são vistas como um desafio ao longo do futuro, seja através das consequências aos sistemas que mantêm a vida em funcionamento, como agricultura, qualidade de vida, acesso aos recursos naturais, entre outros, como também o desenvolvimento de meios sustentáveis para a manutenção econômica dos países industrializados (Zhang et al., 2021). Inúmeros modelos matemáticos preditivos que consideram dados de alterações climáticas ao longo dos anos passados, têm alertado que o setor agrônomo já sofre e sofrerá impactos diretos (Ceballos-Sierra & Dall’Erba, 2021; Chemura et al., 2016; Ovalle-Rivera et al., 2015). Não necessariamente são apontados somente resultados negativos, essas mudanças também podem ocasionar aumento de produtividade de algumas cultivares (Zhang et al., 2019, 2021). Alguns impactos drásticos das alterações climáticas envolvem desde as mudanças das localizações geográficas das plantações em nível mundial, bem como alterações químicas destes sistemas biológicos (Bunn et al., 2015; Ovalle-Rivera et al., 2015). As modificações químicas podem beneficiar os produtos com aumento da qualidade metabólica (por exemplo, aumento da bioatividade), mas podem também diminuir conteúdos nutricionais, alterar propriedades sensoriais e inviabilizar setores econômicos nacionais importantes.

No mundo, estudos de predição que analisam as alterações nos padrões naturais de temperatura, precipitação, concentração de dióxido de carbono e outros fatores ambientais, indicam que o cultivo e produção de cafés será afetado até o final do século (Bunn et al., 2015; Ovalle-Rivera et al., 2015). Porém, modelos preditivos considerando alterações no meio ambiente são apenas hipóteses, visto que a interação dos diversos ecossistemas coordena todas as respostas – e essa interação global da biosfera é de difícil elucidação (Gomes et al., 2020). Dessa forma, estudos reais que considerem essas alterações simultaneamente são necessários

para estabelecer o conhecimento acerca da produção, qualidade e sobrevivência da cultivar (Ainsworth & Long, 2004). Em virtude da importância econômica, o café é uma das matrizes mais exploradas cientificamente no Brasil e não poderia deixar de ser protagonista em estudos que envolvam as alterações climáticas (Gomes et al., 2020; Marcheafave et al., 2019; Tormena et al., 2019; Tormena et al., 2019). A Embrapa Jaguariúna implantou um experimento FACE (do inglês, *Free-air Carbon Dioxide Enrichment*) em cultivares de café com o objetivo de avaliar o maior número de aspectos inerentes ao cafeeiro, como produtividade, aspectos fitossanitários, funcionalização da planta, alterações químicas de folhas e grãos, entre outros, frente as alterações de dióxido de carbono e disponibilidade hídrica de água (Martins et al., 2014; Rakocevic et al., 2018; Rakocevic & Matsunaga, 2018; Tormena et al., 2019).

Especificamente a matriz química dos grãos, apesar de extensamente explorada por métodos clássicos de análise, em estudos de metabolômica resultam em conjuntos de dados complexos, tanto em virtude dos diferentes compostos químicos presentes quanto pela similaridade estrutural entre algumas classes químicas, que pode levar a conclusões equivocadas (Bosco et al., 1999; Wei et al., 2010). Os principais compostos estudados nos grãos de café verde são: ácidos clorogênicos, cafestol, caveol, trigonelina e cafeína (Fig. 1) (Dias et al., 2013; Moreira et al., 2014). Outros compostos como açúcares e lipídios também são ditos como importantes nos atributos sensoriais da bebida (Farah et al., 2006). A análise simultânea do conjunto de espécies químicas do café traz desafios a ensaios metabolômicos, como a impressão digital, em virtude do processo extrativo, detecção e tratamento estatísticos complexo dos dados (Pauli, Bruns, et al., 2016; Pauli, Scarminio, et al., 2016; Tormena et al., 2020).



**Fig. 1.** Estrutura química dos principais metabólitos estudados no café: ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico), cafeína, cafestol, caveol e trigonelina.

A impressão digital objetiva um perfil químico robusto do material estudado (Silva et al., 2021), dessa forma, uma extração metabólica global ou altamente representativa do conjunto químico é a etapa limitante do procedimento experimental (Moreira & Scarminio, 2013). Para suprir essa demanda analítica, estratégias multivariadas têm sido aplicadas nos últimos anos em preparo de amostras vegetais, como alimentos e produtos naturais em geral (Marcheafave et al., 2019). O planejamento estatístico de misturas é a principal ferramenta aplicada nos processos de extração multivariada. Através de um delineamento experimental

entre os diferentes solventes, é possível investigar o processo extrativo dos extratores puros, combinações binárias, ternárias, quaternárias, quinárias, assim sucessivamente de acordo com o número de componentes utilizados no delineamento (Azcarate et al., 2020; Balieiro et al., 2020). Nesse processo é possível avaliar os efeitos e interações dos compostos extraídos nos diferentes sistemas e ainda maximizar o número de compostos extraídos em virtude da variação dos parâmetros físico-químicos dos solventes (Soares et al., 2007). Por fim, uma série de técnicas espectroscópicas ou cromatográficas podem capturar o instante metabólico do sistema vegetal em análise.

A metabolômica consolidou nos últimos tempos técnicas cromatográficas hifenadas à espectrometria de massas e a ressonância magnética nuclear (RMN) como ferramentas promissoras nas análises alvo, não alvo e de impressão digital (Jan & Ahmad, 2019). Realmente tais técnicas são poderosas na obtenção de perfis químicos, porém são onerosas e demandam, principalmente, mão de obra altamente qualificada para as análises. Dessa forma, técnicas alternativas devem ser exploradas, desenvolvidas e aplicadas em casos reais com o objetivo de minimizar a necessidade de equipamentos altamente sofisticadas (Alves & Valderrama, 2015; Salamanca-Neto et al., 2020).

Considerando as lacunas científicas no conhecimento apontadas até então, o objetivo geral desta tese é investigar através de ferramentas multivariadas a mudança química por impressão digital ecometabolômica em grãos crus de café sob aumento de dióxido de carbono atmosférico e disponibilidade hídrica.

Para atingir o objetivo geral citado acima, lançou-se mão dos seguintes objetivos específicos:

- Utilizar a espectroscopia na região do infravermelho próximo (NIRS) de baixo custo para uma compreensão preliminar da mudança química nos grãos de café em virtude das alterações de concentração de dióxido de carbono atmosférico e disponibilidade hídrica;

- Explorar a discriminação por análise de componentes principais (ACP) de impressões digitais obtidas por planejamento estatístico de misturas com a espectroscopia NIR em virtude das alterações de concentração de dióxido de carbono atmosférico e disponibilidade hídrica;
- Avaliar a discriminação das multi-impressões digitais na região ultravioleta por ACP em virtude das alterações de concentração de dióxido de carbono atmosférico e disponibilidade hídrica;
- Determinar a existência de efeitos e interações em virtude das alterações de concentração de dióxido de carbono atmosférico e disponibilidade hídrica no metaboloma de grãos de café por análise de variância (ANOVA) - análise de componente simultânea (ASCA) em impressões digitais RMN;
- Classificar por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA) os grãos de café por meio da impressão digital RMN em virtude do efeito principal da alteração de concentração de dióxido de carbono atmosférico;
- Utilizar a configuração planejamento fatorial-planejamento de misturas- análise de dados multitabelas (ComDim) para a investigação simultânea das variações dos sistemas de extração, aquisição de sinais dos sistemas metabólicos extraídos (UV, NIR, RMN de  $^1\text{H}$ , SWV e FT-IR), bem como a exploração em múltiplos blocos do conjunto de dados ecometabólicos das mudanças químicas no café durante o experimento FACE;
- Aplicar o método supervisionado de  $k$ -vizinhos mais próximos ( $k$ -NN) para confirmar os resultados do ComDim, com classificação dos grãos de café cultivados em diferentes condições ambientais.

## REFERÊNCIAS

- Ainsworth, E. A., & Long, S. P. (2004). What have we learned from 15 years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO<sub>2</sub>. *New Phytologist*, *165*, 351–372.
- Alves, F. C. G. B. S., & Valderrama, P. (2015). Ultraviolet spectroscopy and supervised pattern recognition methods for authentication of transgenic and non-transgenic soybean oils. *Analytical Methods*, *7*(22), 9702–9706. <https://doi.org/10.1039/c5ay02440d>
- Azcarate, S. M., Pinto, L., & Goicoechea, H. C. (2020). Applications of mixture experiments for response surface methodology implementation in analytical methods development. *Journal of Chemometrics*, *34*(12). <https://doi.org/10.1002/cem.3246>
- Balieiro, O. C., da Silva Pinheiro, M. S., Silva, S. Y. S., Oliveira, M. N., Silva, S. C., Gomes, A. A., & Pinto, L. (2020). Analytical and preparative chromatographic approaches for extraction of spilanthol from *Acmella oleracea* flowers. *Microchemical Journal*, *157*, 105035. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105035>
- Bosco, M., Toffanin, R., Palo, D. de, Zatti, L., & Segre, A. (1999). High-resolution <sup>1</sup>H NMR investigation of coffee. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(6), 869–878. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990501\)79:6<869::AID-JSFA302>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990501)79:6<869::AID-JSFA302>3.0.CO;2-6)
- Bunn, C., Läderach, P., Jimenez, J. G. P., Montagnon, C., & Schilling, T. (2015). Multiclass classification of agro-ecological zones for arabica coffee: An improved understanding of the impacts of climate change. *PLoS ONE*, *10*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140490>
- Ceballos-Sierra, F., & Dall'Erba, S. (2021). The effect of climate variability on Colombian coffee productivity: A dynamic panel model approach. *Agricultural Systems*, *190*, 103126. <https://doi.org/10.1016/j.agsy.2021.103126>

- Chemura, A., Kutuywayo, D., Chidoko, P., & Mahoya, C. (2016). Bioclimatic modelling of current and projected climatic suitability of coffee (*Coffea arabica*) production in Zimbabwe. *Regional Environmental Change*, 16(2), 473–485. <https://doi.org/10.1007/s10113-015-0762-9>
- Dias, R. C. E., De Faria, A. F., Mercadante, A. Z., Bragagnolo, N., & Benassi, M. T. de. (2013). Comparison of extraction methods for kahweol and cafestol analysis in roasted coffee. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(3), 492–499. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130057>
- Farah, A., Monteiro, M., Calado, V., Franca, A., & Trugo, L. (2006). Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. *Food Chemistry*, 98(2), 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.07.032>
- Gomes, L. C., Bianchi, F. J. J. A., Cardoso, I. M., Fernandes, R. B. A., Filho, E. I. F., & Schulte, R. P. O. (2020). Agroforestry systems can mitigate the impacts of climate change on coffee production: A spatially explicit assessment in Brazil. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 294, 106858. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.106858>
- Jan, S., & Ahmad, P. (2019). Introducing Metabolomics. In *Ecometabolomics: Metabolic Fluxes versus Environmental Stoichiometry* (1st ed., pp. 1–56). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814872-3.00001-1>
- Marcheafave, G.G., Tormena, C. D., Afonso, S., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019). Integrated chemometric approach to optimize sample preparation for detecting metabolic changes provoked by abiotic stress in *Coffea arabica* L. leaf fingerprints. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(10). <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190068>
- Marcheafave, G. G., Tormena, C. D., Pauli, E. D., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019). Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and

- antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. *Microchemical Journal*, *146*, 713–721.  
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.073>
- Martins, L. D., Tomaz, M. A., Lidon, F. C., DaMatta, F. M., & Ramalho, J. C. (2014). Combined effects of elevated [CO<sub>2</sub>] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. *Climatic Change*, *126*, 365–379. <https://doi.org/10.1007/s10584-014-1236-7>
- Moreira, I., & Scarminio, I. S. (2013). Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. *Talanta*, *107*, 416–422. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.053>
- Moreira, I., Scheel, G. L., Hatumura, P. H., & Scarminio, I. S. (2014). Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*. *Quimica Nova*, *37*(1), 39–43. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422014000100008>
- Ovalle-Rivera, O., Läderach, P., Bunn, C., Obersteiner, M., & Schroth, G. (2015). Projected shifts in *Coffea arabica* suitability among major global producing regions due to climate change. *PLoS ONE*, *10*(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124155>
- Pauli, E. D., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2016). UV-Vis spectral fingerprinting and chemometric method applied to the evaluation of *Camellia sinensis* leaves from different harvests. *Anal. Methods*, *8*(41), 7537–7544. <https://doi.org/10.1039/C6AY02462A>
- Pauli, E. D., Scarminio, I. S., & Tauler, R. (2016). Analytical investigation of secondary metabolites extracted from *Camellia sinensis* L. leaves using a HPLC-DAD-ESI/MS data fusion strategy and chemometric methods. *Journal of Chemometrics*, *30*(2), 75–85. <https://doi.org/10.1002/cem.2772>
- Rakocevic, M., & Matsunaga, F. T. (2018). Variations in leaf growth parameters over the tree structure of adult *Coffea arabica* in relation to seasonal growth, water availability and air carbon dioxide concentration. *Annals of Botany*, *122*(1), 117–131.

- Rakocevic, M., Ribeiro, R. V., Marchiori, P. E. R., Filizola, H. F., & Batista, E. R. (2018). Structural and functional changes in coffee trees after four years under free air CO<sub>2</sub> enrichment. *Annals of Botany*, *121*, 1065–1078.
- Rehman, A., Ma, H., Ahmad, M., Irfan, M., Traore, O., & Chandio, A. A. (2021). Towards environmental Sustainability: Devolving the influence of carbon dioxide emission to population growth, climate change, Forestry, livestock and crops production in Pakistan. *Ecological Indicators*, *125*, 107460. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107460>
- Salamanca-Neto, C. A. R., Marcheafave, G. G., Scremin, J., Barbosa, E. C. M., Camargo, P. H. C., Dekker, R. F. H., Scarminio, I. S., Barbosa-Dekker, A. M., & Sartori, E. R. (2020). Chemometric-assisted construction of a biosensing device to measure chlorogenic acid content in brewed coffee beverages to discriminate quality. *Food Chemistry*, *315*, 126306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126306>
- Silva, F. B., Tormena, C. D., Pauli, E. D., de Almeida, A. G., Berg, A. B. C., Rakocevic, M., Bruns, R. E., Scarminio, I. S., & Marcheafave, G. G. (2021). Time dependent berry maturation for planting density levels in *Coffea arabica* L. beans: Mixture design-fingerprinting using near-infrared transmittance spectroscopy. *Journal of Food Composition and Analysis*, *97*, 103795. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103795>
- Soares, P. K., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2007). Statistical mixture design – principal component optimization for selective compound extraction from plant material. *Journal of Separation Science*, *30*, 3302–3310. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700236>
- Tormena, C. D., Marcheafave, G. G., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019). Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds. *Talanta*, *191*, 382–389.
- Tormena, C. D., Marcheafave, G. G., Pauli, E. D., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019). Potential biomonitoring of atmospheric carbon dioxide in *Coffea arabica* leaves using

near-infrared spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, 26(29), 30356–30364. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06163-1>

Tormena, C. D., Pauli, E. D., Marcheafave, G. G., Scheel, G. L., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2020). FT-IR biomarkers of sexual dimorphism in yerba-mate plants: seasonal and light accessibility effects. *Microchemical Journal*, 158, 105329. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105329>

Wei, F., Furihata, K., Hu, F., Miyakawa, T., & Tanokura, M. (2010). Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 48(11), 857–865. <https://doi.org/10.1002/mrc.2678>

Zhang, Y., Niu, H., & Yu, Q. (2021). Impacts of climate change and increasing carbon dioxide levels on yield changes of major crops in suitable planting areas in China by the 2050s. *Ecological Indicators*, 125, 107588. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107588>

Zhang, Y., Wang, Y., & Niu, H. (2019). Effects of temperature, precipitation and carbon dioxide concentrations on the requirements for crop irrigation water in China under future climate scenarios. *Science of The Total Environment*, 656, 373–387. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.362>

# CAPÍTULO 1

**“Efeito dos níveis de água e concentração de CO<sub>2</sub> sobre o metabolismo de grãos de *Coffea arabica* a partir do planejamento de misturas e impressões digitais espectroscópicas no infravermelho próximo”**



**Publicado em:** *Microchemical Journal*, Volume 152, Janeiro 2020, 104276

## RESUMO

A cafeicultura é um setor importante da economia e, como qualquer outra cultura, é uma atividade agrícola dependente de fatores climáticos. Como o metabolismo das plantas é regulado em resposta à fatores ambientais, a elevação dos níveis de dióxido de carbono na atmosfera associada aos diversos estresses abióticos podem influenciar e conseqüentemente alterar o seu metaboloma. Portanto, o desenvolvimento de metodologias que possam indicar essas mudanças se torna importante para a tomada de decisões sobre o futuro da cultura cafeeira. O presente estudo propõe uma análise exploratória das alterações metabólicas dos grãos de *Coffea arabica* por meio das impressões digitais espectrais adquiridas pela Espectroscopia no Infravermelho Próximo (*Near-infrared spectroscopy*-NIRS) combinada com a Análise de Componentes Principais (ACP). Os cafeeiros foram cultivados no experimento de Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (*Free-Air Carbon dioxide Enrichment* - FACE) sob dois níveis de CO<sub>2</sub>, atual ou elevado, associados com irrigação ou cultivados em condições de água de campo (sem irrigação). Quando as medições foram feitas diretamente nos grãos no modo de refletância, os resultados das impressões digitais do espectro NIR não discriminaram os grãos de café originários das diferentes condições de cultivo. Uma metodologia alternativa foi proposta utilizando impressões digitais espectrais NIR no modo de transmitância, obtidas a partir das soluções extrativas do planejamento estatístico de misturas. Entre etanol, diclorometano, hexano, éter etílico e suas combinações, a ACP mostrou que etanol puro e a mistura binária envolvendo etanol e diclorometano foram os solventes que permitiram a discriminação dos extratos de grãos de café. Um número maior de amostras confirmou a discriminação entre os diferentes níveis de CO<sub>2</sub> e as condições de irrigação desses grãos. Bandas em diferentes regiões foram responsáveis por essas discriminações e foram diferentes para os extratos de etanol e a mistura etanol-diclorometano. Os resultados indicam que a discriminação depende das propriedades intrínsecas da matriz orgânica e do tipo de solvente utilizado. Além disso, na impossibilidade de uma análise exploratória dos espectros NIR adquiridos diretamente no material vegetal, o delineamento experimental, para obter extratos utilizando diferentes solventes, associados à obtenção das impressões digitais espectrais na região NIR no modo de transmitância, mostrou uma alternativa para esses estudos.

**Palavras-chave:** grão cru; dióxido de carbono; irrigação; planejamento estatístico de mistura; NIR; transmitância.

## 1 INTRODUÇÃO

As plantas assimilam dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) da atmosfera através de um complexo processo fotossintético [1]. Esse processo essencial da vida na Terra depende fortemente das condições de luz, temperatura e concentrações de  $\text{CO}_2$ . O influxo de  $\text{CO}_2$  atmosférico nos cloroplastos é um importante passo limitante para a atividade fotossintética das folhas, sob condições ótimas, assim como em condições sob estresse ambiental. A resposta da fotossíntese ao estresse hídrico é principalmente mediada pelo fechamento estomático [2]. As etapas de difusão de  $\text{CO}_2$  da folha para os sítios de carboxilação no estroma do cloroplasto também apresentam resistência ao  $\text{CO}_2$  [3]. No café Arábica (*Coffea arabica* L.), resistências significativas no mesofilo foliar, além do estomático, são o motivo da baixa taxa de fotossíntese dessa espécie em comparação com muitas outras, mesmo sob  $\text{CO}_2$  elevado [4].

O aumento do  $\text{CO}_2$  atmosférico é consequência de práticas industriais e agrícolas intensivas [5]. Associado a outras causas, é considerado um dos motivos que causam o aquecimento global [6]. Mudanças climáticas são um risco para a disponibilidade de alimentos no futuro [7,8]. Para estimar os efeitos da elevação da concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$  nas plantas da maneira mais natural, foram desenvolvidos dispositivos de Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (FACE, do inglês, *Free-Air Carbon dioxide Enrichment*). No experimento FACE,  $\text{CO}_2$  puro é injetado no ar em um espaço confinado por anéis contendo as espécies de plantas ou ecossistema de interesse, permitindo respostas precisas das plantas projetadas ao longo do tempo e durante as etapas diárias, permitindo a avaliação da produtividade das principais espécies de culturas [9].

Devido ao interesse econômico mundial no café Arábica, o primeiro experimento FACE a estudar essa cultura foi situado em Jaguariúna, Brasil [10]. O cafeeiro adulto apresentou maior fotossíntese foliar sob elevado  $\text{CO}_2$  em comparação com o nível atual [11]. A condutância estomática e a eficiência no uso da água foram maiores sob elevado  $\text{CO}_2$  em alguns estágios

observados de floração, expansão de baga e amadurecimento. O CO<sub>2</sub> elevado foi responsável pelo maior teor de água em todo o perfil do solo após anos de experimento. Os efeitos compensatórios do CO<sub>2</sub> elevado pela baixa disponibilidade de água foram observados pela retenção e expansão foliar do cafeeiro [12]. Nos três primeiros anos de produção sob elevado CO<sub>2</sub>, o rendimento de grãos aumentou em comparação com os cafeeiros sob CO<sub>2</sub> atual [13], mas esse aumento não ocorreu no quarto ano de produção. O conteúdo lipídico dos grãos verdes decresceu em elevado CO<sub>2</sub>, sem modificações na qualidade da bebida [14]. O CO<sub>2</sub> elevado mitigou os efeitos de secas anômalas e temperaturas elevadas, reduzindo a proporção de estruturas reprodutivas anormais. No entanto, poucos aspectos químicos foram estudados em relação às alterações metabólicas nas folhas e grãos e as conseqüências metabólicas sobre a planta e a qualidade da bebida [15]. Após 5 anos do experimento FACE, as principais modificações metabólicas das folhas causadas pelo aumento do CO<sub>2</sub> foram alterações no conteúdo de cafeína e ácidos fenólicos [16]. Estudos de simulação em cenários hipotéticos de mudança climática, consideraram a elevação da concentração de CO<sub>2</sub> durante os últimos 4 meses antes do amadurecimento dos grãos e mostraram a atenuação de alguns impactos negativos promovidos pelo calor nos grãos de café, tais como no teor de ácidos clorogênicos, mantendo as características químicas do grão mais próximas daquelas obtidas sob condições adequadas de temperatura [15].

A primeira etapa nas investigações com o objetivo de detectar alterações metabólicas nos sistemas vivos sob condições controladas, envolve apontar uma técnica simples e rápida que indique a diferença entre as classes. Atualmente, uma das abordagens mais utilizadas para identificar diferenças metabólicas envolve técnicas de impressões digitais, utilizando perfis de separação, espectrofotometria na região ultravioleta-visível, espectroscopia no infravermelho médio, espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas [17–21]. Variações metabólicas são observadas principalmente por mudanças nos padrões

espectroscópicos, cromatográficos ou espectrométricos, sem conhecimento prévio das identidades dos compostos [22]. Um método analítico também utilizado para obtenção de impressão digital metabólica é a espectroscopia de infravermelho próximo (NIRS) [23]. Esse método possui vantagens atraentes por ser rápido, não destrutivo, não invasivo, com alta penetração do feixe de radiação nos tecidos, além de ter aplicação quase universal [24]. Seu uso têm sido restrito a aplicações com demandas mínimas de preparação de amostra, no entanto, em alguns casos, com sucesso limitado. Uma de suas características envolve o uso de métodos quimiométricos, porque sua região espectral é dominada por bandas de absorção amplas, sobrepostas e fracas [24–26].

A espectroscopia NIR combinada com métodos quimiométricos pode ser usada para detectar alterações nos padrões de material originário de sistemas agrícolas em condições controladas de estudo. Na análise química de alimentos, abordagens com preparação mínima ou inexistente são aplicadas na determinação da origem geográfica e genotípica do café arábica [27], leite contaminado [28], fibras animais [29], infestação de insetos em arroz [30] entre outros. Nesses casos, a análise por reflectância ou transmitância garantiu sucesso na indicação da diferenciação química. Entretanto, alternativas de preparação de amostras para essa técnica devem ser desenvolvidas para solucionar problemas nos casos em que não há sucesso na análise direta e, assim, indicar rapidamente a existência de alterações nos padrões das amostras investigadas. Um preparo de amostra alternativo envolve a utilização do planejamento estatístico de misturas baseado nos parâmetros de seletividade do solvente, a fim de extrair o maior número de classes metabólicas na soma de todo o projeto de maneira ordenada e global [31–34].

Para as impressões digitais espectrais exploratórias obtidas pelo planejamento de misturas, a Análise de Componentes Principais (ACP) fornece uma compreensão preliminar dos efeitos provocados pelas perturbações ambientais em muitas classes de metabólitos. A ACP

é amplamente utilizada para impressões digitais metabólicas [19], permitindo a visualização das informações do conjunto de dados por poucas componentes principais, mantendo a variabilidade máxima dentro do conjunto [35]. O presente estudo relata a investigação de possíveis alterações metabólicas em grãos crus de *Coffea arabica*, cultivados em experimento FACE sob dois níveis de CO<sub>2</sub> e condições de água, utilizando impressões digitais espectrais adquiridas por espectroscopia NIR e exploradas por ACP. O planejamento estatístico de misturas foi utilizado como estratégia de preparação de amostra para a extração de metabólitos, otimizando a aquisição dos dados.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 COLETA DE GRÃOS DE *Coffea arabica*

A instalação FACE foi construída no campo experimental da Embrapa, Jaguariúna SP, Brasil (22°43'S, 47°01'W, 570 m de altitude). Os cafeeiros (cultivar Catuaí Vermelho IAC 144) foram delimitados por parcelas em octógonos (anéis de 10m de diâmetro), contendo quatro linhas de plantas e somando 44 plantas em cada anel [10].

A adição de CO<sub>2</sub> à atmosfera teve início em 25 de agosto de 2011 e encerrou-se em 30 de junho de 2016. O nível normal de CO<sub>2</sub> no início do experimento era de aproximadamente 390 µL L<sup>-1</sup>. A injeção direta de CO<sub>2</sub> puro permitiu elevar a concentração atmosférica em cerca de 150-200 µL L<sup>-1</sup> acima do nível normal durante o dia. O CO<sub>2</sub> foi emitido a partir de tubos instalados a 0,9 e 1,4 m acima da superfície do solo, seguindo a direção do vento com velocidade mínima de 0,5 m s<sup>-1</sup> para permitir a mistura homogênea do gás dentro das parcelas experimentais do FACE. A irrigação começou em outubro de 2015 e foi conduzida até o final do experimento FACE [11].

A produção de frutos de oito plantas representativas cultivadas com CO<sub>2</sub> elevado e oito com nível atual de CO<sub>2</sub> foi colhida em maio de 2016, no quinto ano do experimento FACE. Metade dos cafeeiros foram irrigados e metade dispunha de água apenas através das condições ambientais (solo, chuva, umidade, etc). Os frutos foram coletados de quatro camadas de 50 cm cada sobre o perfil vertical da árvore. Na camada mais baixa da planta (1<sup>a</sup> camada), foi encontrado um número insuficiente de frutos para realizar medidas experimentais, de modo que apenas os frutos da 2<sup>a</sup> à 4<sup>a</sup> camada da planta foram coletados. Todos os tipos de frutos foram coletados, incluindo verdes e vermelhos. Os frutos foram secos e separados da casca e do pergaminho. Os grãos crus foram selecionados por exclusão de todos os defeituosos e, finalmente, moídos para análise.

## 2.2 REAGENTES

Para extração do conjunto metabólico, todos os solventes orgânicos foram de grau analítico. Hexano, etanol, diclorometano foram adquiridos da Anidrol (Diadema, Brasil) e éter etílico da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

## 2.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Para otimizar a extração dos metabólitos presentes nos grãos de *C. arabica*, foi utilizado um planejamento estatístico de misturas com quatro solventes: etanol (*E*), diclorometano (*D*), hexano (*H*) e éter etílico (*e*) (Tabela 1). A seleção de solventes foi baseada no triângulo de seletividade de solventes de Snyder [36]. As extrações do planejamento de misturas foram realizadas para os grãos das três camadas do cafeeiro (2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> camada do perfil vertical), enquanto o ponto central do delineamento foi realizado em triplicata, resultando em 17 extratos para cada planejamento de misturas e 51 extratos para cada condição de cultivo (ou seja, 51 extratos para plantas irrigadas com o nível atual de CO<sub>2</sub>; 51 extratos de plantas não irrigadas com nível atual de CO<sub>2</sub>; 51 extratos para plantas irrigadas com nível elevado de CO<sub>2</sub>; 51 extratos para plantas não irrigadas com nível elevado de CO<sub>2</sub>). Cada processo extrativo consistiu de 2,50 g de grãos moídos de *C. arabica* e 60,0 mL das misturas de solventes (Tabela 1). Cada mistura extrativa foi colocada em banho ultrassônico (modelo Ultracleaner 1600, Unique) por 60 minutos a 15 °C e filtrada para separar a solução dos grãos moídos. Esses mesmos grãos foram submetidos novamente à extração por mais quatro vezes, totalizando 300 mL de extrato líquido. O extrato líquido obtido foi utilizado para as análises espectrais. Após a seleção do melhor solvente extrator na discriminação das diferentes classes, uma coleção de grãos de dezesseis cafeeiros foi selecionada aleatoriamente para validação experimental com novas extrações.

**Tabela 1.** Planejamento estatístico de misturas para quatro solventes: etanol, diclorometano, hexano e éter etílico com suas respectivas proporções de composição.

Experimentos	Notação do extrato	Solventes			
		Etanol ( <i>E</i> )	Diclorometano ( <i>D</i> )	Hexano ( <i>H</i> )	Éter etílico ( <i>e</i> )
1	<i>E</i>	1	0	0	0
2	<i>D</i>	0	1	0	0
3	<i>H</i>	0	0	1	0
4	<i>e</i>	0	0	0	1
5	<i>ED</i>	1/2	1/2	0	0
6	<i>EH</i>	1/2	0	1/2	0
7	<i>Ee</i>	1/2	0	0	1/2
8	<i>DH</i>	0	1/2	1/2	0
9	<i>De</i>	0	1/2	0	1/2
10	<i>He</i>	0	0	1/2	1/2
11	<i>EHe</i>	1/3	0	1/3	1/3
12	<i>EDe</i>	1/3	1/3	0	1/3
13	<i>EDH</i>	1/3	1/3	1/3	0
14	<i>DHe</i>	0	1/3	1/3	1/3
15	<i>EDHe</i>	1/4	1/4	1/4	1/4
16	<i>EDHe</i>	1/4	1/4	1/4	1/4
17	<i>EDHe</i>	1/4	1/4	1/4	1/4

## 2.4 AQUISIÇÃO DE ESPECTROS NIR

### 2.4.1 Modo reflectância – aquisição direta nos grãos

Os espectros na região de infravermelho próximo (NIR) no modo de reflectância foram adquiridos com o *software* DLP NIR scan Nano (Texas Instruments Inc., Dallas, EUA). A aquisição do espectro foi realizada diretamente nos grãos de café moídos, de 900 nm a 1700 nm, à temperatura ambiente de  $22 \pm 1$  °C. Cada espectro foi obtido a partir da média de 99 varreduras na resolução de 1 nm. O espectro de um bloco de politetrafluoretileno (PTFE) foi usado como branco. Após a aquisição, os espectros de reflectância NIR foram pré-processados pela método de Savitzky-Golay usando polinômio de segunda ordem com janela de 15 pontos e derivação de segunda ordem. As medições foram obtidas de todos os conjuntos de amostras em triplicatas.

### 2.4.2 Modo transmitância – aquisição nos extratos

Os espectros no modo de transmitância na região de infravermelho próximo foram adquiridos com o *software* DLP NIRscan Nano (Texas Instruments Inc., Dallas, EUA). Para a análise NIR (de 900 a 1700 nm), 1,0 mL de extrato foi colocado na cubeta de quartzo. Cada espectro foi obtido a partir da média de 99 varreduras na resolução de 3,9 nm e registrado em unidades de absorvância. O procedimento foi realizado em temperatura ambiente de cerca de  $22 \pm 1$  °C. Após a aquisição, os espectros de transmitância NIR foram pré-processados por suavização Savitzky-Golay com janelas de 9 pontos, polinômio de segunda ordem e primeira derivação.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA E *SOFTWARE*

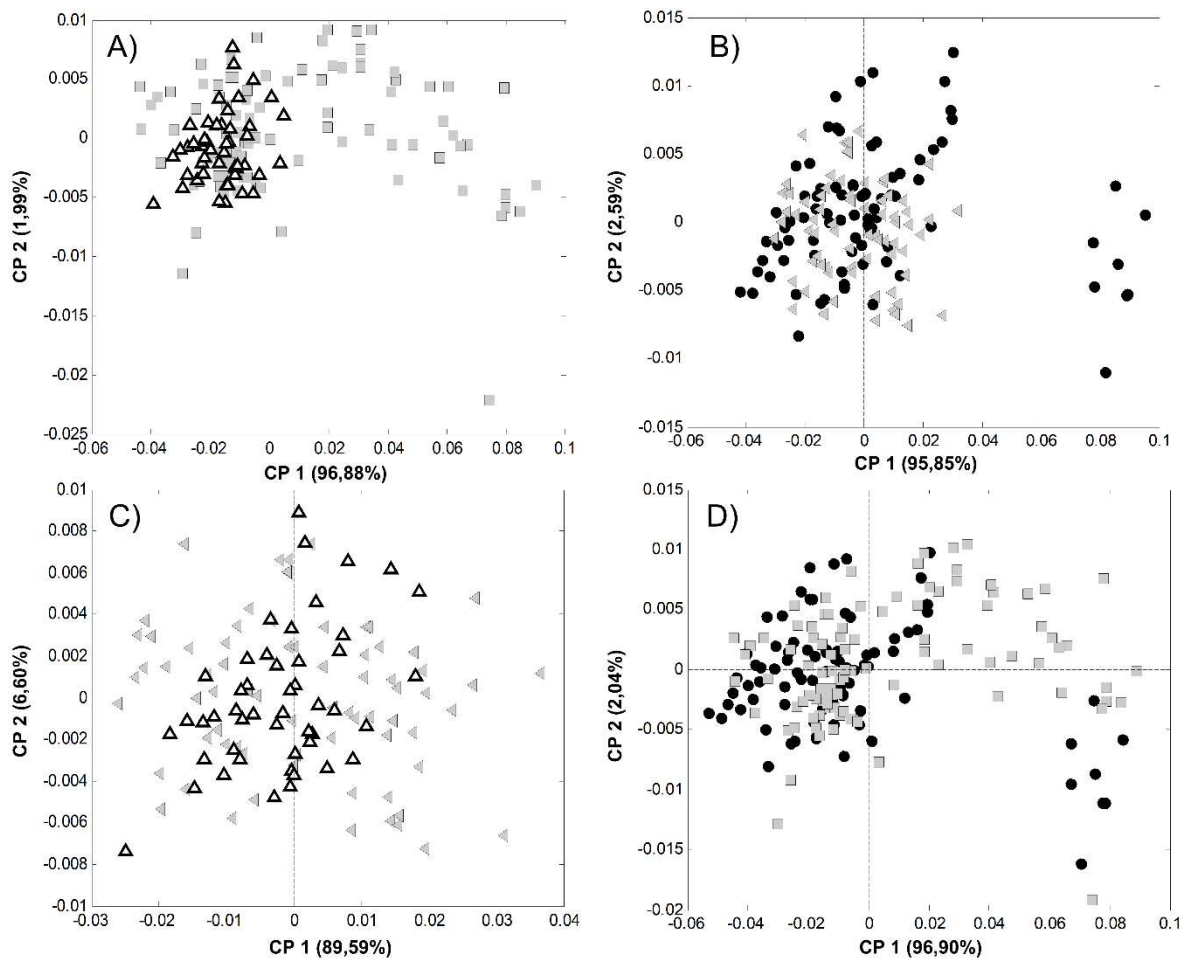
O tratamento dos dados e a análise quimiométrica foram realizados no software Matlab 2007b<sup>®</sup>, utilizando o pacote de ferramentas PLS 7.8<sup>®</sup> da Eigenvector Research (licenciado por Elis Pauli-PR).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A ACP foi utilizada como uma ferramenta exploratória para investigar tendências nas impressões digitais espectrais NIR no modo de reflectância dos grãos de café e determinar os fatores que permitem a discriminação entre amostras de café cru cultivadas sob dois níveis de CO<sub>2</sub> e condições de irrigação.

Devido à complexidade do conjunto de dados espectrais, algumas estratégias de pré-processamento foram testadas, incluindo a correção multiplicativa de sinal (*MSC-Multiplicative Scatter Correction*) [37], Transformação Normal Padrão de Variação (*SNV-Standard Normal Variate*) [38], primeira e segunda derivada dos espectros e suas possíveis diferentes combinações, todos com dados centrados na média. Entretanto, mesmo após diferentes tentativas espectrais de pré-processamentos antes da modelagem ACP, não foi possível visualizar separações entre grupos de grãos de café cultivados sob dois níveis de CO<sub>2</sub> ou condições de irrigação. Os resultados de uma dessas combinações, pela suavização de Savitzky-Golay com polinômio de segunda ordem (janela de 15 pontos), e derivação de segunda ordem, são ilustrados na Fig. 1.

Como a análise exploratória dos espectros adquiridos diretamente nos grãos de café crus não teve êxito na diferenciação das amostras, uma metodologia alternativa foi persuadida para discriminar os cafés crus nas diferentes condições de cultivo. Foram aplicadas à análise exploratória as impressões digitais NIR no modo de transmitância, obtidas a partir de extratos do planejamento de misturas (seção 2.3). Matrizes de espectros NIR foram submetidas à ACP, para avaliar o comportamento e indicar os solventes e suas misturas que discriminam os grãos de café obtidos em dois níveis de CO<sub>2</sub> e condições de abundância de água. Vários pré-processamentos foram testados. Os melhores resultados foram obtidos com a suavização Savitzky-Golay, com polinômio de segunda ordem, janela de 9 pontos, e primeira derivada, com dados centrados na média.

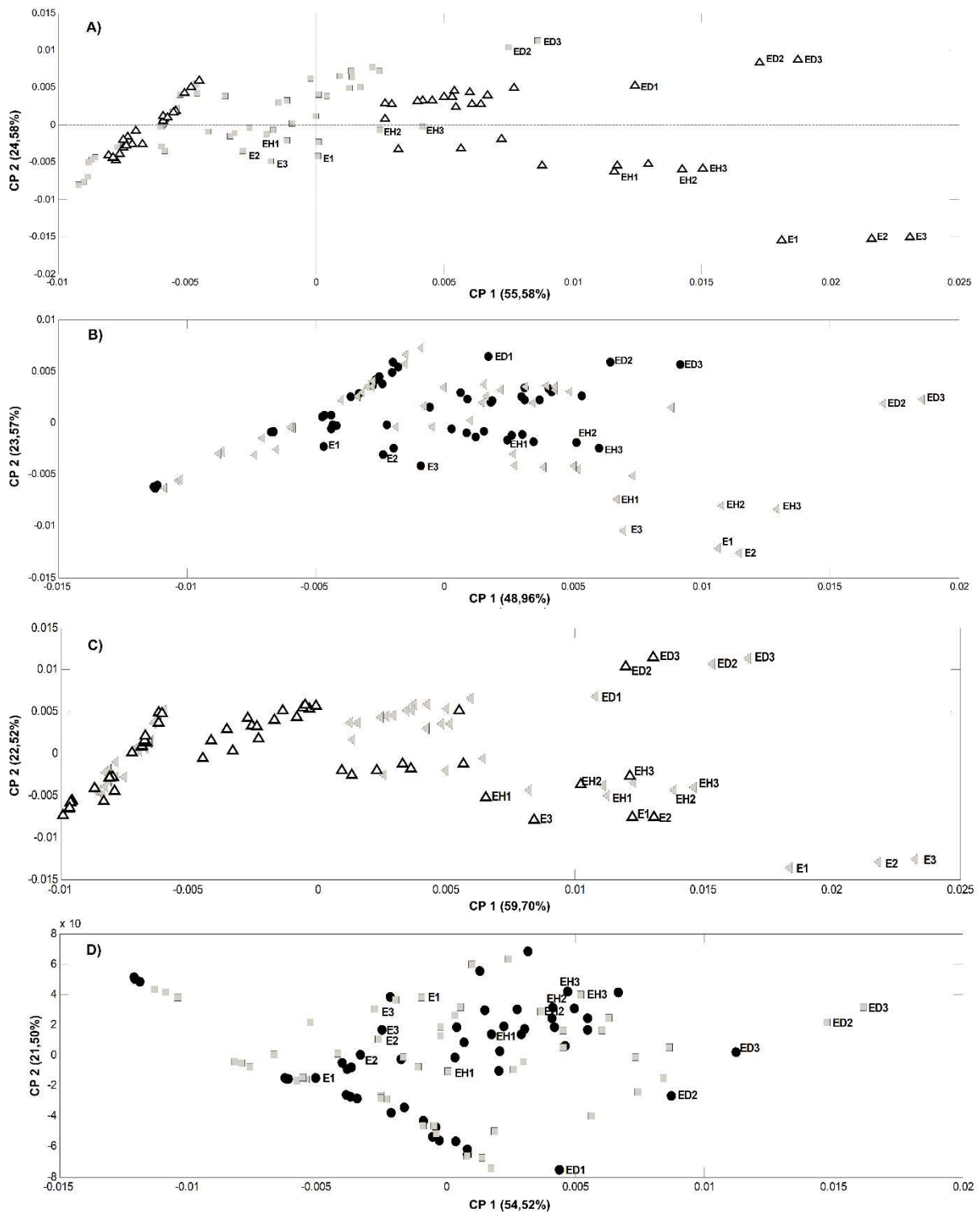


**Fig. 1.** Gráficos dos escores da primeira e segunda componentes principais das impressões digitais NIR no modo reflectância de grãos crus de *C. arabica*. Grãos colhidos de plantas cultivadas em: ( $\Delta$ )  $\text{CO}_2$  elevado e não irrigadas; ( $\blacksquare$ )  $\text{CO}_2$  atual e não irrigadas; ( $\bullet$ )  $\text{CO}_2$  atual e irrigadas e ( $\blacktriangleleft$ )  $\text{CO}_2$  elevado e irrigadas – **A)** plantas não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado e atual; **B)** plantas irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado e atual; **C)** plantas irrigadas e não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado; **D)** plantas irrigadas e não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  atual.

A Fig. 2A mostra o gráfico de escores das impressões digitais espectrais NIR dos extratos de café para os dois níveis de  $\text{CO}_2$ , em condições não irrigadas. As duas primeiras componentes explicam 80,2% da variação total dos dados e ajudam a diferenciar os níveis elevado e atual de  $\text{CO}_2$  de três extratos contendo etanol puro (*E*) e as misturas binárias *ED* e *EH*. Os extratos etanólicos e a mistura *EH* de grãos de café cultivados em  $\text{CO}_2$  elevado apresentaram valores de escores mais positivos na primeira componente principal (CP1) e mais negativos na CP2 do que os grãos de plantas cultivadas no nível atual de  $\text{CO}_2$ . Além disso, os extratos *ED* de grãos provenientes do  $\text{CO}_2$  elevado também apresentaram valores mais positivos

na CP1 do que os cultivados no nível atual de CO<sub>2</sub>. A Fig. 2B é muito semelhante à Fig. 2A contendo os escores da ACP para extratos de grãos de café cultivados com irrigação e cultivados sob níveis elevado e atual de CO<sub>2</sub>. Novamente, os extratos obtidos por etanol (*E*), misturas binárias *EH* e *ED* discriminaram os grãos de café coletados de plantas cultivadas sob condições elevadas de CO<sub>2</sub> daquelas no nível atual de CO<sub>2</sub>. Extratos etanólicos puros e *EH* de grãos provenientes de plantas em CO<sub>2</sub> elevado também apresentaram valores de escores mais positivos na CP1 e mais negativos na CP2 do que os do nível atual de CO<sub>2</sub>. Os extratos *ED* dos grãos cultivados em CO<sub>2</sub> elevado mostram valores mais positivos na CP1 do que os do nível atual.

Outro interesse nesse estudo foi verificar, pelos espectros NIR e ACP, a possibilidade de discriminação de extratos de café entre plantas irrigadas daquelas cultivadas em condições não irrigadas enquanto expostas ao mesmo nível de CO<sub>2</sub>, além de encontrar solventes ou suas misturas que proporcionam a melhor separação. A Fig. 2C mostra as duas primeiras componentes principais da ACP, com CP1 explicando 59,7% da variância total dos dados e CP2 explicando 22,5%. Para os extratos obtidos de plantas irrigadas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado, o etanol puro (*E*) apresentou a melhor discriminação, com valores mais positivos na CP1 e mais negativos na CP2. No caso dos grãos cultivados nas condições atuais de CO<sub>2</sub> de plantas irrigadas e não irrigadas, a CP2 (21,5% da variância explicada dos dados) mostrou que os extratos obtidos pela mistura *ED* melhor separavam essas plantas (Fig. 2D). Em outras palavras, os extratos de grãos crus de café não irrigados obtidos pela mistura *ED* tendem a ter escores mais positivos na CP2, enquanto os extratos irrigados tendem a ter escores negativos.



**Fig. 2.** Gráficos dos escores da primeira e segunda componentes principais das impressões digitais NIR no modo transmitância de grãos crus de *C. arabica*. Grãos colhidos de plantas cultivadas em: ( $\Delta$ )  $\text{CO}_2$  elevado e não irrigadas; ( $\blacksquare$ )  $\text{CO}_2$  atual e não irrigadas; ( $\bullet$ )  $\text{CO}_2$  atual e irrigada e ( $\blacktriangleleft$ )  $\text{CO}_2$  elevado e irrigada. **A)** plantas não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado e atual; **B)** plantas irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado e atual; **C)** plantas irrigadas e não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado; **D)** plantas irrigadas e não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  atual.

Finalmente, a ACP sugeriu que o etanol (*E*) e a mistura binária de etanol e diclorometano

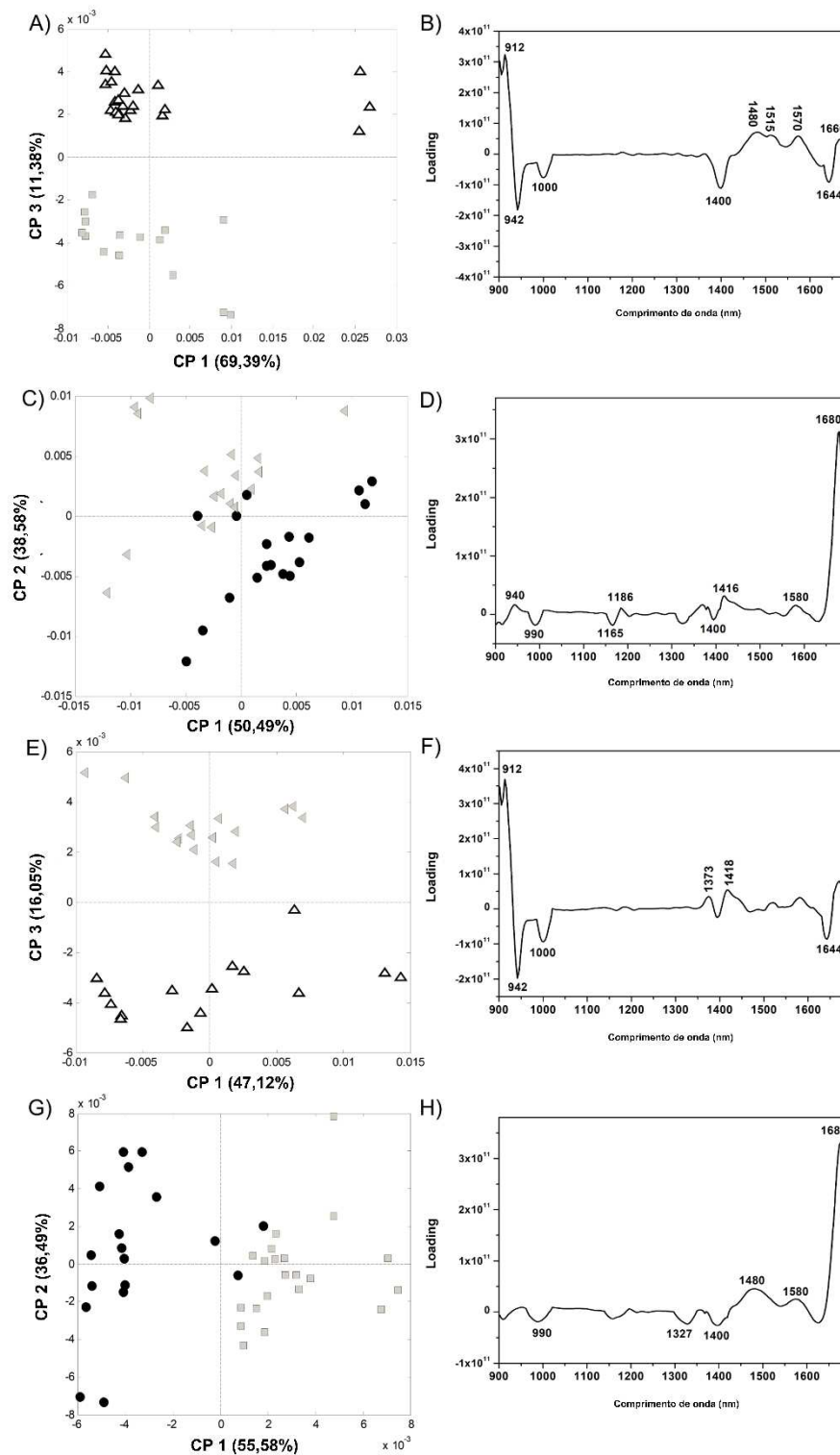
(ED) são os extratores mais promissores para a discriminação de grãos de café cultivados em dois níveis de CO<sub>2</sub> e condições de disponibilidade de água (Fig. 2). Novas extrações foram realizadas com esses solventes usando um número maior de amostras (aproximadamente doze amostras por condição) para validação da discriminação das impressões digitais. O pré-processamento utilizado para as novas impressões digitais foi o mesmo da análise exploratória para a escolha do solvente.

Os extratos obtidos com etanol puro (E) foram analisados pela ACP (Fig. 3). A Fig. 3A mostra o gráfico dos escores da ACP revelando uma clara discriminação entre as amostras cultivadas em níveis atual e elevado de CO<sub>2</sub> atmosférico de plantas não irrigadas ao longo da CP3, que explica 11,4% da variância dos dados. O gráfico de *loadings* correspondente mostra uma região espectral positiva, em torno de 912 nm, indicando que esse comprimento de onda está relacionado com nível elevado de CO<sub>2</sub>.

As Figs. 3E e 3F contêm amostras correspondentes ao nível de CO<sub>2</sub> elevado (cafeeiros irrigados e não irrigados, respectivamente). O gráfico de escores mostra uma clara separação entre as impressões digitais provenientes de grãos de cafeeiros irrigados e não irrigados. Na Fig. 3B, o *loading* positivo em 912 nm está relacionado à plantas não irrigadas com nível elevado de CO<sub>2</sub>, enquanto na Fig. 3F está relacionado à plantas irrigadas no nível elevado de CO<sub>2</sub>. Isso pode indicar que existe uma interação sinérgica entre níveis elevados de CO<sub>2</sub> e suprimento adequado de água. As plantas irrigadas cultivadas sob os dois níveis de CO<sub>2</sub> têm gráficos de escores e *loadings* mostrados nas Figs. 3C e 3D, respectivamente. Observa-se que existe uma discriminação parcial entre amostras de CO<sub>2</sub> elevado daquelas obtidas no nível atual para a CP2. O gráfico de *loadings* correspondente indica que o comprimento de onda em torno de 1680 nm é importante para esta discriminação. As bandas em torno de 1680 nm estão correlacionadas com as amostras de CO<sub>2</sub> elevado em relação às atuais. As Figs. 3G e 3H mostram escores e *loadings* para os cafeeiros não irrigados e irrigados, respectivamente,

cultivados no nível atual de CO<sub>2</sub>. A primeira componente principal, responsável por 55,6% da variância explicada dos dados, discrimina as amostras irrigadas das não irrigadas. Valores de escores positivos para as amostras não irrigadas correlacionam-se com os *loadings* em torno de 1680 nm. Embora essa banda se correlacione com amostras de CO<sub>2</sub> elevado para plantas irrigadas, quando cultivadas em ambiente com CO<sub>2</sub> atual elas atribuem maior peso para amostras não irrigadas. Assim, esses comprimentos de onda indicam condições elevadas de CO<sub>2</sub> e suprimento adequado de água.

Os *loadings* das ACPs presentes nas Figs. 3B, 3D, 3F e 3H mostram os comprimentos de onda que contribuem para a discriminação das quatro condições de tratamento de campo. A região espectral entre 900 e 1050 nm se deve principalmente ao terceiro sobretom dos estiramentos CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> e CH e ao segundo sobretom dos estiramentos OH (H<sub>2</sub>O, ROH) e NH (RONH<sub>2</sub>) [39]. Essa região espectral é de difícil interpretação devido à interação e sobreposições dos diversos grupos funcionais acima mencionados [28]. A região espectral entre 1050 e 1300 nm apresenta o 2º sobretom dos estiramentos dos grupos CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH e ArCH. Em comprimentos de onda entre 1300 e 1500 nm, as principais absorções presentes estão relacionadas ao 1º sobretom das combinações de CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub> e CH e ao 1º sobretom dos estiramentos de OH (H<sub>2</sub>O e ArOH). Além disso, as absorções nesses comprimentos de onda também podem estar relacionadas aos estiramentos dos grupos CONHR, CCNH<sub>2</sub>, RNH e RCH. Finalmente, nas regiões espectrais de 1500 e 1700 nm, as absorções são devidas ao 1º sobretom dos estiramentos CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH e ArCH [39,40].



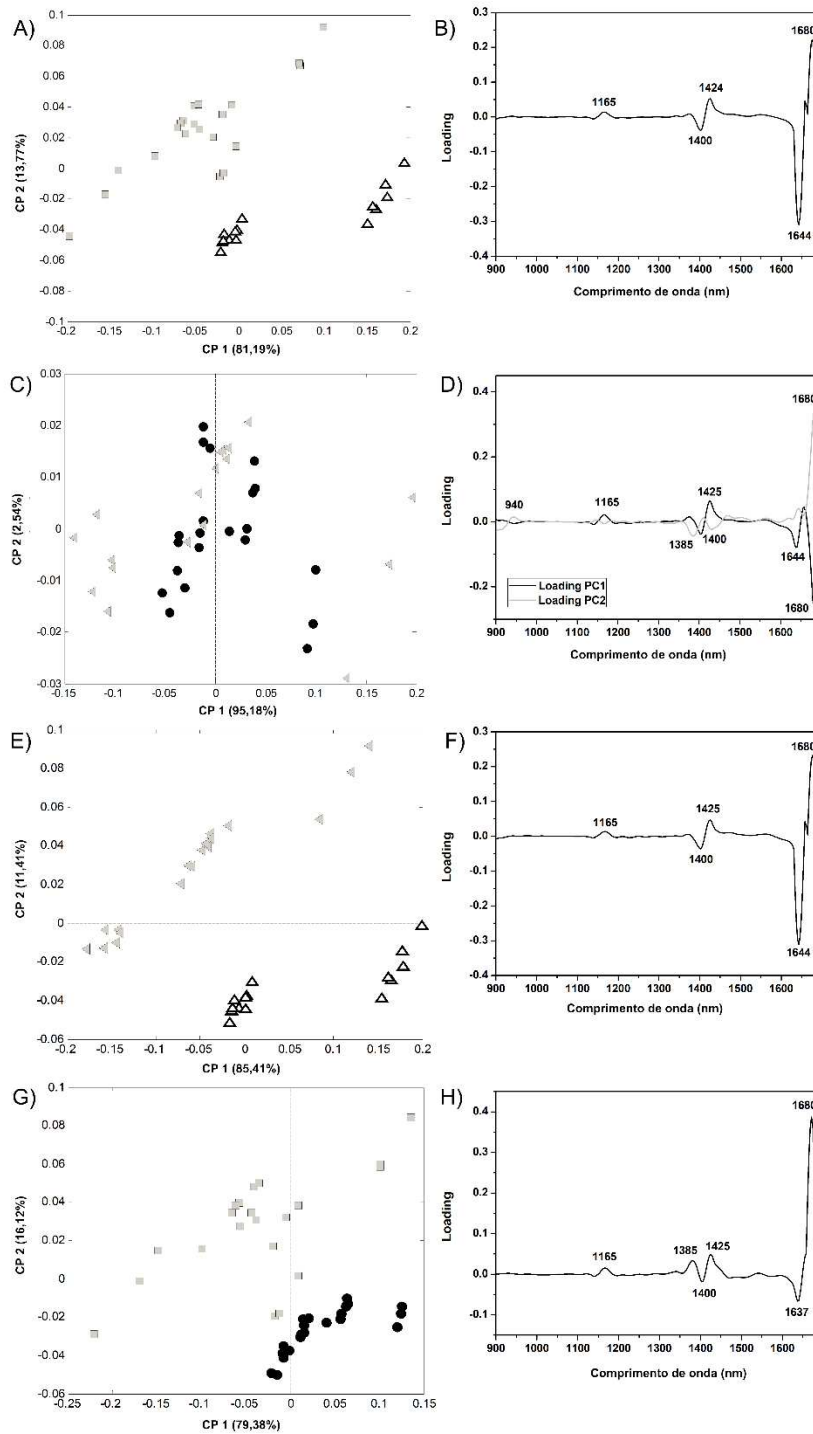
**Fig. 3.** Gráfico dos escores e *loadings* das impressões digitais etanólicas NIR no modo transmitância para grãos crus de *C. arabica*. Grãos colhidos de plantas cultivadas em: ( $\Delta$ )  $\text{CO}_2$  elevado e não irrigadas; ( $\blacksquare$ )  $\text{CO}_2$  atual e não irrigadas; ( $\bullet$ )  $\text{CO}_2$  atual e irrigada e ( $\blacktriangleleft$ )  $\text{CO}_2$  elevado e irrigada. **A-B)** Escores e *loadings* da ACP para plantas não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado e atual; **C-D)** escores e *loadings* da ACP para plantas irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado e atual; **E-F)** escores e *loadings* da ACP para plantas irrigadas e não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado; **G-H)** escores e *loadings* da ACP para plantas irrigadas e não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  atual.

Outro extrato indicado como discriminador das amostras foi a mistura binária de etanol-diclorometano (*ED*) (Fig. 2) ao qual foi analisado por ACP. No gráfico de escores dos espectros NIR para os extratos *ED* de grãos oriundos de plantas não irrigadas, dois grupos são formados ao longo da CP2 (Fig. 4A); um grupo com escores negativos na CP2 envolvendo espectros com níveis elevados de CO<sub>2</sub> e um segundo grupo com escores positivos formados por espectros de plantas no nível atual de CO<sub>2</sub>.

Em relação aos cafeeiros irrigados, não foi possível visualizar a discriminação por ACP entre os espectros de extratos de grãos cultivados sob nível elevado e atual de CO<sub>2</sub>, como mostra a Fig. 4C. Comparando as impressões digitais NIR das plantas cultivadas sob a mesma condição de CO<sub>2</sub>, a CP2 foi capaz de discriminar entre plantas irrigadas e não irrigadas, nas quais a variação explicada está entre parênteses no gráfico de escores, Figs. 4E and 4G. Para os grãos crus de plantas cultivadas sob condição elevada de CO<sub>2</sub>, os espectros NIR de plantas irrigadas apresentaram escores principalmente positivos e os de cafeeiros não irrigados apresentaram escores com valores negativos (Fig. 4E). Para grãos de café cultivados sob o nível atual de CO<sub>2</sub>, o gráfico de escores foi semelhante ao do CO<sub>2</sub> elevado, ou seja, os grãos de cafeeiros não irrigados apresentaram escores mais positivos, enquanto os irrigados têm escores mais negativos, como mostra a Figura 4G. Por fim a mistura binária *ED* não foi capaz de mostrar diferenças nas impressões digitais NIR dos grãos de *C. arabica* cultivados sob diferentes níveis de CO<sub>2</sub> quando os cafeeiros são irrigados.

Ao analisar os *loadings* das ACPs para a mistura binária etanol-diclorometano (*ED*), é possível observar que as bandas de absorção que mais contribuíram para a discriminação desses grãos referem-se a comprimentos de onda acima de 1600 nm. Os *loadings* da ACP mostraram que a banda em 1644 nm foi importante para as impressões digitais obtidas de extratos de grãos cultivados sob CO<sub>2</sub> elevado e 1680 nm para o nível atual de CO<sub>2</sub>, mas apenas quando as plantas não foram irrigadas (Fig. 4B). Ao analisar os grãos das plantas cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado, a

banda espectral de maior peso para os extratos das plantas irrigadas foi em 1680 nm, enquanto para os cafeeiros não irrigados foi em 1644 nm (Fig. 4F). Por outro lado, para amostras cultivadas no nível atual de CO<sub>2</sub>, a banda de maior peso para os cafeeiros irrigados foi em 1637 nm, enquanto a banda em 1680 nm se correlacionaram com amostras de cafeeiros não irrigados (Fig. 4H). Essa região espectral contém absorções referentes ao 1º sobretom dos estiramentos CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH e ArCH. Essa região é rica em informações espectrais e, para grãos de café, essas duas bandas podem estar relacionadas à carboidratos, ácidos clorogênicos e cafeína [40]. Em contraste com o encontrado para o extrato etanólico, não foi possível identificar, com grande relevância, bandas entre 900-950 nm, responsáveis pela discriminação das impressões digitais NIR. Isso prova que a busca por marcadores metabólicos depende das propriedades intrínsecas da matriz orgânica e do tipo de solvente utilizado [16].



**Fig. 4.** Gráfico dos escores e *loadings* das impressões digitais NIR no modo transmitância para grãos crus de *C. arabica* obtidos com a mistura binária etanol-diclorometano. Grãos colhidos de plantas cultivadas em: ( $\Delta$ )  $\text{CO}_2$  elevado e não irrigadas; ( $\blacksquare$ )  $\text{CO}_2$  atual e não irrigadas; ( $\bullet$ )  $\text{CO}_2$  atual e irrigada e ( $\blacktriangleleft$ )  $\text{CO}_2$  elevado e irrigada. **A-B)** Escores e *loadings* da ACP para plantas não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado e atual; **C-D)** escores e *loadings* da ACP para plantas irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado e atual; **E-F)** escores e *loadings* da ACP para plantas irrigadas e não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  elevado; **G-H)** escores e *loadings* da ACP para plantas irrigadas e não irrigadas sob  $\text{CO}_2$  atual.

Embora a impressão digital na região espectral NIR não seja conclusiva sobre as diferenças na composição química [41], as bandas identificadas como responsáveis pelas discriminações sugerem diferenças para os metabólitos devido ao aumento das condições atmosféricas de dióxido de carbono e de água no solo. Poucos estudos relacionaram a qualidade do grão cru de *C. arabica* e mudanças na composição química sob condições controladas e de campo sob aumento do dióxido de carbono atmosférico. Essa composição química é importante para a manutenção da qualidade final da bebida, qualidade nutricional e apreciação do grão cru [42]. Entre os muitos fatores que afetam o impacto do CO<sub>2</sub> elevado no campo (isto é, genótipo, perfil vertical do cafeeiro, estágio de desenvolvimento da planta e localização da plantação), as informações detalhadas sobre as alterações químicas são limitadas [43]. Esse fato suporta pesquisas adicionais na identificação de alterações com técnicas analíticas simples, usando análises não-alvo para prever alterações nos padrões das composições químicas nas células e tecidos vegetais.

A espectroscopia no infravermelho próximo envolve transferência de energia entre luz e matéria. Essa transferência de energia na região NIR está associada às combinações harmônicas e bandas de vibrações dos grupos funcionais presentes em amostras orgânicas. As diferentes impressões digitais na região espectral NIR para substâncias orgânicas são devidas às fortes absorções das interações entre as transições dos diferentes sobretons da molécula e bandas de combinação [39]. As medições de reflectância de amostras sólidas são um importante modo de medição empregado na espectroscopia NIR [24]. Além disso, é evidente que a possibilidade de trabalhar com uma técnica de baixo custo e não destrutiva, como o NIR, sem grandes preparações de amostra, poderia aumentar nosso conhecimento químico de materiais de origem vegetal. Apesar da inviabilidade de se realizar uma análise espectral exploratória adquirida diretamente no material vegetal, não pode se descartar a possibilidade de realizar a análise utilizando o equipamento NIR, conforme demonstrado pelos resultados apresentados

neste estudo. Portanto, o planejamento de misturas, define o meio extrativo utilizando diferentes solventes e suas misturas para obter impressões digitais espectrais na região NIR no modo de transmitância, que podem ser necessárias para investigações de condições ambientais contrastadas.

## 4 CONCLUSÃO

A metodologia que utiliza o modo transmitância em amostras orgânicas é uma alternativa ao modo reflectância nos espectrômetros NIR quando este não fornece informações relevantes. Os resultados demonstraram um desenvolvimento alternativo usando espectroscopia NIR combinada com ACP e metodologias experimentais usando o planejamento estatístico de misturas para determinar e comparar a discriminação de extratos de grão cru de *C. arabica* cultivados sob diferentes condições de dióxido de carbono atmosférico e água.

A análise exploratória dos extratos ordenados pelo planejamento estatístico de misturas proporcionou composições otimizadas de solventes para identificar modificações químicas em extratos de grãos de *C. arabica* oriundos de plantas cultivadas sob duas condições de CO<sub>2</sub> com e sem irrigação. Na análise exploratória, os extratos obtidos a partir de etanol puro e mistura binária de etanol-diclorometano continham informações que indicaram as alterações metabólicas causadas pelo aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico e condições de irrigação. Essa discriminação usando um instrumento de baixo custo e rápido é uma indicação inicial de modificações químicas relevantes evidenciadas em regiões espectrais específicas com bandas características de carboidratos, ácidos clorogênicos e cafeína.

## REFERÊNCIAS

- [1] R.J. Norby, D.R. Zak, Ecological Lessons from Free-Air CO<sub>2</sub> Enrichment (FACE) Experiments, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42 (2011) 181–203.
- [2] G. Cornic, Drought stress and high light effects on leaf photosynthesis, in: N.R. Baker, J.R. Bowyer (Eds.), *Photoinhibition Photosynth. From Mol. Mech. to F.*, 1<sup>st</sup> ed., Garland Science, 1994: pp. 297–313.
- [3] O. Roupsard, P. Gross, E. Dreyer, Limitation of photosynthetic activity by CO<sub>2</sub> different species and during drought, *Ann. For. Sci.* 53 (1996) 243–254.
- [4] F.M. Damatta, A.G. Godoy, P.E. Menezes-Silva, S.C.V. Martins, L.M.V.P. Sanglard, L.E. Morais, A. Torre-Neto, R. Ghini, Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO<sub>2</sub> enrichment conditions: Disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations, *J. Exp. Bot.* 67 (2016) 341–352.
- [5] C.L. Quéré, R.M. Andrew, P. Friedlingstein, S. Sitch, J. Hauck, J. Pongratz, P. Pickers, J. Ivar Korsbakken, G. Peters, J. Canadell, A. Arneeth, V. Arora, L. Barbero, A. Bastos, L. Bopp, P. Ciais, L. Chini, P. Ciais, S. Doney, T. Gkritzalis, D. Goll, I. Harris, V. Haverd, F. Hoffman, M. Hoppema, R. Houghton, G. Hurtt, T. Ilyina, A. Jain, T. Johannessen, C. Jones, E. Kato, R. Keeling, K. Klein Goldewijk, P. Landschützer, N. Lefèvre, S. Lienert, Z. Liu, D. Lombardozzi, N. Metzl, D. Munro, J. Nabel, S.I. Nakaoka, C. Neill, A. Olsen, T. Ono, P. Patra, A. Peregon, W. Peters, P. Peylin, B. Pfeil, D. Pierrot, B. Poulter, G. Rehder, L. Resplandy, E. Robertson, M. Rocher, C. Rödenbeck, U. Schuster, I. Skjelvan, R. Séférian, I. Skjelvan, T. Steinhoff, A. Sutton, P. Tans, H. Tian, B. Tilbrook, F. Tubiello, I. Van Der Laan-Luijkx, G. Van Der Werf, N. Viovy, A. Walker, A. Wiltshire, R. Wright, S. Zaehle, B. Zheng, Global Carbon Budget 2018, *Earth Syst. Sci. Data.* 10 (2018) 2141–2194.

- [6] H.D. Matthews, T.L. Graham, S. Keeverian, C. Lamontagne, D. Seto, T.J. Smith, National contributions to observed global warming, *Environ. Res. Lett.* 9 (2014).
- [7] M. Parry, C. Rosenzweig, M. Livermore, Climate change, global food supply and risk of hunger, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 360 (2005) 2125–2138.
- [8] J. Gornall, R. Betts, E. Burke, R. Clark, J. Camp, K. Willett, A. Wiltshire, Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365 (2010) 2973–2989.
- [9] E.A. Ainsworth, S.P. Long, What have we learned from 15 years of free-air CO<sub>2</sub> enrichment (FACE)? A meta-analytic review of the responses of photosynthesis, canopy properties and plant production to rising CO<sub>2</sub>, *New Phytol.* 165 (2004) 351–372.
- [10] R. Ghini, A. Torre-Neto, A.F.M. Dentzien, O. Guerreiro-Filho, R. Iost, F.R.A. Patrício, J.S.M. Prado, R.A. Thomaziello, W. Bettioli, F.M. DaMatta, Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO<sub>2</sub> enrichment, *Clim. Change.* 132 (2015) 307–320.
- [11] M. Rakocevic, R.V. Ribeiro, P.E.R. Marchiori, H.F. Filizola, E.R. Batista, Structural and functional changes in coffee trees after four years under free air CO<sub>2</sub> enrichment, *Ann. Bot.* 121 (2018) 1065–1078.
- [12] M. Rakocevic, F.T. Matsunaga, Variations in leaf growth parameters within the tree structure of adult *Coffea arabica* in relation to seasonal growth, water availability and air carbon dioxide concentration, *Ann. Bot.* 122 (2018) 117–131.
- [13] F.M. DaMatta, E. Rahn, P. Läderach, R. Ghini, J.C. Ramalho, Why could the coffee crop endure climate change and global warming to a greater extent than previously estimated?, *Clim. Change.* 152 (2019) 167–178.
- [14] M. Rakocevic, K.S. Malagoli-Graga, E.R. Batista, A.H.N. Maia, M.B. dos S. Scholz, H.F. Filizola, The vegetative growth assists to reproductive responses of Arabic coffee trees in a long-term FACE experiment, Unpublished results.

- [15] J.C. Ramalho, I.P. Pais, A.E. Leitão, M. Guerra, F.H. Reboredo, C.M. Máguas, M.L. Carvalho, P. Scotti-Campos, A.I. Ribeiro-Barros, F.J.C. Lidon, F.M. DaMatta, Can elevated air [CO<sub>2</sub>] conditions mitigate the predicted warming impact on the quality of coffee bean?, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 1–14.
- [16] C.D. Tormena, G.G. Marcheafave, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds, *Talanta*. 191 (2019) 382–389.
- [17] G. Le Gall, I.J. Colquhoun, M. Defernez, Metabolite profiling using <sup>1</sup>H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L.), *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 692–700.
- [18] A.A.S.G. Lonni, R. Longhini, G.C. Lopes, J.C.P. De Mello, I.S. Scarminio, Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*, *Anal. Chim. Acta.* 719 (2012) 57–60.
- [19] B. Worley, R. Powers, Multivariate analysis in metabolomics, *Curr. Metabolomics.* 1 (2013) 92–107.
- [20] G. Liu, N. Li, Y. Zhang, J. Wang, LC/MS fingerprint and simultaneous quantification of main bioactive compounds in *Polyporus umbellatus* (Pers.) Fr. from different regions and developmental stages, *Microchem. J.* 144 (2019) 351–360.
- [21] Z. Ben Ahmed, M. Yousfi, J. Viaene, B. Dejaegher, K. Demeyer, D. Mangelings, Y. Vander Heyden, Antioxidant activities of *Pistacia atlantica* extracts modeled as a function of chromatographic fingerprints in order to identify antioxidant markers, *Microchem. J.* 128 (2016) 208–217.
- [22] J.M. Cevallos-Cevallos, J.I. Reyes-De-Corcuera, E. Etxeberria, M.D. Danyluk, G.E. Rodrick, Metabolomic analysis in food science: a review, *Trends Food Sci. Technol.* 20 (2009) 557–566.

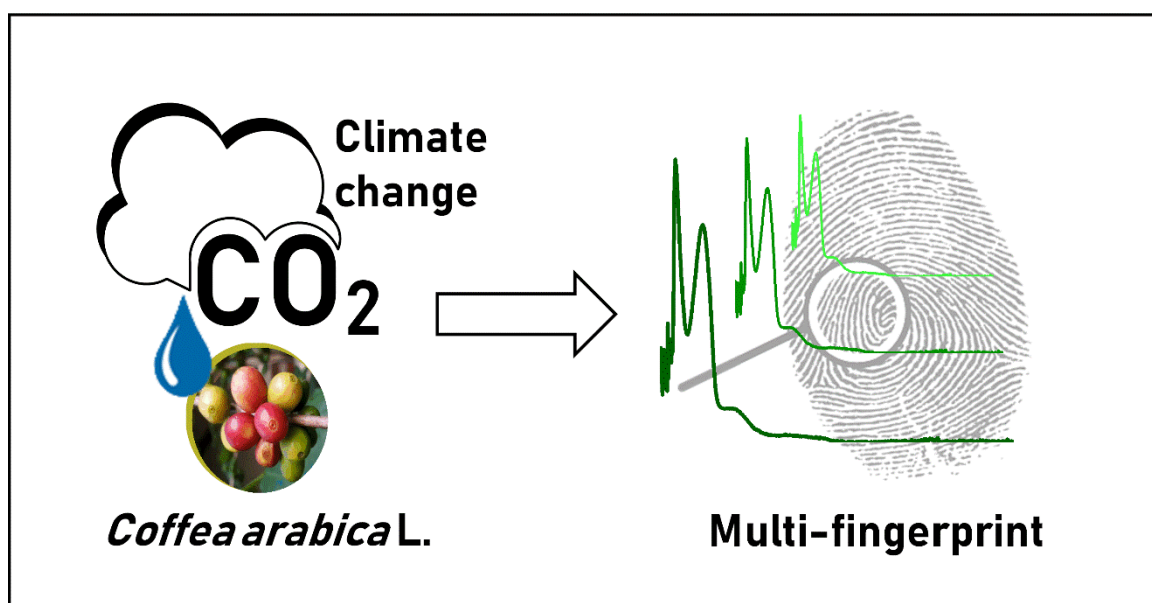
- [23] J.A. Fernández Pierna, O. Abbas, B. Lecler, P. Hogrel, P. Dardenne, V. Baeten, NIR fingerprint screening for early control of non-conformity at feed mills, *Food Chem.* 189 (2015) 2–12.
- [24] C. Pasquini, Near infrared spectroscopy: Fundamentals, practical aspects and analytical applications, *J. Braz. Chem. Soc.* 14 (2003) 198–219.
- [25] Y. Roggo, P. Chalus, L. Maurer, C. Lema-Martinez, A. Edmond, N. Jent, A review of near infrared spectroscopy and chemometrics in pharmaceutical technologies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44 (2007) 683–700.
- [26] P. Dardenne, G. Sinnaeve, V. Baeten, Multivariate calibration and chemometrics for near infrared spectroscopy: Which method?, *J. Near Infrared Spectrosc.* 8 (2000) 229–237.
- [27] I. Marquetti, J.V. Link, A.L.G. Lemes, M.B. dos S. Scholz, P. Valderrama, E. Bona, Partial least square with discriminant analysis and near infrared spectroscopy for evaluation of geographic and genotypic origin of arabica coffee, *Comput. Electron. Agric.* 121 (2016) 313–319.
- [28] J.M. Pereira, L.M. Leme, M.R.F.G. Perdoncini, P. Valderrama, P.H. Março, Fast discrimination of milk contaminated with *Salmonella sp.* via Near-Infrared Spectroscopy, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 1878–1885.
- [29] H. Chen, Z. Lin, C. Tan, Classification of different animal fibers by near infrared spectroscopy and chemometric models, *Microchem. J.* 144 (2019) 489–494.
- [30] A. Biancolillo, P. Firmani, R. Bucci, A. Magri, F. Marini, Determination of insect infestation on stored rice by near infrared (NIR) spectroscopy, *Microchem. J.* 145 (2019) 252–258.
- [31] F.C. Guizellini, G.G. Marcheafave, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, P.K. Soares, PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprint investigation of reference and crossed coffees, *Food Res. Int.* 113 (2018).

- [32] G.G. Marcheafave, C.D. Tormena, E.D. Pauli, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves, *Microchem. J.* 146 (2019) 713–721.
- [33] S. Afonso, F. Silva, G. Marcheafave, P. Hatumura, R. Bruns, I. Scarminio, Influence of seasonality and sunlight effects on *Rollinia mucosa* leaves fingerprint, *J. Braz. Chem. Soc.* 30 (2019) 968-977.
- [34] G. Marcheafave, C. Tormena, S. Afonso, M. Rakocevic, R. Bruns, I. Scarminio, Integrated chemometric approach to optimize sample preparation for detecting metabolic changes provoked by abiotic stress in *Coffea arabica* L. leaf fingerprints, *J. Braz. Chem. Soc.* (2019) 1–10. doi:10.21577/0103-5053.20190068.
- [35] Y. Chen, S.-B. Zhu, M.-Y. Xie, S.-P. Nie, W. Liu, C. Li, X. Gong, Y.-X. Wang, Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods, *Anal. Chim. Acta.* 3 (2008) 146–156.
- [36] L.R. Snyder, P.W. Carr, S.C. Rutan, Solvatochromically based solvent-selectivity triangle, *J. Chromatogr. A.* 656 (1993) 537–547.
- [37] T. Isaksson, T. Naes, The effect of Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Linearity Improvement in NIR Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.* 42 (1988) 1273–1284.
- [38] R.J. Barnes, M.S. Dhanoa, S.J. Lister, Standard Normal Variate Transformation and Detrending of Near-Infrared Diffuse Reflectance Spectra, *Appl. Spectrosc.* 43 (1989) 772–777.
- [39] Z. Xiaobo, Z. Jiewen, M.J.W. Povey, M. Holmes, M. Hanpin, Variables selection methods in near-infrared spectroscopy, *Anal. Chim. Acta.* 667 (2010) 14–32.
- [40] D.F. Barbin, A.L. de S.M. Felicio, D.W. Sun, S.L. Nixdorf, E.Y. Hirooka, Application of infrared spectral techniques on quality and compositional attributes of coffee: An

- overview, *Food Res. Int.* 61 (2014) 23–32.
- [41] C. Mees, F. Souard, C. Delporte, E. Deconinck, P. Stoffelen, C. Stévigny, J.-M. Kauffmann, K. De Braekeleer, Identification of coffee leaves using FT-NIR spectroscopy and SIMCA, *Talanta*. 177 (2018) 4–11.
- [42] M. de S.G. Barbosa, M.B. dos S. Scholz, C.S.G. Kitzberger, M. de T. Benassi, Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews, *Food Chem.* 292 (2019) 275–280.
- [43] C.B. Rajashekar, Elevated CO<sub>2</sub> levels affect phytochemicals and nutritional quality of food crops, *Am. J. Plant Sci.* 9 (2018) 150–162. doi:10.4236/ajps.2018.92013.

## CAPÍTULO 2

**“Discriminação de 'multi-impressões digitais' na região ultravioleta de grãos de *Coffea arabica* cultivados sob dióxido de carbono elevado e condições limitadas de água”**



## RESUMO

O café é uma das *commodities* mais importantes para o setor agrônomico brasileiro, mostrando sensibilidade às variações ambientais. As interações de dois níveis de concentrações atmosféricas de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e dois regimes hídricos foram investigadas a partir do perfil metabólico de grãos de *Coffea arabica*, utilizando impressões digitais na região UV do planejamento estatístico de misturas. Os resultados das impressões digitais UV obtidos a partir de etanol puro e da mistura binária etanol-diclorometano mostraram as maiores discriminações metabólicas entre os níveis de CO<sub>2</sub>. A biossíntese dos principais metabólitos como ácidos clorogênicos, cafestol, caveol e cafeína foi alterada devido às condições ambientais. Maiores quantidades de ácidos clorogênicos e caveol foram observadas em grãos de plantas irrigadas cultivadas com CO<sub>2</sub> elevado e irrigadas no nível atual de CO<sub>2</sub>. A interação entre a disponibilidade de água e a concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico afetaram as quantidades de metabólitos. A disponibilidade de água foi um fator limitante do conteúdo de metabólitos apenas no nível atual de CO<sub>2</sub>, sugerindo sucesso metabólico no enfrentamento de futuros períodos de seca em ambiente com elevado CO<sub>2</sub> atmosférico.

**Palavras-chave:** Café arábica; CO<sub>2</sub> elevado; seca; modificação metabólica; multi-impressões digitais UV.

## 1 INTRODUÇÃO

A fotossíntese é um processo usado pelas plantas para converter energia luminosa em energia química que posteriormente serve para o crescimento, manutenção e reprodução das plantas [1]. O processo é inicializado com a absorção de luz por proteínas que contêm pigmentos de clorofila e finalizado com energia química armazenada na forma de moléculas de carboidratos [2]. Os principais fatores abióticos que afetam a taxa de fotossíntese são a intensidade da luz, a temperatura, a água e a concentração de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) [3]. A primeira reação da planta ao  $\text{CO}_2$  elevado é o aumento da taxa fotossintética [4]. O  $\text{CO}_2$  está envolvido nas reações de fixação de carbono nos tilacoides [5]. O processo químico de fixação de carbono na fotossíntese ocorre através da carboxilação da ribulose-1,5-difosfato (RuDP - açúcar de 5 carbonos) com a fixação de  $\text{CO}_2$  pela enzima primária ribulose-1,5-bifosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO) [6]. Após uma série de processos independentes da luz, o produto final é rapidamente convertido em glicose e outros carboidratos, lipídios ou aminoácidos [7].

O dióxido de carbono só pode entrar na folha através dos estômatos abertos, que são poros delimitados por duas células-guarda [8]. O estoma aberto permite a circulação de  $\text{CO}_2$  e água entre o exterior e o interior da folha, onde o equilíbrio entre a assimilação de  $\text{CO}_2$  e a perda de água pela transpiração é essencial para a sobrevivência e crescimento das plantas [9]. Nas espécies C3 a concentração atmosférica de  $\text{CO}_2$  elevado estimula a assimilação de carbono, uma vez que o RuBisCO normalmente não é saturado sob a concentração atmosférica atual de  $\text{CO}_2$  [10]. A estimulação da fotossíntese em virtude do  $\text{CO}_2$  elevado é mais forte durante o estágio final de frutificação em *Xanthium strumarium*, quando o desenvolvimento de sementes é considerada um sumidouro de carbono [11]. Esse estímulo mais forte no período de frutificação pode causar mudanças indesejadas no metabolismo de grãos comerciais, causando impactos econômicos na produção regional e global devido as mudanças climáticas. Qualquer

modificação no processo fotossintético pode alterar o acúmulo de fotoassimilados, os períodos de crescimento e amadurecimento e, conseqüentemente, a qualidade da bebida do grão de *Coffea arabica* [12].

Nos últimos anos, pesquisadores brasileiros concentraram-se na compreensão dos aspectos de crescimento, produtividade e sobrevivência de *Coffea arabica* (café arábica) sob as perspectivas das mudanças climáticas, especialmente nos efeitos do aumento do CO<sub>2</sub> [13–15], devido ao interesse econômico desta espécie. Vários estudos elucidaram as alterações metabólicas causadas por variações de cultivares e mudanças ambientais como condições de água e luz solar, densidade de plantio, entre outras [16–19]. Esses estudos indicaram que *Coffea arabica* possui alta sensibilidade às mudanças ambientais [20]. A resposta, especificamente para o café arábica, sob CO<sub>2</sub> elevado tem efeito direto na atividade fotossintética [14], acumulação de carbono [13,21], crescimento e rendimento das culturas [22]. As alterações ambientais afetam o metabolismo primário, como a fotossíntese, que pode afetar metabólitos secundários como cafeína, ácidos clorogênicos (ACG), trigonelina, diterpenos e ácidos fenólicos, essenciais para a qualidade da bebida de *Coffea arabica* [23].

Poucos estudos analisaram as alterações metabólicas causadas pelo aumento das concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> associadas a qualquer outro estresse ambiental, como o regime hídrico [24]. Mudanças no perfil metabólico da planta podem variar de mudanças extremas a mínimas, incluindo uma ampla variedade de classes e quantidades de metabólitos, dificultando a distinção de respostas devido aos diferentes distúrbios ambientais [15]. A detecção de alterações químicas por métodos convencionais pode ser útil nesse tipo de investigação, mas pode não refletir a modificação química máxima ou o metaboloma total da planta em análise. Novas metodologias analíticas foram desenvolvidas para acompanhar a demanda tecnológica dessas matrizes complexas. Neste trabalho, foi proposto o uso de 'multi-impressões digitais' em busca de alterações metabólicas em grãos de *Coffea arabica* sob

distúrbios ambientais. Uma 'multi-impressão digital' é definida como uma série de perfis metabólicos estrategicamente extraídos que definem diferentes características para a mesma matriz orgânica. Essas diferentes características do perfil químico são melhor alcançadas variando os sistemas de extração utilizando planejamentos estatísticos de misturas com escolhas apropriadas de solventes [19,25].

Espera-se que os grãos de *Coffea arabica* sofram modificações químicas quando amadurecidos em condições de seca e CO<sub>2</sub> elevado. Os objetivos deste estudo foram discriminar os grãos de *Coffea arabica* cultivados sob nível elevado de CO<sub>2</sub> em experimento de Enriquecimento de CO<sub>2</sub> ao Ar Livre (FACE, do inglês *Free-Air Carbon dioxide Enrichment*), simulando mudanças climáticas futuras, associado ao efeito da disponibilidade de água como fator limitante do uso de carbono e suas correlações com os principais metabólitos. O experimento de instalação FACE foi realizado por 5 anos, preservando o acoplamento natural entre a vegetação e a atmosfera. Impressões digitais espectrofotométricas na região ultravioleta (UV) foram obtidas de extratos a partir do planejamento estatístico de misturas usando os solventes etanol, diclorometano, hexano e éter etílico.

## 2 EXPERIMENTAL

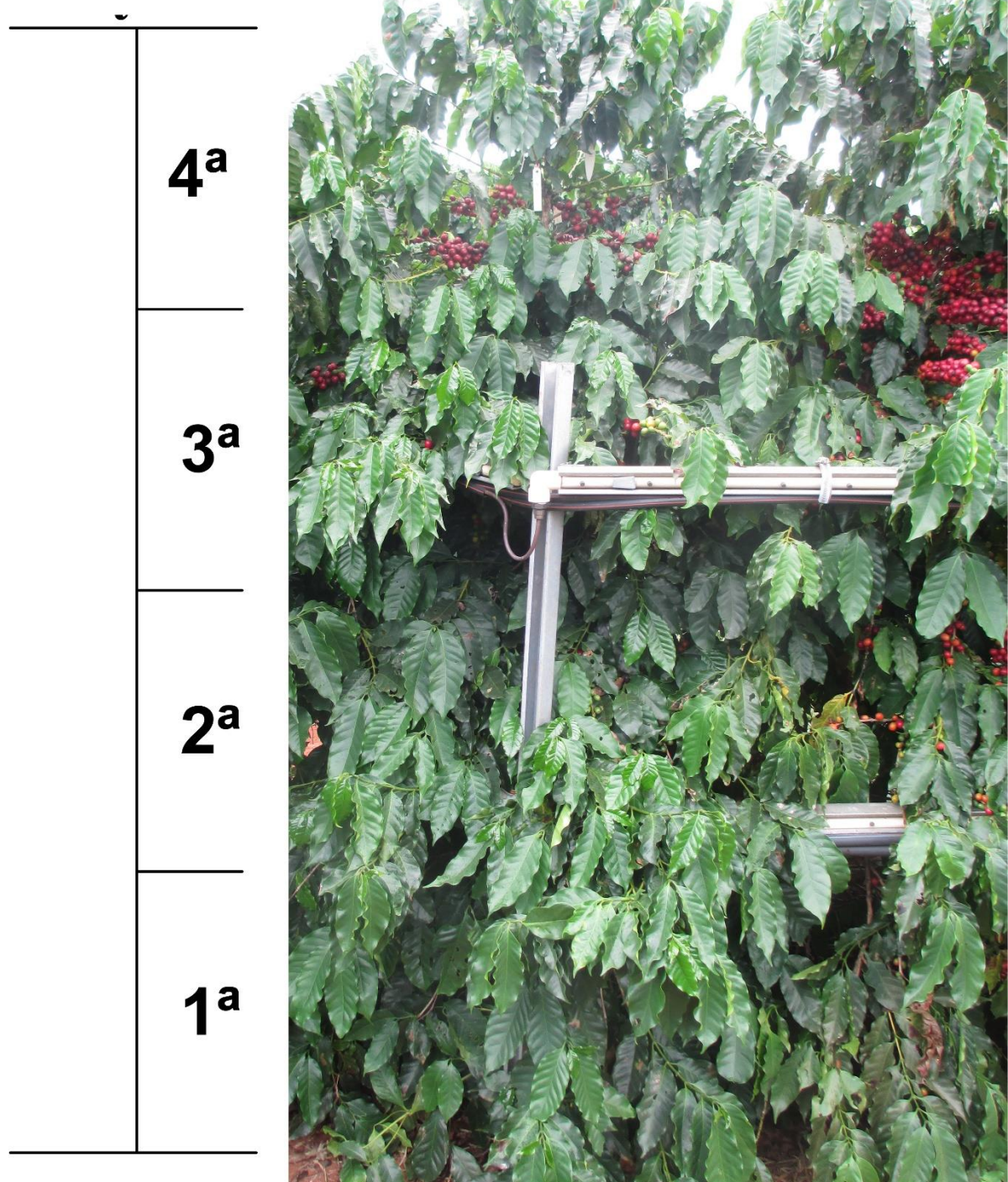
### 2.1 COLETA DE GRÃOS DE *Coffea arabica*

O experimento FACE foi conduzido na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, SP, Brasil, (22°43'S, 47°01'W, 570 m de altitude) para determinar os efeitos da alteração atmosférica de CO<sub>2</sub> e água do solo nas árvores de *Coffea arabica* (cultivar 'Catuaí Vermelho IAC 144').

A injeção de CO<sub>2</sub> na atmosfera iniciou-se em 25 de agosto de 2011[22] e foi encerrada em 30 de junho de 2016 [13]. O nível atmosférico de CO<sub>2</sub> no início do experimento era de aproximadamente 390 µL L<sup>-1</sup>. A injeção direta de CO<sub>2</sub> puro permitiu elevar o CO<sub>2</sub> em 150-200 µL L<sup>-1</sup> acima do nível atual durante o dia. O CO<sub>2</sub> foi emitido por tubos instalados a 0,9 e 1,4 m acima da superfície do solo, seguindo a direção do vento com velocidade mínima de 0,5 m s<sup>-1</sup> para permitir a mistura homogênea de gás dentro dos sítios experimentais do FACE [22]. A irrigação foi implementada em outubro de 2015 e conduzida até o final do experimento FACE [13].

Os frutos de oito plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado e oito no nível atual de CO<sub>2</sub> foram colhidas em maio de 2016, no quinto ano do experimento FACE. Sendo que dessas 16 plantas, metade foram irrigadas. Os frutos foram coletados de quatro camadas do perfil vertical das plantas com 50 cm de espessura cada. Na camada mais baixa da planta (1<sup>a</sup> camada), foi encontrado um número insuficiente de frutos para realizar a análise metabólica. Portanto, apenas os frutos da 2<sup>a</sup> à 4<sup>a</sup> camada da planta foram analisados (Fig. 1). Todos os tipos de frutos foram coletados, incluindo verdes e vermelhos. Os grãos foram selecionados, excluindo todos os defeituosos, secos, separados da casca e do pergaminho e finalmente moídos para análise espectral.

## Estratificação



**Fig. 1.** Árvore de *Coffea arabica* com frutos. Cafeeiros irrigados e não irrigados foram cultivados sob os níveis atual e elevado de CO<sub>2</sub> na instalação FACE. O perfil vertical da planta foi estratificado em quatro camadas de 50 cm de espessura. A 1ª camada não possuía material reprodutivo suficiente para análises químicas e metabólicas.

## 2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Um planejamento estatístico de misturas com quatro solventes: etanol (*E*), diclorometano (*D*), hexano (*H*) e éter etílico (*et*), foi utilizado para a extração dos metabólitos de grãos crus de café. Essa seleção de solventes foi baseada no triângulo de seletividade de solventes de Snyder (Tabela 1) [26]. Todos os solventes orgânicos eram de grau analítico. Hexano, etanol e diclorometano foram adquiridos da Anidrol (Diadema, Brasil) e éter etílico da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). As extrações delineadas pelo planejamento de misturas foram realizadas nos grãos de cafeeiros sob CO<sub>2</sub> atual e elevado (irrigados ou não) oriundos das três estratificações do perfil vertical da planta. O ponto central do delineamento foi executado em triplicata, resultando em 17 extratos por planejamento de misturas resultando em 51 extratos para cada condição de cultivo (3 alturas de coleta). Cada sistema extrativo foi preparado pesando 2,50 g de grão cru moído de *C. arabica* acrescido de 60,0 mL de solvente extrator (Tabela 1). A extração foi realizada em banho ultrassônico (modelo Ultracleaner 1600 Unique) por 60 minutos a 15 °C e filtrada para separar a solução dos grãos. Esse procedimento foi repetido por mais quatro vezes, até o volume total de extrato líquido de 300 mL. O extrato líquido resultante foi utilizado para a análise espectrofotométrica. Após a análise exploratória dos solventes e a escolha do melhor discriminador dos extratos, foram realizadas novas extrações para os grãos crus coletados das dezesseis plantas.

## 2.3 AQUISIÇÕES DE ESPECTROS NA REGIÃO UV

Impressões digitais espectrais na região UV foram adquiridas imediatamente após a extração. O extrato foi diluído (1:9) com seu respectivo solvente extrativo. Os espectros foram

obtidos na faixa de 190-400 nm com o espectrofotômetro modelo Thermo Scientific Evolution 60S, usando cubetas de quartzo com um caminho óptico de 1 cm.

#### 2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA E *SOFTWARE*

A análise quimiométrica foi realizada utilizando o *software* Matlab 2007b<sup>®</sup> e as ferramentas do PLS Toolbox 5.8<sup>®</sup> da Eigenvector Research. A análise de componentes principais (ACP) e análise de variância-análise de componentes simultânea (ASCA, do inglês, *analysis of variance–simultaneous component analysis*) foi aplicada aos dados espectroscópicos. A suavização espectral foi aplicada aos dados com uma janela de 9 pontos (filtro Savitzky – Golay), que também foram centrados na média.

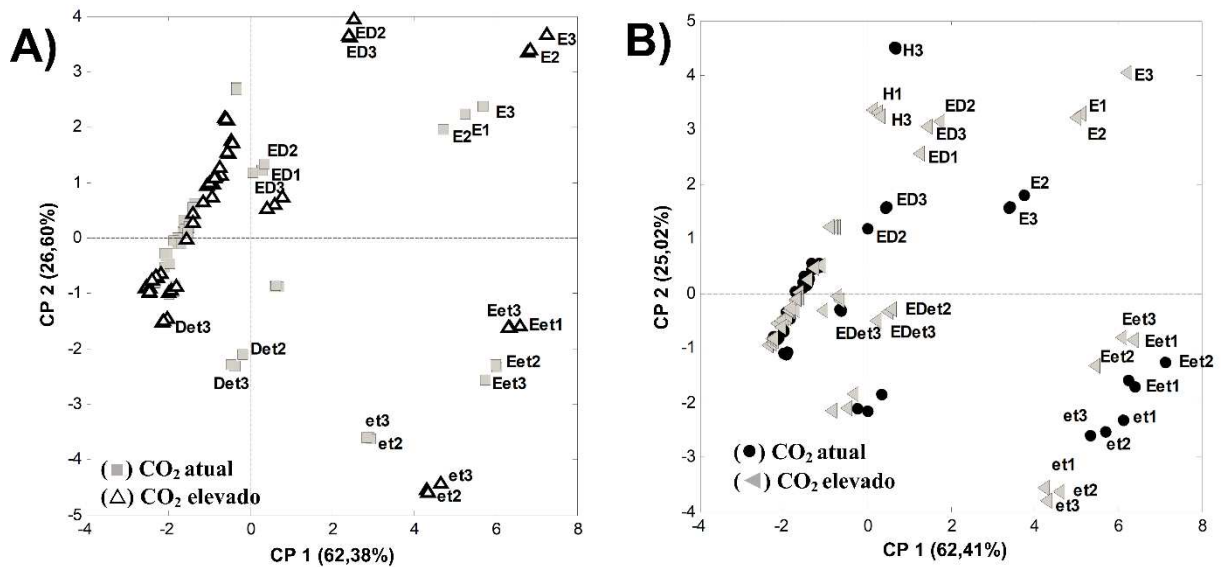
**Tabela 1.** Planejamento estatístico de misturas para quatro solventes: etanol, diclorometano, hexano e éter etílico, com suas proporções de composição e parâmetros solvatocrômicos dos solventes puros e suas misturas (combinação linear) de acordo com o delineamento - acidez ( $\alpha$ ); dipolaridade ( $\pi$ ) e basicidade ( $\beta$ ).

Delineamento	Notação do extrato	Solvente				Parâmetros solvatocrômicos do solvente		
		Etanol (E)	Diclorometano (D)	Hexano (H)	Éter etílico (et)	Acidez ( $\alpha$ )	Dipolaridade ( $\pi$ )	Basicidade ( $\beta$ )
1	<i>E</i>	1	0	0	0	0,83	0,54	0,77
2	<i>D</i>	0	1	0	0	0,20	0,82	0
3	<i>H</i>	0	0	1	0	0	-0,04	0
4	<i>et</i>	0	0	0	1	0	0,27	0,47
5	<i>ED</i>	1/2	1/2	0	0	0,52	0,68	0,39
6	<i>EH</i>	1/2	0	1/2	0	0,42	0,25	0,39
7	<i>Eet</i>	1/2	0	0	1/2	0,42	0,41	0,62
8	<i>DH</i>	0	1/2	1/2	0	0,10	0,39	0
9	<i>Det</i>	0	1/2	0	1/2	0,10	0,55	0,24
10	<i>Het</i>	0	0	1/2	1/2	0	0,12	0,24
11	<i>EHet</i>	1/3	0	1/3	1/3	0,42	0,26	0,41
12	<i>EDet</i>	1/3	1/3	0	1/3	0,34	0,54	0,41
13	<i>EDH</i>	1/3	1/3	1/3	0	0,34	0,44	0,26
14	<i>DHet</i>	0	1/3	1/3	1/3	0,07	0,35	0,16
15	<i>EDHet</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	0,26	0,40	0,31
16	<i>EDHet</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	0,26	0,40	0,31
17	<i>EDHet</i>	1/4	1/4	1/4	1/4	0,26	0,40	0,31

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE CO<sub>2</sub> ELEVADO E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

As multi-impressões digitais UV foram obtidas a partir dos extratos líquidos do planejamento de misturas. Para explorar a relação entre as informações das impressões digitais nos grãos de café, obtidos dos dois níveis de CO<sub>2</sub> e das árvores irrigadas e não irrigadas, as matrizes de absorvâncias foram submetidas à análise de componentes principais (ACP). A ACP foi utilizada para a seleção dos solventes extratores que promoveram as maiores diferenças nos conjuntos metabólicos extraídos entre as condições de cultivo. Nessa análise exploratória de solventes o etanol puro (*E*) e a mistura binária de etanol-diclorometano (*ED*) continham as maiores diferenças para os extratos dos grãos de café cultivados sob os dois níveis de CO<sub>2</sub> e nos dois regimes de água (Figs. 2A e 2B), embora seus escores estejam no mesmo quadrante positivo (primeira e segunda componentes principais). O teste *t* foi aplicado aos valores dos escores da CP1, que explica a maior variância dos dados, tanto para as plantas não irrigadas quanto para as irrigadas (Figs. 2A e 2B), a fim de determinar se a diferença entre os dois níveis de CO<sub>2</sub> foi realmente significativa para esses extratos obtidos do planejamento de mistura. Os resultados do teste *t* mostraram um valor de *p* menor que 0,05, confirmando a significância estatística da discriminação. Informações adicionais sobre a escolha dos solventes e do teste *t* podem ser encontradas no Anexo A (Tabela A1). Assim, novas extrações para validação foram realizadas com a mistura binária etanol-diclorometano (*ED*) e etanol puro (*E*), utilizando grãos de 16 cafeeiros. Discussão sobre o processo de extração e obtenção de multi-impressões digitais estão contidas no Anexo A.

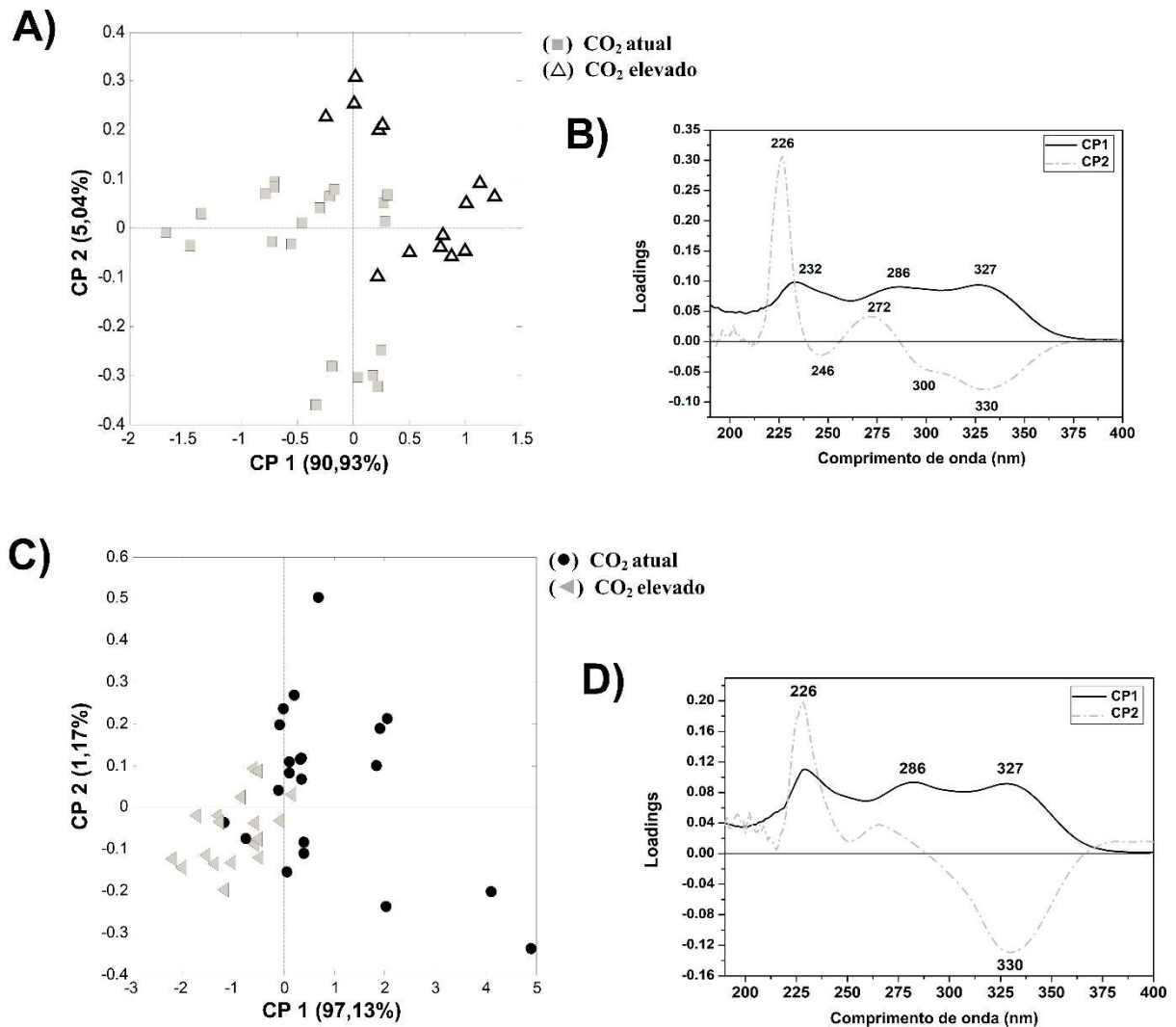


**Fig. 2.** Gráficos de escores da análise de componentes principais (ACP) (CP1 versus CP2) para multi-impressão digital na região UV de grãos crus de *C. arabica* cultivados sob nível atual e elevado de CO<sub>2</sub>. **A)** cafeeiros não irrigados e **B)** cafeeiros irrigados. Multi-impressão digital obtida pelo planejamento estatístico de misturas. (■) CO<sub>2</sub> atual não irrigado; (△) CO<sub>2</sub> elevado não irrigado; (◄) CO<sub>2</sub> elevado irrigado; (●) CO<sub>2</sub> atual irrigado.

Os resultados da ACP para a impressão digital UV de grãos de café obtidos com a mistura de etanol-diclorometano (*ED*) são mostrados na Fig. 3. Os escores para as duas primeiras componentes principais obtidas para os extratos de grãos de café de cafeeiros não irrigados são mostrados na Fig. 3A. Foi observada a formação de dois grupos ao longo do eixo da CP1. Os escores de grãos de café cultivados em CO<sub>2</sub> elevado foram localizados no quadrante mais positivo e aqueles no nível atual de CO<sub>2</sub> no quadrante mais negativo. Os gráficos dos *loadings* indicaram a diferenciação de bandas em torno de 232, 286-294 e 327 nm, responsáveis pelas formações dos grupos, com maior peso para os espectros de extratos de grãos de café de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado (Fig. 3B). Esses comprimentos de onda são relacionados à absorvância de vários constituintes do café cru e representam os máximos de absorção espectral das bandas metabólicas (Fig. 3B). Essas bandas sugerem um perfil característico de compostos pertencentes à classe dos ácidos clorogênicos (ACG) [17,27,28]. No entanto, como a análise foi realizada em solução multi-metabólica, as faixas de bandas de 226-232 nm e 286 nm

também poderiam sinalizar a presença de diterpenos, como cafestol e caveol, respectivamente [17,15,29]. Portanto, esses metabólitos podem estar mais presentes em extratos de grãos de cafeeiros cultivados sob nível elevado de CO<sub>2</sub> do que no atual, uma vez que os extratos dessas duas classes foram orientados em lados opostos da CP1. Mais dois grupos contendo uma menor parte dos espectros foram separados na CP2 (eixo da ordenada - CP2) (Fig. 3A). Um grupo foi formado pelos extratos de grãos coletados de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado, com bandas em torno de 226 nm responsáveis por sua discriminação, enquanto um segundo grupo foi formado pelos extratos de grãos de plantas cultivadas no nível atual de CO<sub>2</sub>, com faixas características de ACG em torno de 246, 300 e 330 nm (Figs. 3A e 3B).

Para as impressões digitais UV obtidas pela mistura binária *ED* para as árvores irrigadas, o gráfico de escores discriminou o nível atual e elevado de CO<sub>2</sub>, principalmente ao longo do eixo da primeira componente principal (Fig. 3C). Em contraste com as plantas não irrigadas, as bandas em torno de 226, 286-294 e 327 nm foram importantes para discriminar os extratos de café cru de árvores irrigadas sob o nível atual de CO<sub>2</sub>. Esse resultado sugere que cafestol, caveol e ACG podem estar presentes em maior quantidade sob o CO<sub>2</sub> atual do que em níveis elevados de CO<sub>2</sub> (Fig. 3D).



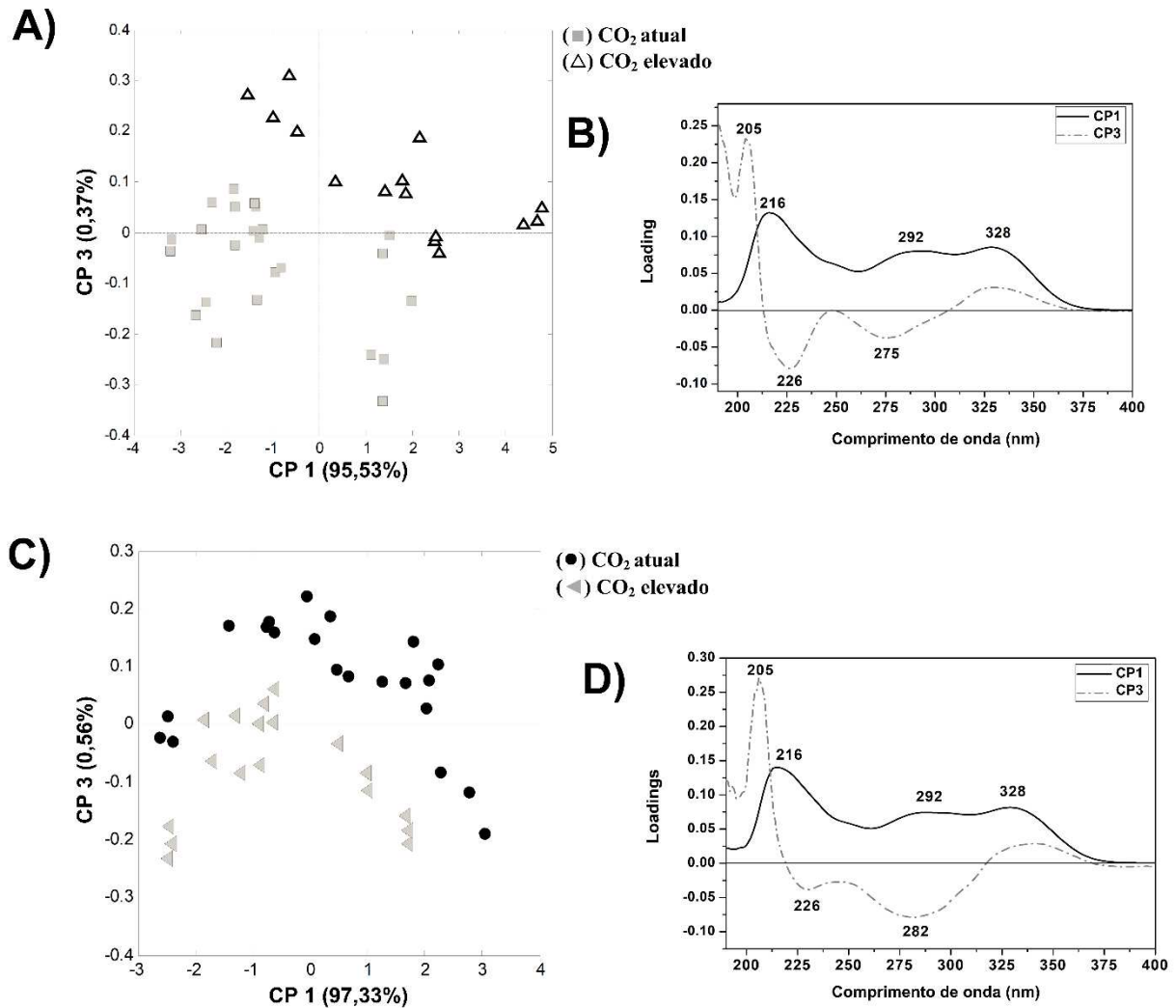
**Fig. 3.** Gráfico de escores e *loadings* da análise de componentes principais (ACP) para a impressão digital na região UV de grãos crus de *C. arabica* cultivados sob nível atual e elevado de CO<sub>2</sub>. Impressão digital obtida usando mistura binária etanol-diclorometano. **A)** Gráfico de escores para cafeeiro não irrigado; **B)** gráfico de *loading* da CP1 e CP2 para cafeeiros não irrigados; **C)** gráfico de escores para cafeeiro irrigado; **D)** gráfico de *loading* da CP1 e CP2 para cafeeiros irrigados. (■) CO<sub>2</sub> atual não irrigado; (Δ) CO<sub>2</sub> elevado não irrigado; (◄) CO<sub>2</sub> elevado irrigado; (●) CO<sub>2</sub> atual irrigado.

Os escores da ACP realizadas com etanol puro (*E*) mostraram que os extratos de grãos de café de plantas não irrigadas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado foram agrupados principalmente devido aos valores positivos na CP1 e CP3 (Fig. 4A). Alguns desses extratos foram agrupados devido às bandas em torno de 216, 286-294, 328 nm para CP1 e 205 nm para CP3 (Fig. 4B). Para os extratos de grãos de café cultivados no nível atual de CO<sub>2</sub>, um grupo foi formado com escores negativos na CP1, orientado na direção oposta àqueles com CO<sub>2</sub> elevado (Fig. 4A).

Como esperado, os extratos de etanol (Fig. 4) mostraram resultados semelhantes em comparação com os extratos de *ED* (Fig. 3), ou seja, os grãos de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado indicam ter maior abundância de ACGs e caveol do que os do nível atual de CO<sub>2</sub>. Alguns extratos de grãos cultivados nas condições atuais de CO<sub>2</sub> foram localizados no escore positivo da CP1 (Fig. 4A), indicando que eles poderiam conter um maior teor de ACGs do que o restante de sua classe. No entanto, a maioria dos extratos de grãos de café com nível atual de CO<sub>2</sub> foram localizados nos escores negativos da CP3 (Fig. 4A), em que bandas em torno de 226 nm e 275 nm foram importantes. Bandas na região de 275 nm sugerem metilxantinas, provavelmente cafeína [30], exhaustivamente estudada no café [31,23,32,33]. Vale ressaltar que a formação de diferentes grupos de extratos de uma mesma classe, extraídas com etanol puro, como também visto para a mistura binária *ED* de cafeeiros não irrigados (Fig. 3), pode ocorrer em virtude dos grãos serem provenientes de três camadas da árvore, onde receberam diferentes intensidades de luz.

Em relação aos extratos etanólicos dos grãos de café de plantas cultivadas sob irrigação, há uma inversão dos resultados em relação aos das plantas não irrigadas (Fig. 4), como também foi mostrado pelos extratos *ED* (Fig. 3). Isto é, a maioria dos extratos etanólicos de grãos de café cultivados em nível atual de CO<sub>2</sub> apresentou valores positivos para CP1 e CP3 (Fig. 4C). Em contraste com o que foi observado para plantas não irrigadas, os extratos provenientes do nível atual de CO<sub>2</sub> apresentaram bandas correspondentes a ACGs e caveol, importantes para a formação desse grupo de escores. Os *loadings* para os cafeeiros irrigados, mostradas na Fig. 4D, são semelhantes às das árvores não irrigadas. A maioria dos extratos etanólicos oriundos de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado foram localizados em escores negativos da CP3 (Fig. 4C), para os quais as bandas em 226, bem como em torno de 282 nm, foram importantes para o agrupamento (Fig. 4D). A banda na região de 282 nm pode ser devido à presença de

compostos aromáticos, principalmente cafeína [34,35], trigonelina e aminoácidos aromáticos [36].

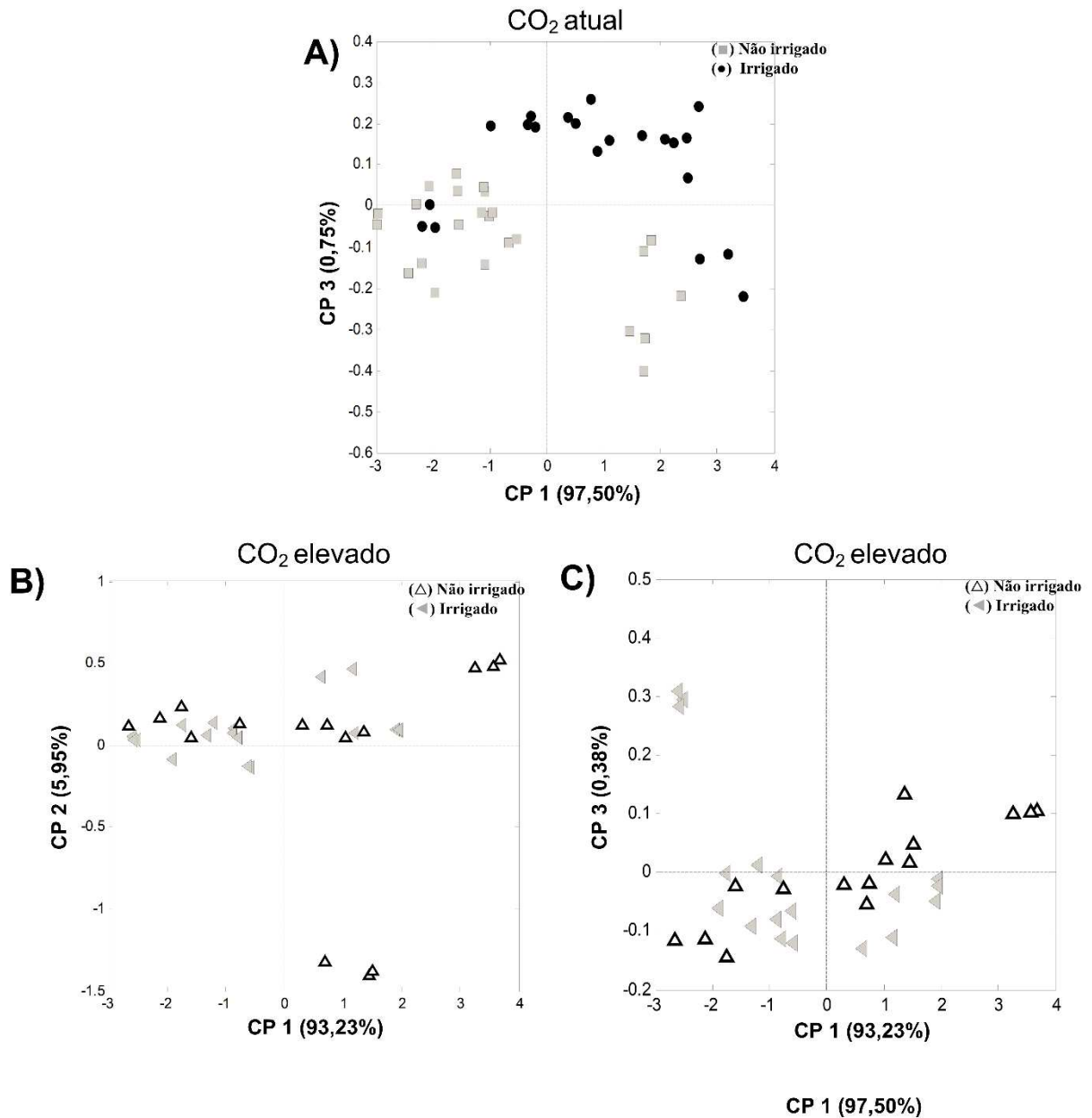


**Fig. 4.** Gráfico de escores e *loadings* da análise de componentes principais (ACP) para a impressão digital na região UV de grãos crus de *C. arabica* cultivados sob nível atual e elevada de CO<sub>2</sub>. Impressão digital obtida usando etanol puro. **A)** Gráfico de escores para cafeeiro não irrigado; **B)** gráfico de *loadings* da CP1 e CP3 para cafeeiros não irrigados; **C)** gráfico de escores de cafeeiro irrigado; **D)** gráfico de *loadings* da CP1 e CP3 de cafeeiros irrigados. (■) CO<sub>2</sub> atual não irrigado; (△) CO<sub>2</sub> elevado não irrigado; (◄) CO<sub>2</sub> elevado irrigado; (●) CO<sub>2</sub> atual irrigado.

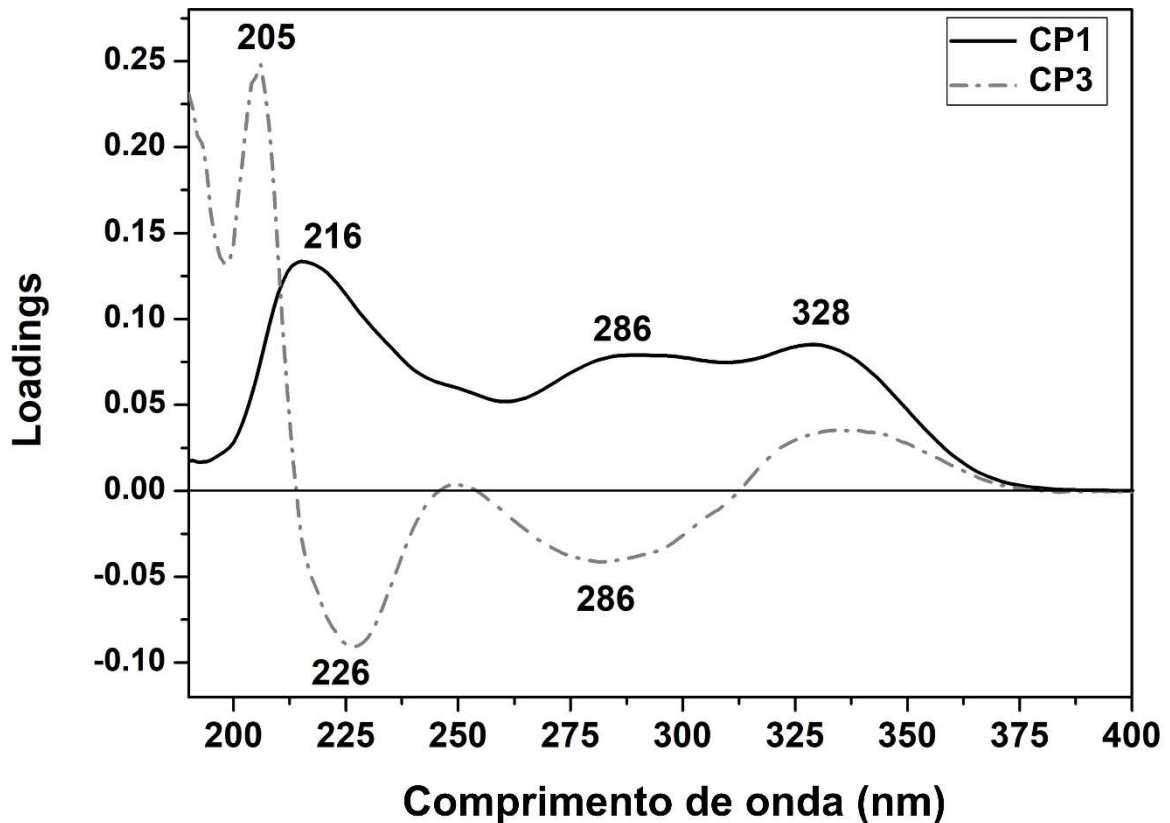
### 3.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS REGIMES HÍDRICOS E ALTERAÇÕES METABÓLICAS

Como etanol e a mistura binária *ED* foram os melhores solventes para discriminar os grãos cultivados em atmosferas atuais e enriquecidos com CO<sub>2</sub>, estes extratos foram usados

para avaliar a influência do regime hídrico nas impressões digitais metabólicas dos grãos de café cru na região UV. Os dados espectrais dos diferentes regimes hídricos foram investigados sob condições atmosféricas idênticas de CO<sub>2</sub>. Para os extratos etanólicos de café cultivados no nível atual de CO<sub>2</sub>, a ACP mostrou a discriminação entre espectros para grãos provenientes de diferentes condições da água. A maioria dos extratos de grãos crus de café sob irrigação apresentou valores mais positivos na CP1 (Fig. 5A). As bandas em torno de 216, 286-294 e 328 nm (*loadings* dos escores positivos da CP1) indicaram que ACGs e caveol podem ter sido responsáveis por essa discriminação (Fig. 6). A maior parte dos extratos provenientes de cafeeiros não irrigados formaram um grupo no lado negativo da CP1 (Fig. 5A), sendo discriminada pelas menores abundâncias de ACGs e caveol (Fig. 6).



**Fig. 5.** Gráfico de escores da análise de componentes principais (ACP) para a impressão digital na região UV de grãos crus de *C. arabica* sob diferentes regimes hídricos: irrigados e não irrigados. Impressão digital obtida usando etanol puro. **A)** CP1 versus CP3 - CO<sub>2</sub> atual; **B)** CP1 versus CP2 - CO<sub>2</sub> elevado; **C)** CP1 versus CP3 - CO<sub>2</sub> elevado. (■) CO<sub>2</sub> atual não irrigado; (△) CO<sub>2</sub> elevado não irrigado; (◄) CO<sub>2</sub> elevado irrigado; (●) CO<sub>2</sub> atual irrigado.

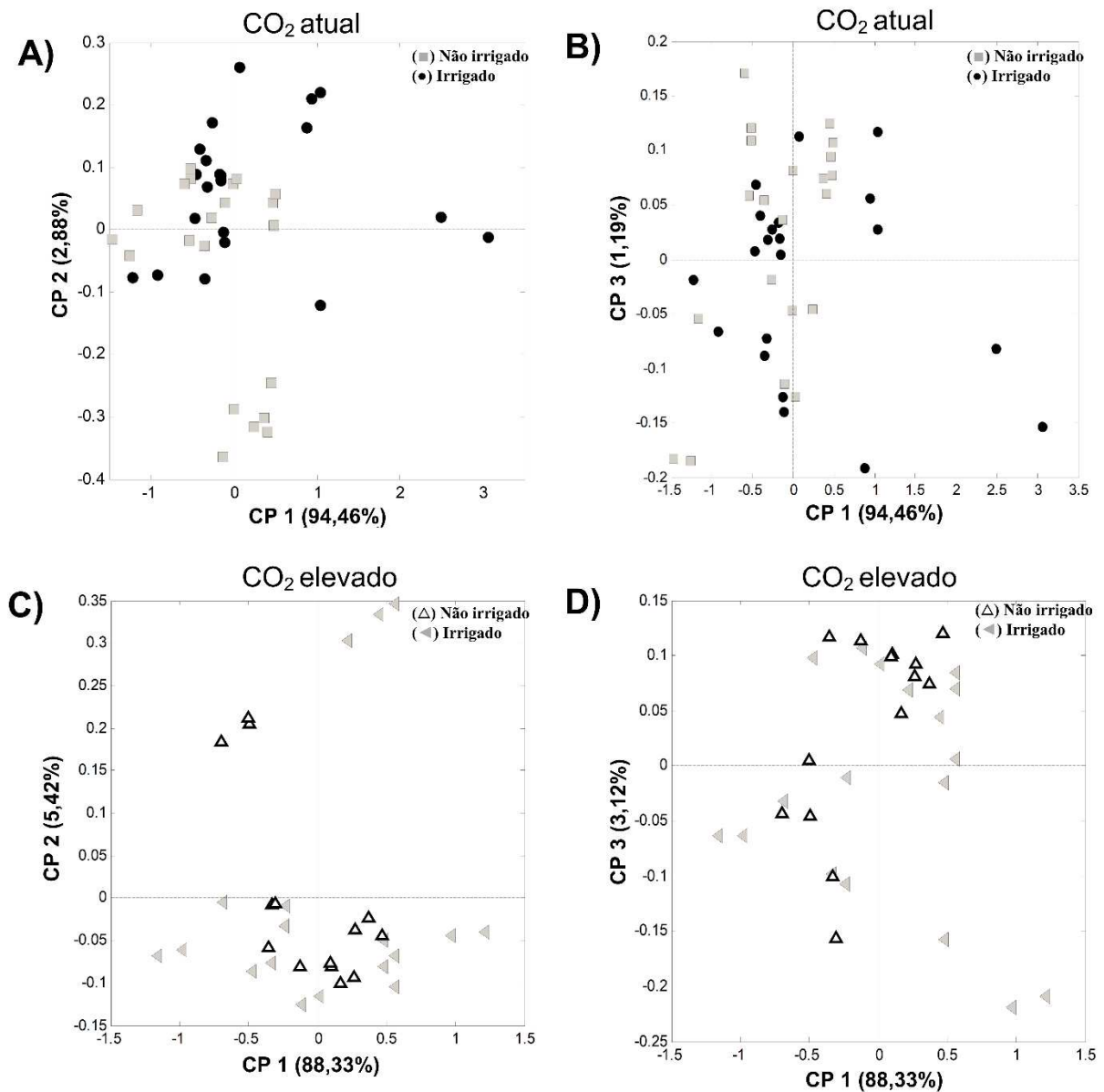


**Fig. 6.** Gráfico de *loadings* da ACP para a impressão digital na região UV a partir dos extratos etanólicos de grãos crus de *C. arabica* cultivados no nível de CO<sub>2</sub> atual sob condições não irrigada e irrigada.

Para os grãos de café cultivados no nível de CO<sub>2</sub> elevado, nenhuma formação de grupo espectral foi observada em relação aos dois regimes hídricos estudados (Fig. 5B e Fig. 5C) em oposição com o observado para os extratos de café em CO<sub>2</sub> atual. Além disso, não foram encontradas formações ou possível discriminação de grupos nos extratos da mistura binária ED independente da atmosfera de CO<sub>2</sub> (Fig. 7).

A significância estatística dos efeitos do CO<sub>2</sub> e da disponibilidade hídrica, bem como sua interação sobre os metabólitos, podem ser investigados usando várias abordagens, entre elas o ASCA. Com a disponibilidade de software em nosso laboratório, os cálculos ASCA foram feitos tanto para as impressões digitais obtidas em etanol puro quanto para as impressões digitais binárias em etanol-diclorometano. A aplicação do teste de permutação com 10<sup>4</sup> permutações resultou em valores de *p* de 0,263 e 0,379 para CO<sub>2</sub> e água para os extratos

etanólicos. Esses valores para os extratos da mistura binária *ED* foram 0,074 e 0,116, respectivamente; assim, não foram detectados efeitos principais significativos pelo método ASCA ( $p > 0,05$ ). O efeito da interação entre os níveis de  $\text{CO}_2$  e água foi significativo acima do nível de confiança de 95% com valores de  $p$  de 0,011 para ambos os extratores ( $p < 0,05$ ).



**Fig. 7.** Gráficos de escores da análise de componentes principais para as impressões digitais na região UV de grãos crus de *C. arabica* cultivados sob dois níveis de dióxido de carbono e duas condições de regime hídrico. Impressão digital obtida usando mistura binária de etanol-diclorometano. **A)** CP1 versus CP2 para cafeeiros não irrigados e irrigados no nível de  $\text{CO}_2$  atual; **B)** CP1 versus CP3 para cafeeiros não irrigados e irrigados no nível de  $\text{CO}_2$  atual; **C)** CP1 versus CP2 para cafeeiros não irrigados e irrigados no nível de  $\text{CO}_2$  elevado; **D)** CP1 versus CP3 para cafeeiros não irrigados e irrigados no nível de  $\text{CO}_2$  elevado. (■)  $\text{CO}_2$  atual não irrigado; (Δ)  $\text{CO}_2$  elevado não irrigado; (◄)  $\text{CO}_2$  elevado irrigado; (●)  $\text{CO}_2$  atual irrigado.

## 4 DISCUSSÃO

O real impacto das mudanças climáticas no crescimento, desenvolvimento, produtividade e qualidade de *Coffea arabica* poderá ser determinado após estudos exaustivos que interpretem as interações de vários fatores ambientais [37]. Um maior conhecimento sobre o desenvolvimento do café pode ser obtido através de estudos que associem a interação entre dois ou mais fatores ambientais. Por exemplo, o CO<sub>2</sub> elevado tende a aumentar a temperatura global e, conseqüentemente, períodos de seca freqüentes e mais intensos ocorrem. Para sobreviver à essas mudanças ambientais, as plantas são pressionadas a adaptar e modificar sua fisiologia e morfologia, induzindo alterações metabólicas [31]. Um dos efeitos mais importantes associados ao aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico é o aumento da fotossíntese foliar, geralmente expresso pela redução da condutância estomática ( $g_s$ ), normalmente levando a menores taxas de transpiração e maior eficiência de uso da água (WUE, do inglês *water use efficiency*) [21].

No café arábica (*Coffea arabica* L.), como em muitas outras espécies de plantas, os efeitos primários do CO<sub>2</sub> elevado estão relacionados às respostas vegetativas incluindo altas taxas de fotossíntese foliar [3,14],  $g_s$  não responsiva ou mais baixos em plantas jovens [3,22] ou aumento de  $g_s$  com transpiração elevada e WUE melhorado em plantas adultas durante a estação seca [14]. Em nosso trabalho, foram observadas as respostas do mais importante sumidouro de carbono durante os estágios reprodutivos finais dos cafeeiros adultos, os grãos de café. Nosso objetivo é compreender as possíveis mudanças futuras no metaboloma dos grãos de café originários das plantas cultivadas sob seca e com níveis elevados de CO<sub>2</sub>. Durante o estágio de enchimento e maturação do café, as condições ambientais influenciam o acúmulo de compostos nos grãos, incluindo metabólitos primários e secundários [12].

Analisando os extratos obtidos de grãos de café cru cultivados sob o nível de CO<sub>2</sub> atual em plantas não irrigadas (regime de água de campo), a maioria das impressões digitais UV

apontou para uma menor quantidade de ACGs e caveol (Figs. 3B e 4B). Por outro lado, sob o CO<sub>2</sub> elevado e a mesma condição de água, os grãos de café apresentaram maiores acúmulos de caveol e ACGs (Figs. 3B e 4B). Os grãos de café de árvores irrigadas sob os níveis atuais de CO<sub>2</sub> apresentaram maior abundância de ACGs e caveol do que sob CO<sub>2</sub> elevado (Figs. 3D e 4D), os resultados são opostos aos encontrados em grãos crus de cafeeiros não irrigados. Além disso, no regime de água de campo explorado para as impressões digitais obtidas com etanol (Fig. 5), a baixa disponibilidade de água foi um fator limitante nas condições atuais de CO<sub>2</sub> do ar. Com o aumento do CO<sub>2</sub> a baixa disponibilidade de água não alterou a presença de caveol e ACGs, como ocorreu na condições de CO<sub>2</sub> atual e seca, sugerindo que o conteúdo desses metabólitos secundários não seria modificado em futuras condições de seca com CO<sub>2</sub> elevado [38]. Isso indica que a influência da irrigação tem um impacto maior nos grãos de café cultivados sob o nível atual de CO<sub>2</sub> do que os cultivados em atmosfera elevada. Em plantas cultivadas com escassez de água e CO<sub>2</sub> elevado ocorreu uma interação entre esses dois fatores ambientais, ajudando os metabólitos secundários dos grãos de café a lidar com as condições de seca.

Sabendo que o suprimento de água afeta a qualidade do grão de café [39], nossos experimentos mostram que a disponibilidade hídrica pode ser um fator limitante, dependendo do nível de CO<sub>2</sub> atmosférico, além de outros fatores possíveis como a temperatura. As limitações impostas pelo estresse hídrico não indicaram necessariamente alterações negativas na composição química do grão cru. Na estação seca o conteúdo de ACG nos grãos secos pode ser estimulado por déficit moderado de água (80% da irrigação total), mas sob condições severas de déficit (40% da irrigação total) o conteúdo da ACG diminuiu [40]. Sob atmosfera de CO<sub>2</sub> atual o conteúdo de ACGs é maior nos grãos de café irrigado do que nos cafeeiros não irrigados [39].

Em plantas de café não irrigadas as adaptações foliares induzem alterações metabólicas

resultantes de processos oxidativos mais intensos, o que poderia provocar deficiências nutricionais, senescência e abscisão prematuras [18]. Essas alterações metabólicas foliares são expressas através da presença de precursores como lactato, arginina e metionina, que podem provocar reduções expressivas na produtividade do fruto, bem como o envelhecimento prematuro da planta. Sob seca, a redução da feofitina *a* também é encontrada nas folhas de café [41].

Pesquisas envolvendo CO<sub>2</sub> elevado e diferentes regimes de água sobre o conteúdo metabólico, como caveol e ACG, são escassos. Entretanto, o impacto do CO<sub>2</sub> elevado e sua interação com o calor na composição química e na qualidade do grão de café durante os últimos quatro meses de maturação do café foram avaliados sob suprimento controlado de água em experimentos com vasos [31]. Sob condições térmicas elevadas foram observados níveis reduzidos de ácido 5-cafeoilquínico e cafeína. O CO<sub>2</sub> elevado minimizou as variações nos ácidos cafeoilquínicos (ACQs) e no ácido caféico; atenuou as variações de 4-ACQ e trigonelina, também revertendo o nível de ácido *p*-cumárico [31]. Em nossos experimentos, o CO<sub>2</sub> elevado forneceu um possível suporte às plantas de café, mitigando os efeitos negativos da seca no perfil de metabólitos secundários. A variação na concentração da maioria dos isômeros ACGs está relacionada ao estágio de amadurecimento do fruto; os frutos do café tendem a acumular 5-CQA nos estágios imaturos, enquanto que durante o processo de amadurecimento sua quantidade diminui [42]. As correlações das bandas de absorção característica para ACGs, encontradas pelos *loadings* da ACP para os grãos cultivados sob irrigação com níveis atuais e elevados de CO<sub>2</sub> podem estar envolvidas no processo de amadurecimento dos frutos (Figs. 3B and 4B). Os grãos de café cultivados com CO<sub>2</sub> elevado atrasaram a maturação quando comparados aos grãos cultivados no nível de CO<sub>2</sub> atual [43]. No entanto, quando os cafeeiros foram irrigados essa relação foi atenuada (Figs 3D and 4D). A mesma correlação entre as quantidades de ACGs e o amadurecimento de grãos pode ser verificada na discriminação de

impressões digitais devido à disponibilidade de água. Normalmente, a maturação dos grãos é acelerada devido ao déficit hídrico e, conseqüentemente, são esperadas concentrações mais baixas de ACGs [44]. A maior parte dos escores da ACP para os grãos de cafeeiros irrigados cultivados no nível de CO<sub>2</sub> atual correlacionou-se com as bandas de absorção características para ACGs (Fig. 5A e Fig. 6). Notavelmente, quando submetido à atmosfera com CO<sub>2</sub> elevado essa relação causada pelo déficit no suprimento de água não foi encontrada (Fig. 5A e 5B).

O conteúdo de diterpenos é sujeito à influência de fatores ambientais e desempenha um papel importante no crescimento e sobrevivência das plantas [42]. Nos grãos de café verde esses diterpenos, como cafestol e caveol, atuam indiretamente na defesa das células contra o estresse oxidativo e contra substâncias xenobióticas [45]. O conteúdo de cafestol é reduzido em grãos provenientes de CO<sub>2</sub> elevado sob seca em comparação com as condições atuais de CO<sub>2</sub> (Figs. 4A and 4B), podendo indicar atraso na floração e, conseqüentemente, atraso na maturação sob CO<sub>2</sub> elevado, mas sem afetar a qualidade geral da bebida [43].

Outra consideração importante encontrada nas Figs. 3, 4 e 5 estão relacionadas à dispersão dos escores nos gráficos da ACP. Essa dispersão está correlacionada com a posição de coleta dos frutos sobre o perfil vertical da planta. Frutos oriundos das posições mais baixas (sombreadas) receberam menor incidência solar (segunda camada, Fig. 1), enquanto frutos nas posições mais altas receberam maior incidência solar (terceira e quarta camada, Fig. 1). Os grãos das camadas sombreadas têm maiores concentrações de cafeína e ACGs do que os expostos à radiação direta do sol, que acumulam mais açúcares redutores e lipídios [46]. Esse padrão de discriminação também é encontrado nas folhas de *C. arabica* sob diferentes condições de CO<sub>2</sub> [15], regimes de água [47] e sob diferentes estágios fenológicos dos cafeeiros [48].

As respostas metabólicas discutidas anteriormente foram obtidas através da análise de extratos de etanol puro e misturas binárias de etanol-diclorometano. Provavelmente, os demais

extratos obtidos do planejamento de mistura conteriam outras informações do que as discutidas nesta seção [17]. Porém, é necessário deixar claro que os extratos *E* e *ED* continham as principais informações químicas relacionadas às diferenças entre as condições de cultivo (Fig. 2). A maximização da diferença química entre as classes é a principal vantagem do uso de multi-impressões digitais obtidas pelo planejamento de misturas. Para uma única amostra, diferentes combinações de perfis químicos são alcançados. Consequentemente, melhores domínios experimentais do metaboloma da planta são investigados, inferindo a importância de planejamentos estatísticos de mistura associados às técnicas espectrais de fácil manuseio e custo relativamente baixo como foi o caso da espectrofotometria UV-Vis.

## 5 CONCLUSÃO

O planejamento estatístico de misturas e impressões digitais espectrais na região UV de extratos de grãos de *Coffea arabica* cultivados sob níveis atmosféricos elevado e atual de CO<sub>2</sub> e diferentes regimes hídricos simularam os potenciais efeitos sobre os metabólitos devido à futura mudança climática. O delineamento de misturas foi importante para determinar a composição do solvente capaz de extrair os metabólitos que exibem as diferenças mais significativas nos níveis dos fatores estudados. A ACP do extrato em etanol puro e da mistura binária etanol - diclorometano mostrou clara discriminação entre os grãos cultivados em diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> sob os diferentes regimes de água. A disponibilidade de água demonstrou ser um fator limitante para o conteúdo de metabólitos apenas no nível de CO<sub>2</sub> atual, sugerindo que grãos de café em ambientes com CO<sub>2</sub> elevado podem ter sucesso metabólico para enfrentar secas futuras mais frequentes. Maiores quantidades de ácidos clorogênicos e cafeol foram observadas em grãos de plantas não irrigadas cultivadas com CO<sub>2</sub> elevado e irrigadas no nível atual de CO<sub>2</sub>. Verificou-se que os grãos cultivados no nível de CO<sub>2</sub> atual não irrigados e no nível de CO<sub>2</sub> elevado irrigados continham mais metilxantinas, implicando mais cafeína, ao contrário do observado nas folhas de *Coffea arabica* [15]. O planejamento de misturas e as impressões digitais a partir de espectros de UV-Vis, facilmente adquiridos, combinadas com métodos quimiométricos formam uma estratégia eficaz para o estudo de alterações metabólicas devido à mudanças ambientais

**REFERÊNCIAS**

- [1] J. Barber, Photosynthetic energy conversion: Natural and artificial, *Chem. Soc. Rev.* 38 (2009) 185–196. doi:10.1039/b802262n.
- [2] W. Zinth, J. Wachtveitl, The first picoseconds in bacterial photosynthesis - Ultrafast electron transfer for the efficient conversion of light energy, *ChemPhysChem.* 6 (2005) 871–880. doi:10.1002/cphc.200400458.
- [3] F.M. Damatta, A.G. Godoy, P.E. Menezes-Silva, S.C.V. Martins, L.M.V.P. Sanglard, L.E. Morais, A. Torre-Neto, R. Ghini, Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO<sub>2</sub> enrichment conditions: Disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations, *J. Exp. Bot.* 67 (2016) 341–352. doi:10.1093/jxb/erv463.
- [4] F. Ewert, M.D.A. Rounsevell, I. Reginster, M.J. Metzger, R. Leemans, Future scenarios of European agricultural land use I. Estimating changes in crop productivity, *Agric. Ecosyst. Environ.* 107 (2005) 101–116. doi:10.1016/j.agee.2004.12.003.
- [5] R.E. Cleland, A. Melis, P.J. Neale, Mechanism of photoinhibition: photochemical reaction center inactivation in system II of chloroplasts, *Photosynth. Res.* 9 (1986) 79–88. doi:10.1007/BF00029734.
- [6] J.M. McGrath, D.B. Lobell, Regional disparities in the CO<sub>2</sub> fertilization effect and implications for crop yields, *Environ. Res. Lett.* 8 (2013) 1–9. doi:10.1088/1748-9326/8/1/014054.
- [7] M.P. Johnson, Photosynthesis, *Essays Biochem.* 60 (2016) 255–273. doi:10.1007/978-981-10-6101-1\_17.
- [8] Y. Sun, L. Gu, R.E. Dickinson, R.J. Norby, S.G. Pallardy, F.M. Hoffman, Impact of mesophyll diffusion on estimated global land CO<sub>2</sub> fertilization, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111 (2014) 15774–15779. doi:10.1073/pnas.1418075111.

- [9] P.M. Ray, *A planta viva*, 2<sup>nd</sup> ed., Pioneira, São Paulo, 1978.
- [10] C. Körner, Carbon limitation in trees, *J. Ecol.* 91 (2003) 4–17. doi:10.1046/j.1365-2745.2003.00742.x.
- [11] J.D. Lewis, X.Z. Wang, K.L. Griffin, D.T. Tissue, Effects of age and ontogeny on photosynthetic responses of a determinate annual plant to elevated CO<sub>2</sub> concentrations, *Plant, Cell Environ.* 25 (2002) 359–368. doi:10.1046/j.0016-8025.2001.00815.x.
- [12] E.B. Fagan, C.H.E. de Souza, N.M.B. Pereira, V.J. Machado, Effect of time on coffee bean (*Coffea* sp) growth in cup quality, *Biosci. J.* 27 (2011) 729–738.
- [13] M. Rakocevic, F.T. Matsunaga, Variations in leaf growth parameters within the tree structure of adult *Coffea arabica* in relation to seasonal growth, water availability and air carbon dioxide concentration, *Ann. Bot.* 122 (2018) 117–131. doi:10.1093/aob/mcy042.
- [14] M. Rakocevic, R.V. Ribeiro, P.E.R. Marchiori, H.F. Filizola, E.R. Batista, Structural and functional changes in coffee trees after four years under free air CO<sub>2</sub> enrichment, *Ann. Bot.* 121 (2018) 1065–1078. doi:10.1093/aob/mcy011.
- [15] C.D. Tormena, G.G. Marcheafave, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds, *Talanta.* 191 (2019) 382–389. doi:10.1016/j.talanta.2018.09.002.
- [16] P.H. Hatumura, G.S. de Oliveira, G.G. Marcheafave, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, A.E. Terrile, Chemometric analysis of <sup>1</sup>H NMR fingerprints of *Coffea arabica* green bean extracts cultivated under different planting densities, *Food Anal. Methods.* 11 (2018) 1906–1914. doi:10.1007/s12161-017-1104-y.
- [17] A.E. Terrile, G.G. Marcheafave, G.S. Oliveira, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Chemometric analysis of UV characteristic profile and infrared fingerprint

- variations of *Coffea arabica* green beans under different space management treatments, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (2016) 1254–1263. doi:10.5935/0103-5053.20160022.
- [18] G. Marcheafave, C. Tormena, S. Afonso, M. Rakocevic, R. Bruns, I. Scarminio, Integrated chemometric approach to optimize sample preparation for detecting metabolic changes provoked by abiotic stress in *Coffea arabica* L. leaf fingerprints, *J. Braz. Chem. Soc.* (2019) 1–10. doi:10.21577/0103-5053.20190068.
- [19] G.G. Marcheafave, C.D. Tormena, E.D. Pauli, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves, *Microchem. J.* 146 (2019) 713–721. doi:10.1016/j.microc.2019.01.073.
- [20] C.D. Tormena, G.G. Marcheafave, E.D. Pauli, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Potential biomonitoring of atmospheric carbon dioxide in *Coffea arabica* leaves using near-infrared spectroscopy and partial least squares discriminant analysis, *Environ. Sci. Pollut. Res.* (2019). doi:10.1007/s11356-019-06163-1.
- [21] F.M. DaMatta, E. Rahn, P. Läderach, R. Ghini, J.C. Ramalho, Why could the coffee crop endure climate change and global warming to a greater extent than previously estimated?, *Clim. Change.* 152 (2019) 167–178. doi:10.1007/s10584-018-2346-4.
- [22] R. Ghini, A. Torre-neto, A.F.M. Dentzien, Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO<sub>2</sub> enrichment, *Clim. Change.* (2015) 307–320. doi:10.1007/s10584-015-1422-2.
- [23] M. de S.G. Barbosa, M.B. dos S. Scholz, C.S.G. Kitzberger, M. de T. Benassi, Correlation between the composition of green Arabica coffee beans and the sensory quality of coffee brews, *Food Chem.* 292 (2019) 275–280. doi:10.1016/j.foodchem.2019.04.072.
- [24] C.B. Rajashekar, Elevated CO<sub>2</sub> levels affect phytochemicals and nutritional quality of

- food crops, *Am. J. Plant Sci.* 9 (2018) 150–162. doi:10.4236/ajps.2018.92013.
- [25] E.D. Pauli, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, UV-Vis spectral fingerprinting and chemometric method applied to the evaluation of *Camellia sinensis* leaves from different harvests, *Anal. Methods*. 8 (2016) 7537–7544. doi:10.1039/C6AY02462A.
- [26] V.J. Barwick, Strategies for solvent selection - A literature review, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 293–309. doi:10.1016/S0165-9936(97)00039-3.
- [27] A. Belay, A. V. Gholap, Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy, *African J. Pure Appl. Chem.* 3 (2009) 234–240. doi:10.5897/AJPAC.
- [28] I. Moreira, G.L. Scheel, P.H. Hatumura, I.S. Scarminio, Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*, *Quim. Nova*. 37 (2014) 39–43. doi:10.1590/S0100-40422014000100008.
- [29] R.C.E. Dias, M. de T. Benassi, Discrimination between Arabica and Robusta coffees using hydrosoluble compounds: Is the efficiency of the parameters dependent on the roast degree?, *Beverages*. 1 (2015) 127–139. doi:10.3390/beverages1030127.
- [30] I. Moreira, I.S. Scarminio, Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints., *Talanta*. 107 (2013) 416–22. doi:10.1016/j.talanta.2013.01.053.
- [31] J.C. Ramalho, I.P. Pais, A.E. Leitão, M. Guerra, F.H. Reboredo, C.M. Máguas, M.L. Carvalho, P. Scotti-Campos, A.I. Ribeiro-Barros, F.J.C. Lidon, F.M. Damatta, Can elevated air [CO<sub>2</sub>] conditions mitigate the predicted warming impact on the quality of coffee bean?, *Front. Plant Sci.* 9 (2018) 1–14. doi:10.3389/fpls.2018.00287.
- [32] H.T.M. Tran, T. Ramaraj, A. Furtado, L.S. Lee, R.J. Henry, Use of a draft genome of coffee (*Coffea arabica*) to identify SNPs associated with caffeine content, *Plant Biotechnol. J.* 16 (2018) 1756–1766. doi:10.1111/pbi.12912.

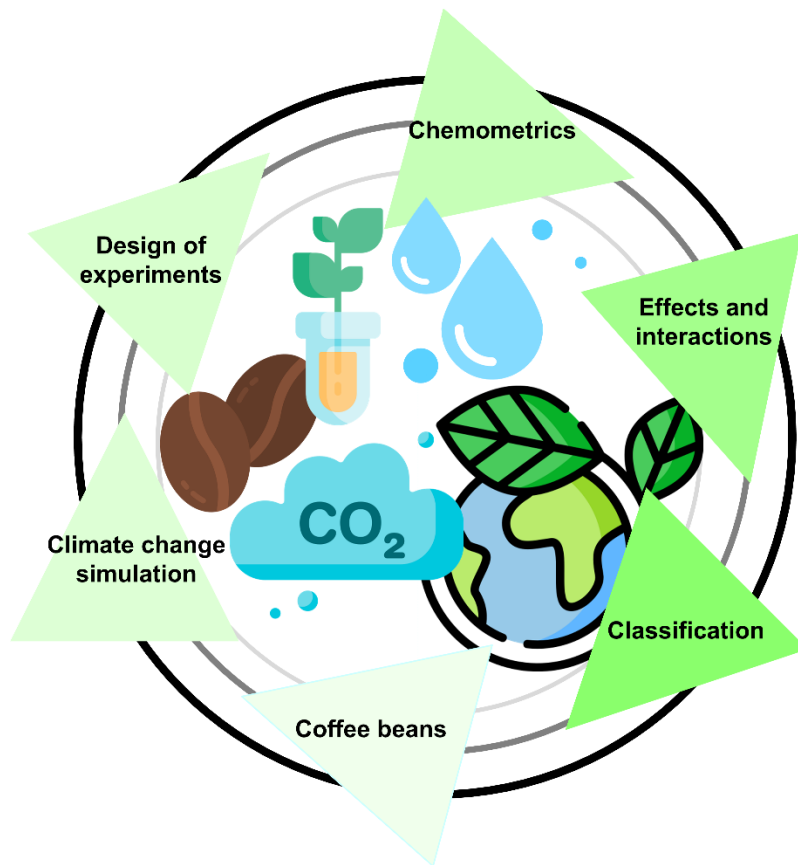
- [33] M. Worku, B. de Meulenaer, L. Duchateau, P. Boeckx, Effect of altitude on biochemical composition and quality of green arabica coffee beans can be affected by shade and postharvest processing method, *Food Res. Int.* 105 (2018) 278–285. doi:10.1016/j.foodres.2017.11.016.
- [34] D. Suhandy, M. Yulia, The use of Partial Least Square Regression and spectral data in UV-Visible region for quantification of adulteration in Indonesian Palm Civet coffee, *Int. J. Food Sci.* 2017 (2017) 1–7. doi:10.1155/2017/6274178.
- [35] W.J. Hurst, R.A. Martin, S.M. Tarka, Analytical methods for quantitation of methylxanthines, in: G.A. Spiller (Ed.), *Caffeine*, 1<sup>st</sup> ed., CRC Press, London, 1998: p. 384.
- [36] R. Macrae, J. Beaumont, J.G. Vaughan, Detection and analysis, in: R.J. Clarke, R. Macrae (Eds.), *Coffee Vol. 5 Relat. Beverages*, Elsevier Applied Science, New York, 1987: pp. 149–178.
- [37] F.M. DaMatta, R.T. Avila, A.A. Cardoso, S.C. V. Martins, J.C. Ramalho, Physiological and agronomic performance of the coffee crop in the context of climate change and global warming: A Review, *J. Agric. Food Chem.* 66 (2018) 5264–5274. doi:10.1021/acs.jafc.7b04537.
- [38] A. Farah, Nutritional and health effects of coffee, in: P. Lashermes (Ed.), *Achiev. Sustain. Cultiv. Coffee*, Burleigh Dodds Science Publishing Limited, Cambridge, 2018: pp. 1–31.
- [39] F. Vinecky, F. Davrieux, A.C. Mera, G.S.C. Alves, G. Lavagnini, T. Leroy, F. Bonnot, O.C. Rocha, G.F. Bartholo, A.F. Guerra, G.C. Rodrigues, P. Marraccini, A.C. Andrade, Controlled irrigation and nitrogen, phosphorous and potassium fertilization affect the biochemical composition and quality of Arabica coffee beans, *J. Agric. Sci.* 155 (2017). doi:10.1017/S0021859616000988.

- [40] X. Liu, F. Li, Y. Zhang, Q. Yang, Effects of deficit irrigation on yield and nutritional quality of Arabica coffee (*Coffea arabica*) under different N rates in dry and hot region of southwest China, *Agric. Water Manag.* 172 (2016) 1–8. doi:10.1016/j.agwat.2016.04.007.
- [41] G.L. Scheel, E.D. Pauli, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Environmental stress evaluation of *Coffea arabica* L. leaves from spectrophotometric fingerprints by PCA and OSC–PLS–DA, *Arab. J. Chem.* (2016). doi:10.1016/j.arabjc.2016.05.014.
- [42] B. Cheng, A. Furtado, H.E. Smyth, R.J. Henry, Influence of genotype and environment on coffee quality, *Trends Food Sci. Technol.* 57 (2016) 20–30. doi:10.1016/j.tifs.2016.09.003.
- [43] M. Rakocevic, K.S. Malagodi-Braga, E.R. Batista, A.H.N. Maia, M.B. dos S. Scholz, H.F. Filizola, The vegetative growth assists to reproductive responses of Arabic coffee trees in a long-term FACE experiment, *Clim. Chang.* In Press (2019).
- [44] M.R. Petek, T. Sera, I.C. de B. Fonseca, Exigências climáticas para o desenvolvimento e maturação dos frutos de cultivares de *Coffea arabica*, *Bragantia.* 1 (2009) 169–181. doi:10.1590/S0006-87052009000100018.
- [45] A. Tsukui, S.S. Oigman, C.M. Rezende, Oil green coffee beans: Diterpenes cafestol and kahweol, *Rev. Virtual Quim.* 6 (2014) 16–33. doi:10.5935/1984-6835.20140003.
- [46] F. Delarozza, M. Rakocevic, G.B. Malta, P.M. Sanchez, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Factorial design effects of plant density, pattern and light availability on the caffeine, chlorogenic acids, lipids, reducing sugars and ash contents of *Coffea arabica* L. beans and leaves, *Anal. Methods.* 9 (2017) 3612–3618. doi:10.1039/C7AY00721C.
- [47] P.M. Sanchez, E.D. Pauli, G.L. Scheel, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Irrigation and light access effects on *Coffea arabica* L. leaves by FTIR-Chemometric analysis, *J. Braz. Chem. Soc.* 29 (2018) 168–176. doi:10.21577/0103-5053.20170125.

- [48] F. Delaroza, M. Rakocevic, G.B. Malta, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases, *J. Braz. Chem. Soc.* 25 (2014) 1929–1938. doi:10.5935/0103-5053.20140172.

# CAPÍTULO 3

**“Principais efeitos do aumento de CO<sub>2</sub> atmosférico e da deficiência de água no solo nas impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H em grãos de *Coffea arabica* através do planejamento fatorial e de misturas”**



**Publicado em:** *Science of The Total Environment*, Volume 749, 20 Dezembro 2020, 142350

## RESUMO

A resposta metabólica das plantas de *Coffea arabica* em face da concentração atmosférica crescente de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) combinada com a redução na disponibilidade de água no solo é complexa devido aos vários *feedbacks* (bio)químicos. Ferramentas analíticas modernas e o avanço experimental da ciência agrônômica tendem a progredir na compreensão da complexidade metabólica das plantas. Neste trabalho, plantas de *Coffea arabica* foram cultivadas em um dispositivo de enriquecimento de dióxido de carbono ao ar livre delineado por um planejamento fatorial (2<sup>2</sup>) considerando dois níveis de CO<sub>2</sub> e dois níveis de disponibilidade de água no solo. Os efeitos dos níveis de CO<sub>2</sub> e água no solo sobre as impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H dos grãos foram investigados estrategicamente usando análise de componente principal (ACP), análise de variância (ANOVA) - análise de componente simultânea (*analysis of variance - simultaneous component analysis*, ASCA) e análise discriminante de mínimos quadrados parciais (*partial least squares-discriminant analysis*, PLS-DA). A partir do ASCA, o fator CO<sub>2</sub> teve efeito significativo na mudança do perfil de RMN de <sup>1</sup>H das impressões digitais. O fator considerando a disponibilidade de água no solo e a interação (CO<sub>2</sub> × água) não foram significativos. As impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H com análise ACP, ASCA e PLS-DA determinaram perfis espectrais para ácidos graxos, cafeína, trigonelina e de glicose com aumentos em grãos de CO<sub>2</sub> atual, enquanto ácido quínico/ácidos clorogênicos, ácido málico e caveol/cafestol aumentaram em grãos de café sob elevado CO<sub>2</sub>. Os resultados do modelo PLS-DA revelaram um bom desempenho de classificação entre o efeito significativo dos níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico nas impressões digitais, independentemente das disponibilidades de água no solo. Finalmente, o modelo PLS-DA mostrou boa capacidade de previsão, classificando com sucesso o conjunto de dados de validação de grãos de café coletados ao longo do perfil vertical das plantas incluindo várias impressões digitais de diferentes solventes de extração. Os resultados desta investigação sugerem que a associação de planejamento fatorial, planejamento estatístico de mistura, ACP, ASCA e PLS-DA pode fornecer informações precisas sobre uma série de alterações metabólicas provocadas por mudanças climáticas em produtos de importância comercial, além de minimizar o trabalho extra necessário nas abordagens analíticas clássicas, incentivando o desenvolvimento de estratégias semelhantes.

**Palavras-chave:** Mudanças climáticas; dióxido de carbono; *Coffea arabica* L.; planejamento estatístico de mistura; métodos quimiométricos; alterações metabólicas.

## 1 INTRODUÇÃO

A variação no clima da Terra depende de vários processos multivariados que envolvem a litosfera, hidrosfera e atmosfera (Ainsworth et al., 2020). Nas últimas décadas, graves mudanças climáticas vêm ocorrendo, em parte devido às emissões de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) associadas à atividade industrial (Cernusak et al., 2019). As consequências das mudanças climáticas, como períodos de seca mais frequentes, temperaturas elevadas e elevações de gases atmosféricos, têm sido investigadas (Bazzaz, 1990; McGrath and Lobell, 2013; Nagelkerken and Connell, 2015; Rajashekar, 2018). A preocupação com o aumento da emissão de CO<sub>2</sub> está relacionada às conseqüentes mudanças ambientais, como o aumento da temperatura do ar e mudanças no funcionamento das espécies vegetais e sua distribuição geográfica, que afetariam a economia agrícola. (Clapp et al., 2018). A reversão dessas ocorrências críticas depende de políticas públicas urgentes, da conscientização humana e de ações para minimizar as emissões de gases, retardar e prevenir mudanças climáticas e eventuais catástrofes. (International Renewable Energy Agency, 2010; Montzka et al., 2011).

Considerando as respostas fisiológicas, morfológicas ou químicas dos sistemas vegetativos, muitos projetos de pesquisa investigam apenas o efeito de um único fator ambiental nessas respostas, raramente considerando as interações entre vários fatores ambientais e, portanto, podem não indicar a realidade de campo (Abdalla Filho et al., 2019; Marcheafave et al., 2020a). No cenário de estudos univariados, poucas interações foram detectadas nas respostas químicas e metabólicas das plantas devido às mudanças simultâneas nos níveis de CO<sub>2</sub> e disponibilidade de água. A química analítica combinada com áreas agrícolas/biológicas pode ajudar a preencher essas lacunas de conhecimento. Estudos ambientais multivariados (ou seja, considerando  $n$  variáveis mudando simultaneamente em sistemas reais) são uma limitação prática para experimentação de campo. Nas últimas décadas, o Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (FACE, do inglês, *Free-Air Carbon dioxide Enrichment*) tem permitido

verificar as respostas das plantas aos efeitos e conseqüente interação de estresses ambientais como CO<sub>2</sub>, água e temperatura em sistemas de campo controlados (Pleijel and Högy, 2015; Rakocevic et al., 2018). Alguns estudos investigaram as respostas químicas (ou seja, mudanças metabólicas) de sistemas de cultivo sob distúrbios ambientais, embora tenham explorado os efeitos das mudanças ambientais (por exemplo, estresse nutricional, alta temperatura, CO<sub>2</sub> elevado) reportaram apenas quantificações metabólicas (Miyagi et al., 2017; Temme et al., 2019). Estudar apenas alguns metabólitos, frequentemente complica a compreensão da resposta global do sistema metabólico dessas plantas e não define completamente a relação entre as várias perturbações ambientais que modificam o funcionamento dos órgãos. Para resolver esses desafios, metodologias multivariadas de impressão digital foram desenvolvidas e aprimoradas nas últimas décadas como uma ferramenta metabolômica por meio de técnicas espectroscópicas, espectrométricas e cromatográficas (Alonso et al., 2015; Gallo and Ferranti, 2016).

O metaboloma da planta é amplamente considerado o mais complexo do mundo vivo, devido à presença de metabólitos primários e especialmente secundários (Dunn and Ellis, 2005). A impressão digital metabolômica por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de <sup>1</sup>H) oferece a detecção de uma ampla variedade de metabólitos e fornece uma assinatura metabólica instantânea para o extrato vegetal (Kim et al., 2010). Essa assinatura pode estar relacionada as diferentes condições climáticas que as plantas podem estar submetidas durante seu desenvolvimento. Devido às grandes vantagens inerentes à técnica de RMN (Pontes et al., 2017), esta é usada atualmente como um dos principais métodos para definir controles de qualidade (Gall et al., 2004; Minoja and Napoli, 2014), procurar marcadores (Gebregiworgis and Powers, 2012), impressão digital (Locci et al., 2011; Porzel et al., 2014), entre outras aplicações. Na impressão digital metabólica baseada em RMN de <sup>1</sup>H, quanto maior o número de espécies químicas presentes na assinatura, a robustez aumenta e o domínio experimental da

análise metabólica sob diferentes condições de cultivo de espécies vegetais torna-se mais informativo.

Nosso grupo de pesquisa implementou o planejamento estatístico de misturas como uma ferramenta de preparação de amostra para extração e consequente impressão digital juntamente com várias técnicas espectroscópicas, espectrométricas e cromatográficas (Marcheafave et al., 2020a, 2020b; Soares et al., 2018). A variação nas propriedades químicas de solventes puros e suas misturas fornecem impressões digitais com diferentes características e quando combinadas podem melhor representar a condição instantânea do metaboloma da planta quando comparadas a um único solvente ou mistura, resultando em conjuntos de dados mais complexos (Afonso et al., 2019; Tormena et al., 2019a). Após a aquisição das impressões digitais provenientes do planejamento de misturas, o conjunto de dados metabolômicos complexos contém uma grande quantidade de deslocamentos químicos. Para determinar os efeitos dos fatores ambientais e suas interações na expressão do metaboloma, são necessários experimentos multifatoriais em campo, que por fim, aumentam as variações dentro do conjunto de dados espectrais (Jansen et al., 2005; Zwanenburg et al., 2011). Para definir os fatores ambientais que mais impactam a composição química do sistema, a análise de variância (ANOVA) - análise de componente simultânea (do inglês, *analysis of variance - simultaneous component analysis*; ASCA) é utilizada como ferramenta exploratória (Jansen et al., 2005). Além disso, métodos supervisionados, como análise discriminante por mínimos quadrados parciais (do inglês, *partial least squares-discriminant analysis*; PLS-DA), podem ser aplicados ao conjunto de dados, classificando as amostras devido ao efeito ambiental significativo e assim reduzir a complexidade da modelagem matemática. Portanto, o conjunto de todas essas ferramentas (planejamento estatístico de misturas, impressões digitais de RMN, ASCA e PLS-DA) supera uma série de dificuldades encontradas no processo de detecção de alterações químicas em sistemas metabólicos complexos, ampliando a faixa de variabilidade dos perfis químicos,

determinando estatisticamente os efeitos e interações significativas e classificando adequadamente as mudanças químicas devido às mudanças climáticas.

Neste estudo, grãos verdes de *Coffea arabica* L. (café arábica) foram coletados no quarto ano de produção sob o experimento FACE em um planejamento fatorial ( $2^2$ ) com níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico e disponibilidade de água no solo. Através do planejamento estatístico de misturas, impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H, ACP, ASCA e PLS-DA, mudanças químicas significativas nos grãos de café devido à disponibilidade de água e níveis elevados de CO<sub>2</sub> podem ser determinadas com segurança. Os principais objetivos são: 1) aplicar o planejamento de mistura como uma ferramenta de preparação de amostra para aumentar a variabilidade espectral das impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H; 2) usar ACP e ASCA para explorar e determinar quantitativamente a significância estatística dos efeitos principais e de interação nas impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H de grãos de *C. arabica* para os experimentos de planejamento fatorial envolvendo dois níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico e duas disponibilidades de água no solo; 3) detectar as principais alterações metabólicas em grãos de *C. arabica* sob condições de seca e CO<sub>2</sub> elevado a partir da classificação por PLS-DA e 4) testar a capacidade de predição deste modelo PLS-DA usando a variabilidade dos solventes de extração e diferentes localizações dos frutos sobre o perfil vertical dos cafeeiros.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 COLETA DE GRÃOS DE CAFÉ

O dispositivo FACE com café arábica foi localizado na Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna (22°43'S, 47°01'W, 570 m de altitude), São Paulo, Brasil. O experimento FACE foi realizado em plantações de 7 hectares, limitado em 12 parcelas octogonais. Cada octógono continha quatro linhas de plantas, somando 44 plantas para cada parcela (Marcheafave et al., 2020a; Tormena et al., 2019a; Tormena et al., 2019b). Os experimentos foram realizados entre 25 de agosto de 2011 e 30 de junho de 2016. A injeção de CO<sub>2</sub> puro foi limitada a seis parcelas de octógono, mantendo a concentração atmosférica em cerca de 590 µL L<sup>-1</sup>, que foi comparado a seis octógonos mantidos nas atuais condições de CO<sub>2</sub> (390 µL L<sup>-1</sup>) (Fig. B1; anexo B). No último ano de produção do experimento, metade de cada octógono foi irrigada (iniciada em outubro de 2015 até o final de maio de 2016) e a outra metade foi mantida em regime de chuva (considerada seca), dependente do déficit de pressão de vapor e distribuição de chuva (Fig. B1).

Cada baga de café pode conter um ou dois grãos. No quarto ano de produção da cultura do café arábica no âmbito do FACE (2015-2016), as bagas foram colhidas na segunda semana de maio de 2016 (indicado na Fig. B1), em estratificações de 50 cm de espessura dos perfis verticais do cafeeiro (Rakocevic and Matsunaga, 2018). A coleção de bagas continha frutas cereja e verdes juntas (Rakocevic et al., 2020). As bagas foram secas e beneficiadas, resultando em amostras de grãos bem formados.

Para avaliar se os efeitos e/ou interação de dois fatores climáticos na impressão digital metabólica de grãos verde de *C. arabica* são estatisticamente significativos, os experimentos foram executados seguindo um planejamento fatorial completo de dois níveis com dois fatores (2<sup>2</sup>) (Hibbert, 2012; Neto et al., 2010) (Tabela B1). Os fatores considerados foram os níveis de

dióxido de carbono atmosférico (1) e a disponibilidade de água no solo (2). Os níveis de dióxido de carbono foram atuais (-1) e elevados (1) e os níveis de água no solo foram sem (-1) e com (1) irrigação.

## 2.2 REAGENTES

Para extração reagentes de grau analítico, hexano, etanol, diclorometano (Anidrol, Diadema, Brasil) e éter etílico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), foram utilizados. Para a análise de RMN de  $^1\text{H}$ , foi usado dimetilsulfóxido- $d_6$  (DMSO- $d_6$ , Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) com tetrametilsilano (TMS) como referência interna.

## 2.3 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Para maximizar a extração das classes metabólicas e obter um conjunto de impressões digitais que determinem as variações máximas decorrentes das mudanças ambientais, um planejamento estatístico de misturas com quatro componentes consistindo de etanol (*E*), diclorometano (*D*), hexano (*H*) e éter etílico (*e*) foi usado para planejar o processo experimental (Fig. 1). Para diversificar as interações químicas entre a matriz da planta e o solvente de extração, a seleção do solvente foi baseada no triângulo de seletividade de Snyder para solventes (Barwick, 1997). A extração foi realizada de acordo com Marcheafave (2020b). As extrações correspondem a quatro condições de cultivo das plantas de café de acordo com a Tabela B1. Os grãos foram coletados do perfil vertical total da planta e homogeneizados. O ponto central do planejamento de mistura foi realizado em triplicata, resultando em 17 extratos por condição de cultivo. O procedimento de extração ocorreu com 2,50 g de grãos crus moídos de *C. arabica* imersos em 60,0 mL de cada solvente por 60 min em banho de ultrassom Unique a 15 °C. Após a filtração, esse procedimento foi repetido mais quatro vezes. O volume final de

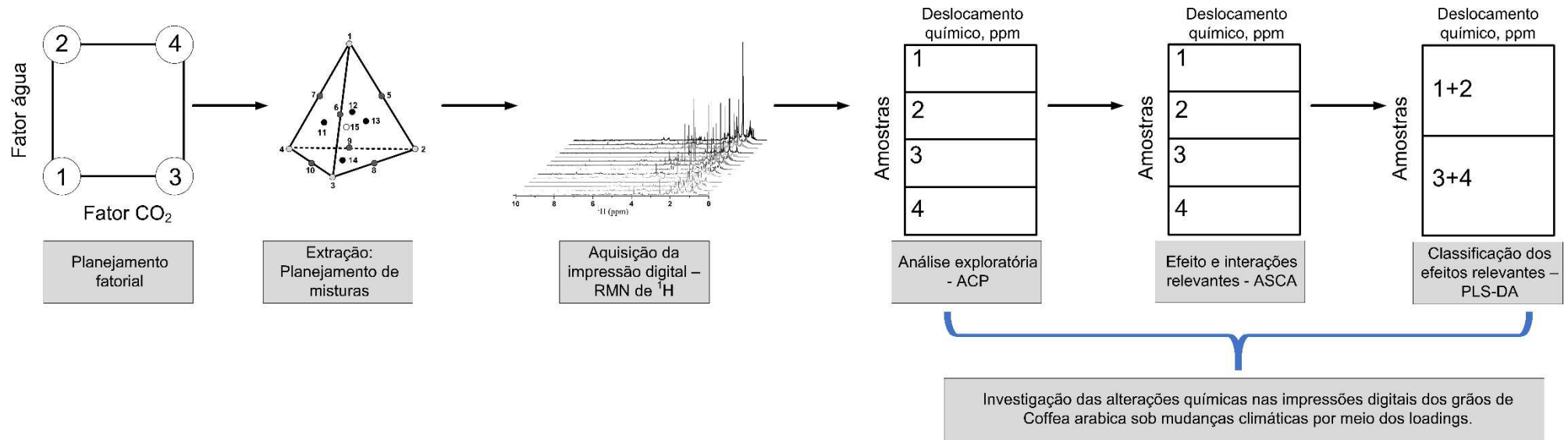


espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados usando a sequência de pulso padrão Bruker (zg30). As análises foram processadas pelo *software* TopSpin 3.6.1 (Bruker). Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  resultantes foram faseados manualmente, corrigidos na linha de base, referenciados ao TMS no deslocamento químico ( $\delta$ ) de 0,0 ppm e salvos no formato de arquivo de dados '.txt' retendo 32,768 pontos de dados por amostra.

## 2.5 PROCESSAMENTO ESPECTRAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Um planejamento fatorial completo de dois níveis com dois fatores ( $2^2$ ) (Hibbert, 2012; Neto et al., 2010) foi delineado, considerando dois níveis de  $\text{CO}_2$  (atual (-1) e elevado (1)) e duas disponibilidades de água no solo (sem (-1) e com (1) irrigação).

Para a análise multivariada, cada espectro de RMN de  $^1\text{H}$  no intervalo entre 0,0177 e 10,9997 ppm foi segmentado em intervalos de deslocamento químico de 0,0006 ppm. O  $\delta$  residual de água e DMSO nas regiões de 3,2867-3,4608 e 2,4703-2,5306 ppm, respectivamente, foram removidos, retendo 17.590 pontos de dados por amostra. Assim, o conjunto de dados foi organizado em uma matriz de 68 extratos (17 extratos para cada condição ambiental listada na Tabela B1)  $\times$  17.590 ppm obtidos por RMN. As ferramentas quimiométricas foram aplicadas à matriz de dados contendo as impressões digitais espectrais, mas antes de construir modelos os dados foram pré-processados de forma adequada para cada método multivariado. O escalonamento de Pareto foi aplicado aos dados espectrais para a ACP (Sarabhai and Centre, 1990) e ASCA (Jansen et al., 2005; Smilde et al., 2005). Para o PLS-DA (Barker and Rayens, 2003) os espectros foram normalizados (inf-Norm, máximo = 1). Após, o filtro de Correção Ortogonal de Sinal (OSC, do inglês, *Orthogonal Signal Correction*) foi usado (Wold et al., 1998). Por fim, os espectros foram centrados na média antes de qualquer análise multivariada. A estratégia de análise experimental e quimiométrica é resumida na Fig. 2.



**Fig. 2.** Estratégia experimental e análise de dados. Efeitos dos fatores da mudança climática em grãos de *Coffea arabica* coletados de plantas cultivadas em dispositivo de Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (FACE). Delineamento fatorial do experimento: **1**-para grãos de café cultivados sob CO<sub>2</sub> atual (-) e sem irrigação (-); **2**-CO<sub>2</sub> atual (-) e com irrigação (+); **3**-CO<sub>2</sub> elevado (+) e sem irrigação (-); e **4**-CO<sub>2</sub> elevado (+) e com irrigação (+) para extração metabólica usando planejamento estatístico de mistura com quatro componentes. Aquisição de impressões digitais por ressonância magnética nuclear de prótons (RMN de <sup>1</sup>H). Análise exploratória de impressões digitais por Análise de Componentes Principais (ACP) e determinação de efeitos e interações por Análise de Variância (ANOVA) - Análise de Componentes Simultâneos (ASCA). Classificação de impressões digitais com base em efeitos significativos por análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). A estrutura da matriz foi baseada em um planejamento fatorial completo de dois níveis com dois fatores (2<sup>2</sup>).

A ACP foi usada para explorar a adaptação de plantas de *C. arabica* aos efeitos do CO<sub>2</sub> e da disponibilidade de água do solo, com base no metaboloma do grão verde. ACP é uma ferramenta valiosa para a exploração, revelando fontes dominantes de variância nos dados observados, sendo frequentemente usada para impressões digitais metabólicas (Chen et al., 2008; Worley and Powers, 2013). Esse método fornece uma compreensão preliminar dos efeitos provocados em muitas classes de metabólitos e permite a visualização de informações pertinentes do conjunto de dados com apenas alguns componentes principais.

ASCA é uma técnica exploratória para a análise de dados multivariados resultantes de um planejamento experimental (Jansen et al., 2005; Luca et al., 2016; Olmos et al., 2019; Smilde et al., 2005). ASCA usa um modelo ANOVA para primeiro decompor a matriz de dados observada em uma série de matrizes de efeitos aditivos, de acordo com o planejamento experimental. Em seguida, um modelo ACP é ajustado para cada matriz de efeito para extrair e avaliar a contribuição de cada fator experimental (Saccenti et al., 2018; Timmerman et al., 2015). Portanto, um modelo ASCA pode ser explorado e interpretado como um modelo ACP padrão (Saccenti et al., 2018). Neste trabalho, o ASCA foi aplicado para avaliar estatisticamente a significância dos efeitos dos fatores do planejamento fatorial (níveis de dióxido de carbono e disponibilidade de água no solo) e sua interação nas mudanças espectrais dos grãos de *C. arabica*. Para estimar a significância de cada fator, os valores-*p* foram calculados com base no teste de permutação (Vis et al., 2007). Mais informações podem ser encontradas em Hoefsloot et al. (2009).

PLS-DA é uma técnica quimiométrica discriminante que estabelece uma regressão linear entre uma matriz independente (**X**), que são as respostas analíticas, e a matriz ou vetor dependente (**Y** ou **y**, respectivamente), que contém variáveis indicando a classe para a qual cada amostra pertence (Barker and Rayens, 2003; Bevilacqua et al., 2013; Miaw et al., 2018). No vetor dependente (**y**), como no caso deste estudo, o valor 1 é atribuído à amostra que pertence

a uma determinada classe e o valor 0 à outra classe. O método PLS-DA foi usado para discriminar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  entre grãos de *C. arabica* cultivados sob  $\text{CO}_2$  atmosférico elevado e atual e para avaliar o efeito deste fator sobre a impressão digital. Neste trabalho, sensibilidade, especificidade, precisão, eficiência e coeficiente de correlação de Matthews (MCC, do inglês, *Matthews correlation coefficient*) foram usados para avaliar os modelos de classificação obtidos. Mais detalhes podem ser encontrados em Oliveira et. al. (2020), Garreta-Lara et. al. (2018) and Chao et. al. (2014). A seleção do número ótimo de variáveis latentes no PLS-DA foi feita usando o critério de menor erro quadrático médio de validação cruzada (RMSECV, do inglês, *root mean square error of cross-validation*) para as amostras de calibração obtidas pelo método *venetian blinds*.

## 2.6 TESTE DE CAPACIDADE DE PREVISÃO DO MODELO PLS-DA

Testamos a capacidade de previsão do modelo PLS-DA para os efeitos de dois níveis de  $\text{CO}_2$  e duas disponibilidades de água do solo nos perfis metabólicos do grão de café. Esse teste foi realizado usando um conjunto de dados que não fazia parte do conjunto de dados inicial usado para construir o modelo PLS-DA. Os dados foram coletados a partir de amostras de quatro camadas de 50 cm de espessura do perfil vertical dos cafeeiros, como um teste para avaliar a variabilidade ambiental inerente à localização da produção sobre a arquitetura da planta.

Usando o modelo preditivo PLS-DA construído, 22 novas extrações foram realizadas usando apenas grãos coletados de plantas de *C. arabica* cultivadas no nível de  $\text{CO}_2$  atual. Essas extrações foram realizadas selecionando aleatoriamente os solventes de extração do planejamento estatístico de mistura para avaliar o efeito do solvente na classificação correta dessas amostras por meio de impressões digitais de RMN de  $^1\text{H}$ . As informações sobre as camadas de grãos de café e solventes usados são indicadas na Tabela B2.

## 2.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O tratamento dos dados e a análise quimiométrica foram realizados com o *software* Matlab 2016b<sup>®</sup> (The MathWorks Inc., Natick, EUA), utilizando ferramentas do PLS toolbox 8.7<sup>®</sup> (Eigenvector Research Inc., Manson, WA, EUA).

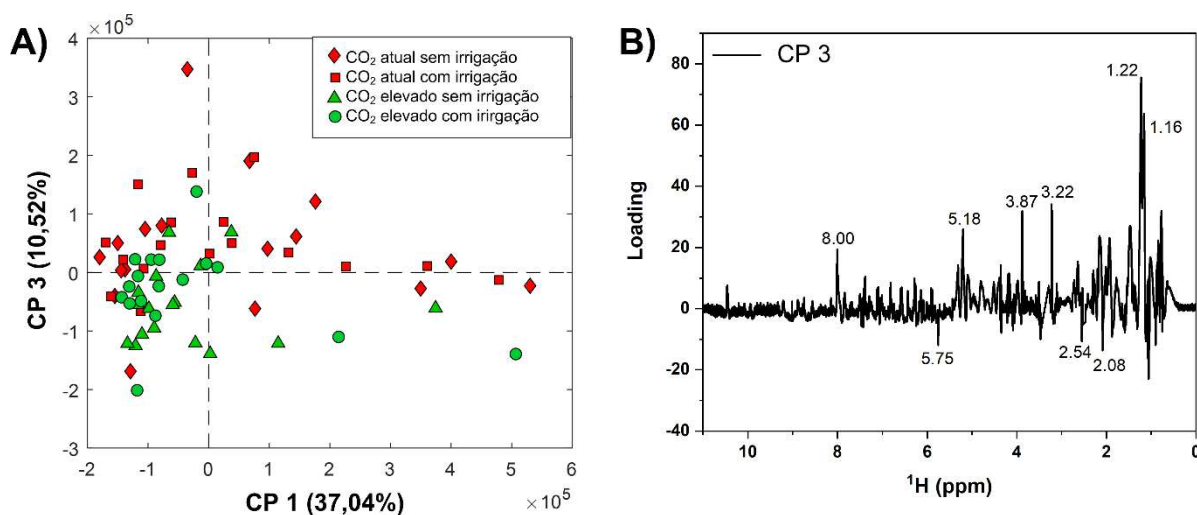
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dois níveis de CO<sub>2</sub> e duas disponibilidades de água no solo foram explorados inicialmente pelo método de análise não supervisionada, neste caso por ACP, realizada em espectros de RMN de <sup>1</sup>H para observar as diferenças naturais entre os grãos de *C. arabica* e as relações entre variáveis e classes. De acordo com a Fig. 3a, a componente principal 1 (CP1) explicou 37,04% da variância total, e CP3 foi responsável por 10,52% da variância dos dados. Não foi possível fazer a distinção entre os fatores experimentais de cultivo estudados em relação a CP1, talvez devido às diferentes proporções dos metabólitos extraídos de acordo com os solventes e suas características e/ou variação natural entre as diferentes amostras. Ao longo da CP3, a formação de dois *clusters* pode ser encontrada, um grupo de escores caracterizando a maioria dos grãos de café sob CO<sub>2</sub> elevado no lado negativo e CO<sub>2</sub> atual no lado positivo.

Os resultados dos escores da ACP mostraram que o fator CO<sub>2</sub> teve relevância no perfil espectral de RMN de <sup>1</sup>H nos grãos de *C. arabica*, e isso foi devido às mudanças nas respostas dos metabólitos frente ao estresse ambiental. (Fig. 3b). Os sinais em 1,16; 1,22; 3,22; 3,87; 5,18-5,19 ppm; e 8,00 ppm tiveram valores positivos ao longo da CP3, como mostrado na Fig. 3b e são relacionados aos grãos de *C. arabica* cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual. A região dos picos em torno de 1,16 e 1,22 ppm pode estar associada à presença de ácidos graxos (Barison et al., 2010; Consonni et al., 2012; Knothe and Kenar, 2004; Toci et al., 2018), que são constituintes comuns em grãos de café (Scholz et al., 2018). Alguns picos presentes nos espectros originais (não mostrados) reforçaram a presença de ácidos graxos, como aqueles em 0,9; 2,3 e 2,7 ppm (Barison et al., 2010; Knothe and Kenar, 2004). Os picos na região entre 3,22 e 3,87 ppm sugerem um perfil de cafeína (Bosco et al., 1999; del Campo et al., 2010; Toci et al., 2018), uma vez que os espectros originais apresentam um pico em 3,50 ppm, possivelmente produzido pelos três grupos N-metil. Além disso, o pico em 7,85 ppm provavelmente corresponde a um

próton aromático (del Campo et al., 2010). O *loading* em 8,00 ppm (Fig. 3b), pode corresponder a trigonelina, sendo suportado pela presença de um tripleto na região de 8,00 ppm, dois dupletos em 8,78 e 8,87 ppm e um singleto a 9,21 ppm, correspondendo a prótons aromáticos, enquanto o sinal em torno de 4,36 ppm está relacionado ao grupo N-metil, observado nos espectros originais dos extratos de alguns solventes extratores (del Campo et al., 2010; Toci et al., 2018). Os picos em 5,18-5,19 ppm podem ser devido à presença de glicose (Abreu et al., 2018; D'Agostina et al., 2004; Hatzakis, 2019; Wei et al., 2014), uma vez que esta região é típica dos hidrogênios anoméricos (D'Agostina et al., 2004).

O gráfico de *loadings* da CP3 mostrou os picos que contribuíram para o agrupamento de grãos de *C. arabica* obtidos de plantas cultivadas sob elevado CO<sub>2</sub> (Fig. 3b). Os valores de *loadings* negativos apontaram os sinais em 2,08; 2,54; e 5,75 ppm. Neste caso, o pico em 2,08 ppm indicou compostos pertencentes às classes de ácido quínico/ácido clorogênico (ACG) (Consonni et al., 2018; Wei et al., 2011, 2010). O sinal em 2,54 ppm também pode estar relacionado a ácidos orgânicos, como o málico (Aguilera-Sáez et al., 2019; Wei et al., 2010), que está presente no café verde (Clarke and Vitzthum, 2001). Finalmente, o sinal em 5,75 ppm pode ser atribuído aos diterpenos como caveol ou cafestol, presentes nos grãos de *C. arabica* (Medina et al., 2017; Monakhova et al., 2015; Okaru et al., 2020; Toci et al., 2018). Essa atribuição foi reforçada pelo deslocamento químico em 4,20 ppm encontrado nos espectros originais, conforme relatado por Williamson and Hatzakis (Williamson and Hatzakis, 2019).



**Fig. 3. A)** Gráfico de escores da análise de componente principal (ACP) de impressões digitais de RMN de  $^1\text{H}$  de grãos de *Coffea arabica* obtidas de plantas cultivadas em um dispositivo de Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (FACE) delineado por um planejamento fatorial completo de dois níveis com dois fatores: níveis de  $\text{CO}_2$  (elevado e atual) e duas disponibilidades de água no solo (com e sem irrigação) e **B)** Gráfico de *loadings* da CP3.

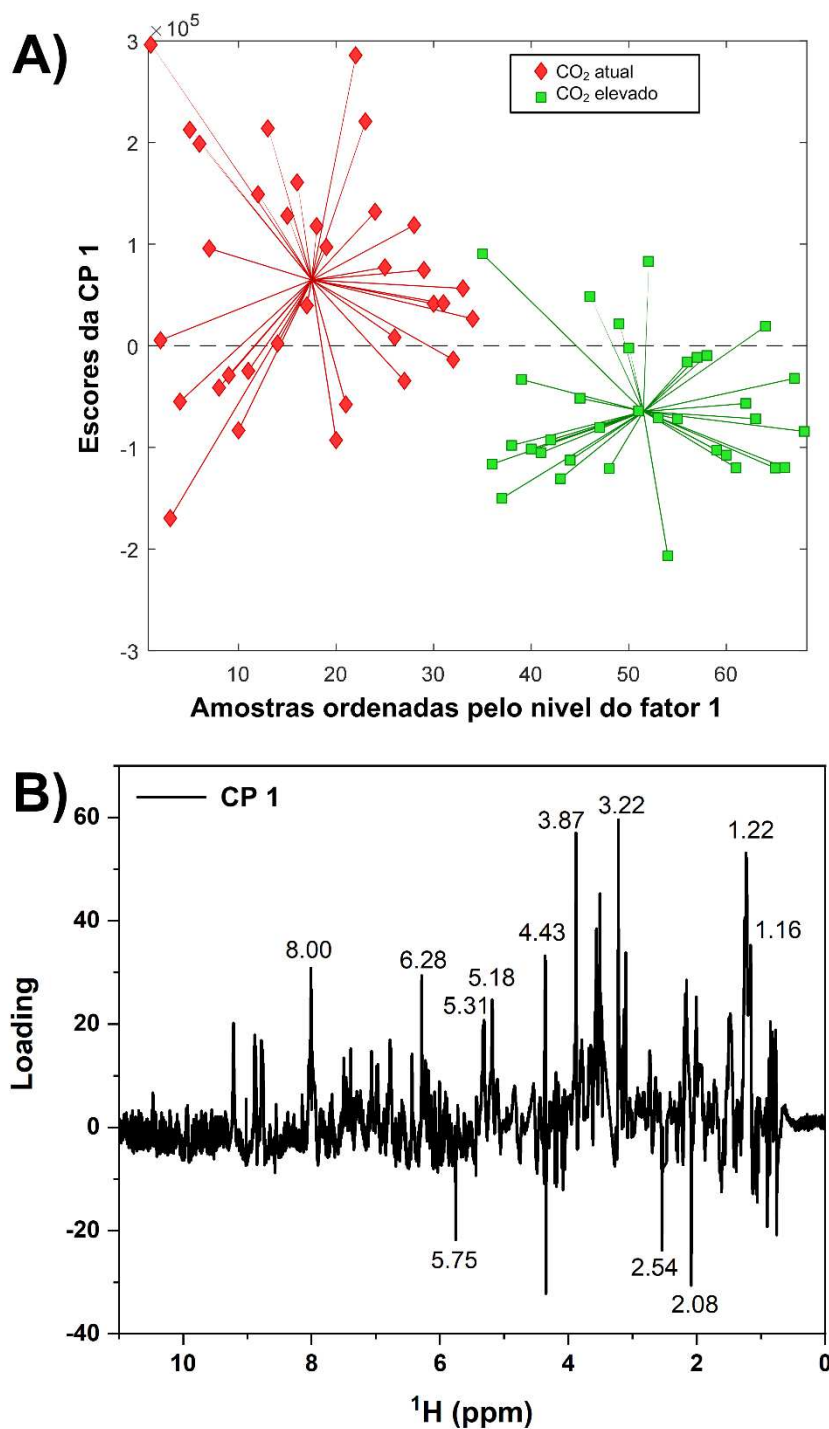
Para verificar se os dois fatores experimentais e sua interação binária têm um efeito significativo nas mudanças das impressões digitais espectrais de RMN de  $^1\text{H}$ , um modelo ASCA com interação foi realizado. A variabilidade na matriz espectral foi particionada pelo ASCA, sendo que a variância total do sinal espectroscópico do RMN foi de 5,1% para o fator  $\text{CO}_2$ , 1,2% para o fator disponibilidade de água no solo, 1,6% para a interação ( $\text{CO}_2 \times$  água), e 92% para os resíduos (Tabela 1). O modelo mostrou que o fator  $\text{CO}_2$  foi significativo com *p*-valor igual a 0,0042, baseado no teste de permutação, que utilizou 10.000 randomizações. A disponibilidade de água no solo e a interação dióxido de carbono  $\times$  disponibilidade de água no solo não foram significativas, com valores de *p* maiores que 0,05, conforme mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados do modelo ASCA para os efeitos de dois níveis de CO<sub>2</sub> (atual e elevado) e dois níveis de disponibilidade de água no solo (com e sem irrigação) nas impressões digitais do grão de *Coffea arabica* obtidas com análise espectral de RMN de <sup>1</sup>H. Valores de  $p < 0,05$  são marcados em negrito.

	CPs	Efeito (%)	<i>p</i> -valor
Níveis de CO <sub>2</sub>	1	5,1	<b>0,0042</b>
Disponibilidade de água no solo	1	1,2	0,4846
Interação (CO <sub>2</sub> × água)	1	1,6	0,3067
Resíduo		92,0	

Os gráficos de escores e *loadings* do submodelo ACP, obtidos por análise ASCA, correspondente aos grãos de *C. arabica* de plantas cultivadas sob os dois níveis de CO<sub>2</sub> são ilustrados na Fig. 4 e mostram uma clara separação para os dois níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico. A maioria dos escores relativos aos grãos de café sob o nível atual de CO<sub>2</sub> teve valores positivos, enquanto os escores daqueles cultivados sob CO<sub>2</sub> elevado apresentou valores negativos (Fig. 4a). Os *loadings* dos modelos (Fig.4b) podem ser usados para relacionar as mudanças em certas regiões espectrais do RMN de <sup>1</sup>H aos efeitos do fator de CO<sub>2</sub> atmosférico, ou seja, elucidar as variáveis espectrais mais sensíveis a este efeito. Os sinais mais relevantes, de acordo com os picos dos *loadings* para os grãos de *C. arabica* obtidos de plantas cultivadas na atmosfera atual de CO<sub>2</sub>, foram em regiões associadas aos ácidos graxos (1,16 e 1,22 ppm) (Barison et al., 2010; Consonni et al., 2012; Knothe and Kenar, 2004; Toci et al., 2018); cafeína (3,22 e 3,87 ppm) (Bosco et al., 1999; del Campo et al., 2010; Toci et al., 2018); glicose (5,18-5,19 ppm) (Abreu et al., 2018; D'Agostina et al., 2004; Hatzakis, 2019; Nunes et al., 2008; Wei et al., 2014); trigonelina (4,43 e 8,00 ppm) (del Campo et al., 2010; Toci et al., 2018), e picos em 5,31 e 6,28 ppm, que sugerem compostos pertencentes à classe dos ácidos clorogênicos (Wei et al., 2010). Para os grãos de *C. arabica* obtidos de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado, os sinais de RMN de <sup>1</sup>H foram relacionados ao ácido quínico/ACGs (2,08ppm) (Consonni et al., 2018; Wei et al., 2011, 2010); ácido málico (2,54 ppm) (Wei et al., 2010) e diterpenos (5,75 ppm) (Medina et

al., 2017; Monakhova et al., 2015; Okaru et al., 2020). Esses são essencialmente os mesmos valores de *loadings* indicados pela ACP.

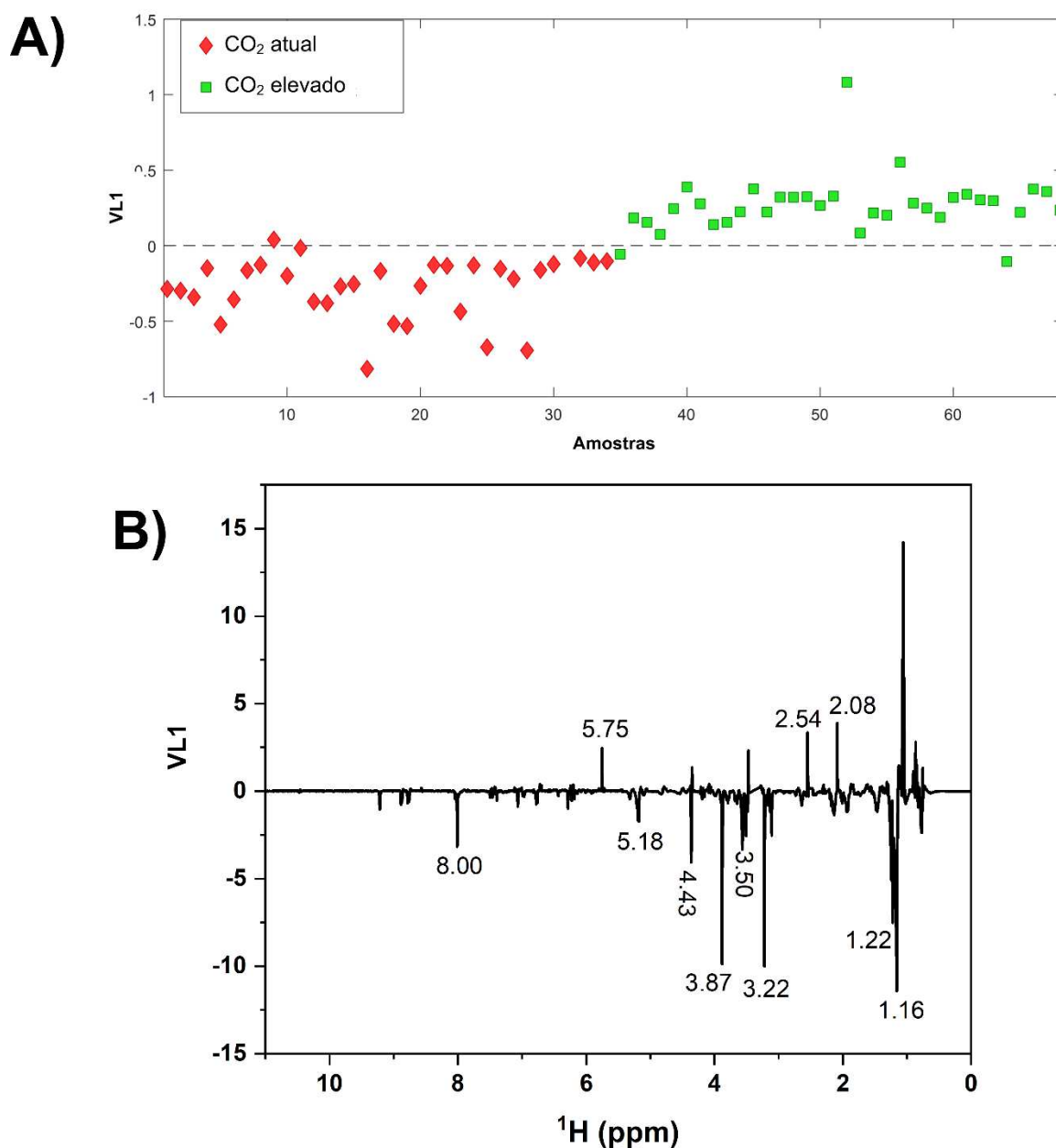


**Fig. 4.** Análise ASCA das impressões digitais de RMN de  $^1\text{H}$  de grãos de *Coffea arabica* cultivados em um dispositivo de Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (FACE) e delineada em um planejamento fatorial com dois níveis de  $\text{CO}_2$  (atual e elevado) e duas disponibilidades de água no solo (com e sem irrigação). **A)** Gráfico de escores para o efeito da concentração de  $\text{CO}_2$  com resíduos projetados e **B)** Gráfico de *loadings* da CP1

Com base nos modelos ACP e ASCA, o método de reconhecimento supervisionado de padrões, PLS-DA, foi aplicado para correlacionar as mudanças dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos grãos obtidos de plantas cultivadas sob os dois níveis de  $\text{CO}_2$ , para verificar as bandas coincidentes com as indicadas pelos modelos mencionados anteriormente. Quatro variáveis latentes (VL) foram necessárias para construir o modelo ideal, representando 66,9% da variância explicada em  $\mathbf{X}$  e 80,6% da variância de  $\mathbf{y}$ . Um bom desempenho de classificação foi alcançado com sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos) e especificidade (taxa de verdadeiros negativos) de 100% para ambas as classes. A exatidão, que mostra a proporção de amostras identificadas corretamente, que nos conjuntos de testes foram iguais a 100%, bem como o índice de eficiência que combina todas as informações transportadas pela sensibilidade e especificidade. O coeficiente de correlação de Matthews dá uma visão geral do comportamento do modelo e foi igual a 1,0, mostrando uma classificação muito boa para as amostras. Os resultados da validação, por validação cruzada, também foram satisfatórios, uma vez que o desempenho da classificação não diminuiu significativamente. Ou seja, sensibilidade igual a 93,9% e 100% para as classes atual e elevada, respectivamente; precisão e eficiência igual ou superior a 97% e MCC igual a 0,94.

Os escores PLS-DA da primeira variável latente mostraram a formação de dois grupos distintos. Os grãos de *C. arabica* obtidos de plantas cultivadas sob condições elevadas de  $\text{CO}_2$  têm valores positivos, enquanto aqueles no nível atual são negativos (Fig. 5a). O gráfico de *loadings* mostra as regiões de RMN de  $^1\text{H}$  que contribuem para a diferenciação entre as classes (Fig. 5b). Sinais relativos ao ácido quínico/ACGs (2,08 ppm) (Consonni et al., 2018; Wei et al., 2010); ácido málico (2,54 ppm) (Wei et al., 2010) e caveol (5,75 ppm) (Medina et al., 2017; Monakhova et al., 2015; Okaru et al., 2020) caracterizaram grãos de *C. arabica* de plantas cultivadas sob  $\text{CO}_2$  elevado (Fig. 5b). Os mesmos metabólitos indicados por ACP e ASCA também foram responsáveis pela discriminação de grãos de *C. arabica* de plantas cultivadas

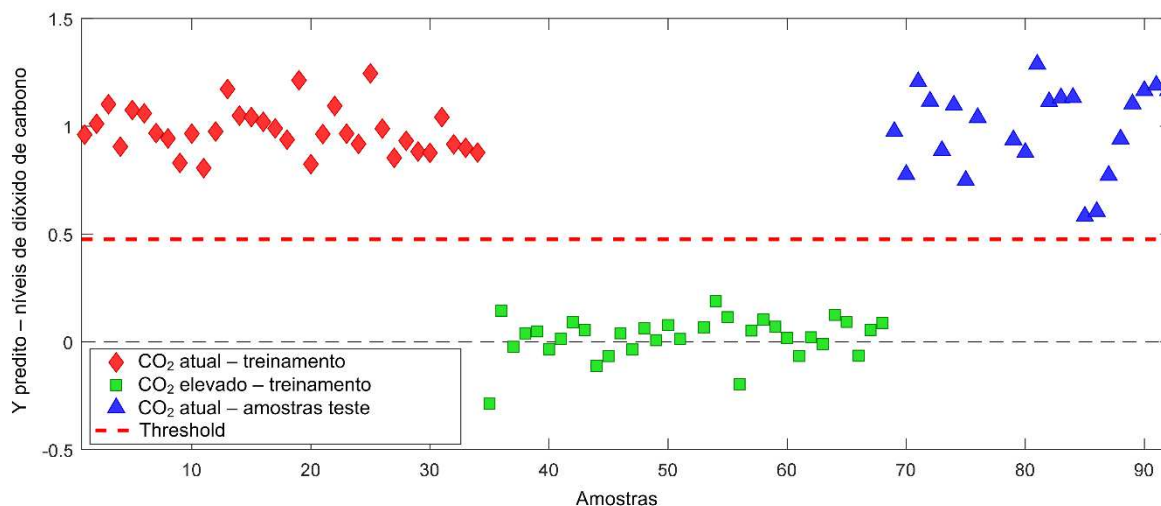
sob o CO<sub>2</sub> atual, ou seja, os ácidos graxos (1,16 e 1,22 ppm) (Barison et al., 2010; Consonni et al., 2012; Knothe and Kenar, 2004; Toci et al., 2018), cafeína (3,22, 3,50 e 3,87 ppm) (Bosco et al., 1999; del Campo et al., 2010; Toci et al., 2018), glicose (5,18-5,19 ppm) (Abreu et al., 2018; D'Agostina et al., 2004; Hatzakis, 2019; Nunes et al., 2008; Wei et al., 2014) e trigonelina (4,43 and 8,00 ppm) (Barison et al., 2010; Toci et al., 2018). A importância da variável química na projeção (VIP, do inglês, *variable importance in projection*) acima do limite de 1,0 indica a contribuição espectral significativa para o modelo PLS-DA. (Fig. B2). Dentre as diversas regiões apontadas pelos escores VIP, a maioria também foi apontada pelos *loadings* do PLS-DA.



**Fig. 5.** Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). **A)** Gráfico de escores das impressões digitais de RMN de  $^1\text{H}$  de grãos de *Coffea arabica* obtidas de plantas cultivadas em um dispositivo de Enriquecimento de Dióxido de Carbono ao Ar Livre (FACE) sob dois níveis de  $\text{CO}_2$  (atual e elevado); **B)** Gráfico de loadings para VL1.

Novas amostras foram preparadas e investigadas para testar a capacidade de predição do modelo PLS-DA para os dois níveis de  $\text{CO}_2$  e duas disponibilidades de água no solo. Todas as amostras foram classificadas como cultivadas sob  $\text{CO}_2$  atual, independentemente dos solventes de extração e do perfil vertical da planta em que os grãos foram coletados. (Fig. 6).

Além disso, o modelo também mostrou a importância do fator CO<sub>2</sub>, que apresentou bons parâmetros de classificação



**Fig. 6.** Inclusão de grãos de *Coffea arabica* coletados ao longo do perfil vertical de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual nas previsões do modelo PLS-DA de impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H e classificação dos dois grupos de amostras.

Como se sabe, o aumento do CO<sub>2</sub> atmosférico pode atuar mitigando os efeitos de estressores abióticos, como temperatura elevada ou seca (Marcheafave et al., 2020b; Ramalho et al., 2018). Em plantas de *C. arabica*, o elevado CO<sub>2</sub> atmosférico influencia as taxas de fotossíntese foliar (Damatta et al., 2016; Rakocevic et al., 2018), área foliar (Rakocevic and Matsunaga, 2018), condutância estomática (Ghini et al., 2015; Rakocevic et al., 2018), eficiência do uso da água (Rakocevic et al., 2018), entre outros, mas vale ressaltar que diferentes genótipos de café podem responder de maneira particular quanto a este efeito. (Ghini et al., 2015; Martins et al., 2016; Ramalho et al., 2013; Scotti-Campos et al., 2019). Especificamente em grãos crus de café, ainda existem poucos dados sobre o impacto nas mudanças metabólicas em resposta ao enriquecimento de CO<sub>2</sub> em relação ao nível atual. Além disso, poucos pesquisadores encontraram um efeito de mitigação de CO<sub>2</sub> sobre a seca na composição química dos grãos de *C. arabica*. Recentemente, foi detectada a interação entre as concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> e os fatores de disponibilidades de água no solo, que podem ser configurados como mitigação da seca, por meio de impressões digitais metabólicas espectrais

na região do UV para grãos de *C. arabica* (Marcheafave et al., 2020b). Nessa região espectral, bandas de grupos cromóforos são fortemente sobrepostas e poucos metabólitos podem ser detectados ou caracterizados com base em perfis espectrais de espécies químicas. Como poucas espécies químicas foram detectadas pelo perfil de UV, provavelmente, estas foram as principais responsáveis pelo efeito de mitigação. Embora a interação entre a disponibilidade de água e CO<sub>2</sub> seja importante no processo de mitigação da seca no cafeeiro, não foi evidenciada pelos resultados de RMN de <sup>1</sup>H. A análise espectral de RMN de <sup>1</sup>H, tem a capacidade de analisar a identidade, estrutura, concentração e comportamento de inúmeras moléculas simultaneamente devido à sua ampla janela de deslocamentos químicos. Em comparação com os espectros de UV dos extratos da mistura binária de etanol-diclorometano e etanol puro (Marcheafave et al., 2020b), as impressões digitais provenientes do planejamento de mistura de RMN de <sup>1</sup>H fornecem uma maior variedade de informações sobre as classes de metabólitos. Talvez por isso os compostos correspondentes aos sinais de RMN, discutidos nesta pesquisa, tenham respondido significativamente ao efeito do CO<sub>2</sub>, mas não para a água e sua interação (CO<sub>2</sub> × água).

Métodos quimiométricos distintos aplicados aos espectros de RMN de <sup>1</sup>H mostraram que o CO<sub>2</sub> atmosférico teve um efeito proeminente nas mudanças metabólicas em grãos crus de café. Os deslocamentos químicos de RMN de <sup>1</sup>H contidos nos *loadings* (Figs. 3b, 4b, 5b) fornecidos por ACP, ASCA e PLS-DA, mostraram bandas espectrais coincidentes para a discriminação de grãos de café nos dois níveis de CO<sub>2</sub>. Isso sugere que os metabólitos correspondentes, ácido quínico/ACGs, ácido málico e caveol, podem ser usados como potenciais marcadores dos efeitos produzidos por um nível de CO<sub>2</sub> elevado.

Deslocamentos químicos característicos para cafeína e trigonelina em grãos de *C. arabica* foram encontradas em plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual, indicando que esses grãos podem fornecer bebidas mais energéticas em comparação com aqueles em condições de CO<sub>2</sub>

elevado. A quantidade de cafeína e trigonelina também foi menor em grãos de plantas cultivadas sob elevado CO<sub>2</sub> e expostas a temperaturas elevadas nos últimos estágios de maturação dos frutos. (Ramalho et al., 2018). Ambos os metabólitos contribuem para a percepção geral do aroma tanto dos grãos de café torrados quanto da bebida de café, sendo que a cafeína influencia a percepção de intensidade, corpo e amargor da bebida (Sunarharum et al., 2014). Embora a trigonelina também seja um precursor de compostos de sabor/aroma no café e sofra degradação significativa durante a torra, altos teores de trigonelina e seus derivados voláteis, especialmente pirróis, foram relatados para cafés de baixa qualidade (Farah et al., 2019). Os sinais de ácidos graxos também discriminaram grãos de *C. arabica* coletados de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual, assim os ácidos graxos não são prevalentes em grãos cultivados em uma atmosfera de CO<sub>2</sub> elevado. O aumento da participação de frutas verdes no cafeeiro e menores concentrações de lipídios nestes grãos (nas quais os ácidos graxos fazem parte) são detectadas sob níveis de CO<sub>2</sub> elevados em comparação aos níveis normais (Rakocevic et al., 2020), sugerindo florescimento tardio ou amadurecimento prolongado.

Por último, a região da glicose também foi importante para a discriminação com sinais positivos para grãos de plantas cultivadas sob o CO<sub>2</sub> atual (Figs. 3b, 4b, 5b). Sob CO<sub>2</sub> elevado, normalmente ocorre o aumento na concentração de carboidratos não estruturais totais (amido, frutano, sacarose, etc.), visto nas folhas de várias espécies de plantas (Poorter et al., 1997). Esses carboidratos são usados para produzir todas as cadeias de carbono nas plantas, incluindo metabólitos primários e secundários, usando a glicose necessária para as estruturas químicas das moléculas e também para a produção de NAD(P)H e ATP para conduzir as várias reações biossintéticas. A glicose livre tende ser mais abundante nos grãos de café nos níveis atuais, em vez de CO<sub>2</sub> elevado, o que poderia ser atribuído a maior glicose necessária para a produção de NAD(P)H e ATP no amadurecimento avançado dos frutos (Rakocevic et al., 2020).

A região com sinais característicos para o ácido quínico, indicada pelos *loadings*, para grãos cultivados sob níveis elevados de CO<sub>2</sub> pode ser decorrente do processo de amadurecimento (Figs. 3b, 4b, 5b). A presença desse sinal de ácido quínico pode indicar a presença de compostos com estruturas semelhantes, como a classe do ácido clorogênico, já conhecida e bem estabelecida em grãos de café crus (Zanin et al., 2016). Os grãos de café de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado tiveram maturação atrasada em comparação com os grãos cultivados no nível atual de CO<sub>2</sub> (Rakocevic et al., 2020), o que justificaria uma maior sensibilidade desses sinais em amostras cultivadas nesta condição atmosférica. O ácido málico também discriminou os grãos de café cultivados sob CO<sub>2</sub> elevado. Esse ácido orgânico está presente nas fases de desenvolvimento dos grãos de café e durante a maturação sua concentração diminui (Rogers et al., 1999). O fato de grãos sob CO<sub>2</sub> elevado apresentarem atraso na maturação (Rogers et al., 1999), poderia explicar a maior presença de ácido málico. Como o pico em 2,54 ppm é muito fraco no espectro original (não mostrado) de grãos cultivados sob CO<sub>2</sub> atual, isso reforçaria a hipótese de atraso de maturação. Sobre os diterpenos, estudos quantitativos envolvendo sua formação em condições de CO<sub>2</sub> elevado são escassos. Grãos de plantas de *C. arabica* cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado sem irrigação são discriminadas por bandas de cafestol e caveol na região do UV, enquanto, quando irrigadas, estas têm valores de *loadings* superiores em grãos de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual (Marcheafave et al., 2020b). Os resultados investigando impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H demonstraram que *loadings* de cafestol e caveol são encontradas em grãos de plantas cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado, independente da disponibilidade de água.

A aplicação das diferentes ferramentas quimiométricas mostraram regiões espectrais coincidentes. Cada sinal/região corresponde a um metabólito ou classe correspondente, e como já se sabe, os solventes utilizados possuem características que podem ou não extrair determinados metabólitos e sua combinação pode ter efeitos sinérgicos ou antagônicos,

dependendo da matriz vegetal em estudo (Garcia et al., 2010; Guizzellini et al., 2018; Marcheafave et al., 2019; Moreira and Scarminio, 2013; Pauli et al., 2016). Ao trabalhar com impressões digitais espectrais, a gama de metabólitos analisados pode ser aumentada, dependendo dos solventes utilizados, ou até mesmo alguns sinais podem ser atenuados nas diversas regiões espectrais. Isso indica que esse tipo de estudo de extração pode permitir uma análise mais rica em respostas. Em nossa pesquisa, podemos ver que alguns solventes ou combinações foram destacados com determinados metabólitos. No caso de extratos obtidos por éter etílico puro e suas misturas sem a presença de etanol, espectros mais seletivos para ácidos graxos são encontrados, bem como para extratos com hexano. Extratos obtidos de diclorometano puro apresentaram seletividade para ácidos graxos e metilxantinas. Os espectros do etanol foram menos seletivos, apresentando ampla classe de metabólitos extraídos e sinergismo de suas interações com solventes como diclorometano e hexano. Ao trabalhar com uma variedade de solventes, obtém-se uma maior cobertura espectral, ao contrário, ao executar extrações com um único solvente, poucos ou limitados sinais podem ser detectados.

## 4 CONCLUSÃO

Alterações nas impressões digitais metabólicas de RMN de  $^1\text{H}$  de grãos de *C. arabica* foram aplicadas para a exploração dos efeitos do  $\text{CO}_2$  atmosférico e disponibilidade de água no solo, delineados por planejamento fatorial. Os modelos ACP e ASCA forneceram evidências de que o  $\text{CO}_2$  atmosférico teve um efeito significativo e proeminente nas mudanças metabólicas nos grãos de café crus em comparação com o efeito da água e da interação  $\text{CO}_2 \times$  água, o que foi confirmado pelo método PLS-DA. Esses três métodos quimiométricos mostraram que ácidos graxos, cafeína, trigonelina e glicose discriminam grãos de *C. arabica* coletados de plantas cultivadas sob os níveis atuais de  $\text{CO}_2$ . Ácido quinico/ácidos clorogênicos, ácido málico e caveol/cafestol foram importantes para os grãos de café sob atmosfera elevada de  $\text{CO}_2$ , provavelmente devido ao seu processo de amadurecimento retardado, e poderiam ser usados como potenciais marcadores dos efeitos produzidos por esta condição. Além disso, o modelo PLS-DA apresentou boa capacidade de predição independentemente dos solventes de extração e do perfil vertical da planta em que os grãos foram coletados. Por fim, esta pesquisa mostrou que ao trabalhar com o planejamento estatístico de mistura de solventes, a faixa de metabólitos analisados pode ser aumentada, com alguns metabólitos sendo atenuados e outros detectados, permitindo análises de respostas mais informativas.

## REFERÊNCIAS

- Abdalla Filho, A.L., Costa, G.T., Lima, P.M.T., Soltangheisi, A., Abdalla, A.L., Ghini, R., Piccolo, M.C., 2019. Fiber fractions, multielemental and isotopic composition of a tropical C4 grass grown under elevated atmospheric carbon dioxide. *PeerJ* 7:e5932. <https://doi.org/10.7717/peerj.5932>
- Abreu, A.C., Aguilera-Sáez, L.M., Peña, A., García-Valverde, M., Marín, P., Valera, D.L., Fernández, I., 2018. NMR-Based metabolomics approach to study the influence of different conditions of water irrigation and greenhouse ventilation on zucchini crops. *J. Agric. Food Chem.* 66, 8422–8432. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02590>
- Afonso, S., Silva, F., Marchefave, G., Hatumura, P., Bruns, R., Scarminio, I., 2019. Influence of seasonality and sunlight effects on *Rollinia mucosa* leaves fingerprint. *J. Braz. Chem. Soc.* 30, 968-977. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180242>
- Aguilera-Sáez, L.M., Arrabal-Campos, F.M., Callejón-Ferre, Á.J., Suárez Medina, M.D., Fernández, I., 2019. Use of multivariate NMR analysis in the content prediction of hemicellulose, cellulose and lignin in greenhouse crop residues. *Phytochemistry* 158, 110–119. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.11.013>
- Ainsworth, E.A., Lemonnier, P., Wedow, J.M., 2020. The influence of rising tropospheric carbon dioxide and ozone on plant productivity. *Plant Biol.* 22, 5–11. <https://doi.org/10.1111/plb.12973>
- Alonso, A., Marsal, S., Julià, A., 2015. Analytical methods in untargeted metabolomics: State of the art in 2015. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 3, 1–20. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2015.00023>
- Barison, A., Da Silva, C.W.P., Campos, F.R., Simonelli, F., Lenz, C.A., Ferreira, A.G., 2010. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 48, 642–650.

<https://doi.org/10.1002/mrc.2629>

- Barker, M., Rayens, W., 2003. Partial least squares for discrimination. *J. Chemom.* 17, 166–173. <https://doi.org/10.1002/cem.785>
- Barwick, V.J., 1997. Strategies for solvent selection - A literature review. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 16, 293–309. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00039-3)
- Bazzaz, F.A., 1990. The response of natural ecosystems to the rising global CO<sub>2</sub> levels. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 21, 167–196. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.21.110190.001123>
- Bevilacqua, M., Bucci, R., Magrì, A.D., Magrì, A.L., Nescatelli, R., Marini, F., 2013. Classification and Class-Modelling, in: Marini, F (Ed.), *Data Handling in Science and Technology*. Elsevier, Amsterdam, pp. 171–233. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59528-7.00005-3>
- Bosco, M., Toffanin, R., Palo, D. de, Zatti, L., Segre, A., 1999. High-resolution <sup>1</sup>H NMR investigation of coffee. *J. Sci. Food Agric.* 79, 869–878. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990501\)79:6<869::AID-JSFA302>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990501)79:6<869::AID-JSFA302>3.0.CO;2-6)
- Cernusak, L.A., Haverd, V., Brendel, O., Le Thiec, D., Guehl, J.M., Cuntz, M., 2019. Robust response of terrestrial plants to rising CO<sub>2</sub>. *Trends Plant Sci.* 24, 578–586. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.04.003>
- Chao, L., Mei, H., Pan, X., Tan, W., Liu, T., Yang, L., 2014. Combinations of fragment descriptors for improved prediction of CYP2C19 inhibitors. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 130, 109–114. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2013.10.013>
- Chen, Y., Zhu, S.-B., Xie, M.-Y., Nie, S.-P., Liu, W., Li, C., Gong, X., Wang, Y.-X., 2008. Quality control and original discrimination of *Ganoderma lucidum* based on high-performance liquid chromatographic fingerprints and combined chemometrics methods. *Anal. Chim. Acta* 3, 146–156. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.06.018>

- Clapp, J., Newell, P., Brent, Z.W., 2018. The global political economy of climate change, agriculture and food systems. *J. Peasant Stud.* 45, 80–88. <https://doi.org/10.1080/03066150.2017.1381602>
- Clarke, R., Vitzthum, O.G., 2001. *Coffee: Recent Developments*, 1<sup>st</sup> ed. Wiley-Blackwell.
- Consonni, R., Cagliani, L.R., Cogliati, C., 2012. NMR based geographical characterization of roasted coffee. *Talanta* 88, 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.11.010>
- Consonni, R., Polla, D., Cagliani, L.R., 2018. Organic and conventional coffee differentiation by NMR spectroscopy. *Food Control* 94, 284–288. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.013>
- D'Agostina, A., Boschini, G., Bacchini, F., Arnoldi, A., 2004. Investigations on the high molecular weight foaming fractions of espresso coffee. *J. Agric. Food Chem.* 52, 7118–7125. <https://doi.org/10.1021/jf049013c>
- Damatta, F.M., Godoy, A.G., Menezes-Silva, P.E., Martins, S.C.V., Sanglard, L.M.V.P., Morais, L.E., Torre-Neto, A., Ghini, R., 2016. Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO<sub>2</sub> enrichment conditions: Disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *J. Exp. Bot.* 67, 341–352. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv463>
- del Campo, G., Berregi, I., Caracena, R., Zuriarrain, J., 2010. Quantitative determination of caffeine, formic acid, trigonelline and 5-(hydroxymethyl)furfural in soluble coffees by <sup>1</sup>H NMR spectrometry. *Talanta* 81, 367–371. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.12.010>
- Dunn, W.B., Ellis, D.I., 2005. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 24, 285–294. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>
- Farah, A., Ferreira, T., Vieira, A.C., 2019. Trigonelline and Derivatives, in: Farah, A. (Ed.), *Coffee: Production, Quality and Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, pp. 627–640.

- Gall, G. Le, Colquhoun, I.J., Defernez, M., 2004. Metabolite profiling using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L.). *J. Agric. Food Chem.* 52, 692–700. <https://doi.org/10.1021/jf034828r>
- Gallo, M., Ferranti, P., 2016. The evolution of analytical chemistry methods in foodomics. *J. Chromatogr. A* 1428, 3–15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.09.007>
- Garcia, L.M.Z., Oliveira, T.F. de, Soares, P.K., Bruns, R.E., Scarminio, I.S., 2010. Statistical mixture design — Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 103, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2010.04.016>
- Garreta-Lara, E., Campos, B., Barata, C., Lacorte, S., Tauler, R., 2018. Combined effects of salinity, temperature and hypoxia on *Daphnia magna* metabolism. *Sci. Total Environ.* 610–611, 602–612. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.05.190>
- Gebregiworgis, T., Powers, R., 2012. Application of NMR metabolomics to search for human disease biomarkers. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 15, 595–610. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Ghini, R., Torre-Neto, A., Dentzien, A.F.M., Guerreiro-Filho, O., Iost, R., Patrício, F.R.A., Prado, J.S.M., Thomaziello, R.A., Bettioli, W., DaMatta, F.M., 2015. Coffee growth, pest and yield responses to free-air  $\text{CO}_2$  enrichment. *Clim. Change* 132, 307–320. <https://doi.org/10.1007/s10584-015-1422-2>
- Guizellini, F.C., Marcheafave, G.G., Rakocevic, M., Bruns, R.E., Scarminio, I.S., Soares, P.K., 2018. PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprint investigation of reference and crossed coffees. *Food Res. Int.* 113, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.070>
- Hatzakis, E., 2019. Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy in food science: A comprehensive review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 18, 189–220. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12408>

- Hibbert, D.B., 2012. Experimental design in chromatography: A tutorial review. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 910, 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.01.020>
- Hoefsloot, H.C.J., Vis, D.J., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., Jansen, J.J., 2009. Multiset Data Analysis: ANOVA Simultaneous Component Analysis and Related Methods, in: *Comprehensive Chemometrics*. Elsevier, pp. 453–472. <https://doi.org/10.1016/B978-044452701-1.00054-5>
- International Renewable Energy Agency, 2010. *Global renewables outlook, 2010th ed.* IRENA, Abu Dhabi. <https://doi.org/978-92-9260-238-3>
- Jansen, J.J., Hoefsloot, H.C.J., Van Der Greef, J., Timmerman, M.E., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., 2005. ASCA: Analysis of multivariate data obtained from an experimental design. *J. Chemom.* 19, 469–481. <https://doi.org/10.1002/cem.952>
- Kim, H.K., Choi, Y.H., Verpoorte, R., 2010. NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat. Protoc.* 5, 536–549. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.237>
- Knothe, G., Kenar, J.A., 2004. Determination of the fatty acid profile by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 88–96. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200300880>
- Locci, E., Piras, C., Mereu, S., Marincola, F.C., Scano, P., 2011. <sup>1</sup>H NMR metabolite fingerprint and pattern recognition of mullet (*Mugil cephalus*) bottarga. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9497–9505. <https://doi.org/10.1021/jf2012979>
- Luca, S. de, Filippis, M. de, Bucci, R., Magrì, A.D., Magrì, A.L., Marini, F., 2016. Characterization of the effects of different roasting conditions on coffee samples of different geographical origins by HPLC-DAD, NIR and chemometrics. *Microchem. J.* 129, 348–361. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.07.021>
- Marcheafave, G., Tormena, C., Afonso, S., Rakocevic, M., Bruns, R., Scarminio, I., 2019. Integrated chemometric approach to optimize sample preparation for detecting metabolic

- changes provoked by abiotic stress in *Coffea arabica* L. leaf fingerprints. J. Braz. Chem. Soc. 30, 2085-2094. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190068>
- Marcheafave, G.G., Pauli, E.D., Tormena, C.D., Mattos, L.E., de Almeida, A.G., Rakocevic, M., Bruns, R.E., Scarminio, I.S., 2020a. Irrigated and CO<sub>2</sub> level effects on metabolism in *Coffea arabica* beans from mixture design – near infrared fingerprints. Microchem. J. 152, 104276. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104276>
- Marcheafave, G.G., Pauli, E.D., Tormena, C.D., Ortiz, M.C. V., de Almeida, A.G., Rakocevic, M., Bruns, R.E., Scarminio, I.S., 2020b. Factorial design fingerprint discrimination of *Coffea arabica* beans under elevated carbon dioxide and limited water conditions. Talanta 209, 120591. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120591>
- Martins, M.Q., Rodrigues, W.P., Fortunato, A.S., Leitão, A.E., Rodrigues, A.P., Pais, I.P., Martins, L.D., Silva, M.J., Reboredo, F.H., Partelli, F.L., Campostrini, E., Tomaz, M.A., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.J.C., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C., 2016. Protective response mechanisms to heat stress in interaction with high [CO<sub>2</sub>] conditions in *Coffea* spp. Front. Plant Sci. 7, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00947>
- McGrath, J.M., Lobell, D.B., 2013. Regional disparities in the CO<sub>2</sub> fertilization effect and implications for crop yields. Environ. Res. Lett. 8, 1–9. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/1/014054>
- Medina, J., Caro Rodríguez, D., Arana, V.A., Bernal, A., Esseiva, P., Wist, J., 2017. Comparison of attenuated total reflectance mid-infrared, near infrared, and <sup>1</sup>H-nuclear magnetic resonance spectroscopies for the determination of coffee's geographical origin. Int. J. Anal. Chem. 2017, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2017/7210463>
- Miaw, C.S.W., Sena, M.M., Souza, S.V.C. de, Callao, M.P., Ruisanchez, I., 2018. Detection of adulterants in grape nectars by attenuated total reflectance Fourier-transform mid-infrared

- spectroscopy and multivariate classification strategies. *Food Chem.* 266, 254–261.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.006>
- Minoja, A.P., Napoli, C., 2014. NMR screening in the quality control of food and nutraceuticals. *Food Res. Int.* 63, 126–131. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.056>
- Miyagi, A., Uchimiya, H., Kawai-Yamada, M., 2017. Synergistic effects of light quality, carbon dioxide and nutrients on metabolite compositions of head lettuce under artificial growth conditions mimicking a plant factory. *Food Chem.* 218, 561–568.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.102>
- Monakhova, Y.B., Ruge, W., Kuballa, T., Ilse, M., Winkelmann, O., Diehl, B., Thomas, F., Lachenmeier, D.W., 2015. Rapid approach to identify the presence of Arabica and Robusta species in coffee using  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy. *Food Chem.* 182, 178–184.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.02.132>
- Montzka, S.A., Dlugokencky, E.J., Butler, J.H., 2011. Non-CO<sub>2</sub> greenhouse gases and climate change. *Nature* 476, 43–50. <https://doi.org/10.1038/nature10322>
- Moreira, I., Scarminio, I.S., 2013. Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. *Talanta* 107, 416–22. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.053>
- Nagelkerken, I., Connell, S.D., 2015. Global alteration of ocean ecosystem functioning due to increasing human CO<sub>2</sub> emissions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 13272–13277.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1510856112>
- Neto, B.B., Scarminio, I.S., Bruns, R.E., 2010. *Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria*, 4th ed. Bookman, Porto Alegre.
- Nunes, F.M., Reis, A., Silva, A.M.S., Domingues, M.R.M., Coimbra, M.A., 2008. Rhamnoarabinosyl and rhamnoarabinoarabinosyl side chains as structural features of coffee arabinogalactans. *Phytochemistry* 69, 1573–1585.

<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.01.021>

- Okaru, A.O., Scharinger, A., De Rezende, T.R., Teipel, J., Kuballa, T., Walch, S.G., Lachenmeier, D.W., 2020. Validation of a quantitative proton nuclear magnetic resonance spectroscopic screening method for coffee quality and authenticity (NMR coffee screener). *Foods* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3390/foods9010047>
- Oliveira, V.M.A.T., Baqueta, M.R., Março, P.H., Valderrama, P., 2020. Authentication of organic sugars by NIR spectroscopy and partial least squares with discriminant analysis. *Anal. Methods* 12, 701–705. <https://doi.org/10.1039/C9AY02025J>
- Olmos, V., Marro, M., Loza-Alvarez, P., Raldúa, D., Prats, E., Piña, B., Tauler, R., de Juan, A., 2019. Assessment of tissue-specific multifactor effects in environmental –omics studies of heterogeneous biological samples: Combining hyperspectral image information and chemometrics. *Talanta* 194, 390–398. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.029>
- Pauli, E.D., Scarminio, I.S., Tauler, R., 2016. Analytical investigation of secondary metabolites extracted from *Camellia sinensis* L. leaves using a HPLC-DAD-ESI/MS data fusion strategy and chemometric methods. *J. Chemom.* 30, 75–85. <https://doi.org/10.1002/cem.2772>
- Pleijel, H., Högy, P., 2015. CO<sub>2</sub> dose-response functions for wheat grain, protein and mineral yield based on FACE and open-top chamber experiments. *Environ. Pollut.* 198, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.12.030>
- Pontes, J.G.M., Brasil, A.J.M., Cruz, G.C.F., De Souza, R.N., Tasic, L., 2017. NMR-based metabolomics strategies: plants, animals and humans. *Anal. Methods* 9, 1078–1096. <https://doi.org/10.1039/c6ay03102a>
- Poorter, H., Van Berkel, Y., Baxter, R., Den Hertog, J., Dijkstra, P., Gifford, R.M., Griffin, K.L., Roumet, C., Roy, J., Wong, S.C., 1997. The effect of elevated CO<sub>2</sub> on the chemical composition and construction costs of leaves of 27 C<sub>3</sub> species. *Plant, Cell Environ.* 20,

- 472–482. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-84.x>
- Porzel, A., Farag, M.A., Mülbradt, J., Wessjohann, L.A., 2014. Metabolite profiling and fingerprinting of *Hypericum* species: A comparison of MS and NMR metabolomics. *Metabolomics* 10, 574–588. <https://doi.org/10.1007/s11306-013-0609-7>
- Rajashekar, C.B., 2018. Elevated CO<sub>2</sub> levels affect phytochemicals and nutritional quality of food crops. *Am. J. Plant Sci.* 9, 150–162. <https://doi.org/10.4236/ajps.2018.92013>
- Rakocevic, M., Braga, K.S.M., Batista, E.R., Maia, A.H.N., Scholz, M.B.S., Filizola, H.F., 2020. The vegetative growth assists to reproductive responses of Arabic coffee trees in a long-term FACE experiment. *Plant Growth Regul.* 91, 305–316. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00607-2>
- Rakocevic, M., Matsunaga, F.T., 2018. Variations in leaf growth parameters over the tree structure of adult *Coffea arabica* in relation to seasonal growth, water availability and air carbon dioxide concentration. *Ann. Bot.* 122, 117–131. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy042>
- Rakocevic, M., Ribeiro, R.V., Marchiori, P.E.R., Filizola, H.F., Batista, E.R., 2018. Structural and functional changes in coffee trees after four years under free air CO<sub>2</sub> enrichment. *Ann. Bot.* 121, 1065–1078.
- Ramalho, J.C., Pais, I.P., Leitão, A.E., Guerra, M., Reboredo, F.H., Máguas, C.M., Carvalho, M.L., Scotti-Campos, P., Ribeiro-Barros, A.I., Lidon, F.J.C., DaMatta, F.M., 2018. Can elevated air [CO<sub>2</sub>] conditions mitigate the predicted warming impact on the quality of coffee bean? *Front. Plant Sci.* 9, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00287>
- Ramalho, J.C., Rodrigues, A.P., Semedo, J.N., Pais, I.P., Martins, L.D., Simões-Costa, M.C., Leitão, A.E., Fortunato, A.S., Batista-Santos, P., Palos, I.M., Tomaz, M.A., Scotti-Campos, P., Lidon, F.C., DaMatta, F.M., 2013. Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO<sub>2</sub>]. *PLoS One* 8, 1–19.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082712>

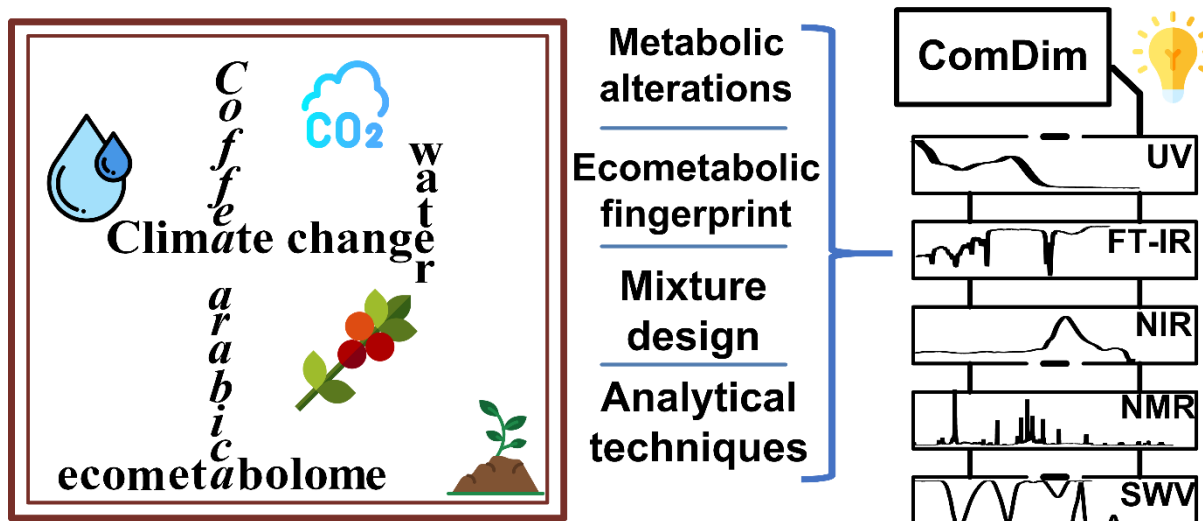
- Rogers, W.J., Michaux, S., Bastin, M., Bucheli, P., 1999. Changes to the content of sugars, sugar alcohols, myo-inositol, carboxylic acids and inorganic anions in developing grains from different varieties of Robusta (*Coffea canephora*) and Arabica (*C. arabica*) coffees. *Plant Sci.* 149, 115–123. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00147-8)
- Saccetti, E., Smilde, A.K., Camacho, J., 2018. Group-wise ANOVA simultaneous component analysis for designed omics experiments. *Metabolomics* 14, 73. <https://doi.org/10.1007/s11306-018-1369-1>
- Sarabhai, V., Centre, S., 1990. Magnetospheric substorm-related electric fields in the ionosphere: 17, 2333–2336.
- Scholz, M.B., Kitzberger, C.S.G., Durand, N., Rakocevic, M., 2018. From the field to coffee cup: impact of planting design on chlorogenic acid isomers and other compounds in coffee beans and sensory attributes of coffee beverage. *Eur. Food Res. Technol.* 244, 1793–1802. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3091-7>
- Scotti-Campos, P., Pais, I.P., Ribeiro-Barros, A.I., Martins, L.D., Tomaz, M.A., Rodrigues, W.P., Campostrini, E., Semedo, J.N., Fortunato, A.S., Martins, M.Q., Partelli, F.L., Lidon, F.C., DaMatta, F.M., Ramalho, J.C., 2019. Lipid profile adjustments may contribute to warming acclimation and to heat impact mitigation by elevated [CO<sub>2</sub>] in *Coffea* spp. *Environ. Exp. Bot.* 167, 103856. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.103856>
- Smilde, A.K., Jansen, J.J., Hoefsloot, H.C.J., Lamers, R.J.A.N., van der Greef, J., Timmerman, M.E., 2005. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): A new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics* 21, 3043–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti476>
- Soares, P.K., Marcheafave, G.G., Gomes, A.A., Scarminio, I.S., Bruns, R.E., 2018. Mixture design PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprints of fractionated organic and

- basic extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. *Chromatographia* 81, 1189–1200. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3554-9>
- Sunarharum, W.B., Williams, D.J., Smyth, H.E., 2014. Complexity of coffee flavor: A compositional and sensory perspective. *Food Res. Int.* 62, 315–325. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.030>
- Temme, A.A., Liu, J.C., Cornwell, W.K., Aerts, R., Cornelissen, J.H.C., 2019. Hungry and thirsty: Effects of CO<sub>2</sub> and limited water availability on plant performance. *Flora Morphol. Distrib. Funct. Ecol. Plants* 254, 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.11.006>
- Timmerman, M.E., Hoefsloot, H.C.J., Smilde, A.K., Ceulemans, E., 2015. Scaling in ANOVA-simultaneous component analysis. *Metabolomics* 11, 1265–1276. <https://doi.org/10.1007/s11306-015-0785-8>
- Toci, A.T., Ribeiro, M.V. de M., de Toledo, P.R.A.B., Boralle, N., Pezza, H.R., Pezza, L., 2018. Fingerprint and authenticity roasted coffees by <sup>1</sup>H-NMR: the Brazilian coffee case. *Food Sci. Biotechnol.* 27, 19–26. <https://doi.org/10.1007/s10068-017-0243-7>
- Tormena, C.D., Marcheafave, G.G., Rakocevic, M., Bruns, R.E., Scarminio, I.S., 2019a. Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds. *Talanta* 191, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.002>
- Tormena, C.D., Marcheafave, G.G., Pauli, E.D., Bruns, R.E., Scarminio, I.S., 2019b. Potential biomonitoring of atmospheric carbon dioxide in *Coffea arabica* leaves using near-infrared spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 26, 30356–30364. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06163-1>
- Vis, D.J., Westerhuis, J.A., Smilde, A.K., van der Greef, J., 2007. Statistical validation of megavariate effects in ASCA. *BMC Bioinformatics* 8, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-322>

- Wei, F., Furihata, K., Hu, F., Miyakawa, T., Tanokura, M., 2011. Two-dimensional  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance (NMR)-based comprehensive analysis of roasted coffee bean extract. *J. Agric. Food Chem.* 59, 9065–9073. <https://doi.org/10.1021/jf201716w>
- Wei, F., Furihata, K., Hu, F., Miyakawa, T., Tanokura, M., 2010. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem.* 48, 857–865. <https://doi.org/10.1002/mrc.2678>
- Wei, F., Furihata, K., Miyakawa, T., Tanokura, M., 2014. A pilot study of NMR-based sensory prediction of roasted coffee bean extracts. *Food Chem.* 152, 363–369. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.161>
- Williamson, K., Hatzakis, E., 2019. NMR analysis of roasted coffee lipids and development of a spent ground coffee application for the production of bioplastic precursors. *Food Res. Int.* 119, 683–692. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.046>
- Wold, S., Antti, H., Lindgren, F., Öhman, J., 1998. Orthogonal signal correction of near-infrared spectra. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 44, 175–185. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(98\)00109-9](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(98)00109-9)
- Worley, B., Powers, R., 2013. Multivariate Analysis in Metabolomics. *Curr. Metabolomics* 1, 92–107. <https://doi.org/10.2174/2213235X11301010092.Multivariate>
- Zanin, R.C., Corso, M.P., Kitzberger, C.S.G., Scholz, M.B. dos S., Benassi, M. de T., 2016. Good cup quality roasted coffees show wide variation in chlorogenic acids content. *LWT* 74, 480–483. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2016.08.012>
- Zwanenburg, G., Hoefsloot, H.C.J., Westerhuis, J.A., Jansen, J.J., Smilde, A.K., 2011. ANOVA – principal component analysis and ANOVA – simultaneous component analysis: a comparison. *J. Chemom.* 25, 561–567. <https://doi.org/10.1002/cem.1400>

# CAPÍTULO 4

“Análise exploratória multibloco de impressões digitais ecometabólicas por planejamento estatístico de misturas em grãos de *Coffea arabica* sob mudanças climáticas: dióxido de carbono atmosférico elevado e disponibilidade reduzida de água no solo”



Aceito para publicação em: *Food Chemistry*, 129716

## RESUMO

Impressões digitais ecometabólicas obtidas pelo planejamento de misturas em grãos de café cultivado sob mudanças climáticas foram exploradas quimicamente usando o método ComDim. Multi-blocos foram formados usando dados de UV, NIRS, RMN de  $^1\text{H}$ , SWV e FT-IR. ComDim possibilitou investigar todas essas diferentes impressões digitais de acordo com o solvente extrator e em virtude do aumento de  $\text{CO}_2$  atmosférico. Etanol e etanol-diclorometano apresentaram as melhores separações entre as impressões digitais devido ao  $\text{CO}_2$  atmosférico. Os *loadings* de RMN de  $^1\text{H}$  indicaram aumentos de ácidos graxos, cafeína, trigonelina e glicose em grãos sob os níveis de  $\text{CO}_2$  atual, enquanto ácido quínico/ácidos clorogênicos, ácido málico e cafeol/cafestol aumentaram em grãos sob condições de  $\text{CO}_2$  elevado. SWV indicou quercetina e ácido clorogênico como compostos importantes em grãos de café cultivados sob  $\text{CO}_2$  atual e elevado, respectivamente. Com base nas impressões digitais de etanol e etanol-diclorometano, *k*-NN classificou corretamente os grãos cultivados em diferentes ambientes de dióxido de carbono e disponibilidades hídricas, confirmando a existência de alterações metabólicas devido às mudanças climáticas. O SWV provou ser promissor em comparação com métodos espectroscópicos amplamente usados.

**Palavras chave:** grãos de café, planejamento estatístico de misturas, ComDim, *k*-NN, impressões digitais, ecometabolômica.

## 1 INTRODUÇÃO

A ecometabolômica de alta performance em plantas utiliza estratégias analíticas hifenizadas para realizar análises globais dos sistemas biológicos complexos, onde a integração de conjuntos de dados adquiridos de várias fontes instrumentais analíticas é de difícil realização (Jan & Ahmad, 2019). Em geral, os estudos científicos em ecometabolômica baseiam-se na utilização de técnicas cromatográficas hifenizadas com os mais diversos tipos de detectores. Exemplos de técnicas analíticas hifenizadas usadas são cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM) e cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e suas derivações instrumentais (Nagler et al., 2018; Peters et al., 2018). Em princípio, quando as investigações são baseadas em análises não-alvo, o objetivo é detectar o maior número possível de classes ou metabólitos, buscando traçar a expressão fenotípica em nível metabólico e fornecer uma captura metabólica instantânea do sistema biológico (Jan & Ahmad, 2019). Por outro lado, a análise alvo em impressões digitais ecometabólicas pode ser aplicada para a triagem de substâncias biomarcadoras para obter a caracterização de plantas de interesse comercial, por exemplo. (Jan & Ahmad, 2019).

Com base nas ideias que circundam a metabolômica e nas vantagens e sucessos obtidos com as técnicas de impressão digital, pesquisadores configuraram estratégias que aplicam métodos instrumentais que não são caros, têm aquisição analítica rápida e baixa demanda técnica. Possuindo alguns destes requisitos, podemos destacar a ressonância magnética nuclear (RMN) (Marcheafave et al., 2020a), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR, do inglês, *Fourier-transform infrared spectroscopy*) (Afonso et al., 2019), espectroscopia no infravermelho próximo (NIRS, do inglês, *near-infrared spectroscopy*) (Marcheafave et al., 2020b), espectroscopia no ultravioleta (UV) (Marcheafave et al., 2020c; Tormena et al., 2019a) e mais recentemente, métodos eletroanalíticos que incluem voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês, *square-wave voltammetry*) (Salamanca-Neto et al., 2020)

empregados para inúmeras aplicações nas ciências biológicas e alimentares, controles de processos e produtos. Claramente, nessas técnicas, as limitações de determinação estrutural de metabólitos oriundos de sistemas biológicos complexos são evidentes para moléculas específicas na análise alvo em impressões digitais. Na maioria dos casos, a determinação molecular detalhada não é o objetivo das análises químicas, mas sim um perfil metabólico instantâneo como uma estratégia holística.

Os métodos espectroscópicos são ferramentas valiosas para resolver problemas de discriminação ou classificação em sistemas sujeitos a perturbações ambientais, onde o objetivo não é somente definir a mudança química através de determinações estruturais ou valores quantitativos absolutos, por exemplo, mas prever a existência de mudanças químicas com base nas variações quantitativas e qualitativas dos sinais analíticos usando métodos quimiométricos, criando modelos matemáticos (Marcheafave et al., 2020a). Vale ressaltar que, esses métodos podem ser aplicados com sucesso em casos de triagem química com alvo, como no caso de biomarcadores espectroscópicos (Tormena et al., 2020). No entanto, com base em estratégias não alvo, o domínio químico do perfil metabólico detectado por essas técnicas, incluindo métodos cromatográficos, não é capaz de representar todo o metaboloma, devido às limitações do processo de extração (Soares et al., 2018). Analiticamente, é impossível estabelecer qualquer método de preparo de amostra que possa extrair todas as substâncias químicas do material investigado. Alternativas são investigadas para reduzir esse vazio experimental, como a aplicação sistemática de planejamentos estatísticos de misturas para obter sistemas multifacetados de impressão digital em investigações ecometabolômicas, rastreando os diferentes metabólitos entre sistemas perturbados e controlados (Delaroza et al., 2014).

Além do planejamento de misturas, diversas técnicas analíticas de detecção metabólica podem ser utilizadas ou comparadas para aumentar o alcance das classes metabólicas extraídas e detectadas nos diferentes solventes e suas misturas (Marcheafave et al., 2019a). Devido à sua

ampla inclusão metabólica, seu significado biológico pode ser identificado com a mínima presunção sobre a expressão fenotípica no nível metabólico. A maioria das metodologias analíticas univariadas de extração metabólica são tendenciosas para determinadas classes e metabólitos específicos, assim modelam apenas uma fração do metaboloma do objeto biológico (Jan & Ahmad, 2019). Nossa hipótese é que a análise exploratória multibloco com variações de solvente extrator e técnicas analíticas de aquisição pode auxiliar na montagem coerente de diferentes conjuntos metabolômicos e permitir a expansão de proposições por raciocínio indutivo entre as classes biológicas investigadas, reduzindo o efeito de extrações tendenciosas e detecções enviesadas para classes específicas. Aqui também é hipotetizado que metabólitos ou classes metabólicas específicas poderiam ser apontadas como indicadores do distúrbio ambiental, considerando que essa variação não seja conhecida anteriormente.

Em estudos ecometabólicos, quanto maior a combinação de múltiplas mudanças ambientais pelas quais as plantas experimentais passam, maior será a compreensão de como essas mudanças ambientais afetam os aspectos químicos e bioquímicos do metaboloma e os riscos biológicos associados a essas mudanças (Jan & Ahmad, 2019; Peters et al., 2018). No Brasil, o café representa hoje a maior *commodity*. Devido aos riscos associados à produção, qualidade e comercialização, o cenário de mudanças climáticas previsto para o final do século XXI, foi investigado na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, Jaguariúna-SP). Esse experimento é considerado a primeira instalação de enriquecimento de dióxido de carbono ao ar livre (FACE, do inglês, *Free-Air Carbon dioxide Enrichment*) na América do Sul, estabelecida em 2011 (Ghini et al., 2015). Foi também a primeira no mundo a operar durante 5 anos com o aumento de dióxido de carbono atmosférico e no último ano com a variação da disponibilidade hídrica aplicada à cafeicultura. Os experimentos FACE permitiram a exploração do desenvolvimento, produtividade, ecofisiologia e aspectos fitossanitários da cultura de café sob maiores concentrações de CO<sub>2</sub> atmosférico (Damatta et

al., 2016; Ghini et al., 2015; Rakocevic et al., 2020; Tormena et al., 2019b). A exposição a longo prazo aos níveis de CO<sub>2</sub> projetados para o final do século, associada à variação da disponibilidade hídrica, fornece valiosas amostras para estudos ecometabólicos com robustas mudanças metabólicas.

Consolidando diferentes lacunas analíticas da ecometabolômica, o presente estudo tem como objetivo comparar as impressões digitais dos grãos de café submetidos a um experimento fatorial 2<sup>2</sup> com dois fatores (concentração atmosférica de CO<sub>2</sub> e disponibilidade de água no solo) e dois níveis (CO<sub>2</sub> elevado e atual/cafeeiros irrigados e não irrigados). A novidade deste estudo é a busca metodológica para impressões digitais de café usando um planejamento de misturas de quatro componentes (etanol, diclorometano, hexano e éter etílico) com cinco aquisições instrumentais (RMN de <sup>1</sup>H, FT-IR, NIRS, UV e SWV). O método quimiométrico de análise de dados multitabelas (ComDim, do inglês, *Common Dimension*) para análise multibloco foi aplicado para compilar todas as variações das impressões digitais ecometabólicas. A configuração planejamento fatorial-planejamento de misturas-ComDim permitiu a investigação simultânea das variações dos sistemas de extração, aquisição de sinais dos sistemas metabólicos extraídos, bem como a exploração em múltiplos blocos do conjunto de dados ecometabólicos das mudanças químicas no café durante o experimento FACE. O método supervisionado de *k*-vizinhos mais próximos (*k*-NN, do inglês, *k-Nearest Neighbors*) permitiu confirmar os resultados do ComDim, onde evidenciou a separação entre os grãos de café cultivados em diferentes condições ambientais, utilizando voltametria de onda quadrada.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 COLETA DE GRÃOS DE CAFÉ

Os experimentos de dióxido de carbono atmosférico aumentado foram realizados em uma instalação FACE localizada em Jaguariúna - Brasil (22°43'S, 47°01'W), utilizando a espécie *Coffea arabica*, cultivar Catuaí Vermelho IAC 144. A instalação FACE consistia em seis parcelas para tratamento de CO<sub>2</sub> elevado e seis parcelas de controle nas condições atuais de CO<sub>2</sub>, cada uma contida em um anel de 10 m de diâmetro. Os doze anéis estavam localizados em um cafezal de 7 ha. Os doze anéis foram espaçados no mínimo em 70 m um do outro. A injeção de CO<sub>2</sub> na atmosfera começou em 25 de agosto de 2011 e terminou em 30 de junho de 2016 (Rakocevic & Matsunaga, 2018). No início do experimento, a concentração de CO<sub>2</sub> atmosférica era de aproximadamente 390 µL L<sup>-1</sup>. Nas parcelas sob CO<sub>2</sub> elevado, as injeções diretas de CO<sub>2</sub> puro foram de 150-200 µL L<sup>-1</sup> acima do nível atual. Mais detalhes sobre a configuração dos experimentos FACE nos cafeeiros podem ser vistos em Ghini et al. (2015). A irrigação ocorreu em metade dos cafeeiros no período de outubro de 2015 a junho de 2016.

Os frutos de café foram colhidos em maio de 2016, no 5º ano do experimento FACE. Os frutos foram coletados aleatoriamente nos anéis de dezesseis pés de café estratificados em quatro camadas de 50 cm de espessura sobre o perfil vertical da árvore (Marcheafave et al., 2020c). Quatro plantas foram cultivadas com irrigação nos níveis atuais de CO<sub>2</sub>, quatro em condições de não irrigação sob CO<sub>2</sub> atual, quatro plantas irrigadas sob atmosfera elevada de CO<sub>2</sub> e quatro plantas não irrigadas (condições de chuva) com CO<sub>2</sub> elevado. Bagas verdes e vermelhas foram coletadas, secas, processadas com a separação da casca e do pergaminho, moídas e armazenadas em ultracongelador a -60 ° C em sacos de papel.

## 2.2 ESTRATÉGIA DE EXTRAÇÃO

### 2.2.1 Planejamento estatístico de misturas em ecometabolômica

A principal limitação da abordagem metabolômica de impressão digital corresponde ao processo de extração do conjunto de metabólitos do tecido vegetal. Os solventes usados na preparação das amostras fornecerão apenas uma fração do conjunto metabólico original e conseqüentemente, tendências metabólicas para apenas algumas classes ou metabólitos específicos serão observadas (Marcheafave et al., 2019b). Essa limitação no processo de extração pode ser minimizada com o uso sistemático de vários solventes com diferentes características de interação solvente/soluto (Barwick, 1997). O planejamento de misturas codifica estrategicamente combinações de solventes com diferentes propriedades químicas, proporcionando uma oportunidade de otimizar sistematicamente o sistema extrator para metabólitos específicos (Silveira et al., 2020), múltiplos metabólitos ou para maximizar a análise exploratória das impressões digitais. Para maximizar a extração dos metabólitos dos grãos de *C. arabica*, um planejamento de misturas de quatro componentes foi usado, delineado com etanol (Anidrol - Diadema, Brasil), diclorometano (Anidrol - Diadema, Brasil), hexano (Anidrol - Diadema, Brasil) e éter etílico (Vetec - Rio de Janeiro, Brasil). Todos os solventes orgânicos foram de grau analítico. O delineamento de quatro solventes resultou em quatro extratos de solventes puros, seis extratos das misturas binárias, quatro extratos das misturas ternárias e um extrato da mistura quaternária (Tabela 1), totalizando quinze extratos variados ou dezessete extratos com o ponto central em triplicata. Os extratos obtidos pela combinação de vários solventes não fornecem necessariamente a impressão digital que contém as informações mais importantes no processo de discriminação ou classificação. A combinação de diferentes solventes permite que ocorram interações antagônicas ou sinérgicas, modificando os perfis metabólicos desses extratos (Pauli, Bruns, & Scarminio, 2016).

**Tabela 1.** Planejamento estatístico de misturas para quatro componentes: etanol, diclorometano, hexano e éter etílico. As proporções usadas para extração são dadas em mL.

Delineamento	Notação do extrato	Volume de solvente (mL)			
		Etanol ( <i>E</i> )	Diclorometano ( <i>D</i> )	Hexano ( <i>H</i> )	Éter etílico ( <i>e</i> )
1	<i>E</i>	60	0	0	0
2	<i>D</i>	0	60	0	0
3	<i>H</i>	0	0	60	0
4	<i>e</i>	0	0	0	60
5	<i>ED</i>	30	30	0	0
6	<i>EH</i>	30	0	30	0
7	<i>Ee</i>	30	0	0	30
8	<i>DH</i>	0	30	30	0
9	<i>De</i>	0	30	0	30
10	<i>He</i>	0	0	30	30
11	<i>EHe</i>	20	0	20	20
12	<i>EDH</i>	20	20	20	0
13	<i>EDe</i>	20	20	0	20
14	<i>DHe</i>	0	20	20	20
15	<i>EDHe</i>	15	15	15	15
16	<i>EDHe</i>	15	15	15	15
17	<i>EDHe</i>	15	15	15	15

## 2.2.2 Triângulo de seletividade para solventes em extrações de plantas

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem reforçado a ideia de que procedimentos extrativos experimentais com materiais biológicos, principalmente vegetativos, quando devidamente delineados, podem servir como uma estratégia eficaz para aumentar o número de classes metabólicas investigadas simultaneamente, eliminando o viés do solvente extrator quando experimentos univariados são realizados (Marcheafave et al., 2020a; Passari, Scarminio, Marcheafave, & Bruns, 2019). Assim, sistemas de classificação de solventes baseados em propriedades químicas são interessantes para a escolha dos sistemas que compõem o planejamento de misturas. Neste trabalho, a escolha dos solventes foi baseada na reclassificação de Rutan et al. (1989) para os parâmetros de seletividade ( $x_i$ ) - dipolaridade ( $x_n$ ), acidez ( $x_d$ ) e basicidade ( $x_e$ ) do triângulo de seletividade de solvente de Rohrschneider-Snyder (SST, do inglês, *Rohrschneider-Snyder solvent-selectivity triangle*). Parâmetros de seletividade de Snyder ( $x_e$ ,  $x_d$ , e  $x_n$ ) são 0,53, 0,13, 0,34 para éter etílico; 0,52, 0,19, 0,29 para

etanol; 0,27, 0,33, 0,40 para diclorometano e 0, 0, 0 para hexano, respectivamente (Rutan et al., 1989). A magnitude dos parâmetros de seletividade indicam a importância de diferentes tipos de interações intermoleculares entre os diferentes solventes (Snyder, Carr, & Rutan, 1993).

### 2.2.3 Preparação dos extratos

A extração foi realizada em banho ultrassônico modelo Ultracleaner 1600 Unique operando na frequência de 40kHz e temperatura constante de 15 °C. Os erlenmeyers contendo 2,5 g de grãos de café verde moídos com 60 mL de cada solvente (Tabela 1), foram imersos em sonicação por 60 min. Após esse tempo, a solução foi filtrada através de um filtro qualitativo da Unifil, Brasil (0,16 mm de espessura e 80 g m<sup>2</sup>) por aproximadamente 5 min. A solução filtrada foi armazenada em erlenmeyers fechados em uma capela de exaustão a 22 ± 1 °C. Os grãos foram novamente imersos em 60 mL de solvente e filtrados mais 4 vezes. Ao final do 5º processo de extração, 300 mL de extrato metabólico foram obtidos para amostras das quatro condições de cultivo em 17 sistemas de solventes extrativos, incluindo as repetições do ponto central (Tabela 1). O extrato líquido foi usado para análises de UV, NIRS e SWV. Para RMN de <sup>1</sup>H e FT-IR as soluções foram evaporadas sob circulação forçada de ar e liofilizadas até peso constante.

Para a etapa exploratória dos extratos, os grãos coletados nos três estratos da planta foram homogeneizados. Na etapa de validação, as extrações foram realizadas da mesma forma como descrito acima para amostras de dezesseis plantas e grãos coletados em três camadas sobre o perfil vertical da árvore, excluindo a camada mais baixa (0-50 cm) que não deu frutos no 4º ano de produção (Rakocevic et al., 2021). Essa estratégia incluiu diferentes camadas de crescimento do fruto do café ao longo do perfil vertical da árvore, tendendo a aumentar a robustez do método, incluindo as variabilidades do campo experimental.

## 2.3 AQUISIÇÕES INSTRUMENTAIS

### 2.3.1 Medições de espectrofotometria ultravioleta

As impressões digitais de absorção na região UV foram registrados usando um espectrofotômetro UV-Vis Thermo Scientific modelo Evolution 60S, usando cubetas de quartzo (1 cm × 1 cm × 4,5 cm) com caminho óptico de 1 cm, acoplado ao *software* VISION Lite. Os espectros foram obtidos de 190 a 400 nm com resolução de 1 nm a  $22 \pm 1$  °C. As aquisições foram feitas a partir dos extratos diluídos na proporção de 1:9 (1 mL) com seu respectivo solvente extrator. Os conjuntos de dados foram coletados em unidades de absorbância e salvos no formato de arquivo de dados txt' com 211 pontos de dados por amostra.

### 2.3.2 Medições de espectroscopia de transmitância no infravermelho próximo

As medidas de absorção de NIR foram realizadas usando o *software* DLP NIR scan Nano (Texas Instruments Inc., Dallas, EUA) no modo de transmitância equipado com uma cubeta de quartzo (1 cm × 0,2 cm × 2,8 cm) com um caminho óptico de 2 mm. Os espectros NIR foram obtidos entre 1700 e 900 nm com uma resolução de 3,9 nm a  $22 \pm 1$  °C e cada espectro correspondeu a uma média de 99 varreduras. As aquisições foram feitas com 1 mL do extrato imediatamente após a extração, sem diluição. Os espectros NIR foram salvos em unidades de absorbância no formato de arquivo de dados txt' com 215 pontos de dados por amostra.

### 2.3.3 Medições de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de prótons

Para análise de RMN, 50,0 mg de extrato liofilizado foram dissolvidos em 0,5 mL de DMSO-d<sub>6</sub> com TMS usando um misturador vórtex. Em seguida, o extrato solubilizado foi

colocado em um tubo de RMN de 5 mm. As medições unidimensionais de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizadas a  $28^\circ\text{C}$  em um espectrômetro Bruker Model Avance III operando a 400 MHz, equipado com uma sonda multinuclear inversa (BBI) de 5 mm. Os espectros foram adquiridos com 64 varreduras, um tempo de aquisição de 10 min com 1 s de tempo de espera. Para cada amostra, a aquisição e processamento de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizados usando o parâmetro Bruker padrão (sequência de pulso zg30). As análises foram processadas pelo *software* TopSpin 3.6.1 (Bruker). Os espectros de RMN resultantes foram faseados manualmente, com correção da linha de base e referenciados ao TMS no deslocamento químico ( $\delta$ ) de 0,0 ppm, e salvos no formato de arquivo de dados txt' retendo 32.768 pontos de dados por amostra. O  $\delta$  residual de água e DMSO nas regiões de 3,2867-3,4608 e 2,4703-2,5306 ppm, respectivamente, foram removidos retendo 17.590 pontos de dados por amostra.

### 2.3.4 Medições de voltametria de onda quadrada

As medições de SWV foram realizadas usando uma célula de vidro de compartimento único de três eletrodos acoplada a um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT101 (Metrohm; Schiedam, Holanda) controlado pelo *software* NOVA 2.1. Uma placa de platina foi usada como eletrodo auxiliar, Ag/AgCl ( $3,0 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ ) como eletrodo de referência de junção dupla e um eletrodo de diamante dopado com boro (EDDB; 8000 ppm; área exposta de  $7,07 \text{ mm}^2$ ; Windsor Scientific, Slough, Reino Unido) como eletrodo de trabalho. Antes de cada análise, o EDDB foi polido manualmente usando pasta aquosa de pó de alumina ( $0,01 \text{ }\mu\text{m}$  de diâmetro) em um pano de polimento liso (Metrohm; Schiedam, Holanda), limpo em etanol em banho ultrassom durante 30 s e deixado para secar em temperatura ambiente. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente.

Uma solução de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de ácido perclórico em metanol foi usada como eletrólito suporte nas medições voltamétricas. Para a obtenção de cada do perfil voltamétrico,  $500 \text{ }\mu\text{L}$  do

extrato foram transferidos para a célula eletroquímica contendo 4,5 mL do eletrólito suporte. O conteúdo da célula foi agitado para homogeneização durante 30 s, com 5 segundos de pausa antes de colocar o eletrodo de trabalho e iniciar a varredura de potencial catódico ou anódico, usando SWV (amplitude: 20 mV; incremento de potencial: 4 mV; frequência: 30 Hz). Os voltamogramas foram corrigidos na linha de base, usando o modo de média móvel. Os dados foram coletados em unidades de microamperes ( $\mu\text{A}$ ) e salvos no formato de arquivo de dados txt' com 374 pontos de dados por amostra para SWV catódico e 531 pontos para SWV anódico.

O perfil voltamétrico qualitativo foi obtido usando padrões de ácido clorogênico, ácido palmítico, D(-)-ácido quínico, ácido cafeico, ácido ferúlico, teobromina, ácido p-cumárico, cafeína, quercetina, teofilina, cloridrato de trigonelina todos da Sigma-Aldrich, D(+)-manose, sacarose, D(+)-glicose, D(+)-xilose, D(-)-manitol todos da Merck, D-frutose da Vetec e ácido gálico da Reatec, com concentração de  $20 \mu\text{g L}^{-1}$  nas mesmas condições eletroquímicas dos extratos.

### **2.3.5 Medições de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier**

A análise espectral FT-IR dos extratos foi realizada usando um equipamento PerkinElmer Spectrum Two com acessório ATR universal (UATR) com cristal de diamante. Os espectros de ATR-FTIR foram adquiridos no modo de transmitância, na faixa de 4000-450  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de  $1 \text{ cm}^{-1}$  com força 60 na pressão de braço, em temperatura ambiente. As análises espectroscópicas dos extratos foram realizadas com os extratos sólidos após secagem. Os espectros FT-IR foram coletados pelo *software* de aquisição de dados Spectrum 10™ (PerkinElmer) e salvos no formato de arquivo de dados txt' com 3.551 pontos de dados por amostra. Para análise quimiométrica, o conjunto de dados foi convertido em unidades de absorbância.

## 2.4 ANÁLISE DE DADOS E *SOFTWARE*

### 2.4.1 Método quimiométrico de análise por dimensões comuns (ComDim) para análise de dados multibloco em ecometabolômica

O método ComDim é uma implementação particular da Análise de Componentes Comuns e Pesos Específicos (CCSWA, do inglês, *common component and specific weights analysis*) (Bouveresse et al., 2011). Seu algoritmo é integralmente descrito por Qannari et al. (2000). Pertence à família das análises de componentes multibloco ou multitabelas e consiste em descrever várias tabelas de dados para as mesmas  $n$  amostras, não necessariamente tendo o mesmo número de variáveis observadas em cada tabela (Makimori & Bona, 2019; Mazerolles et al., 2006). Esse método calcula iterativamente, para cada dimensão comum sucessiva, uma série de vetores de escore, que representam uma direção de dispersão máxima das amostras em um espaço comum a todas as tabelas de dados. Cada tabela tem um peso específico (ou 'saliência') associado a cada dimensão para este espaço comum, refletindo a importância que várias tabelas de variáveis atribuem aos componentes (Cariou, Qannari, Rutledge, & Vigneau, 2018; Karoui, Dufour, & De Baerdemaeker, 2006). A diferença entre os valores dos pesos específicos para uma determinada dimensão pode ser devido ao fato de a dimensão conter informações que estão presentes em algumas tabelas, mas não em outras. Para cada componente comum, os *loadings* das variáveis em cada tabela também são calculados (Rosa et al., 2017; Vieira et al., 2020), ajudando na interpretação dos resultados.

Para maximizar a extração de classes metabólicas e minimizar o viés instrumental e extrativo na análise de dados exploratórios ecometabólicos associadas as impressões digitais do planejamento de misturas, ComDim permitiu o estudo dos perfis metabólicos adquiridos por diferentes técnicas instrumentais, indicando possíveis relações entre essas tabelas, e discriminando as amostras usando informações globais incluídas em todas as tabelas de dados.

Os dados para ComDim foram organizados em seis blocos: espectros de UV (bloco 1), espectros de FT-IR (bloco 2), espectros de NIR (bloco 3), espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (bloco 4), voltamogramas SW catódicos (bloco 5) e Voltamogramas anódicos de SW (bloco 6) (Tabela 2). Cada bloco de dados foi devidamente pré-tratado (Tabela 2), sendo os parâmetros definidos empiricamente em testes preliminares. Antes da análise por ComDim, cada bloco foi centrado na coluna e então normalizado, usando a divisão por sua norma de Frobenius para obter uma matriz escalonada (Qannari et al., 2000).

**Tabela 2.** Blocos de dados das impressões digitais de grãos de *C. arabica* obtidos a partir de diferentes técnicas instrumentais para análise ComDim.

<b>Bloco</b>	<b>Faixas de medição das impressões digitais</b>	<b>Dimensão da matriz (amostras × variáveis)</b>	<b>Pré-processamento</b>
UV	190-400 nm	68×211	Filtro Savitzky–Golay (9 pontos por janela)
FT-IR	4000-450 $\text{cm}^{-1}$	68×3551	Correção de dispersão multiplicativa (MSC)
NIR (transmitância)	900-1700 nm	68×215	Variação normal padrão (SNV)
RMN de $^1\text{H}$	10,9997-0,0177 ppm	68×17590	Escalonamento de Pareto
SWV Catódico	1,5-0,0 V	68×374	Média Móvel
SWV Anódico	-0,8-1,3 V	68×531	Média Móvel

#### 2.4.2 Método *k*-vizinhos mais próximos em ecometabolômica

Como primeira tentativa, métodos de classificação linear (modelagem independente suave de analogias de classe - SIMCA, do inglês, *soft independent modeling of class analogies*; análise linear discriminante e quadrática - LDA (do inglês, *linear discriminant analysis*) e QDA (do inglês, *quadratic discriminant analysis*) - nos escores da análise de componentes principal) foram aplicados, mas não forneceram resultados satisfatórios em termos de taxas de classificação (dados não mostrados), indicando que um método não linear precisa ser testado.

Assim, o método  $k$ -NN foi escolhido para a classificação dos grãos de café cultivados em níveis atuais/elevados de CO<sub>2</sub>; com e sem irrigação, para confirmar os resultados obtidos pelo método exploratório não supervisionado (ComDim), que apresentou separações devido a diferentes condições ambientais. Esse método é um algoritmo de aprendizado de máquina supervisionado conhecido como classificador não paramétrico e é indicado quando o conjunto de dados de entrada não é pré-atribuído a uma função paramétrica ( $Y = f(X)$ ) - esta limitação é configurada pela complexidade da relação entre  $X$  e  $Y$  e assim, a linearidade não é adequada para explicar a relação entre as variáveis de entrada e saída (Mezquita et al., 2020). Como comumente descrito, os dados teste de entrada são projetados em um espaço multidimensional e são classificados com base no cálculo da distância ou dissimilaridade métrica usando distâncias de Manhattan, Euclidiana, Minkowski ou Mahalanobis ou por cálculos de correlação (Mezquita et al., 2020). A dependência de classe é atribuída de acordo com o número de amostras de treinamento mais perto da amostra de teste, ou seja, a classe com o maior número de amostras vizinhas determinará a classe da amostra de teste. Além disso, é um dos métodos menos propensos a sobreajuste graças à simplicidade de seu algoritmo (Malegori et al., 2018).

Na ecometabolômica, muitos conjuntos de dados apresentam distribuição não linear e, conseqüentemente, quando modelos lineares são utilizados na modelagem matemática, podem apresentar falhas ou sobreajuste no modelo preditivo. A não linearidade nos conjuntos de dados espectroscópicos ou voltamétricos dos grãos, origina-se devido os diversos fatores abióticos ou bióticos, como a concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e a emissão de frutos no perfil vertical da planta. Nesse caso, diferentes estratificações recebem diferentes influências do ambiente; luz, sombra, temperatura, concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico (Rakocevic et al., 2021) são exemplos de fatores que influenciam mudanças através do perfil vertical, alterando a composição química dos diferentes órgãos da planta, como folhas, gemas (Tormena et al., 2019a) e grãos (Rakocevic et al., 2021).

Voltamogramas anódicos de SW para análise de  $k$ -NN foram organizados em quatro matrizes de acordo com suas respectivas classes: CO<sub>2</sub> atual não irrigado, CO<sub>2</sub> atual irrigado, CO<sub>2</sub> elevado não irrigado e CO<sub>2</sub> elevado irrigado. Em seguida, todo o conjunto de dados, composto de 25 voltamogramas para cada classe, foi dividido em conjunto de treinamento com 18 amostras e conjunto de teste com 7 amostras pelo algoritmo Kennard-Stone (Kennard & Stone, 1969). Por fim, as matrizes foram novamente organizadas de acordo com o objetivo de classificação pela análise  $k$ -NN.

### **2.4.3 Processamento de dados**

O pré-processamento, análise e visualização dos dados espectrais foram realizados com as ferramentas quimiométricas Gamma 3.0 (Bona, E. GAMMA-Routines for Multivariate Analysis. Campo Mourão 2017; Galvan - drop) para o ComDim e PLS\_Toolbox 8.7 (Eigenvector, US) para análise de  $k$ -NN, aplicada com Matlab 2016 (Mathworks, US). ComDim foi implementado no MATLAB R2008b de acordo com o algoritmo apresentado em Ghaziri, Cariou, Rutledge, & Qannari (2016) e descrito em detalhes por Bouveresse et al. (2011).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise multibloco por ComDim foi realizada com conjuntos de dados espectrais e voltamétricos, nos quais as impressões digitais foram obtidas a partir de extratos provenientes do planejamento estatístico de misturas. Como diferentes solventes de extração e técnicas analíticas foram aplicados, a necessidade de análises comparativas adicionais foi imposta. ComDim foi aplicado para calcular os escores globais para as amostras e os *loadings* das variáveis em cada bloco (UV, FT-IR, NIR, NMR, SWV catódico e SWV anódico) para cada Dimensão Comum (DC), fornecendo também os valores de saliência (Rosa et al., 2017). A análise ComDim foi realizada usando 8 dimensões comuns, consideradas suficientes para contemplar todas as fontes importantes de variação nos dados. No entanto, apenas quatro foram exploradas (Fig. 1 e Fig. C1) uma vez que as outras DCs não forneceram informações adicionais significativas sobre as amostras (Fig. C2).

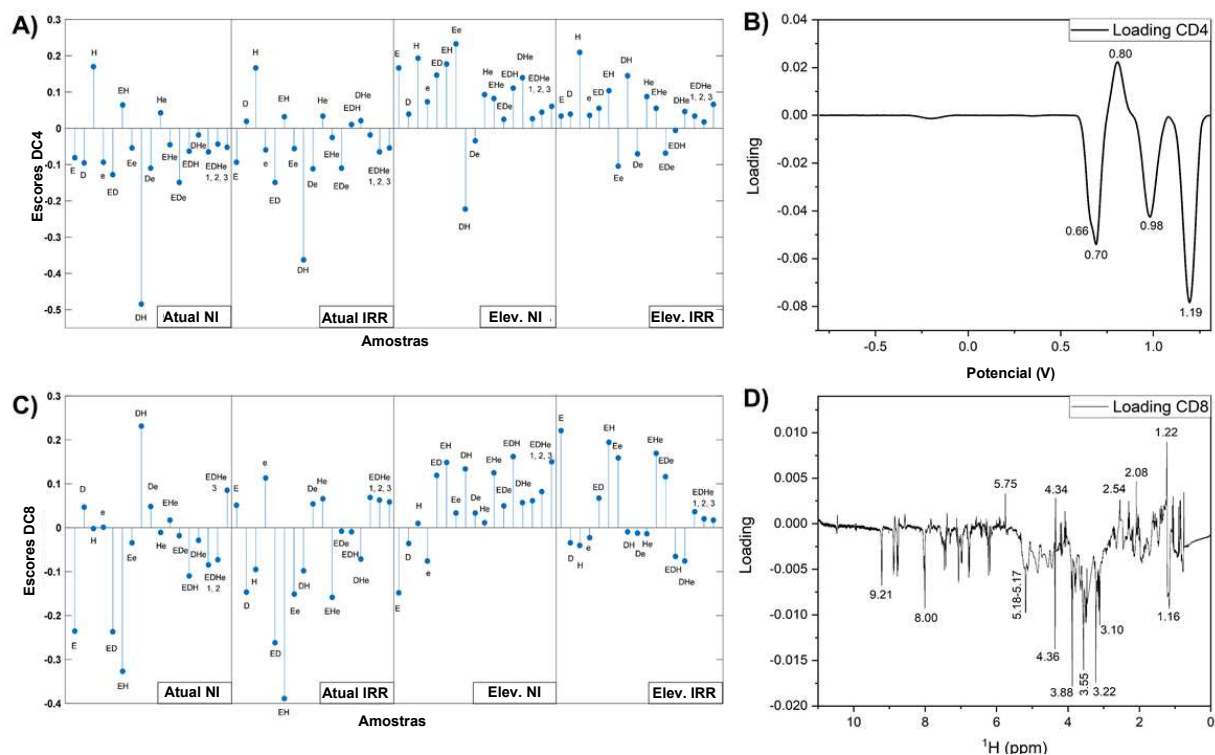
Os gráficos de escores para DC1 e DC2 são apresentados na Fig. C1. Foi observada a separação das amostras quanto às características dos solventes utilizados na extração dos metabólitos dos grãos de *C. arabica*. O gráfico de escores da DC1 mostrou a discriminação entre extratos contendo etanol, de outros extratos não etanólicos. De acordo com as saliências (Tabela 3), todas as técnicas analíticas contribuíram para essa separação, em ordem decrescente foram: SWV anódico e catódico, seguidos de FT-IR e RMN de  $^1\text{H}$ , UV e NIRS. A DC2 mostrou a separação do éter etílico puro e da mistura binária de extratos de etanol-éter etílico de outros extratos. Dois blocos contribuíram para essa separação: espectros de UV, com altos valores de saliência e de FT-IR. Mais informações e discussões sobre as variáveis que mais contribuíram para a discriminação dos solventes de extração podem ser encontradas no Anexo C (Fig. C3).

**Tabela 3.** Saliências de cada bloco instrumental e para cada dimensão comum (DC).

Block	DC1	DC2	DC3	DC4	DC5	DC6	DC7	DC8
UV	<b>0,2658</b>	<b>0,4893</b>	0,0283	0,0365	0,0041	0,0017	0,1249	0,0005
FT-IR	<b>0,3600</b>	<b>0,1092</b>	0,3107	0,0025	0,0096	0,1429	0,0010	0,0006
NIR	<b>0,1941</b>	0,0274	0,1075	0,0259	0,2022	0,0274	0,0298	0,0027
RMN	<b>0,3394</b>	0,0082	0,0465	0,0468	0,0111	0,0056	0,0093	<b>0,1317</b>
SWV Catódico	<b>0,6325</b>	0,0786	0,0494	0,0620	0,0097	0,0066	0,0076	0,0070
SWV Anódico	<b>0,6038</b>	0,0344	0,0601	<b>0,1653</b>	0,0055	0,0038	0,0096	0,0081
Variância DC (%)	76,51	15,23	3,49	1,46	1,21	0,36	0,41	0,33
Variância acumulada (%)	76,51	91,74	95,23	96,69	97,90	98,26	98,67	99,00

\* Maiores valores de saliência para Dimensões Comuns (DC) com resultados significativos estão marcados em negrito.

A projeção dos escores do ComDim ao longo da DC4 e DC8 mostrou a discriminação dos grãos de *C. arabica* de acordo com as condições de cultivo (Fig. 1). A DC4 permitiu a separação da maioria dos extratos em dois grupos relacionados aos grãos cultivados nos dois ambientes de CO<sub>2</sub>. Os grãos de *C. arabica* coletados de plantas cultivadas em atmosfera de CO<sub>2</sub> elevado foram agrupados no lado positivo da DC4, enquanto os do ambiente atual de CO<sub>2</sub> estavam no lado negativo da DC4. As saliências para DC4 (Tabela 3) mostraram que a contribuição predominante para a dispersão dos grãos de *C. arabica* foi devido às alterações metabólicas observadas nos voltamogramas anódicos de SW. Ao avaliar o gráfico de *loadings* para DC4 (Fig. 1B), os grãos coletados de plantas cultivadas sob o ambiente atual de CO<sub>2</sub> foram discriminados pelos picos voltamétricos anódicos em 0,66; 0,70; 0,98 e 1,19 V e aqueles sob CO<sub>2</sub> elevado em 0,80 V. A quercetina foi um dos compostos químicos importantes atribuídos aos grãos de café coletados sob ambiente atual de CO<sub>2</sub>, sendo confirmada pela adição de extratos de etanol com seu respectivo o padrão analítico. (Fig. C4). O ácido clorogênico foi um dos metabólitos importantes para a separação dos grãos de café coletados de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado, também confirmado com seu padrão analítico (Fig C4).



**Fig. 1.** Escores da análise ComDim para DC4 (A) e DC8 (C) para as impressões digitais das quatro classes de grãos de *Coffea arabica* e gráficos de *loadings* para os voltamogramas SW anódicos em DC4 (B) e para RMN de <sup>1</sup>H em DC8 (D); Atual NI: CO<sub>2</sub> atual não irrigado; Atual IRR: CO<sub>2</sub> atual irrigado; Elev. NI: CO<sub>2</sub> elevado não irrigado; Elev. IRR: CO<sub>2</sub> elevado irrigado. As identificações dos escores correspondem ao meio de extração utilizado através do planejamento de misturas (Tabela 1): *E* = etanol; *D* = diclorometano; *H* = hexano; *e* = éter etílico.

A projeção dos escores para DC8 (Fig. 1C) indicou a discriminação da maioria dos grãos de *C. arabica* em dois grupos, nos quais os grãos de plantas cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado foram agrupados na região positiva e aqueles de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual na região negativa. Os valores de saliência (Tabela 3) apontaram que essa separação foi melhor expressa nos espectros de RMN (Bloco 4). *Loadings* do ComDim (Fig. 1D) revelaram que os sinais em 1,22; 2,08; 2,54; 4,34; e 5,75 ppm tiveram valores positivos e contribuíram para discriminar os grãos cultivados em CO<sub>2</sub> elevado. Os sinais em 1,16; 3,10; 3,22; 3,55; 3,88; 4,36; 5,17-5,18; 8,00; e 9,21 ppm tiveram valores negativos e foram relevantes para discriminar os grãos de plantas de *C. arabica* cultivadas nas atuais condições de CO<sub>2</sub>. A separação metabólica devido ao ambiente de CO<sub>2</sub> atmosférico também foi encontrada quando o RMN de <sup>1</sup>H foi associado a outras

ferramentas quimiométricas (análise de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*), análise de variância - análise de componentes simultâneos (ASCA, do inglês, *analysis of variance - simultaneous component analysis*) e análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA, do inglês, *partial least squares - discriminant analysis*)) (Marcheafave et al., 2020a). Perfis espectrais para ácidos graxos, cafeína, trigonelina e glicose aumentaram em grãos sob o CO<sub>2</sub> atmosférico atual, enquanto perfis espectrais para ácido quínico/ácidos clorogênicos, ácido málico e caveol/cafestol aumentaram em grãos de café cultivados em CO<sub>2</sub> elevado. Além disso, pelas impressões digitais do planejamento de misturas adquiridas pelo RMN de <sup>1</sup>H, o dióxido de carbono foi o único efeito principal significativo na mudança química no metaboloma dos grãos de café, reforçando os resultados atuais encontrados em DC4 e DC8. Nenhuma separação entre os escores relativa à disponibilidade de água nos grãos de *C. arabica* foi observada nas DCs computadas. Isso ocorreu devido à alta variabilidade de solventes e misturas, onde a variação química relacionada a eles nas amostras foi maior do que a variação causada pelos diferentes regimes de água.

Até onde sabemos, a técnica SWV ainda não foi explorada para classificar os grãos de café cultivados sob diferentes níveis de CO<sub>2</sub>. Essa técnica instrumental foi aplicada para analisar novas amostras de *C. arabica* extraídas com dois solventes: etanol puro (*E*) e a mistura binária etanol-diclorometano (*ED*). Dois pontos foram levados em consideração na escolha desses solventes. Primeiramente, os extratos obtidos com eles foram corretamente separados de acordo com os níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico em que as plantas de café foram cultivadas (Figs. 1A e 1C). O segundo ponto é que os voltamogramas originais dos extratos *ED* e *E* (Fig. C5) apresentaram picos anódicos bem definidos em 0,66, 0,70, 0,80, 0,98 e 1,19 V, que foram importantes para a separação das classes, conforme indicado pelo *loading* do ComDim (Figs. 1B and 1D).

Novas extrações foram realizadas a partir de grãos coletados em três camadas de 50 cm de espessura do perfil vertical das plantas, para auxiliar na classificação dos grãos do cafeeiro

cultivado nos diferentes níveis de CO<sub>2</sub>. Bagas de posições mais baixas são sombreadas, recebendo baixa radiação fotossinteticamente ativa (RFA) (Rakocevic et al., 2021). Ao meio-dia, durante o período de colheita, o RFA incidente no topo da copa é de cerca de 1700  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , diminuindo a irradiância média disponível para 439, 122 e 4  $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para as camadas 3, 2 and 1, respectivamente. A temperatura varia ao longo do perfil vertical, mas menos do que RFA. Varia de 32,5 °C a 27,4 °C pela manhã, de 34,2 °C a 31,2 °C ao meio-dia e de 32,3 °C a 28,0 °C à tarde, para as camadas superior e inferior, respectivamente. Espera-se que essas diferenças microclimáticas provoquem mudanças metabólicas ao longo do perfil vertical do mesmo cafeeiro, conforme mostrado em Rakocevic et al. (2021) usando análises NIR. Os voltamogramas anódicos de SW poderiam fornecer dados de distribuição não linear devido às variações ambientais relacionadas às estratificações e até mesmo sobre a homogeneização do CO<sub>2</sub> gasoso entre as alturas em que as bagas estão localizadas. Resultados de ACP em Marcheafave et al. (2020c) para espectros de UV de grãos de café cultivados sob diferentes níveis de CO<sub>2</sub> e coletados em diferentes estratos, mostram que extratos da mesma classe tinham alguns agrupamentos separados e podem ser explicados devido às estratificações. Assim, para confirmar a separação dos grãos cultivados em diferentes níveis de CO<sub>2</sub>, as matrizes do voltamograma SW anódico para os extratos *ED* e *E* foram submetidas à análise de classificação utilizando o algoritmo *k*-NN, separadamente para cada solvente. Aqui *k*-NN foi escolhido porque é não probabilístico e livre de quaisquer suposições sobre distribuições de variáveis (Oliveri et al., 2019). Em seguida, todo o conjunto de dados, composto de 100 voltamogramas para cada solvente, foi dividido em conjunto de treinamento com 72 amostras (36 atuais e 36 elevadas) e conjunto de teste de 28 amostras (14 atuais e 14 elevadas) pelo algoritmo Kennard–Stone (Kennard & Stone, 1969). Três vizinhos mais próximos foram selecionados para as duas classes, pois forneceram a melhor classificação, conforme indicado pelos resultados de validação cruzada. Os parâmetros de desempenho de qualidade encontrados para os modelos *k*-

NN para classificação entre os níveis de CO<sub>2</sub> foram calculados a partir da matriz de confusão (Tabela 4).

Um bom desempenho de classificação foi alcançado para os extratos *ED* de grãos de café do conjunto de treinamento, com sensibilidade (taxa de verdadeiros positivos) e especificidade (taxa de verdadeiros negativos) de 91,67% para as classes de CO<sub>2</sub> elevado e atual (Tabela 4). Para o conjunto de predição, o modelo apresentou sensibilidade de 100% e especificidade de 92,86% para a classe de CO<sub>2</sub> atual e 92,86% e 100%, respectivamente, para a classe de CO<sub>2</sub> elevado. No caso dos extratos de etanol puro, o modelo de treinamento foi 94,44% sensível e 100% específico para os grãos de café da classe de CO<sub>2</sub> atual, e teve 100% de sensibilidade e 94,44% de especificidade para os grãos da classe de CO<sub>2</sub> elevado. No conjunto de previsão, a sensibilidade foi de 92,86% e a especificidade de 85,71% para a classe de CO<sub>2</sub> atual. As taxas de predição para grãos cultivados sob CO<sub>2</sub> atmosférico elevado tiveram sensibilidade de 85,71% e especificidade de 92,86%.

**Tabela 4.** Matriz de confusão e parâmetros de desempenho de qualidade para o modelo *k*-NN construído a partir de voltamogramas SWV anódicos de extratos etanólicos e de mistura binária etanol-diclorometano para discriminação entre os níveis de CO<sub>2</sub> de grãos de café coletados de plantas cultivadas em diferentes ambientes. Atual: CO<sub>2</sub> atmosférico atual; Elev.: CO<sub>2</sub> atmosférico elevado; Sens: Sensibilidade; Espec: Especificidade.

<i>k</i> = 3	Conjunto treinamento				Conjunto teste			
	Atual	Elev	Sens	Espec	Atual	Elev	Sens	Espec
<b>Etanol: Diclorometano (<i>ED</i>)</b>								
Atual	33	3	91,67	91,67	14	1	100	92,86
Elevado	3	33	91,67	91,67	0	13	92,86	100
<b>Etanol (<i>E</i>)</b>								
Atual	34	0	94,44	100	13	2	92,86	85,71
Elevado	2	36	100	94,44	1	12	85,71	92,86

Os resultados dos modelos *k*-NN confirmaram que os grãos de café foram classificados de acordo com os ambientes de CO<sub>2</sub>, mesmo quando coletados em diferentes camadas dos

cafeeiros, por meio de perfis SWV. A fim de avaliar se o  $k$ -NN é capaz de classificar os grãos de café de plantas cultivadas nos dois ambientes de CO<sub>2</sub> levando em consideração o regime de água, quatro classes foram investigadas usando os extratos *ED* e *E*. Cada conjunto relativo a cada solvente foi dividido em um conjunto de treinamento de 72 amostras (18 para CO<sub>2</sub> atual não irrigado, 18 para CO<sub>2</sub> atual irrigado; 18 para CO<sub>2</sub> elevado não irrigado e 18 para CO<sub>2</sub> elevado irrigado) e um conjunto de teste de 28 amostras (7 para CO<sub>2</sub> atual não irrigado, 7 para CO<sub>2</sub> irrigado atual; 7 para CO<sub>2</sub> elevado não irrigado e 7 para CO<sub>2</sub> elevado irrigado), usando o algoritmo de Kennard-Stone (Tabela 5).

Para o conjunto de treinamento para extratos *ED* de grãos de café coletados de plantas irrigadas cultivadas sob o ambiente atual de CO<sub>2</sub>, a sensibilidade e especificidade foram de 100% (Tabela 5), enquanto os resultados do conjunto de predição foram 100% sensíveis e 90,48% específicos. Os grãos da classe formada por plantas não irrigadas no nível atual de CO<sub>2</sub> tiveram uma sensibilidade do conjunto de treinamento de 83,33% e especificidade de 94,44%. Para o conjunto de predição, a sensibilidade foi 85,71% e a especificidade de 100%. Os resultados de sensibilidade e especificidade encontrados por  $k$ -NN para grãos de plantas irrigadas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado foram os mesmos que para a classe de grãos de plantas não irrigadas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual. Os resultados de treinamento para os grãos de café da classe não irrigada de CO<sub>2</sub> elevado foram 94,44% sensíveis e 98,15% específicos, enquanto o conjunto de predição mostrou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 100%.

Os extratos obtidos com etanol puro para grãos de café de plantas irrigadas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual tiveram sensibilidade de 88,89% e especificidade de 100% para o modelo de treinamento  $k$ -NN, com 100% e 85,71%, respectivamente, para o conjunto de predição (Tabela 5). Grãos de ambas as plantas, não irrigadas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual e plantas irrigadas cultivadas sob CO<sub>2</sub> elevado, apresentaram sensibilidade e especificidade de 100% para o conjunto de treinamento. No entanto, o modelo de predição para a classe de grãos de plantas

não irrigadas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual foi de apenas 71,43% sensível, enquanto a sensibilidade do modelo para a classe de grãos de plantas irrigadas cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado foi de 85,71%. Ambos os modelos tiveram especificidade superior a 95%. Finalmente, para o conjunto de dados de predição dos grãos de plantas não irrigadas cultivadas em CO<sub>2</sub> elevado, o modelo apresentou sensibilidade e especificidade de 85,71% e 100%, respectivamente.

O avanço das técnicas analíticas para detecção e quantificação metabólica aprofundou nosso conhecimento sobre as alterações ecometabólicas em plantas devido a distúrbios ambientais (Jan & Ahmad, 2019). No entanto, como mostramos, cada técnica instrumental contribui com diferentes informações químicas sobre as impressões digitais metabólicas. O método ComDim tem se mostrado uma ferramenta vantajosa para investigar respostas instrumentais pertinentes ao interesse da investigação. Neste estudo, ComDim forneceu informações sobre o processo de extração em relação aos solventes empregados, além das alterações metabólicas decorrentes das mudanças climáticas. Vale ressaltar que a associação de planejamento fatorial-planejamento de misturas-ComDim é promissor em processos de análise exploratória quando o conhecimento sobre qualquer fator experimental é desconhecido, como metabólitos alterados, solvente extrator ideal e técnica instrumental que melhor caracteriza a discriminação das classes investigadas, e até mesmo determinar quais perturbações ambientais têm efeitos importantes na modificação da composição química do órgão da planta.

A primeira DC mostrou que todas as técnicas são capazes de explorar o efeito do solvente extrator na composição da impressão digital. O processo de identificação da similaridade ou dissimilaridade entre os escores é fundamental para a escolha de solventes de extração adequados que atribuem diferentes informações químicas ao método de impressão digital. Esse tipo de estudo sistemático permite ganhos no número de classes metabólicas contidas no processo de classificação ou exploração multivariada (Marcheafave et al., 2020a).

**Tabela 5.** Matriz de confusão e parâmetros de desempenho de qualidade para o modelo  $k$ -NN dos voltamogramas SWV anódicos de extratos etanólicos e de mistura binária etanol-diclorometano para discriminação entre os níveis de CO<sub>2</sub> de grãos de café coletados de plantas irrigadas e não irrigadas. Atual IRR.: CO<sub>2</sub> atual irrigada; Atual NI: CO<sub>2</sub> atual não irrigada; Elev. IRR.: CO<sub>2</sub> elevado irrigado; Elev. NI: CO<sub>2</sub> elevado não irrigado; Sens: Sensibilidade; Espec: Especificidade.

$k = 3$	Conjunto de treinamento						Conjunto teste					
	Atual IRR	Atual NI	Elev. IRR	Elev. NI	Sens	Espec	Atual IRR	Atual NI	Elev. IRR	Elev. NI	Sens	Espec
<b>Etanol: Diclorometano (ED)</b>												
Atual IRR.	18	0	0	0	100	100	7	1	1	0	100	90,48
Atual NI.	0	15	3	0	83,33	94,44	0	6	0	0	85,71	100
Elev. IRR.	0	2	15	1	83,33	94,44	0	0	6	0	85,71	100
Elev. NI.	0	1	0	17	94,44	98,15	0	0	0	7	100	100
<b>Etanol (E)</b>												
Atual IRR.	16	1	0	0	88,89	100	7	1	1	1	100	85,71
Atual NI.	0	17	0	0	100	100	0	5	0	0	71,43	100
Elev. IRR.	0	0	18	0	100	100	0	1	6	0	85,71	95,24
Elev. NI.	2	0	0	18	100	96,30	0	0	0	6	85,71	100

DC4 e DC8 indicaram a separação entre os escores devido à concentração de dióxido de carbono atmosférico. ComDim destaca o potencial da análise SWV anódica e RMN de  $^1\text{H}$  como perfis espectrais que melhor indicam a significância biológica devido aos efeitos das mudanças climáticas na composição química dos grãos de café. RMN de  $^1\text{H}$  é indicada como a técnica espectroscópica mais adequada para a obtenção de perfis metabolômicos, mas requer equipamentos e análises caras. Apesar de seu baixo custo e relativa simplicidade, as classificações metabólicas do SWV, juntamente com métodos quimiométricos adequados de reconhecimento de padrões, ainda são raramente utilizadas em estudos de ecometabolômica, com poucos exemplos no controle de qualidade de alimentos (Salamanca-Neto et al., 2020). Por meio de métodos multibloco, é possível comparar a SWV com técnicas amplamente utilizadas (por exemplo, CL-EM, GC-EM, RMN, FT-IR, entre outros) e avaliar seu uso e implementação, conforme aplicado em nosso estudo. A análise de SWV é fácil de operar, sendo rápida, econômica, sensível e a sua respectiva instrumentação está em pleno desenvolvimento científico.

Finalmente,  $k$ -NN classificou com sucesso os grãos de *C. arabica* devido aos níveis de concentração de  $\text{CO}_2$  atmosférico, mostrando alta especificidade e sensibilidade para os extratos *E* e *ED*, conforme indicado pelos escores do ComDim. A classificação pelo modelo  $k$ -NN mostrou que a distribuição dos grãos no perfil vertical da planta fornece impressões digitais não lineares devido às variações ambientais. Dentre os 15 extratos obtidos a partir do planejamento de misturas, aqueles obtidos com etanol e etanol-diclorometano apresentaram os melhores conjuntos metabólicos que indicaram a alteração química devido ao aumento do dióxido de carbono atmosférico. Esses mesmos solventes são promissores na discriminação de grãos de café cultivados sob diferentes níveis de  $\text{CO}_2$ , quando analisados por outros métodos instrumentais e quimiométricos (Marcheafave et al., 2020b; Marcheafave et al., 2020c), o que corrobora com nossos resultados.

## 4 CONCLUSÃO

A estratégia, Planejamento Fatorial-Planejamento de Misturas-ComDim, apresentou bons resultados para a análise multibloco dos dados obtidos a partir de diferentes métodos analíticos e impressões digitais multifacetadas. ComDim permitiu a discriminação dos grãos de café cultivados sob dois níveis de CO<sub>2</sub> por SWV anódico e RMN de <sup>1</sup>H, de acordo com os parâmetros das DC4 e DC8, e indicou os solventes extratores que melhor promovem a separação entre as classes. Este estudo destacou o potencial da análise SWV anódica, juntamente com métodos quimiométricos adequados para a classificação de amostras de café cultivadas sob dois níveis diferentes de CO<sub>2</sub> atmosférico. De acordo com o gráfico de *loadings* da DC4, as impressões digitais voltamétricas indicaram que os grãos cultivados no nível atual de CO<sub>2</sub> foram discriminados pelos picos anódicos em 0,66, 0,70, 0,98 e 1,19 V, e os grãos sob CO<sub>2</sub> elevado pelo pico em 0,80 V. Enquanto a quercetina foi um dos compostos químicos importantes nos grãos de café cultivados nas atuais condições ambientais de CO<sub>2</sub>, o ácido clorogênico foi predominante para o CO<sub>2</sub> elevado. A partir dos parâmetros da DC8, as impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H para ácidos graxos, cafeína, trigonelina e glicose aumentaram nos grãos nos níveis atuais de CO<sub>2</sub>, enquanto o ácido quínico/ácidos clorogênicos, ácido málico e caveol/cafestol aumentaram nos grãos de café devido ao CO<sub>2</sub> elevado. Os extratos obtidos nas misturas binárias etanol-diclorometano e etanol puro indicaram as melhores separações entre os grãos devido à alteração do dióxido de carbono. Por outro lado, ComDim não apresentou padrão de separação entre os escores devido à disponibilidade de água, indicando que o fator CO<sub>2</sub> teve maior impacto no metaboloma do grão de *Coffea arabica* do que a disponibilidade de água. A classificação *k*-NN confirmou os resultados do ComDim, discriminando e prevendo grãos cultivados em diferentes ambientes de CO<sub>2</sub>. Além disso, por meio da seleção de solventes de extração, o algoritmo *k*-NN foi capaz de classificar as impressões digitais ecometabólicas devido ao regime hídrico. Como tal, as técnicas

eletroanalíticas são ferramentas promissoras para explorar as mudanças nas condições ambientais dos grãos de café e outras matrizes vegetais, complementando outras técnicas analíticas.

**REFERÊNCIAS**

- Afonso, S., Silva, F. B., Marcheafave, G. G., Hatumura, P. H., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019). Influence of seasonality and sunlight effects on *Rollinia mucosa* leaves fingerprint. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 30(5), 968–977. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180242>
- Barwick, V. J. (1997). Strategies for solvent selection - A literature review. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 16(6), 293–309. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(97\)00039-3](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(97)00039-3)
- Bouveresse, D. J., Pinto, R. C., Schmidtke, L. M., Locquet, N., & Rutledge, D. N. (2011). Identification of significant factors by an extension of ANOVA – PCA based on multi-block analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 106, 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2010.05.005>
- Cariou, V., Qannari, E. M., Rutledge, D. N., & Vigneau, E. (2018). ComDim: From multiblock data analysis to path modeling. *Food Quality and Preference*, 67, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2017.02.012>
- Damatta, F. M., Godoy, A. G., Menezes-Silva, P. E., Martins, S. C. V., Sanglard, L. M. V. P., Morais, L. E., Torre-Neto, A., Ghini, R. (2016). Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO<sub>2</sub> enrichment conditions: Disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of Experimental Botany*, 67(1), 341–352. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv463>
- Delarozza, F., Rakocevic, M., Malta, G. B., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2014). Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25(11), 1929–1938. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140172>
- Ghaziri, A. El, Cariou, V., Rutledge, D. N., & Qannari, E. M. (2016). Analysis of multiblock

- datasets using ComDim: Overview and extension to the analysis of (K+1) datasets. *Journal of Chemometrics*, *30*, 420–429. <https://doi.org/10.1002/cem.2810>
- Ghini, R., Torre-Neto, A., Dentzien, A. F. M., Guerreiro-Filho, O., Iost, R., Patrício, F. R. A., Prado, J. S. M., Thomaziello, R. A., Bettiol, W., DaMatta, F. M. (2015). Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO<sub>2</sub> enrichment. *Climatic Change*, *132*, 307–320. <https://doi.org/10.1007/s10584-015-1422-2>
- Jan, S., & Ahmad, P. (2019). Introducing Metabolomics. In *Ecometabolomics: Metabolic Fluxes versus Environmental Stoichiometry* (1st ed., pp. 1–56). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-814872-3.00001-1>
- Karoui, R., Dufour, É., & De Baerdemaeker, J. (2006). Common components and specific weights analysis: A tool for monitoring the molecular structure of semi-hard cheese throughout ripening. *Analytica Chimica Acta*, *572*, 125–133. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.04.089>
- Kennard, R. W., & Stone, L. A. (1969). Computer aided design of experiments. *Technometrics*, *11*(1), 137–148. <https://doi.org/10.2307/1266770>
- Makimori, G. Y. F., & Bona, E. (2019). Commercial instant coffee classification using an electronic nose in tandem with the ComDim-LDA Approach. *Food Analytical Methods*, *12*, 1067–1076. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01443-5>
- Malegori, C., Grassi, S., Ohm, J.-B., Anderson, J., & Marti, A. (2018). GlutoPeak profile analysis for wheat classification: Skipping the refinement process. *Journal of Cereal Science*, *79*, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2017.09.005>
- Marcheafave, G. G., Tormena, C. D., Mattos, L. E., Liberatti, V. R., Ferrari, A. B. S., Rakocevic, M., Bruns, R. E., Scarminio, I. S., Pauli, E. D. (2020a). The main effects of elevated CO<sub>2</sub> and soil-water deficiency on <sup>1</sup>H NMR-based metabolic fingerprints of *Coffea arabica* beans by factorial and mixture design. *Science of The Total Environment*, *749*,

142350. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142350>
- Marcheafave, G.G., Pauli, E. D., Tormena, C. D., Mattos, L. E., de Almeida, A. G., Rakocevic, M., Bruns, R. E., Scarminio, I. S. (2020b). Irrigated and CO<sub>2</sub> level effects on metabolism in *Coffea arabica* beans from mixture design—near infrared fingerprints. *Microchemical Journal*, *152*, 104276. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104276>
- Marcheafave, G. G., Pauli, E. D., Tormena, C. D., Ortiz, M. C. V., de Almeida, A. G., Rakocevic, M., Bruns, R. E., Scarminio, I. S. (2020c). Factorial design fingerprint discrimination of *Coffea arabica* beans under elevated carbon dioxide and limited water conditions. *Talanta*, *209*, 120591. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120591>
- Marcheafave, G. G., Tormena, C. D., Pauli, E. D., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019a). Experimental mixture design solvent effects on pigment extraction and antioxidant activity from *Coffea arabica* L. leaves. *Microchemical Journal*, *146*, 713–721. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.073>
- Marcheafave, G. G., Tormena, C. D., Afonso, S., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019b). Integrated chemometric approach to optimize sample preparation for detecting metabolic changes provoked by abiotic stress in *Coffea arabica* L. leaf fingerprints. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *30*(10), 2085–2094. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190068>
- Mazerolles, G., Hanafi, M., Dufour, E., Bertrand, D., & Qannari, E. M. (2006). Common components and specific weights analysis: A chemometric method for dealing with complexity of food products. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, *81*, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2005.09.004>
- Mezquita, Y., Alonso, R. S., Casado-Vara, R., Prieto, J., & Corchado, J. M. (2020). A review of *k*-NN algorithm based on classical and quantum machine learning. In J. Kacprzyk (Ed.), *Advances in Intelligent Systems and Computing* (pp. 189–199). Poland: Springer.

- Nagler, M., Nägele, T., Gilli, C., Fragner, L., Korte, A., Platzer, A., Farlow, A., Nordborg, M., Weckwerth, W. (2018). Eco-metabolomics and metabolic modeling: Making the leap from model systems in the lab to native populations in the field. *Frontiers in Plant Science*, *871*, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01556>
- Oliveri, P., Malegori, C., Casale, M., Tartacca, E., & Salvatori, G. (2019). An innovative multivariate strategy for HSI-NIR images to automatically detect defects in green coffee. *Talanta*, *199*, 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.049>
- Passari, L. M. Z. G., Scarminio, I. S., Marcheafave, G. G., & Bruns, R. E. (2019). Seasonal changes and solvent effects on fractionated functional food component yields from *Mikania laevigata* leaves. *Food Chemistry*, *273*, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.12.075>
- Pauli, E. D., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2016). UV-Vis spectral fingerprinting and chemometric method applied to the evaluation of *Camellia sinensis* leaves from different harvests. *Analytical Methods*, *8*, 7537–7544. <https://doi.org/10.1039/C6AY02462A>
- Peters, K., Worrich, A., Weinhold, A., Alka, O., Balcke, G., Birkemeyer, C., ... van Dam, N. M. (2018). Current challenges in plant Eco-Metabolomics. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5), 1–38. <https://doi.org/10.3390/ijms19051385>
- Qannari, E. M., Wakeling, I., Courcoux, P., & MacFie, H. J. H. (2000). Defining the underlying sensory dimensions. *Food Quality and Preference*, *11*, 151–154. [https://doi.org/10.1016/s0950-3293\(99\)00069-5](https://doi.org/10.1016/s0950-3293(99)00069-5)
- Rakocevic, M., Batista, E. R., Pazianotto, R. A. A., Scholz, M. B. S., Souza, G. A. R., Campostrini, E., & Ramalho, J. C. (2021). Leaf gas exchange and bean quality fluctuations over the whole canopy vertical profile of Arabica coffee cultivated under elevated CO<sub>2</sub>. *Functional Plant Biology*. <https://doi.org/10.1071/FP20298>
- Rakocevic, M., Braga, K. S. M., Batista, E. R., Maia, A. H. N., Scholz, M. B. S., & Filizola, H.

- F. (2020). The vegetative growth assists to reproductive responses of Arabic coffee trees in a long-term FACE experiment. *Plant Growth Regulation*, *91*(2), 305–316. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00607-2>
- Rakocevic, M., & Matsunaga, F. T. (2018). Variations in leaf growth parameters within the tree structure of adult *Coffea arabica* in relation to seasonal growth, water availability and air carbon dioxide concentration. *Annals of Botany*, *122*(1), 117–131. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy042>
- Rosa, L. N., de Figueiredo, L. C., Bonafé, E. G., Coqueiro, A., Visentainer, J. V., Março, P. H., Rutledge, D. N., Valderrama, P. (2017). Multi-block data analysis using ComDim for the evaluation of complex samples: Characterization of edible oils. *Analytica Chimica Acta*, *961*, 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.019>
- Rutan, S. C., Carr, P. W., Cheong, W. J., Park, J. H., & Snyder, L. R. (1989). Re-evaluation of the solvent triangle and comparison to solvatochromic based of solvent strenght and selectivity. *Journal of Chromatography*, *463*, 21–37.
- Salamanca-Neto, C. A. R., Marcheafave, G. G., Scremin, J., Barbosa, E. C. M., Camargo, P. H. C., Dekker, R. F. H., Scarminio, I. S., Barbosa-Dekker, A. M., Sartori, E. R. (2020). Chemometric-assisted construction of a biosensing device to measure chlorogenic acid content in brewed coffee beverages to discriminate quality. *Food Chemistry*, *315*, 126306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126306>
- Silveira, T. F. F., Lima, M. de A., Meinhart, A. D., Kuhnle, G. G. C., & Godoy, H. T. (2020). Effect of solvent composition on the extraction of phenolic compounds and antioxidant capacity of bacaba juice (*Oenocarpus bacaba* Mart.). *Food Analytical Methods*, *13*(5), 1119–1128. <https://doi.org/10.1007/s12161-020-01726-2>
- Snyder, L. R., Carr, P. W., & Rutan, S. C. (1993). Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. *Journal of Chromatography A*, *656*(1–2), 537–547. <https://doi.org/10.1016/0021->

9673(93)80818-S

- Soares, P. K., Marcheafave, G. G., Gomes, A. de A., Scarminio, I. S., & Bruns, R. E. (2018). Mixture Design PARAFAC HPLC-DAD metabolomic fingerprints of fractionated organic and basic extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. *Chromatographia*, *81*(8), 1189–1200. <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3554-9>
- Tormena, C.D., Marcheafave, G. G., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019a). Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds. *Talanta*, *191*, 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.002>
- Tormena, C. D., Marcheafave, G. G., Pauli, E. D., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2019b). Potential biomonitoring of atmospheric carbon dioxide in *Coffea arabica* leaves using near-infrared spectroscopy and partial least squares discriminant analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, *26*(29), 30356–30364. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-06163-1>
- Tormena, C. D., Pauli, E. D., Marcheafave, G. G., Scheel, G. L., Rakocevic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. (2020). FT-IR biomarkers of sexual dimorphism in yerba-mate plants: seasonal and light accessibility effects. *Microchemical Journal*, *158*, 105329. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105329>
- Vieira, T. F., Makimori, G. Y. F., dos Santos Scholz, M. B., Zielinski, A. A. F., & Bona, E. (2020). Chemometric approach using ComDim and PLS-DA for discrimination and classification of commercial Yerba Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). *Food Analytical Methods*, *13*, 97–107. <https://doi.org/10.1007/s12161-019-01520-9>

## CONCLUSÃO GERAL

Individualmente, a espectroscopia NIR com medidas de impressão digital no modo de transmitância associada aos extratos delineados pelo planejamento de misturas foi capaz de indicar satisfatoriamente mudanças químicas entre os grãos de *Coffea arabica* oriundos de diferentes concentrações atmosféricas de CO<sub>2</sub> e disponibilidade hídrica. A análise exploratória por ACP indicou que, nesta técnica, os extratos em etanol e etanol-diclorometano contém a informação metabólica que melhor indica as alterações químicas nos grãos. Coincidentemente, esses mesmos extratos têm comportamento similar nas impressões digitais obtidas com a espectrofotometria na região UV e na técnica SWV.

As impressões digitais UV indicaram a diferenciação química entre os grãos em virtude das alterações de CO<sub>2</sub> atmosférico. Através dessa técnica, pela primeira vez, o efeito de mitigação do CO<sub>2</sub> sob a seca foi verificado quimicamente pela impressão digital. Em condições elevadas de CO<sub>2</sub> atmosférico, não houve evidência de diferença química pelo perfil espectral investigado no extrato etanólico – o que contrapõe os perfis espectrais sob CO<sub>2</sub> atual de grãos irrigados e não irrigados que são discriminados em virtude dessa alteração ambiental. A impressão digital UV foi capaz de indicar a interação CO<sub>2</sub>×disponibilidade hídrica a partir das impressões digitais para o sistema extrator etanólico e mistura binária etanol-diclorometano pelo ASCA.

Através da técnica de RMN de <sup>1</sup>H, perfis químicos com maior diversidade metabólica, frente aos demais métodos, demonstrou que o CO<sub>2</sub> atmosférico é o efeito principal de maior significância sob as alterações químicas dos grãos crus de café. Nessa técnica, o efeito principal da disponibilidade hídrica e a interação entre CO<sub>2</sub>×disponibilidade hídrica não foram significativos pelo ASCA. As impressões digitais de RMN de <sup>1</sup>H com análise ACP, ASCA e PLS-DA determinaram perfis espectrais para ácidos graxos, cafeína, trigonelina e de glicose com aumentos em grãos de CO<sub>2</sub> atual, enquanto ácido quínico/ácidos clorogênicos, ácido

málico e caveol/cafestol aumentaram em grãos de café sob elevado CO<sub>2</sub>. Estas alterações químicas foram parcialmente concordantes entre UV, RMN e SWV. Modelos de discriminação PLS-DA confirmaram a mudança química entre os grãos e ainda, através de um teste de robustez do método, provou ser capaz de classificar corretamente impressões digitais de grãos de *C. arabica* provenientes de diferentes estratificações do perfil vertical da planta e diferentes sistemas extratores.

O método multiblocos sumarizou todas as impressões digitais provenientes das técnicas UV, NIRS, RMN de <sup>1</sup>H, SWV e FT-IR obtidas com os diferentes solventes extratores. Resultados do ComDim indicaram que SWV anódico e RMN de <sup>1</sup>H tem maior capacidade de discriminação entre os grãos cultivados em diferentes ambientes de CO<sub>2</sub> atmosférico.

O compilado de resultados demonstra que os grãos de *C. arabica* são suscetíveis as mudanças climáticas, principalmente o aumento atmosférico de CO<sub>2</sub>. A mitigação da seca pelo incremento de CO<sub>2</sub> pode ser um indicador benéfico ao desenvolvimento dos cafés, visto a previsão de secas mais severas no futuro. Entretanto, as mudanças ocasionadas por essas alterações não se restringem apenas a mudanças químicas. Todo o ecossistema é alterado e põe em risco diversas vertentes sociais, políticas, econômicas e sanitárias.

A associação entre o experimento agrônomico FACE e as metodologias de impressão digital foram capazes de indicar e explorar as alterações químicas ocasionadas no frutos crus de forma real, evidenciando a concordância metabólica entre as diferentes técnicas instrumentais e metodologias químimétricas. Dessa forma confirma a hipótese de mudança química em virtude das alterações climáticas.

Por fim, a aplicação do planejamento estatístico de misturas associado a ecometabolômica foi fundamental para determinar os sistemas extratores que continham o máximo de informação metabólica relacionado as alterações químicas dos grãos de *Coffea arabica*. A junção das várias técnicas experimentais foram fundamentais para explorar a

mudança climática em uma matriz complexa de forma abrangente, consolidando estratégias analíticas de experimentação na área de ecometabolômica.

## ANEXO A

### ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA MULTI-IMPRESSÃO DIGITAL

A vantagem de usar o planejamento de misturas para obter diversas impressões digitais do material vegetal é a variabilidade da seletividade do solvente extrator - dipolaridade, acidez e basicidade. A variação nos parâmetros de Snyder [1] permite observar as interações do sistema extrator, seja maximizando ou minimizando a extração de determinadas classes de compostos e, conseqüentemente, alterando o perfil metabólico obtido pela técnica espectrofotométrica (Tabela 1).

As variações nos padrões das impressões digitais podem ser fundamentais para identificar as diferenças em matrizes que possuem composições químicas muito semelhantes, como é o caso de investigações sobre o estresse ambiental em alimentos, onde muitas vezes diferenças quantitativas são detectadas em poucos metabólitos. Essa abordagem permite maximizar o número de impressões digitais possíveis em experimentos sistemáticos com seletividades conhecidas para uma única amostra (multi-impressão digital). As ferramentas de discriminação multivariada podem, assim, identificar mudanças sutis no perfil dessas multi-impressões digitais e indicar a melhor condição de extração para maximizar as diferenças metabólicas. A aplicação da técnica experimental do planejamento de misturas pode indicar o máximo possível de diferenças nos perfis metabólicos entre os conjuntos de amostras investigadas, que dificilmente serão encontrados através da escolha aleatória de um único solvente de extração.

O gráfico de escores para as multi-impressões digitais na região UV para os grãos irrigados e não irrigados nas duas condições de CO<sub>2</sub> mostraram comportamentos semelhantes (Fig. 2A e 2B, texto principal). Esse fato apoia a reprodutibilidade das extrações - o que também pode ser visto nos respectivos gráficos de *loadings* (Fig. A1). Na região positiva da CP1 no

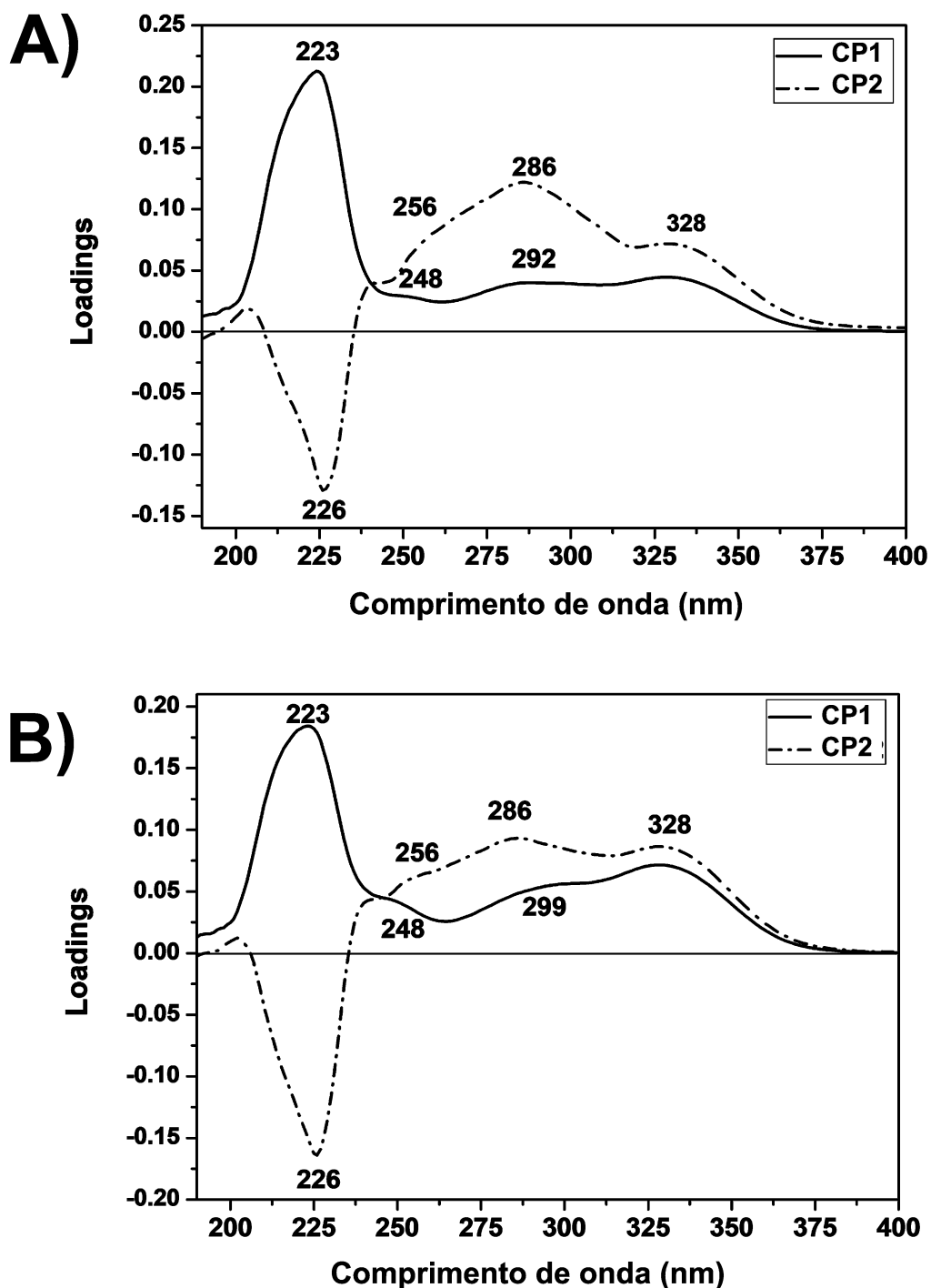
gráfico dos escores (Fig. 2A e 2B, texto principal), localizaram-se as impressões digitais de extratos de etanol puro, éter etílico e suas misturas, enquanto na região negativa localizaram-se as demais impressões digitais. Etanol e éter etílico têm valores altos e similares para o parâmetro de basicidade ( $\beta$ ). Pressupõe-se, portanto, que a discriminação das impressões digitais ao longo da CP1 se deve a essa interação no processo extrativo. Em correlação com os *loadings* (Fig. A1A e A1B), as bandas em 223, 248, 292 e 328 nm estão relacionadas aos extratos de etanol e éter etílico. Essas bandas são características dos metabólitos da classe dos ácidos clorogênicos [2,3].

A região positiva da CP2 discriminou extratos de etanol puro e sua mistura com diclorometano (*ED*), enquanto na região negativa foram encontradas impressões digitais obtidas com éter etílico puro e as misturas binárias *Eet* e *Det* (Fig. 2A e 2B, texto principal). A principal diferença entre éter etílico e etanol está no parâmetro de acidez ( $\alpha$ ). O éter etílico não tem essa seletividade característica, enquanto o etanol possui um alto valor de acidez. Na região positiva, as bandas de 256, 286 e 328 nm, características dos ácidos clorogênicos, estão correlacionadas com o extrato etanólico (Fig. A1A e A1B). Por outro lado, a banda em 226 nm na região negativa, correlacionada com éter etílico, sugere a presença de cafestol (Fig. A1A e A1B) [3,4].

A variação físico-química das propriedades do sistema de solventes fornece impressões digitais com informações diversas. O solvente pode ser escolhido para investigar as diferenças mais intrigantes e sutis das diferentes classes metabólicas.

Testes estatísticos univariados podem ser usados como complemento para interpretações gráficas multivariadas. Para o nosso conjunto de dados do planejamento de misturas, o teste *t* foi aplicado aos escores médios da CP1 e CP2 de árvores não irrigadas e irrigadas para confirmar os extratos de solvente com diferenças significativas entre as condições atuais e elevadas de CO<sub>2</sub> (Tabela A1). As plantas não irrigadas apresentaram para CP1 uma

diferença significativa nos escores de 11 dos 15 sistemas de solventes, enquanto 12 dos 15 apresentaram diferenças significativas nos escores da CP2. Os escores de CP1 e CP2 para árvores irrigadas tiveram ambas 10 diferenças significativas diante dos 15 sistemas extratores.



**Fig. A1.** Gráficos de *loadings* para multi-impressão digital na região UV de grãos crus de *C. arabica* cultivados sob nível atual e elevado de CO<sub>2</sub>. As multi-impressões digitais foram obtidas através de um planejamento estatístico de misturas. **A)** Cafeeiros não irrigados; **B)** cafeeiros irrigados.

**Tabela A1.** Resultados do teste *t* para os escores da análise de componentes principais comparando as diferenças de média entre as duas condições de dióxido de carbono para a multi-impressão digital obtida pelo planejamento estatístico de misturas.

Notação do extrato	Cafeeiros não irrigados		Cafeeiros irrigados	
	Escores da CP1	Escores da CP2	Escores da CP1	Escores da CP2
<i>E</i>	<u>5,45</u>	<u>7,85</u>	<u>4,86</u>	<u>6,75</u>
<i>D</i>	-0,13	0,36	<u>8,99</u>	<u>12,25</u>
<i>H</i>	<u>-16,46</u>	<u>-36,81</u>	<u>-7,43</u>	<u>-32,20</u>
<i>et</i>	<u>13,11</u>	<u>-20,00</u>	<u>-5,18</u>	<u>-10,97</u>
<i>ED</i>	<u>22,26</u>	<u>21,08</u>	<u>5,97</u>	<u>6,64</u>
<i>EH</i>	<u>4,83</u>	<u>5,48</u>	<u>5,87</u>	<u>5,99</u>
<i>Eet</i>	<u>3,73</u>	<u>9,30</u>	-1,53	2,46
<i>DH</i>	<u>-3,19</u>	<u>-6,28</u>	2,09	<u>6,82</u>
<i>Det</i>	<u>-18,96</u>	<u>11,29</u>	-2,45	-0,01
<i>Het</i>	-1,28	-2,21	-0,73	-0,98
<i>EHet</i>	<u>3,60</u>	1,20	<u>6,75</u>	<u>9,95</u>
<i>EDet</i>	-0,35	<u>25,42</u>	<u>10,28</u>	-1,34
<i>EDH</i>	<u>10,18</u>	<u>10,22</u>	<u>-2,95</u>	<u>4,53</u>
<i>DHet</i>	0,47	<u>2,80</u>	-0,72	0,42
<i>EDHet</i>	<u>10,16</u>	<u>9,40</u>	<u>-6,38</u>	<u>-8,27</u>

\* Valor *t* crítico correspondente no nível de 95% de confiança:  $t_{4;0,05} = 2,78$ .

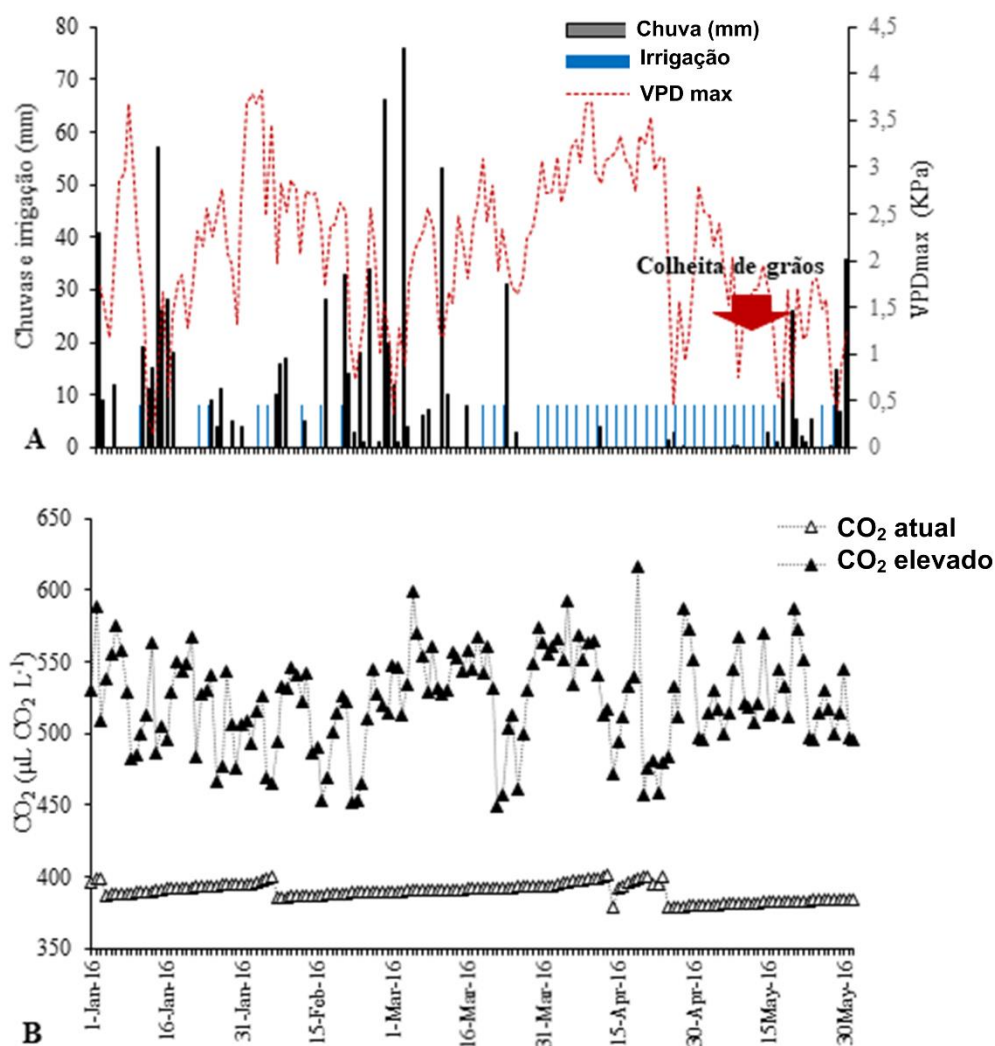
\* Os valores em vermelho são significativos no nível de confiança de 95%.

## Referências

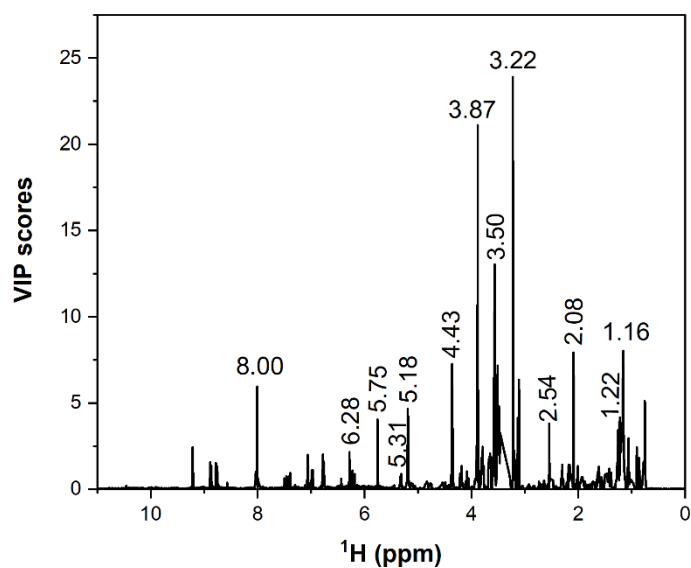
- [1] V.J. Barwick, Strategies for solvent selection - A literature review, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 293–309. doi:10.1016/S0165-9936(97)00039-3.
- [2] A. Belay, A. V. Gholap, Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy, *African J. Pure Appl. Chem.* 3 (2009) 234–240. doi:10.5897/AJPAC.
- [3] A.E. Terrile, G.G. Marcheafave, G.S. Oliveira, M. Rakocevic, R.E. Bruns, I.S. Scarminio, Chemometric Analysis of UV characteristic profile and infrared fingerprint variations of *Coffea arabica* green beans under different space management treatments, *J. Braz. Chem. Soc.* 27 (2016) 1254–1263. doi:10.5935/0103-5053.20160022.
- [4] R.C.E. Dias, M. de T. Benassi, Discrimination between Arabica and Robusta coffees

using hydrosoluble compounds: Is the efficiency of the parameters dependent on the roast degree?, *Beverages*. 1 (2015) 127–139. doi:10.3390/beverages1030127.

## ANEXO B



**Fig. B1.** Dinâmica em: **A)** chuvas diárias e irrigação (mm) e déficit de pressão de vapor máximo diário estimado, próximo do meio-dia (VPDmax, KPa), **B)** CO<sub>2</sub> elevado diário (e[CO<sub>2</sub>]) e atual (a[CO<sub>2</sub>]) (µL CO<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>) registrados dentro dos octógonos do experimento FACE de janeiro de 2016 a maio de 2016. A injeção de CO<sub>2</sub> ocorreu apenas durante o dia. O período de colheita dos frutos é indicado.



**Fig. B2.** Importância da variável na projeção (VIP) da análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA).

**Tabela B1.** Planejamento fatorial para investigação dos efeitos das mudanças climáticas na impressão digital metabólica dos grãos de *Coffea arabica*.

Fatores	-	+
1. Níveis de CO <sub>2</sub>	Atual (390 μL L <sup>-1</sup> )	Elevado (590 μL L <sup>-1</sup> )
2. Disponibilidade de água	Sem irrigação	Com irrigação
	Nível do fator	
Experimento fatorial	1	2
1	-	-
2	-	+
3	+	-
4	+	+

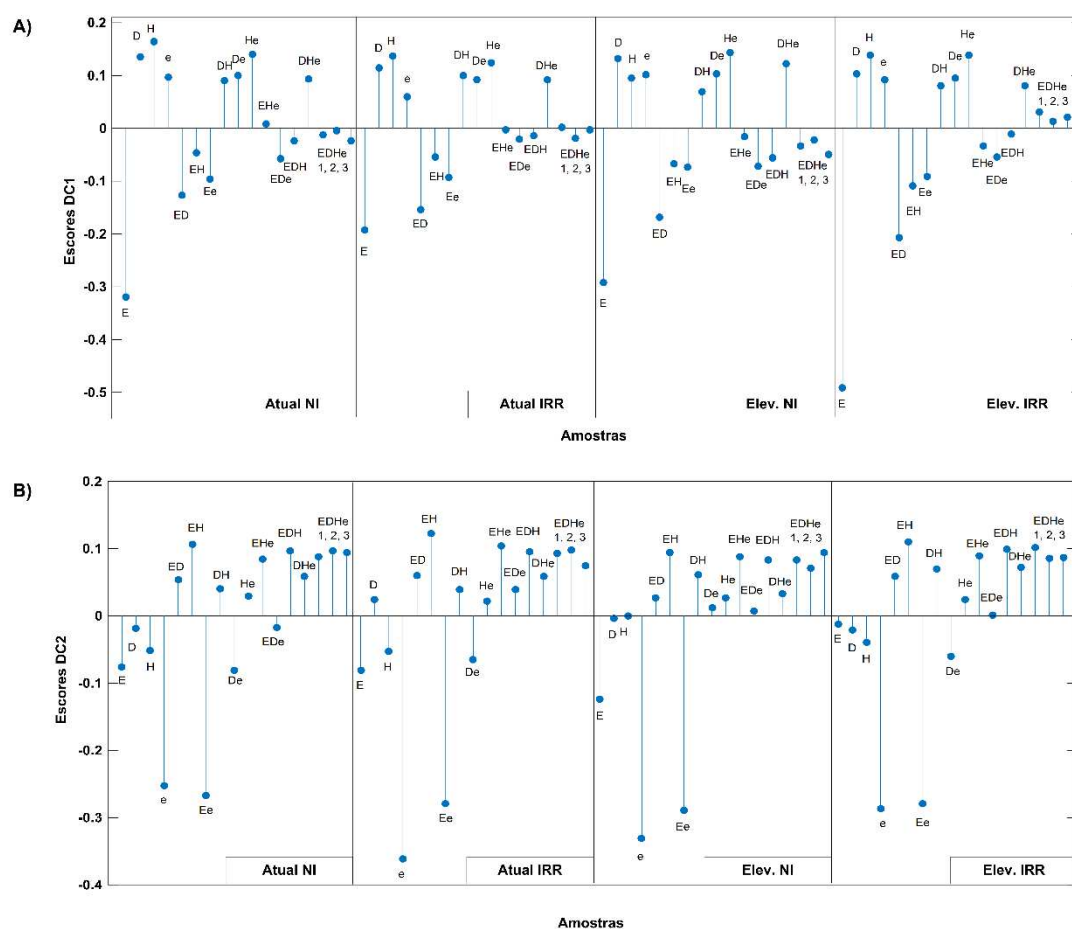
**Tabela B2.** Grãos de *Coffea arabica* coletados de plantas cultivadas sob CO<sub>2</sub> atual foram usados para confirmar a classificação correta pelo modelo de previsão PLS-DA a partir de impressões digitais de RMN. Grãos coletados de quatro camadas dos cafeeiros com 50 cm de espessura (camada 1: <50 cm, camada 2: 51 - 100 cm, camada 3: 101 - 150 cm, camada 4:> 150 cm). Solventes de extração escolhidos aleatoriamente a partir do delineamento do planejamento de misturas, *E* = etanol; *H* = hexano; *D* = diclorometano; *e* = éter etílico.

<b>Amostra</b>	<b>Estrato de coleta</b>	<b>Solvente de extração</b>
1	3	<i>H</i>
2	4	<i>EDH</i>
3	3	<i>ED</i>
4	3	<i>De</i>
5	3	<i>De</i>
6	3	<i>D</i>
7	3	<i>D</i>
8	3	<i>EDe</i>
9	3	<i>EDe</i>
10	4	<i>EDH</i>
11	4	<i>EDH</i>
12	3	<i>H</i>
13	3	<i>H</i>
14	4	<i>Ee</i>
15	3	<i>E</i>
16	3	<i>E</i>
17	4	<i>EHD<sub>e</sub></i>
18	3	<i>He</i>
19	4	<i>DH</i>
20	4	<i>DH</i>
21	2	<i>e</i>
22	2	<i>EHe</i>

## ANEXO C

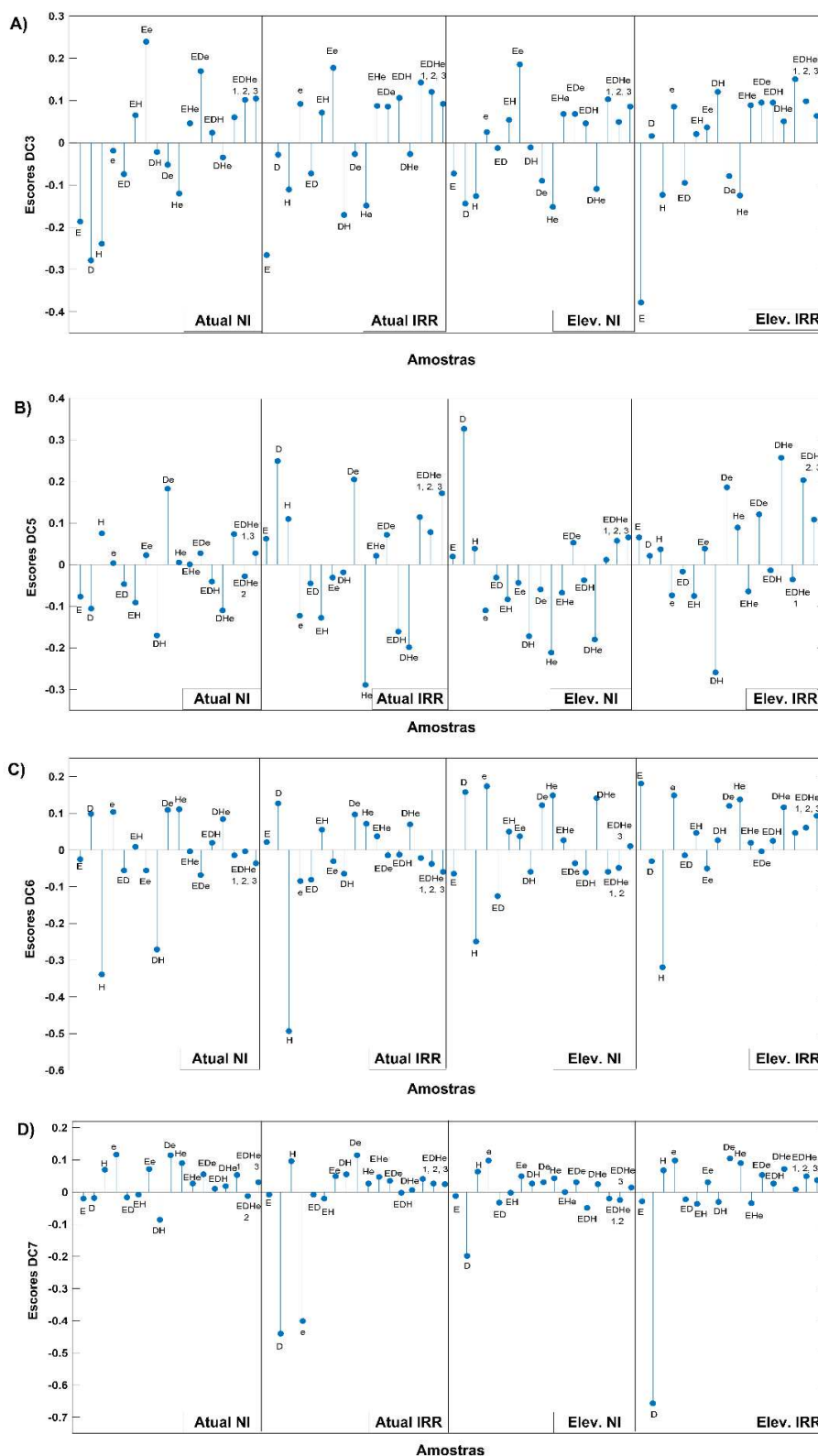
### ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE IMPRESSÕES DIGITAIS POR COMDIM

A análise exploratória dos extratos de café por ComDim foi obtida por meio de seis técnicas instrumentais. Os escores de DC4 e DC8 mostram a separação dos extratos de grãos de café cultivados sob níveis elevados e atuais de CO<sub>2</sub> (Fig. 1). Os padrões de discriminação dos escores de DC1 e DC2 foram identificados pelos tipos de solventes e suas misturas usadas (Fig. C1). No entanto, o gráfico de escores de DC3, DC5, DC6 e DC7 não forneceu informações adicionais significativas para diferenciar as amostras (Fig. C2).



**Fig. C1.** Escores da análise ComDim para DC1 (A) e DC2 (B) para as impressões digitais das quatro classes de grãos de *Coffea arabica*; Atual NI = CO<sub>2</sub> atual não irrigado; Atual IRR = CO<sub>2</sub> atual irrigado; Elev. NI = CO<sub>2</sub> elevado não irrigado; Elev. IRR = CO<sub>2</sub> elevado irrigado. As identificações dos escores correspondem ao meio de extração usado a partir do planejamento de misturas (Tabela 1): *E* = etanol; *D* = diclorometano; *H* = hexano; *e* = éter etílico.

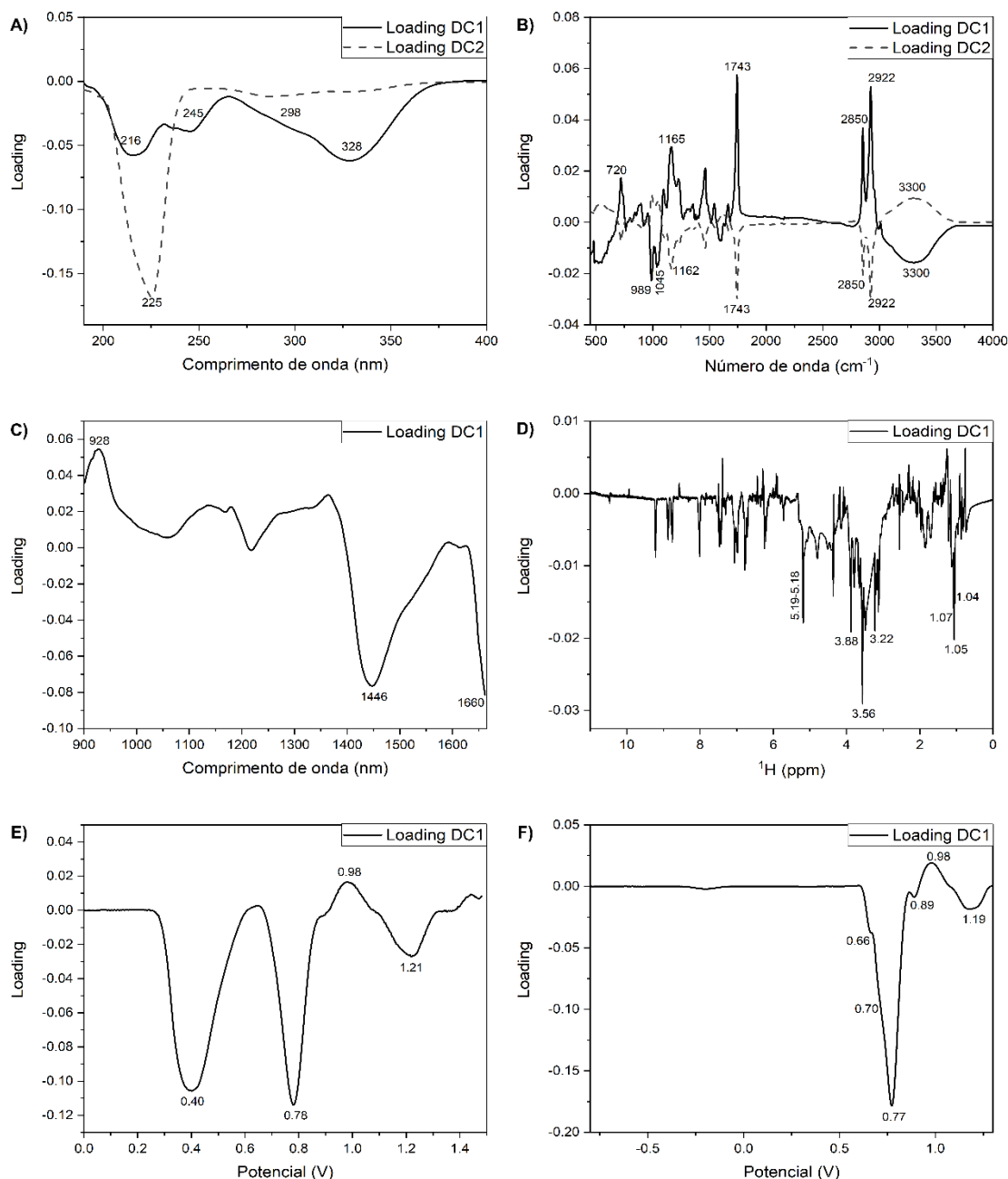
A Fig. C1A mostra a projeção dos escores na DC1, em que a maioria dos extratos obtidos usando solventes contendo etanol estavam localizados no lado negativo, enquanto os extratos com solventes não etanólicos (isto é, sem etanol) estavam no lado positivo. Todas as técnicas estudadas contribuíram para a separação dos extratos na DC1, de acordo com os valores de saliência (Tabela 3). A ordem decrescente das contribuições observadas foram: SWV, FT-IR e RMN de <sup>1</sup>H, UV e NIRS.



**Fig. C2.** Escores da análise ComDim para DC3 (A), DC5 (B), DC6 (C) e DC7 (D) para as impressões digitais das quatro classes de grãos de *Coffea arabica*; Atual NI = CO<sub>2</sub> atual não irrigado; Atual IRR = CO<sub>2</sub> atual irrigado; Elev. NI = CO<sub>2</sub> elevado não irrigado; Elev. IRR = CO<sub>2</sub> elevado irrigado. As identificações dos escores correspondem ao meio de extração usado a partir do planejamento de misturas (Tabela 1): E = etanol; D = diclorometano; H = hexano; e = éter etílico.

Para avaliar as variáveis de cada bloco na DC1, foram investigados os respectivos *loadings* (Fig. C3). O gráfico *loadings* dos voltamogramas SW mostrou que os picos que mais contribuíram para a separação dos extratos etanólicos estavam localizados principalmente no lado negativo do gráfico de escores foram: 0,40, 0,78 e 1,21 V para a varredura catódica e 0,66, 0,70, 0,77, 0,89 e 1,19 V para a varredura anódica de SWV (Fig. C3E e C3F, respectivamente). Uma avaliação do perfil voltamétrico (varreduras catódicas e anódicas) foi realizada onde o extrato de *C. arabica* foi incrementado individualmente com a adição de padrão analítico dos principais constituintes do café (Fig. C4). De acordo com os resultados, os picos catódicos em 0,40 e 0,78 V foram relacionados ao ácido clorogênico (dados não mostrados). O ácido clorogênico (0,80 V) e a quercetina (0,66 e 0,98 V) (Fig. C4) também foram metabólitos importantes para a discriminação de extratos etanólicos no modo anódico (Fig. C3F). Bandas de UV (Fig. C3A) em 216, 245 e 328 nm, com ombro em 298 nm, também indicaram ácido clorogênico, reforçando a conclusão de que este metabólito pode ser extraído em maiores quantidades na presença de etanol na composição do extrator em comparação com misturas de solventes para as quais o etanol não era um componente. O RMN apresentou picos que podem ser atribuídos à cafeína, como 3,88, 3,56 e 3,22 ppm (Marcheafave et al., 2020) e a estrutura de glicose 5,19-5,18 ppm (Marcheafave et al., 2020), além dos picos em 1,07, 1,05 e 1,04 ppm (Fig. C3D). As bandas do espectro FT-IR relacionadas a esses extratos foram em torno de 3300, 1045 e 989  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. C3B), que podem ser atribuídos a glicose (Belchior, Botelho, Casal, Oliveira, & Franca, 2020; Craig, Franca, & Oliveira, 2011; Sivakesava & Irudayaraj, 2000, 2001). Finalmente, os valores de *loading* na região NIR mais importantes foram em 1446 nm e 1660 nm (Fig. C3C), ambos os comprimentos de onda altamente relacionados aos açúcares. Embora a primeira região seja dominada por sinais de água, outros compostos com alongamento O-H podem contribuir para essas absorções, assim como carboidratos (Rambo, Amorim, &

Ferreira, 2013). A segunda região pode ser atribuída a uma combinação do primeiro sobretudo do O-H em açúcares, como mencionado acima (Paradkar, Sakhamuri, & Irudayaraj, 2002).

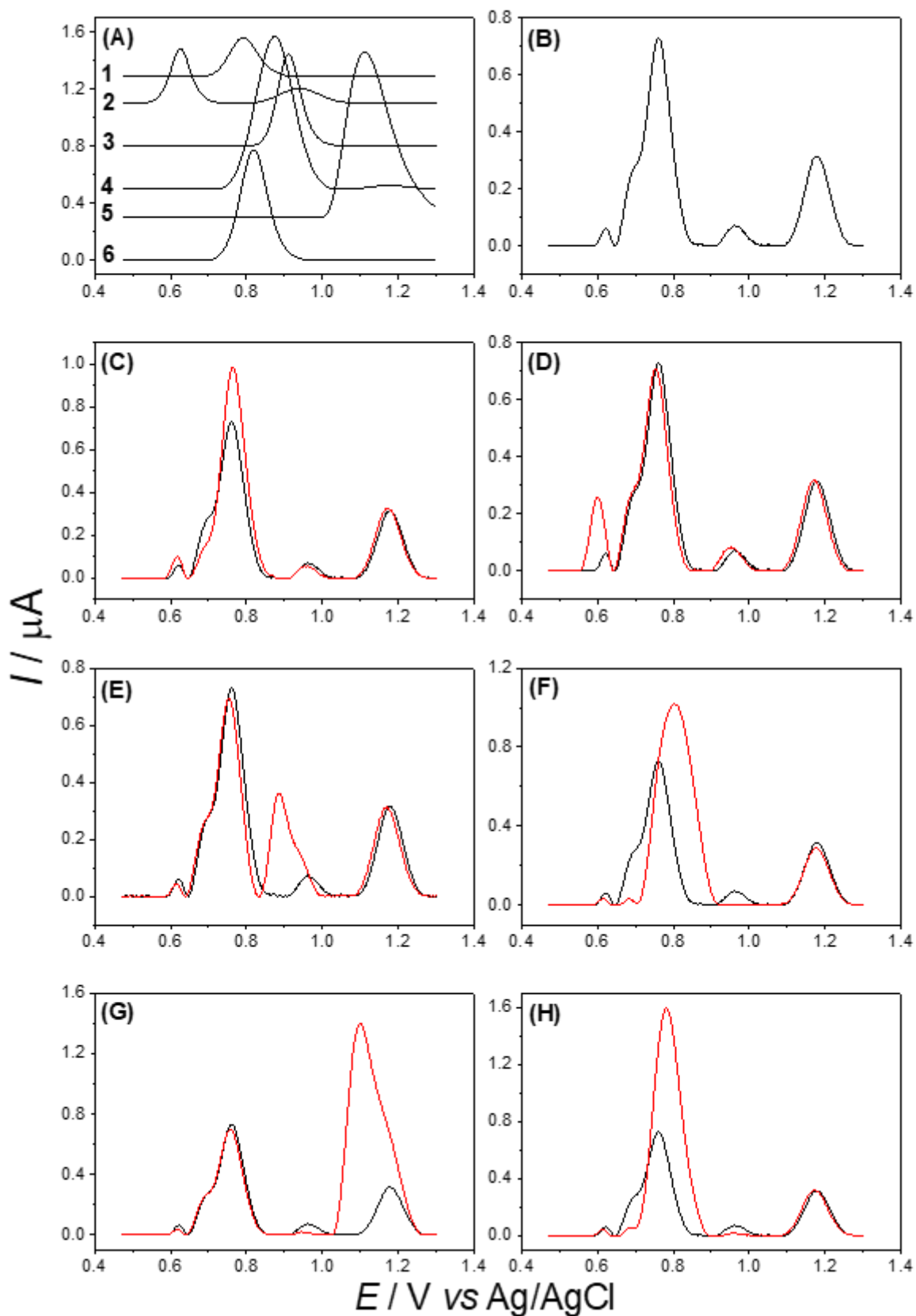


**Fig. C3.** Gráficos de *loadings* para a primeira dimensão comum (DC1): **A)** UV; **B)** FT-IR; **C)** NIRS; **D)** RMN de <sup>1</sup>H; **E)** SWV catódico; **F)** SWV anódico e para a segunda dimensão comum (DC2): **A)** UV; **B)** FT-IR.

Para os extratos sem etanol na composição do extrator (hexano, diclorometano e éter etílico e suas respectivas misturas binárias e ternárias), o gráfico de *loadings* para DC1, com valores positivos nos voltamogramas, apresentou apenas um pico em 0,98 V no catódico

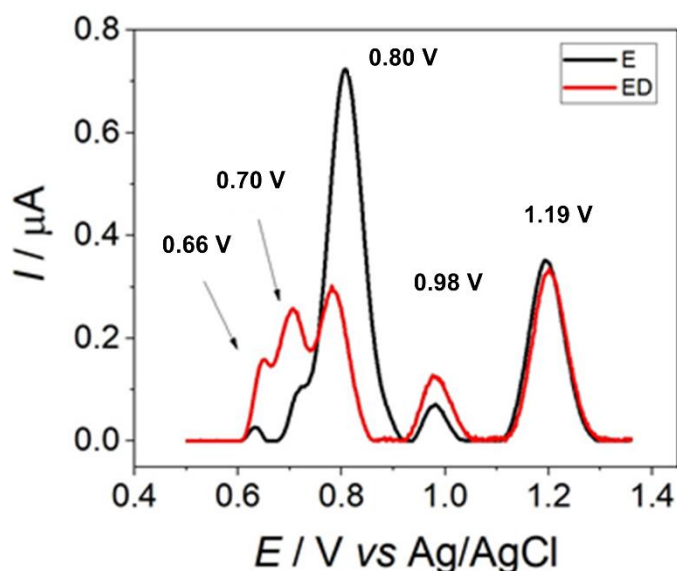
Fig.C3E) e modo anódico (Fig. C3F), respectivamente. Os *loadings* com valores positivos nas bandas de FT-IR correspondem aos metabólitos da fração lipídica (2922, 2850, 1743, 1165 e 720  $\text{cm}^{-1}$ ) (Belchior et al., 2020; Gomez, Abonia, Cadavid, & Vargas, 2011; Raba et al., 2015), que ajudou na separação dos extratos obtidos sem a presença de etanol (Fig. C3B). Essas classes metabólicas foram sugeridas, pois o éter etílico é o solvente mais amplamente utilizado para a extração de lipídios e o hexano para a extração de óleos em geral. O gráfico de *loadings* para DC1 para os espectros NIR (Fig. C3C) também ajudou a discriminar os extratos sem etanol com a banda de 928 nm atribuída à vibração angular C-H (Paradkar & Irudayaraj, 2002).

Os gráficos de escores da DC2 (Fig. C1B) forneceram informações adicionais significativas para a separação dos extratos em relação aos solventes, bem como DC1. Na região negativa da DC2, encontram-se os extratos obtidos pelo éter etílico puro e a mistura binária etanol-éter etílico. Para esta dimensão comum, dois blocos contribuíram para a discriminação desses extratos: espectros de UV - com maiores valores de saliência (Tabela 3) e espectros de FT-IR. Avaliando os gráficos de *loading* da DC2 para a técnica espectrofotométrica de UV, a separação dos metabólitos por éter etílico puro e a mistura binária de etanol-éter etílico foi devido à banda em 225 nm (Fig. S3A), que pode ser atribuída à metabólitos da fração lipídica (Dias, De Faria, Mercadante, Bragagnolo, & Benassi, 2013; Gomez et al., 2011). Os espectros originais para o éter etílico puro e a mistura etanol-éter etílico apresentaram banda em 280 nm, reforçando a presença e importância da fração lipídica para esses extratos. Além disso, os espectros FT-IR confirmam esta classe de metabólitos, uma vez que as bandas importantes para a separação desses extratos foram em torno de 2922, 2850, 1743, e 1162  $\text{cm}^{-1}$  (Fig. S3B) (Gomez et al., 2011; Raba et al., 2015).



**Fig. C4.** Voltamogramas de onda quadrada dos padrões: (A-1) ácido clorogênico, (A-2) quercetina, (A-3) ácido ferúlico, (A-4) ácido gálico, (A-5) ácido cumárico e (A-6) ácido cafeico. Perfil voltamétrico de onda quadrada do extrato etanólico (BH; linha preta) antes e (linha

vermelha) após a adição dos padrões: (C) ácido clorogênico, (D) quercetina, (E) ácido ferúlico, (F) ácido gálico, (G) ácido cumárico e (H) ácido cafeico. Condições SWV:  $f = 30$  Hz,  $A = 40$  mV,  $\Delta E_s = 2$  mV. Eletrólito suporte:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HClO}_4$  em metanol,  $c = 20 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  de cada padrão e diluição 1:10 do extrato.



**Fig. C5.** Perfil voltamétrico de onda quadrada dos extratos etanólicos (linha preta) e etanol-diclorometano (linha vermelha) de grãos de *Coffea arabica* usando o BDDE. Condições SWV:  $f = 30$  Hz,  $A = 40$  mV,  $\Delta E_s = 2$  mV. Eletrólito suporte:  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  de  $\text{HClO}_4$  em metanol.

## Referências

- Belchior, V., Botelho, B. G., Casal, S., Oliveira, L. S., & Franca, A. S. (2020). FTIR and chemometrics as effective tools in predicting the quality of specialty coffees. *Food Analytical Methods*, *13*, 275–283.
- Craig, A. P., Franca, A. S., & Oliveira, L. S. (2011). Discrimination between immature and mature green coffees by attenuated total reflectance and diffuse reflectance fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Food Science*, *76*(8), 1162–1168. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02359.x>
- Dias, R. C. E., De Faria, A. F., Mercadante, A. Z., Bragagnolo, N., & Benassi, M. T. de. (2013). Comparison of Extraction Methods for Kahweol and Cafestol Analysis in Roasted Coffee.

- Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24(3), 492–499. <https://doi.org/10.5935/0103-5053.20130057>
- Gomez, N. A., Abonia, R., Cadavid, H., & Vargas, I. H. (2011). Chemical and Spectroscopic Characterization of a Vegetable Oil used as Dielectric Coolant in Distribution Transformers. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(12), 2292–2303.
- Marcheafave, G. G., Tormena, C. D., Mattos, L. E., Liberatti, V. R., Ferrari, A. B. S., Rakocevic, M., ... Pauli, E. D. (2020). The main effects of elevated CO<sub>2</sub> and soil-water deficiency on <sup>1</sup>H NMR-based metabolic fingerprints of *Coffea arabica* beans by factorial and mixture design. *Science of The Total Environment*, 749, 142350. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142350>
- Paradkar, M. M., & Irudayaraj, J. (2002). A rapid FTIR spectroscopic method for estimation of caffeine in soft drinks and total methylxanthines in tea and coffee. *Journal of Food Science*, 67(7), 2507–2511. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08767.x>
- Paradkar, M., Sakhamuri, S., & Irudayaraj, J. (2002). Comparison of FTIR, FT-Raman, and NIR Spectroscopy in a Maple Syrup Adulteration Study. *JFS: Food Chemistry and Toxicology*, 67(6), 1–7.
- Raba, D. N., Poiana, M.-A., Borozan, A. B., Stef, M., Radu, F., & Popa, M.-V. (2015). Investigation on Crude and High-Temperature Heated Coffee Oil by ATR-FTIR Spectroscopy along with Antioxidant and Antimicrobial Properties. *PLoS ONE*, 10(9), e0138080. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138080>
- Rambo, M. K. D., Amorim, E. P., & Ferreira, M. M. C. (2013). Potential of visible-near infrared spectroscopy combined with chemometrics for analysis of some constituents of coffee and banana residues. *Analytica Chimica Acta*, 775, 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.015>
- Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. (2000). Determination of sugars in aqueous mixtures using

MID-Infrared spectroscopy. *Applied Engineering in Agriculture*, 16(5), 543–550.

Sivakesava, S., & Irudayaraj, J. (2001). Detection of inverted beet sugar adulteration of honey by FTIR spectroscopy. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 683–690.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.858>