



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GUILHERME LUIZ SCHEEL

**COMPARAÇÃO DA IMPRESSÃO DIGITAL  
CROMATOGRÁFICA E ESPECTROSCÓPICA DO GENÓTIPO  
CATUAÍ IAC 99 EM DIFERENTES SOLVENTES:  
RELAÇÃO DO DÉFICIT HÍDRICO E OS PRINCIPAIS  
METABÓLITOS**

---

Londrina  
2015

GUILHERME LUIZ SCHEEL

**COMPARAÇÃO DA IMPRESSÃO DIGITAL  
CROMATOGRÁFICA E ESPECTROSCÓPICA DO GENÓTIPO  
CATUAÍ IAC 99 EM DIFERENTES SOLVENTES:  
RELAÇÃO DO DÉFICIT HÍDRICO E OS PRINCIPAIS  
METABÓLITOS**

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

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

Londrina  
2015

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

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

S315c Scheel, Guilherme Luiz.  
Comparação da impressão digital cromatográfica e espectroscópica do  
genótipo Catuai IAC 99 em diferentes solventes : relação do déficit hídrico e  
os principais metabólitos / Guilherme Luiz Scheel. – Londrina, 2015.  
84f. : il.

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

1. Quimiometria – Teses. 2. Coffea arabica – Cultivares – Teses. 3. Extração  
(Química) – Teses. 4. Análise de componentes principais – Teses.  
5. Química analítica – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade  
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação  
em Química. III. Título.

CDU 543.4

GUILHERME LUIZ SCHEEL

**COMPARAÇÃO DA IMPRESSÃO DIGITAL CROMATOGRÁFICA E  
ESPECTROSCÓPICA DO GENÓTIPO CATUAÍ IAC 99 EM  
DIFERENTES SOLVENTES:  
RELAÇÃO DO DÉFICIT HÍDRICO E OS PRINCIPAIS METABÓLITOS**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ieda Spacino Scarmínio  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

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

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Valderrama  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -  
UTFPR

Londrina, 20 de março de 2015.

Dedico este trabalho a Deus, minha  
família, a Fernanda e aos meus  
amigos

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, por estar sempre me iluminando e abençoando meus passos.

A toda a minha família que se orgulharam de mim, confiaram em meu trabalho e que vibraram comigo, desde a aprovação na prova, e sempre fizeram “propaganda” positiva a meu respeito.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ieda Spacino Scarmínio pela orientação, ensinamentos e por acreditar em meu potencial de uma forma a que eu não acreditava ser capaz de corresponder.

A minha namorada Fernanda Midori de Oliveira, por ser tão importante na minha vida. Sempre a meu lado, me incentivando e fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

A todos os meus amigos (especialmente Felipe, Fernanda Delaroza, Elis, Dalva e Mércia) pelo apoio incondicional que sempre demonstraram desde o início. Obrigado por dividir comigo as angústias e alegrias e ouvirem minhas bobagens. Foi bom poder contar com vocês!

E a todos que de alguma forma sempre manifestaram o seu apoio, encorajamento e disponibilidade.

“(…) quando você está estudando um assunto, ou considerando alguma filosofia, pergunte a si mesmo somente quais são os fatos e qual é a verdade que os fatos revelam. Nunca se deixe divergir pelo que você gostaria de acreditar ou por achar que traria benefícios às crenças sociais se fosse acreditado. Olhe apenas e somente para quais são os fatos.”

Bertrand Russell

SCHEEL, Guilherme Luiz. **Comparação da impressão digital cromatográfica e espectroscópica do genótipo Catuaí IAC 99 em diferentes solventes: relação do déficit hídrico e os principais metabólitos.** 2015. 84 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

## RESUMO

Impressões digitais de folhas de *Coffea arabica* L. colhidas do mesmo genótipo (Catuaí IAC 99) em diferentes alturas foram utilizadas para determinar variações de metabólitos devido a diferentes condições hídricas. Pelo planejamento experimental de misturas foi possível desenvolver um procedimento que mostra os efeitos das variações dos solventes na extração de metabólitos no material vegetal. A análise de componentes principais dos espectros na região ultravioleta-visível indicam diferenças espectrais entre solventes como também em condições hídricas, principalmente entre as regiões de 280-370 nm e 400-500 nm podendo ser atribuídos a concentrações de compostos xantínicos, como cafeína e derivados, e a pigmentos predominantes em folhas. Dos espectros no infravermelho verificou-se claramente a presença de pigmentos, como carotenóides, clorofilas e derivados. Pela análise dos cromatogramas e espectros obtidos por CLAE-DAD de extratos selecionados foi possível observar diferenças na quantidade de metabólitos e concentrações para diferentes condições hídricas e alturas das plantas.

**Palavras-chave:** Impressão digital. *Coffea arabica* L. Catuaí IAC 99. Planejamento de misturas. Análise de componentes principais.

SCHEEL, Guilherme Luiz. **Chromatographic and spectroscopic fingerprint comparison of Catuaí IAC 99 genotype in different solvents: relationships of droght and the main metabolites.** 2015. 84 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

### ABSTRACT

Fingerprints of *Coffea arabica L.* leaves collected from the same genotype (Catuaí IAC 99) at different heights were used to determine variations in metabolites due different conditions. By experimental mixture design, it was possible to develop a procedure that presents the solvent variations effects in the metabolites extraction from plant material. Principal component analysis on spectra obtained in the ultraviolet-visible indicates differences between solvents but also for water conditions, pricipally at regions between 280-370nm and 400-500 nm which could be attributed to concetrations of xanthine compounds, such as caffeine and derivatives, and pigments prevalent in leaves. From infrared spectra it were clearly verified the presence of pigments, as carotenoids, chlorophylls and derivatives. By chromatograms and spectra analysis, obtained by HPLC-DAD of selected extracts, it were observed differences in the extracted metabolites amount and concentrations for different water conditions and heights in plants.

**Key words:** Fingerprinting. *Coffea arabica L.*. Catuaí IAC 99. Statistical mixture design. Principal component analysis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Modelo experimental de processo com três fatores independentes em um triângulo com pontos axiais.....	24
<b>Figura 2</b> – Esquema da sequencia usada na análise multivariada dos dados experimentais, ACP (Análise de Componentes Principais) e AH (Agrupamento Hierárquico). .....	26
<b>Figura 3</b> – Esquema da decomposição da matriz $X_{(n,p)}$ no produto de duas matrizes.....	29
<b>Figura 4</b> – Procedimento experimental para a obtenção de dados espectroscópicos e cromatográficos das folhas de <i>Coffea Arabica L.</i> genótipo Catuaí IAC 99. ....	35
<b>Figura 5</b> – Representação da coleta das folhas das plantas do genótipo Catuaí IAC 99.....	36
<b>Figura 6</b> – Representação gráfica dos escores do Fator 1 <i>versus</i> Fator 2 para os espectros em ultravioleta-visível de todos os extratos. ....	42
<b>Figura 7</b> – Projeção gráfica dos “loadings” para o primeiro fator que explica 88.51% da variância total, dos espectros em ultravioleta-visível de todos os extratos. ....	43
<b>Figura 8</b> – Representação gráfico dos escores do Fator 2 <i>versus</i> Fator 4 para os espectros em ultravioleta-visível de todos os extratos. ....	44
<b>Figura 9</b> – Representação gráfica dos “loadings” para o segundo (preto) e quarto (vermelho) fator dos espectros em ultravioleta-visível de todos os extratos.....	45
<b>Figura 10</b> – Projeção gráfica dos espectros em radiação ultravioleta-visível dos extratos obtidos com a) etanol e b) mistura binária etanol:diclorometano (1:1 v/v) como solventes. ....	46
<b>Figura 11</b> – Projeção gráfica dos espectros em radiação ultravioleta-visível dos extratos obtidos com hexano como solvente extrator.....	47

<b>Figura 12</b> – Representação gráfica dos escores do Fator 1 <i>versus</i> Fator 2 para os espectros em ultravioleta-visível de extratos irrigados e não irrigados de altura inferior e superior. Os grupos distintos localizam-se nas áreas demarcadas. ....	48
<b>Figura 13</b> – Representação gráfica dos “loadings” do Fator 1 e Fator 2 para os espectros em ultravioleta-visível de extratos irrigados e não irrigados de altura inferior e superior. ....	49
<b>Figura 14</b> – Representação gráfica em ultravioleta-visível para extratos de plantas irrigadas e não irrigadas a) dos escores dos Fatores 4 e 5 e b) “loadings” do Fator 5. ....	50
<b>Figura 15</b> – Dendograma obtido baseado nos dados dos espectros UV-Vis dos extratos irrigados (escritos em vermelho) e não irrigados (escritos em preto). A linha em verde discrimina as amostras em dois grupos distintos. ....	51
<b>Figura 16</b> – Representação gráfica dos escores do Fator 3 <i>versus</i> Fator 5 dos espectros em radiação infravermelho para todos os extratos. ....	52
<b>Figura 17</b> – Representação gráfica dos “loadings” do Fator 5 dos espectros em radiação infravermelho de todos os extratos. ....	53
<b>Figura 18</b> – Projeção gráfica dos escores do Fator 1 <i>versus</i> Fator 4 para os espectros em radiação infravermelho dos extratos irrigados e não irrigados de inferior e superior altura. ....	54
<b>Figura 19</b> – Representações gráficas dos “loadings” para os espectros em radiação infravermelho a) do Fator 4 e b) dos Fatores 1 <i>versus</i> 4 para extratos irrigado e não irrigados de altura inferior e superior. ....	55
<b>Figura 20</b> – Gráfico dos escores dos Fatores 2 <i>versus</i> 3 dos espectros em radiação infravermelho de extratos irrigados e não irrigados de altura inferior e superior. ....	56
<b>Figura 21</b> – Equilíbrio ceto - enólico e estrutura química da clorofila a e clorofila b. ....	57

<b>Figura 22</b> – Espectros em radiação infravermelho obtidos a partir dos extratos de a) diclorometano, e b) da mistura de solventes edH ( $\frac{1}{6} : \frac{1}{6} : \frac{2}{3}$ , v/v/v).....	58
<b>Figura 23</b> – Espectros de infravermelho dos extratos obtidos em hexano para amostras irrigadas e não irrigada de alturas inferiores e superiores.....	59
<b>Figura 24</b> – Representação gráfica dos escores cromatográficos em 276 nm dos Fatores 2 <i>versus</i> 3 dos extratos selecionados.....	60
<b>Figura 25</b> – Cromatogramas dos extratos obtidos com hexano como solvente.....	61
<b>Figura 26</b> – Espectros DAD dos extratos obtidos com hexano como solvente para os tempos de retenção de a) 1,36 minutos e b) 1,73 minutos.....	62
<b>Figura 27</b> – Espectros DAD dos extratos obtidos com hexano como solvente para o tempo de retenção de 3,94 minutos.....	63
<b>Figura 28</b> – Espectros DAD dos extratos obtidos com hexano como solvente para o tempo de retenção de 8,72 minutos.....	64
<b>Figura 29</b> – Cromatogramas dos extratos obtidos com diclorometano como solvente, com destaque e ampliação da faixa de 1,25-2,00.....	65
<b>Figura 30</b> – Espectros DAD dos extratos obtidos com diclorometano como solvente para os tempos de retenção de a) 1,36 minutos e b) 1.82 minutos.....	66
<b>Figura 31</b> – Espectros DAD dos extratos obtidos com diclorometano como solvente para o tempo de retenção de 3,94 minutos.....	67
<b>Figura 32</b> – Espectros DAD dos extratos obtidos com diclorometano como solvente para o tempo de retenção de 8,72 minutos.....	68
<b>Figura 33</b> – Cromatogramas dos extratos obtidos com etanol: diclorometano: hexano (edH, $\frac{1}{6} : \frac{1}{6} : \frac{2}{3}$ , v/v/v) como solvente.....	69

<b>Figura 34</b> – Espectros DAD dos extratos obtidos com mistura etanol:diclorometano:hexano (edH, $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) como solvente para os tempos de retenção de a) 1,41 minutos e b) 1,82 minutos.....	70
<b>Figura 35</b> – Representação gráfica espectrais dos extratos obtidos com etanol:diclorometano:hexano (edH, $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) como solvente para o tempo de retenção de 3,94 minutos.....	71
<b>Figura 36</b> – Espectros DAD dos extratos obtidos com etanol: diclorometano: hexano (edH, $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ ,v/v/v) como solvente para o tempo de retenção de 8,72 minutos.....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Proporções dos solventes para cada amostra segundo planejamento de misturas. ....	37
<b>Tabela 2</b> – Critérios descritos por Snyder dos solventes selecionados. ....	38
<b>Tabela 3</b> – Polaridade de solventes e suas misturas, em ordem decrescente. ....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Agrupamento Hierárquico
ACG	Ácido Clorogênico
ACN	Acetonitrila
ACP	Análise de Componentes Principais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
d	diclorometano
dh	diclorometano:hexano (1:1 v/v)
DAD	Detector de Arranjo de Fotodiodos
<b>E</b>	Matriz dos resíduos
e	etanol
ed	etanol:diclorometano (1:1 v/v)
eh	etanol:hexano (1:1 v/v)
edh	etanol:diclorometano:hexano (1:1:1 v/v/v)
Edh	etanol:diclorometano:hexano ( $\frac{2}{3} : \frac{1}{6} : \frac{1}{6}$ , v/v/v)
eDh	etanol:diclorometano:hexano ( $\frac{1}{6} : \frac{2}{3} : \frac{1}{6}$ , v/v/v)
edH	etanol:diclorometano:hexano ( $\frac{1}{6} : \frac{1}{6} : \frac{2}{3}$ , v/v/v)
H <sub>2</sub> O	água
h	hexano
IV	Espectroscopia no Infravermelho
<i>n</i>	objetos
P	Polaridade
<b>P<sup>t</sup></b>	Matriz dos “loadings” da análise de componentes principais
<i>p</i>	variáveis
UV-Vis	Espectrofotometria em Ultravioleta-Visível
<b>T</b>	Matriz dos escores da análise de componentes principais
v	volume
<b>X</b>	Matriz de dados para análise de componentes principais
<i>x</i> <sub>1</sub>	Primeiro componente do simplex
<i>x</i> <sub>2</sub>	Segundo componente do simplex
<i>x</i> <sub>3</sub>	Primeiro componente do simplex
β	Parâmetro de Snyder para basicidade

$\alpha$  Parâmetro de Snyder para acidez

$\pi^*$  Parâmetro de Snyder para dipolaridade

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	17
<b>1</b> <b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....	18
<b>CAPÍTULO II</b> .....	23
<b>2</b> <b>MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS</b> .....	24
2.1      PLANEJAMENTO DE MISTURAS .....	24
2.2      ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS .....	26
2.2.1    Pré-processamento dos Dados .....	27
2.2.2    Análise de Componentes Principais .....	28
2.2.3    Análise de Agrupamentos Hierárquicos .....	30
<b>CAPÍTULO III</b> .....	34
<b>3</b> <b>PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	35
3.1      COLETA E ARMAZENAMENTO DAS FOLHAS .....	36
3.2      REAGENTES .....	37
3.3      PREPARO DOS EXTRATOS.....	37
3.4      ESCOLHA DOS SOLVENTES E POLARIDADES DE MISTURA .....	38
3.5      ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL .....	39
3.6      ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS NO INFRAVERMELHO .....	39
3.7      ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	40
3.8      PROGRAMAS COMPUTACIONAIS .....	40
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	41
<b>4</b> <b>RESULTADO E DISCUSSÕES</b> .....	42
4.1      ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA- VISÍVEL .....	42
4.2      ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR ESPECTROSCOPIA INFRAVERMELHO .....	51
4.3      ANÁLISE EXPLORATÓRIA CROMATOGRÁFICA .....	60
<b>CAPÍTULO V</b> .....	73
<b>5 CONCLUSÃO</b> .....	74

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>
-------------------------	-----------



# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

## 1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Para vários estados brasileiros, o café representa um dos pilares da economia por ser uma das bebidas mais difundidas entre as culturas mundiais. Dentre as variedades, a *Coffea arábica L.* apresenta relevante importância por superior qualidade<sup>1,2</sup> e, entre os principais cultivares, os do grupo 'Catuaí' têm se destacado pela elevada adaptação a diversas regiões.<sup>3</sup> O grupo origina-se do cruzamento artificial entre 'Caturra' e 'Mundo Novo', para reunir características de produtividade e rusticidade do 'Mundo Novo' com o porte reduzido de 'Caturra'. Os cultivares oriundos desse cruzamento têm frutos de coloração amarela ou vermelha, maturação média, elevada adaptação a condições com e sem irrigação e características fenotípicas não marcantes.<sup>4,5</sup>

Diferente da maioria das plantas que emitem suas inflorescências na primavera e frutificam no mesmo ano, a variedade leva dois anos para completar seu ciclo fenológico.<sup>6</sup> O estudo da floração do cafeeiro, na perspectiva de uniformização, sempre foi um grande desafio, cheio de antagonismos e controvérsias perante o grande número de fatores de diversas naturezas envolvidos neste notável processo fisiológico. A teoria atual é a de que o cafeeiro necessita de certo estresse hídrico para que ocorra a floração, entretanto existem controvérsias quanto a este aspecto.<sup>7-10</sup>

Vários artigos de revisão e livros abordam as relações entre a água e o cafeeiro,<sup>11-21</sup> no entanto desconhecem-se os mecanismos ecofisiológicos que conduzem o cafeeiro à floração. Sabe-se que as relações hídricas, a temperatura e a irradiância interagem para desencadear os processos que conduzem à formação e abertura da flor, com destaque para a deficiência de água, mas a contribuição de cada um desses fatores ainda encontra-se aberta a investigações.

As condições ambientais em que a planta está exposta também intermediam na síntese de metabólitos secundários, através de indução de reações fisiológicas e adaptações relacionadas às mudanças bioquímicas observadas em seus metabolismos.<sup>22, 23</sup> A intensidade de luz e déficit hídrico, assim como a idade e o desenvolvimento da planta, podem influenciar na quantidade de metabólitos secundários e por consequência na qualidade do produto.<sup>24</sup>

Ao contrário dos metabólitos primários, que são indispensáveis aos seres vivos, os metabólitos secundários agem como mecanismos de autodefesa

para garantir a sobrevivência da planta no ecossistema, como também para atrair polinizadores e contribuir ao perpetuamento da espécie.<sup>24</sup> Em condições de estresse ambiental espera-se que haja variações qualitativas de substâncias de característica defensiva como alcalóides entre outros.<sup>22</sup>

Os alcalóides são constituídos por uma enorme quantidade de substâncias estruturalmente distintas provenientes de aminoácidos, terpenos e esteróides. Alcalóides purínicos são metabólitos secundários derivados de nucleotídeos purínicos provenientes de um amplo grupo na natureza que, em sua constituição, apresentam anéis heterocíclicos contendo nitrogênio.<sup>23, 25</sup>

As metilxantinas são alcalóides purínicos naturalmente presentes no *Coffea arabica L.*, sendo a cafeína de grande relevância. A cafeína é sintetizada em folhas jovens e acumula-se em folhas maduras por ter degradação relativamente lenta. A biossíntese ativa da cafeína ocorre nas folhas superiores e na parte superior da haste, mas está ausente nas folhas inferiores, cotilédones, raízes e caule inferior. A “teoria de defesa química” propõem que altas concentrações de cafeína são encontradas em folhas jovens, frutos e botões florais da espécie para agir como defesa de tecidos vegetais jovens contra patogênicos e herbívoros.<sup>26</sup>

Os compostos fenólicos são constituintes onipresentes de plantas superiores encontradas em uma grande variedade de alimentos comumente consumidos, tais como frutas, legumes, cereais e leguminosas, e nas bebidas como o vinho, chá e café. Estes compostos são metabólitos secundários de plantas geralmente envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos. Vários milhares de compostos fenólicos são descritos em alimentos e podem ser agrupados em diferentes classes de acordo com a sua estrutura química básica, e em subclasses diferentes, de acordo com substituições específicas na estrutura de base, associação com hidratos de carbono e formas polimerizadas.<sup>27</sup>

Enquanto os taninos condensados são os principais compostos fenólicos na polpa de café, na semente os compostos fenólicos estão presentes predominantemente como uma família de ésteres formados entre certos ácidos hidroxicinâmicos e ácido quínico, coletivamente conhecidos como ácidos clorogênicos (ACG). Outros compostos fenólicos, tais como taninos, lignanos e antocianinas também estão presentes nas sementes de café, embora em pequenas quantidades. Ácidos clorogênicos, que estão presentes em concentrações elevadas nas sementes de café verdes, tem um papel muito importante na determinação da

qualidade do café e na formação de sabor do café. Embora os ACG sejam encontrados principalmente nas sementes de café, eles também têm sido encontrados na polpa de café e em folhas.<sup>27</sup>

Pigmentos vegetais correspondem a um amplo número de moléculas que apresentam coloração. Devido à estrutura química é possível distingui-los em cinco famílias: tetrapirrólicos (como as clorofilas), carotenóides, compostos fenólicos, flavonóides e compostos N-heterocíclicos.<sup>28</sup> Por estarem naturalmente presente em plantas, as clorofilas e carotenoides são compostos orgânicos frequentemente encontrados em alimentos e podem ser utilizados como indicadores de estresse. Suas variações espectrais fornecem uma compreensão das respostas fisiológicas para as condições de crescimento e adaptações da planta. O estresse vegetal, ocasionado por uma variedade de fatores, geralmente diminui a concentração de clorofilas e aparentemente aumenta a de carotenoides e outros pigmentos.<sup>29</sup>

Uma das abordagens mais modernas para o controle de qualidade de alimentos são as técnicas de impressão digital.<sup>30-36</sup> São técnicas rápidas, de alta capacidade e que analisam as amostras como um todo para prover classificações por diferentes estados biológicos ou de origem. As variações dos metabólitos são observadas principalmente por variações espectroscópicas ou cromatográficas sem o conhecimento prévio das identidades dos compostos investigados, especialmente quando existe falta de padrões autênticos para identificação dos componentes ativos.<sup>36</sup>

A espectrofotometria ultravioleta-visível (UV-Vis) como ferramenta de triagem é capaz de discriminar variações de diversas origens, devido a grande parte dos metabólitos secundários absorverem luz ultravioleta, incluindo as substâncias que contém uma ou mais duplas ligações e substâncias que apresentam elétrons desemparelhados.<sup>37</sup> Valladão e colaboradores,<sup>38</sup> utilizando espectrofotometria UV-Vis em extratos de *M. salicifolia* obtidos com hexano como solvente, obtiveram resultados que indicam diferenças na síntese de metabólitos devidos a fatores ambientais.

Recentemente a espectroscopia na região do infravermelho tem sido introduzida como uma técnica de impressão digital. Seu principio encontra-se no fato de que ligações químicas, em números de onda específicos, absorvem radiação e vibram de muitas maneiras, como em estiramentos e desdobramentos angulares.

Estas vibrações podem ser correlacionadas com ligações simples ou grupos funcionais de uma molécula para a identificação de compostos desconhecidos. Os estudos investigativos em plantas têm demonstrado a existência de diferenças em metabólitos devido a perturbações abióticas ou bióticas.<sup>36</sup>

Outra técnica muito útil para detecção de metabólitos e amplamente utilizada para impressão digital é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de fotodiodos (DAD). Este tipo de análise é atualmente aplicada para muitos compostos com características cromóforas. Através dela é possível separar metabólitos de extratos brutos sem uma preparação complexa da amostra, pois é uma técnica rápida, sensível e aplicável a uma ampla variedade de matrizes amostrais. O interessante é que as informações geradas por todos os comprimentos de onda são armazenadas durante a análise, e múltiplos comprimentos de onda podem ser monitorados ao mesmo tempo para a detecção de diferentes classes de compostos.<sup>39</sup>

A extração de informações dos resultados de um experimento químico envolve a análise de um grande número de variáveis. Um pequeno número de variáveis muitas vezes contém as informações químicas mais relevantes, enquanto a maioria adiciona pouco ou nada à interpretação dos resultados em termos químicos. A decisão sobre quais variáveis são importantes geralmente é realizada com base na intuição química ou na experiência utilizando critérios mais subjetivos do que objetivos.<sup>40</sup>

Nas últimas décadas a análise estatística multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, com o intuito de extrair maior quantidade de informações dos elementos que estão sendo analisados. Diferente da análise estatística univariada, que tem aplicação limitada por medir uma variável sistematicamente em várias amostras, o modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente.<sup>41</sup> A análise de componentes principais (ACP) e de agrupamento hierárquico (AH) são métodos estatísticos multivariados complementares que tem grande aceitação na análise de dados químicos.<sup>40, 41</sup>

A análise de componentes principais é uma abordagem estatística empregada para analisar inter-relações entre um extenso número de variáveis e explica-las em termos de suas dimensões inerentes comuns. O âmbito é de

condensar as informações contidas em diversas variáveis originais para um conjunto menor de variáveis estatísticas com uma perda mínima de informação.<sup>40, 41</sup>

A técnica de agrupamento hierárquico interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendrograma no qual as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si. A suposição básica de sua interpretação é que, quanto menor for a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras.<sup>40, 41</sup>

Ao contrário da considerável quantidade de pesquisas sobre influência das relações entre déficit hídrico e cafeeiro, poucos estudos relatam o conteúdo metabólico de outras partes da planta do café, como as folhas.<sup>22,42-44</sup> Pelo estudo com folhas, é possível estimar antecipadamente, a característica da planta quanto ao teor dos metabólitos sem a necessidade de esperar a produção de frutos.<sup>43</sup> Delarozza e colaboradores, utilizando perfis químicos obtidos de materiais vegetais provenientes de folhas de *Coffea arabica* L. e planejamentos estatísticos, constataram que folhas expostas a condições de intensa radiação sofrem maior estresse do que folhas autossombreadas provenientes de alturas inferiores.<sup>22</sup> Mondolot e colaboradores investigaram a composição bioquímica e localização de ACGs durante o desenvolvimento foliar de folhas de *Coffea canephora* e observaram que ácidos clorogênicos e alcaloides acumulam-se sob a mesma região e podem ser transportados a órgãos maduros por vasos de floema, especialmente quando estes metabólitos são necessários como resposta a alguma forma de estresse.<sup>44</sup>

Os trabalhos encontrados na literatura revelam que tradicionalmente a extração dos metabólitos secundários é realizada com solventes puros ou com solventes misturados em água.<sup>45</sup> Dessa maneira existe a necessidade de explorar extratos de plantas obtidos com as misturas dos solventes. Por planejamentos estatísticos de misturas é possível desenvolver um procedimento de análise rigoroso e econômico para demonstrar os efeitos das variações dos solventes na extração de metabólitos no material vegetal.<sup>46,47</sup>

O objetivo geral do trabalho é entender e obter relações entre os compostos metabólicos, mediante condições de déficit hídrico e posicionamento vegetal (arquitetura), através de métodos quimiométricos de planejamento experimental e de análise multivariada associada a dados espectroscópicos e cromatográficos.



# **CAPÍTULO II**

## **MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS**

## 2 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

Quimiometria é o uso de métodos matemáticos e estatísticos para melhorar a compreensão da informação química e relacionar parâmetros de qualidade, ou propriedades físicas, aos dados instrumentais obtidos. O resultado da abordagem quimiométrica vem ganhando eficiência na avaliação da qualidade do produto e pode levar a práticas laboratoriais mais eficientes ou sistemas de controle de qualidade automatizados.<sup>48</sup> No campo da química analítica, quimiometria é a disciplina que utiliza métodos matemáticos e estatísticos multivariados para a obtenção de informações relevantes da maneira mais favorável sobre sistemas materiais.<sup>49</sup>

O desenvolvimento de instrumentos e processos químicos conduziu a uma necessidade de métodos avançados para realizar experimentos, calibrar instrumentos e analisar dados. É reconhecido que a maioria dos sistemas é de natureza multivariada e abordagens univariadas não são susceptíveis de resultar em melhores soluções. Ao mesmo tempo, os instrumentos têm evoluído em termos de complexidade, capacidade computacional avançada, de modo que foi possível desenvolver e empregar cada vez mais, complexos métodos de computação intensiva.<sup>49, 50</sup>

### 2.1 PLANEJAMENTO DE MISTURAS

O produto resultante de uma mistura tem características que dependem da natureza de seus ingredientes e das proporções relativas dos mesmos, não da quantidade total da mistura. A soma das proporções dos diversos componentes de uma mistura é sempre 100%.<sup>51</sup> Para uma mistura qualquer de  $b$  componentes, pode-se escrever

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

onde,  $x_i$  representa a proporção do  $i$ -ésimo componente e  $b$  o número total de componentes.

A Equação 1 retira um grau de liberdade das proporções. Para especificar a composição da mistura, só é preciso fixar as proporções de  $b-1$

componentes. A proporção do último componente será sempre o que falta para completar 100%.<sup>51, 52</sup> Devido a restrição da Equação 1 aos valores de  $x_i$  (proporção do  $i$ -ésimo componente), o espaço torna-se uma região simplex. Um simplex apresenta uma configuração espacial determinada por um número de pontos a mais do que o número de dimensões do espaço. Cada um dos  $b$  pontos que determinam o simplex representam uma mistura no qual um dos  $b$  componentes assume a proporção 1.<sup>51,52</sup>

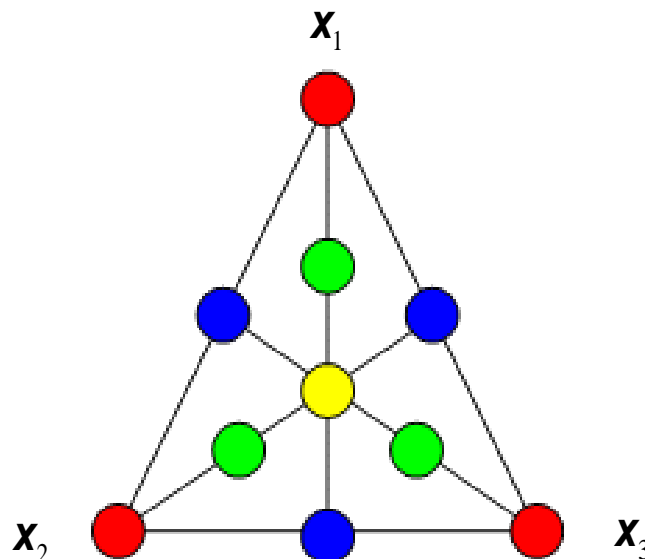
Além da restrição natural mostrada na Equação 1, podem existir restrições dos limites superiores e inferiores dos teores dos componentes na mistura, sempre com a soma menor que um, para possibilitar o preparo da amostra. Tais restrições para um caso geral de  $b$  componentes são descritas na Equação 2, onde os pontos são chamados os vértices do simplex.<sup>52</sup>

$$0 \leq \alpha_i \leq c_i \text{ e } \sum_{i=1}^b \alpha_i < 1, \quad i = 1, 2, \dots, b \quad (2)$$

onde,  $\alpha_i$  equivale a limites inferiores não nulos e  $c_i$  é a proporção do componente  $i$  na mistura.

Para sistemas com três fatores independentes, Figura 1, podem-se realizar experimentos correspondentes a qualquer ponto dentro do triângulo, obedecendo a restrição  $x_1 + x_2 + x_3 = 1$ .<sup>53</sup>

**Figura 1** – Modelo experimental de processo com três fatores independentes em um triângulo com pontos axiais.

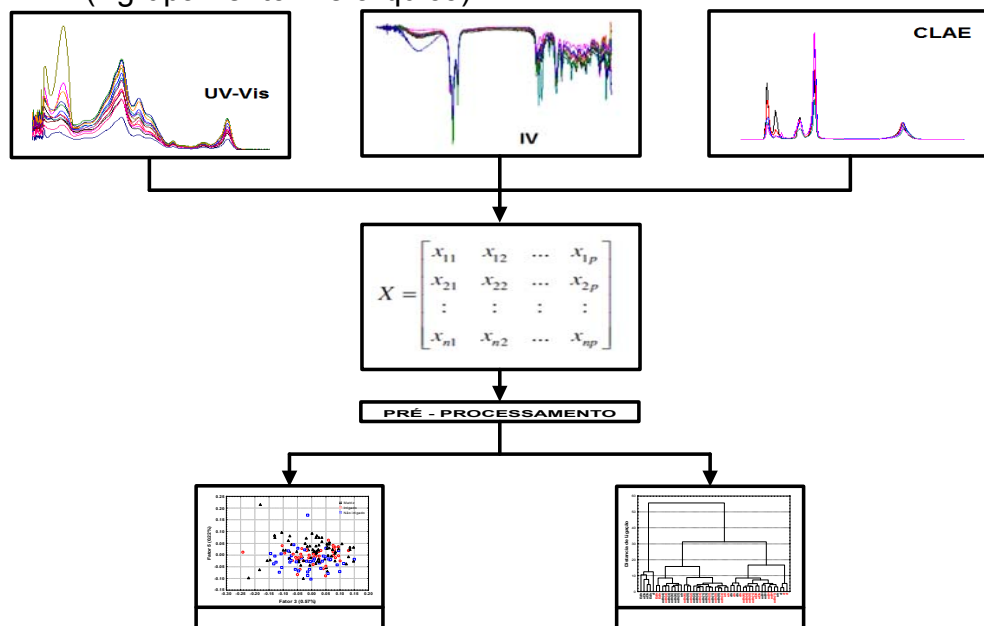


Os pontos correspondentes ao solvente puros estão representados nos vértices. Em cada aresta do triângulo, se encontram os pontos que correspondem às misturas binárias. No centro localiza-se o ponto que representa a mistura ternária equitativa. Para complementar o conjunto de dados, pontos interiores (ou axiais) foram propostos.<sup>52,53</sup>

## 2.2 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DOS DADOS

O esquema de análise multivariada dos dados experimentais por métodos quimiométricos está ilustrado na Figura 2. Antes de proceder à análise dos dados, é realizada visualmente uma inspeção para verificar problemas de variação da linha de base, sobreposição de picos e ruídos. Os dados são convertidos na forma de uma matriz (tabela de dados), a qual será representada por  $X$ . As  $n$  linhas da matriz representam os objetos, enquanto que as  $p$  colunas são variáveis que correspondem a uma variável medida para cada amostra. Se necessário, é realizada, em seguida, uma pré-seleção das variáveis para definir região do espectro ou cromatograma que contém a informação que será utilizada no cálculo.

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



### 2.2.1 Pré-processamento dos Dados

O pré-processamento é uma etapa importante da análise, pois os dados de uma forma geral contêm fontes de variação, como erros aleatórios, erros sistemáticos ou unidades diferentes. Ele é definido como qualquer transformação matemática nos dados com o objetivo de remover ou reduzir estas fontes irrelevantes de variação. Pode ser dividido em dois tipos básicos, dependendo se são operados nos valores relacionados às amostras ou às variáveis, e a sua escolha vai depender do conjunto de dados e do objetivo.<sup>54</sup>

A normalização é um tipo de pré-processamento que tem como objetivo reduzir a influência de variações indesejadas presentes no conjunto de dados.<sup>56</sup> Os dois tipos mais comuns são a normalização por área total ou por comprimento do vetor.<sup>56-58</sup> A normalização por área total é feita dividindo cada valor original pela soma de todos os valores absolutos das medidas, Equação 3. Este procedimento tem a finalidade de corrigir a variação do volume da amostra, sem destruir a proporcionalidade das substâncias orgânicas.<sup>55</sup>

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij}}{\sum_{j=1}^p |x_j|} \quad (3)$$

Onde,  $x'_{ij}$  refere-se aos dados pré-processados da amostra  $i$  e variáveis  $j$ .

A normalização por comprimento de vetor é feita dividindo cada valor original pela raiz quadrada da soma dos quadrados de todos os valores das variáveis da mesma linha, Equação 4. A finalidade é remover a variação sistemática, normalmente associada com a quantidade total da amostra.<sup>56</sup>

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij}}{\sqrt{\sum_{j=1}^p x_{ij}^2}} \quad (4)$$

O pré-processamento mais comum para as variáveis na análise exploratória é o autoescalamento.<sup>57</sup> Neste caso os valores originais em cada coluna da matriz são subtraídos das respectivas médias e divididos pelo desvio

padrão, Equação 5. O propósito dessa transformação é permitir que todas as variáveis possam exercer influências equitativas nos resultados, além de torna-los adimensionais.<sup>58</sup>

$$x'_{ij} = \frac{x_{ij} - \bar{x}_j}{s_j} \quad (5)$$

No qual  $s_j$  é o desvio padrão para a variável  $j$ .

### 2.2.2 Análise de Componentes Principais

A análise por componentes principais reduz as variáveis através de critérios objetivos permitindo a construção de gráficos bidimensionais contendo maior informação estatística. Este método tem por finalidade básica a redução da dimensionalidade dos dados a partir de combinações lineares, permitindo detectar amostras anômalas e selecionar variáveis enquanto simultaneamente retém a informação contida nos dados.<sup>59, 60</sup>

Sua decomposição é calculada através da diagonalização da matriz  $\mathbf{X}\mathbf{X}^t$  ou  $\mathbf{X}^t\mathbf{X}$ . A matriz  $\mathbf{X}_{(n,p)}$ , formada por  $n$  objetos e  $p$  variáveis é decomposta no produto de duas matrizes menores<sup>59, 60</sup>, conforme Equação 6.

$$\mathbf{X}_{(n,p)} = \mathbf{T}_{(n,q)}\mathbf{P}^t_{(q,p)} + \mathbf{E}_{(n,p)} \quad (6)$$

no qual  $\mathbf{T}_{(n,q)}$  é a matriz dos escores das componentes principais,  $\mathbf{P}^t_{(q,p)}$  é a matriz “loadings” das componentes principais e  $\mathbf{E}_{(n,p)}$  é a matriz dos resíduos. O sobrescrito  $t$  indica a transposta da matriz e  $q$  é um escalar que indica o número de fatores que descreve a maior parte da variância dos dados.<sup>59,60</sup> Este procedimento está representado esquematicamente na Figura 3.

**Figura 3** – Esquema da decomposição da matriz  $X_{(n,p)}$  no produto de duas matrizes.

$$\begin{array}{c} p \\ \square \\ X \\ \square \\ n \end{array} = \begin{array}{c} q \\ \square \\ T \\ \square \\ n \end{array} \cdot \begin{array}{c} p \\ \square \\ P^t \\ \square \\ q \end{array} + \begin{array}{c} p \\ \square \\ E \\ \square \\ n \end{array}$$

Na diagonalização da matriz  $X^t X$ , os escores descrevem como as diferentes linhas da matriz  $X_{(n,p)}$  se relacionam. Suas representações gráficas (escores plotados uns contra os outros) formam uma das ferramentas mais poderosas que os métodos baseados em componentes principais podem oferecer. Pelas representações gráficas dos loadings, é possível determinar quais variáveis são responsáveis por padrões encontrados nos escores.<sup>61</sup>

A ACP transforma o conjunto original de variáveis relacionadas entre si, em um novo conjunto de um número igual de variáveis independentes (nominados componentes principais ou fatores), que são combinações lineares das variáveis originais. Embora a quantidade de fatores seja igual ao número de variáveis, em geral a maior parte da variação no conjunto de dados pode ser explicada pelos primeiros fatores, que podem ser usados para representarem as observações originais. O primeiro fator é definido na direção da máxima variância dos dados de todo o conjunto. O segundo é a direção que descreve a variação máxima no subespaço ortogonal ao primeiro fator. Os seguintes são ortogonais as anteriores, descrevendo o máximo das variâncias restantes.<sup>62</sup> Existem dois métodos para obter os fatores,<sup>63</sup> que diferem na forma de normalizar as componentes:

#### Primeiro método

- 1) Calcular a matriz de covariância;
- 2) Calcular os  $q$  autovalores  $\lambda_q$ , e os correspondentes autovetores  $U_q^t$  da matriz de covariância;

- 3) Calcular  $\mathbf{P}_{(q,p)}^t = \Lambda_q (\mathbf{U}_q^t)^{1/2}$ , onde  $\Lambda_q$  é uma matriz diagonal de ordem  $q \times q$ , composta pelos elementos não nulos  $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_q$ . Cada autovetor é normalizado de forma que o quadrado de seu módulo seja igual ao autovalor;
- 4) Calcular  $\mathbf{T}_{(n,q)} = \mathbf{X}_{(n,p)} \mathbf{P}_{(q,p)}^t (\Lambda_q)^{-1}$ . As colunas são normalizadas pelos recíprocos dos autovalores.

### Segundo método

- 1) Calcular a matriz de covariância;
- 2) Calcular os  $q$  autovalores  $\lambda_q$ , e os correspondentes autovetores  $\mathbf{U}_q^t$  da matriz de covariância;
- 3) Calcular  $\mathbf{P}_{(q,p)}^t = \mathbf{U}_q^t$ ;
- 4) Calcular  $\mathbf{T}_{(n,q)} = \mathbf{X}_{(n,p)} \mathbf{P}_{(q,p)}^t$ . Neste caso, cada autovetor é normalizado para 1, tornando o procedimento computacional mais simples que o anterior.

A soma dos quadrados dos elementos de uma coluna é a variância ao longo do fator, representado nesta coluna. Esta soma dividida pelo número de variáveis  $p$  dá a fração de variância explicada pelo fator.<sup>63</sup>

Embora a dimensionalidade se reduza, para um número de fatores  $q$  com variâncias significativas e de mesma unidade, estes fatores nem sempre são facilmente interpretados. A técnica de rotação varimax, descrita por Kaiser, faz a rotação dos fatores para encontrar uma posição mais facilmente interpretável. A matriz dos fatores mais simples para interpretar, obtido pela rotação, contém poucos “loadings” de grandes valores e muitos “loadings” próximos de zero.<sup>63</sup>

### 2.2.3 Análise de Agrupamentos Hierárquicos

A análise de agrupamento é uma técnica utilizada para classificar objetos por associação chamados de conglomerados ou agrupamentos. Logo, em cada agrupamento os objetos tendem a ser semelhantes, mas diferentes de objetos em outros agrupamentos.<sup>40,64</sup>

Através de uma medida de semelhança (similaridade ou dissimilaridade) para todos os pares de objetos é possível obter suas características, possibilitando a comparação com outra medida de semelhança e a associação dos objetos semelhantes por meio da análise de agrupamentos. As medidas de distancia representam a similaridade, na qual descreve a proximidade entre as observações ao longo das variáveis. <sup>40,64</sup>

A distância euclidiana é frequentemente empregada por ser a maneira matematicamente mais simples de calculo. Ela é definida pela Equação 7. Quanto mais próximo de zero for a distância euclidiana, mais similares são os objetos comparados. <sup>40,64</sup>

$$d_{(j,k)} = \left[ \sum_{i=1}^s (x_{ij} - x_{jk})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad (7)$$

Onde,  $x_{ij}$  é a  $j$ -ésima característica do  $i$ -ésimo objeto e  $x_{jk}$  é a  $j$ -ésima característica do  $k$ -ésimo objeto.

O procedimento de aglomeração mais utilizado é a análise hierárquica de agrupamentos que se caracteriza pelo estabelecimento de uma hierarquia ou estrutura em forma de árvore. Ela interliga por suas associações os objetos, produzindo uma representação gráfica chamada de dendograma, onde os objetos semelhantes são agrupados entre si. <sup>40, 64</sup> No eixo horizontal são colocadas as amostras e, no eixo vertical, o índice de similaridade,  $s_{j,k}$ , calculado segundo a Equação 8. Os dendogramas, portanto, consistem em diagramas que representam a similaridade entre pares de amostras (ou grupos de amostras) numa escala que vai de um (identidade) a zero (nenhuma similaridade). <sup>40</sup>

$$s_{j,k} = \left[ 1 - \frac{d_{j,k}}{(d)_{m\acute{a}x}} \right] \quad (8)$$

Onde,  $d_{j,k}$  é a distância entre os pontos  $j$  e  $k$ ,

$(d)_{m\acute{a}x}$  é a distância máxima entre qualquer par de pontos de um conjunto de dados no espaço  $f$ -dimensional.

Para os procedimentos de aglomeração deve-se optar por um método específico. Deve-se definir como vai ser caracterizada a similaridade entre dados ou grupos de dados, para em seguida agrupá-los de acordo com vários critérios, que são apresentados a seguir.<sup>65</sup>

a) Ligação Simples (vizinho mais próximo): Define a semelhança entre agrupamentos como a menor distância de qualquer objeto de um agrupamento a qualquer objeto no outro. Tal abordagem é provavelmente o algoritmo aglomerativo mais versátil, pois ele pode definir uma vasta gama de padrões de aglomeração. Portanto, o agrupamento é função de objetos únicos que estavam próximos.<sup>65</sup>

b) Ligação Completa (vizinho mais distante): É comparável ao da ligação simples, exceto que a similaridade de agrupamento se baseia em distância máxima entre observações em cada agrupamento. Similaridade entre agrupamentos é a menor esfera (diâmetro mínimo) que pode incluir todas as observações em ambos os agrupamentos. Esse método é chamado de ligação completa porque todos os objetos em um agrupamento são conectados uns com os outros a alguma distância máxima.<sup>65</sup>

c) Ligação média: O método de ligação média difere dos procedimentos de ligação simples e completa no sentido de que a similaridade de quaisquer dois agrupamentos é a similaridade média de todos os indivíduos em um agrupamento com todos os indivíduos em outro. A similaridade é baseada em todos os elementos dos agregados, e não em um único par de membros extremos. Os dois agrupamentos com a distância média mais baixa são unidos para formar o novo agrupamento.<sup>65</sup>

d) Método centróide: A similaridade entre dois agrupamentos e a distância entre seus centróides. Centróides são os valores médios das observações sobre as variáveis na variável estatística de agrupamento. Neste método, toda vez que indivíduos são reunidos um novo centróide é computado. Existe uma mudança no centróide do agrupamento toda vez que um novo indivíduo ou grupo de indivíduos são acrescentados a um agregado já existente.<sup>65</sup>

e) Método Ward: O método consiste em um procedimento no qual a medida de similaridade utilizada para formar agrupamentos é calculada como a soma de quadrados, entre dois agrupamentos, feita sobre todas as variáveis. A seleção de qual par de agrupamentos a combinar é baseada em qual combinação de agregados minimiza a soma interna de quadrados no conjunto completo de agrupamentos separados ou disjuntos.<sup>64</sup>



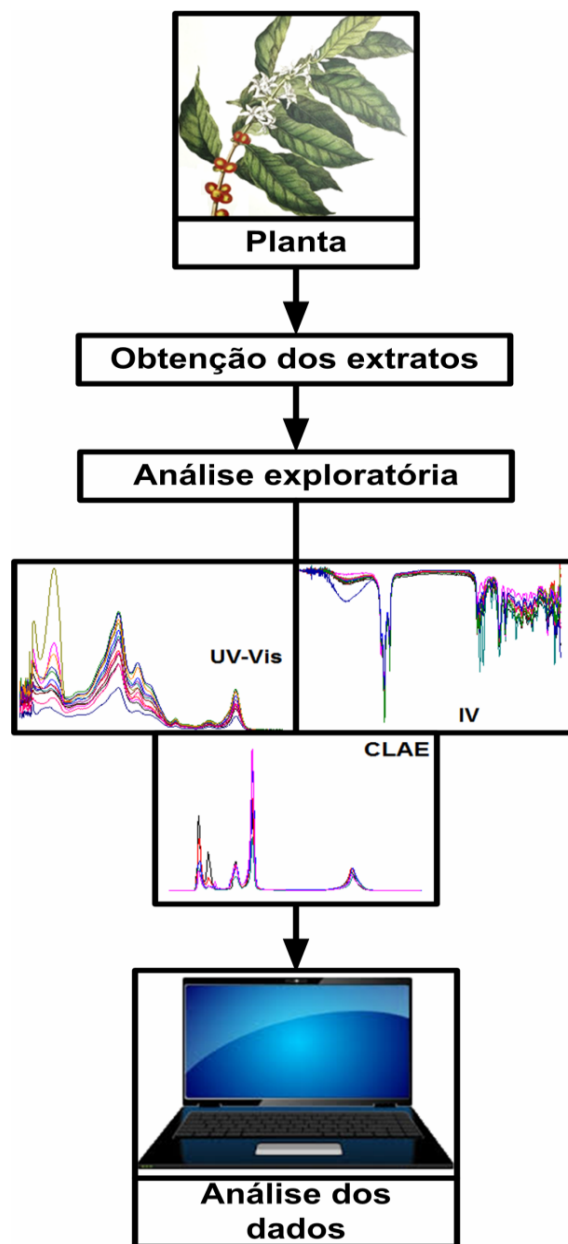
# **CAPÍTULO III**

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

Os aspectos relacionados ao procedimento experimental para a obtenção de dados espectroscópicos e cromatográficos do extrato das folhas de *Coffea arabica* L. genótipo Catuaí IAC 99 são abordados neste capítulo. Um resumo do procedimento experimental está representado na Figura 4.

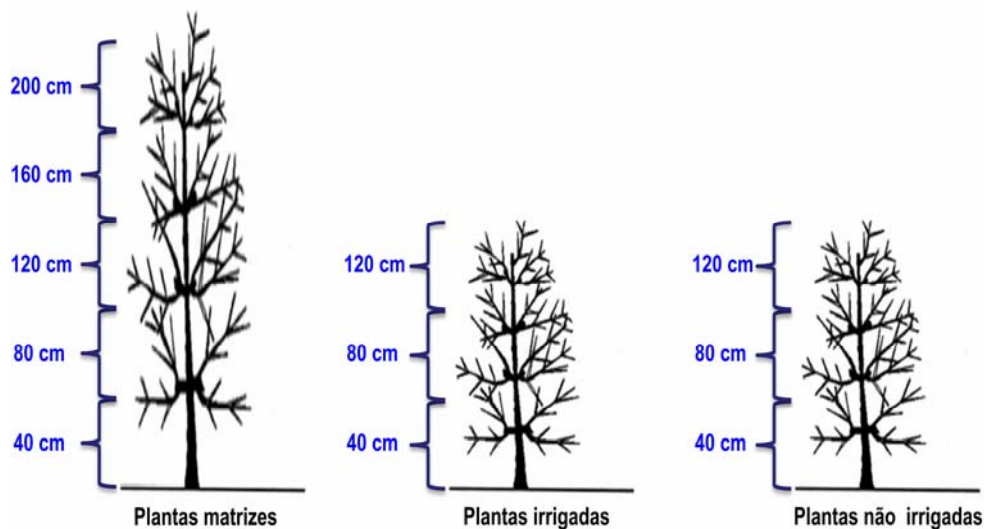
**Figura 4** – Procedimento experimental para a obtenção de dados espectroscópicos e cromatográficos das folhas de *Coffea arabica* L. genótipo Catuaí IAC 99



### 3.1 COLETA E ARMAZENAMENTO DAS FOLHAS

Folhas de *Coffea arabica* correspondentes ao genótipo Catuaí IAC 99, foram coletadas em 09 de outubro de 2012, no Instituto Agronômico do Paraná (Londrina). As folhas foram coletadas de plantas com 46 anos de plantio (matrizes), de plantas irrigadas e não irrigadas, ambas com 3 anos de plantio. Com o objetivo de verificar a influência da arquitetura da planta e do efeito de irradiação luminosa, a colheita foi estratificada de 40 em 40 cm de altura do cafeeiro. O número de estratos para as matrizes foram cinco, três para plantas irrigadas e três para plantas não irrigadas, conforme Figura 5.

**Figura 5** – Representação da coleta das folhas das plantas do genótipo Catuaí IAC 99



As amostras foram transportadas em sacos de papel até o laboratório. Após, procedeu-se a distribuição das amostras em bandejas para efetuar a secagem sob circulação de ar a temperatura ambiente. A cada 24 h, as folhas eram revolvidas para permitir a aeração do material vegetal. O processo de secagem variou de 15 a 20 dias dependendo da quantidade de folhas em cada bandeja. Quando totalmente secas, as folhas foram trituradas em liquidificador doméstico, peneiradas com peneira de plástico para retiradas dos cabinhos, embaladas em sacos de plásticos e submetidas a vácuo. O armazenamento foi realizado em *freezer/cooler*, até o momento das análises.

### 3.2 REAGENTES

Etanol, diclorometano e hexano de grau analítico foram adquiridos, respectivamente, das marcas Impex<sup>®</sup>, Alphatec<sup>®</sup> e Anidrol<sup>®</sup>. Acetonitrila e metanol de grau para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram adquiridos da LiChrosolv<sup>®</sup> (Darmstadt, Alemanha). Para obtenção da fase móvel foi utilizada água preparada a partir do sistema de purificação Milli – Q da Millipore<sup>®</sup>.

### 3.3 PREPARO DOS EXTRATOS

Foram pesados aproximadamente 2,0 g de folhas secas para prosseguir a extração por solvente utilizando o modelo centroide simplex, consistindo de etanol (e), diclorometano (d) e hexano (h) para solventes puros, três misturas binárias, três misturas ternárias axiais e uma ternária equitativa conduzida em sextuplicata. As proporções das misturas estão descritas na Tabela 1. O processo de extração/remaceração foi repetido quatro vezes com intervalo de 24 horas (overnight). Os extratos brutos foram concentrados em rota-evaporador Fisotom<sup>®</sup> e a secagem finalizada em corrente de ventilação de ar e liofilizador VirTis SP Scientific<sup>®</sup> Sentry 2.0 .

**Tabela 1** – Proporções dos solventes para cada amostra segundo planejamento de misturas

Amostra	Etanol (e)	Diclorometano(d)	Hexano (h)
e	1	0	0
d	0	1	0
h	0	0	1
ed	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
eh	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
dh	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
Edh	$\frac{2}{3}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{6}$
eDh	$\frac{1}{6}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{1}{6}$
edH	$\frac{1}{6}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{2}{3}$
edh	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$

### 3.4 ESCOLHA DOS SOLVENTES E POLARIDADES DE MISTURAS

Os solventes foram selecionados segundo características descritas por Snyder para uso cromatográfico, Tabela 2. Esta abordagem conduz a uma descrição dos diferentes solventes em termos de sua acidez ( $\alpha$ ), basicidade ( $\beta$ ), dipolaridade ( $\pi^*$ ) e polaridade (P).<sup>66</sup>

**Tabela 2** – Critérios descritos por Snyder dos solventes selecionados.<sup>70</sup>

<b>Solvente</b>	<b>Polaridade (P)</b>	<b>Acidicidade (<math>\alpha</math>)</b>	<b>Dipolaridade (<math>\pi^*</math>)</b>	<b>Basicidade (<math>\beta</math>)</b>
<b>Etanol</b>	4.3	0.39	0.25	0.36
<b>Diclorometano</b>	3.1	0.27	0.73	0.00
<b>Hexano</b>	0.1	0.00	0.00	0.00

Solventes pouco polares, como o hexano, extraem da planta, mais facilmente, mistura de compostos de baixa polaridade e compostos polares pouco hidrofílicos. Compostos mais polares e hidrofílicos são extraídos com mais facilidade por etanol, devido o solvente ser forte doador e receptor de prótons com caráter dipolar intermediário.<sup>67</sup>

Compostos que se comportam como ácidos ou bases lipossolúveis são extraídos de preferência, utilizando-se suas propriedades de formarem sais hidrossolúveis, com bases inorgânicas no caso de ácidos e, com ácidos inorgânicos, no caso das bases orgânicas. Devido o solvente diclorometano apresentar-se doador de prótons com caráter fortemente dipolar, é possível extrair, além de compostos polares, substâncias lipofílicas básicas, óleos fixos, ceras, agliconas, sapogeninas.<sup>67</sup>

Para misturas de solventes, o parâmetro polaridade é calculado pela multiplicação da proporção de volume de cada solvente e sua própria polaridade, conforme Equação 9. A ordem decrescente de polaridade de solventes e suas misturas estão na Tabela 3.<sup>68</sup>

$$P = \sum_{i=1}^z \varphi_i P_i \quad (9)$$

onde,  $\varphi_i$  é a proporção do volume de cada solvente e  $P_i$  são os valores de polaridade dos solvente puros.<sup>68</sup>

**Tabela 3** – Polaridade de solventes e suas misturas, em ordem decrescente

<b>Solvente</b>	<b>Polaridade (P)</b>
<b>e</b>	4.3
<b>ed</b>	3.7
<b>Edh</b>	3.35
<b>d</b>	3.1
<b>eDh</b>	2.75
<b>edh</b>	2.5
<b>eh</b>	2.2
<b>dh</b>	1.6
<b>edH</b>	1.25
<b>h</b>	0.1

### 3.5 ANÁLISES ESPECTROFOTOMÉTRICAS NO ULTRAVIOLETA-VISÍVEL (UV-Vis)

O espectrofotômetro Thermo Scientific® Evolution 60 foi utilizado para estas análises. Para análise ultravioleta-visível (UV-Vis), 3,0 mg de cada extrato bruto foram solubilizados em 1 mL de seus respectivo solvente ou mistura de solventes de acordo com o planejamento mostrado na Tabela 1. Uma alíquota de 100 µL dessa solução foi diluída em 1900 µL do solvente extrator. Os espectros dos extratos foram registrados na região de 200 – 800 nm.

### 3.6 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS NO INFRAVERMELHO

Um espectrômetro Thermo Scientific® Nicolet IS10 FTIR equipado com um acessório de reflectância total atenuada (ATR) de cristal de germânio foi utilizado para a análise. Os espectros dos extratos foram registrados na região 4000-675  $\text{cm}^{-1}$  e para cada um foram efetuadas 32 varreduras utilizando-se resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.7 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Cada amostra foi preparada pesando-se 3,0 mg de extrato bruto e diluindo em 1 mL de metanol. Após, filtrou-se utilizando um filtro de membrana 0,20 µL CHROMAFIL® XTRA PTFE – 20/25 (Macherey – Nagel GmbH & Co. KG, Germany). Quinhentos microlitros da fase móvel inicial ACN: H<sub>2</sub>O (15:85 v/v) foram adicionados a 100 µL desse extrato. Uma alíquota de 20 µL desta solução diluída foi injetada no CLAE. A análise por CLAE foi conduzida em um cromatógrafo líquido Thermo Scientific® SPD – M10AV Finnigan Surveyor 61607 equipada com detector de arranjo de diodos Finnigan PDA Plus e quatro bombas Thermo – Electron Corporation. As condições cromatográficas foram: coluna Kinetex C18, 2,6 µm HILIC 100 Å, com dimensões de 150 mm x 4,6 mm (Phenomenex), pré-coluna Kinetex HILIC 4,6 mm (Phenomenex) e fluxo de fase móvel de 0,5 mLmin<sup>-1</sup>. O gradiente de concentração da fase móvel foi: ACN: H<sub>2</sub>O (15:85 v/v), 0,00 – 0,44 min.; ACN: H<sub>2</sub>O (35:65 v/v), 0,45 – 2,67 min.; ACN: H<sub>2</sub>O (90:10 v/v), 2,68 – 3,33 min.; ACN: H<sub>2</sub>O (15:85 v/v), 3,34 – 12,00 min. A eluição foi monitorada em 276, 290 e 325 nm. Os dados foram processados utilizando o software ChromQuest 4.2.

### 3.8 PROGRAMAS COMPUTACIONAIS

A análise de componentes principais (calculada pelo primeiro método e com rotação varimax) e agrupamento hierárquico foram realizados nos espectros de ultravioleta-visível, de infravermelho e também nos cromatogramas utilizando os softwares Statistica 7.0 ( Statistica for Windows 7.0, Statsoft, Tulsa, OK, EUA, 2004) e Origin Pro 8 SR0 ( OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA, 2007).



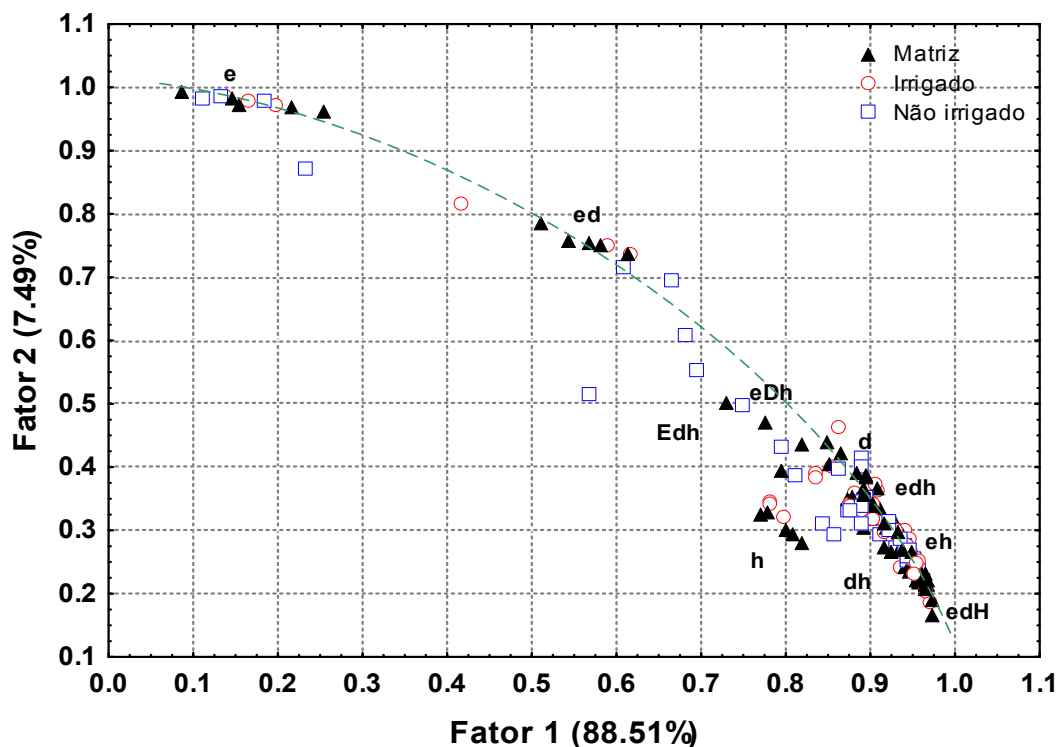
**CAPÍTULO IV**  
**RESULTADOS**  
**E**  
**DISCUSSÕES**

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA POR ESPECTROFOTOMETRIA ULTRAVIOLETA-VISÍVEL

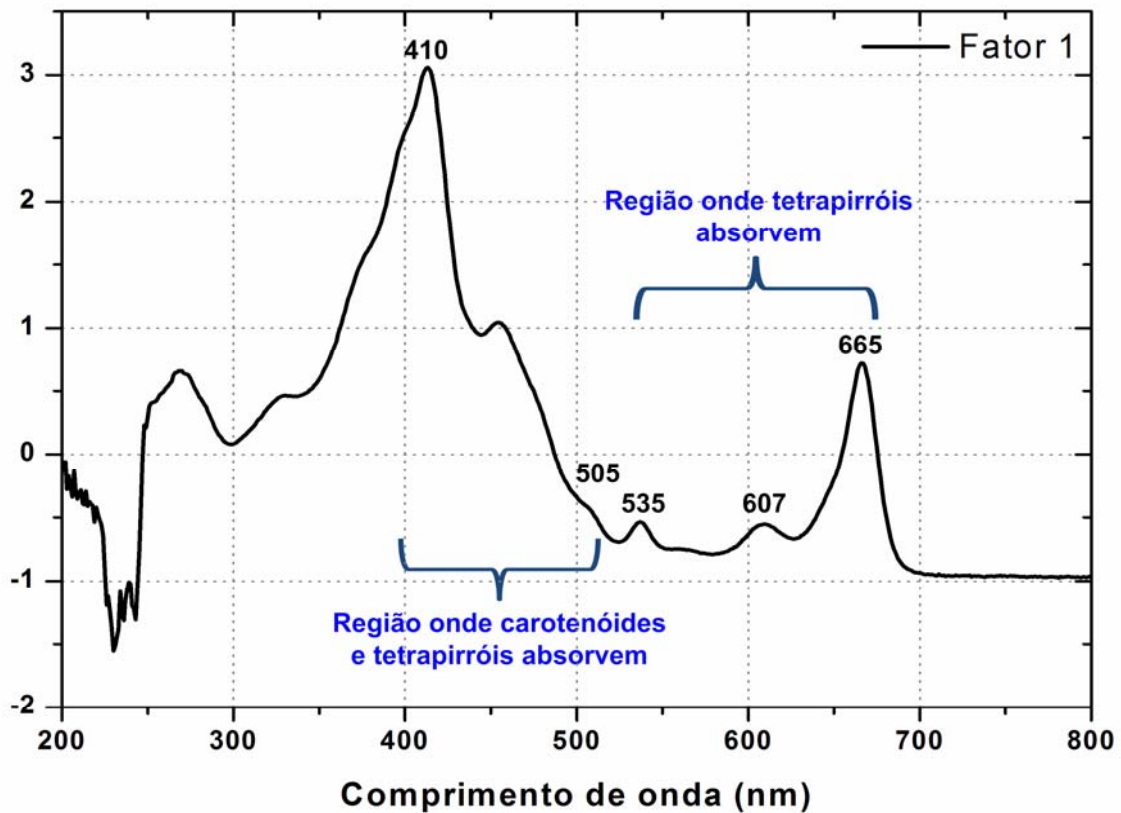
Os 165 extratos obtidos utilizando o planejamento de misturas com três componentes para as três plantas: matriz (5 estratos), irrigada (3 estratos) e não irrigada (3 estratos), foram analisados por espectroscopia no UV-Vis. Os dados dos espectros obtidos na região de 200 a 800 nm foram dispostos numa matriz de dados  $165 \times 601$ . Estes dados foram autoescalados e sujeitos a ACP e AH. Cinco fatores permitem explicar 98,57% da variância dos dados. Embora o Fator 1 tenha a maior variância explicada (88.51%), ele não contém informação química no sentido de discriminar as variações ambientais propostas, mas divide o conjunto em três grupos de acordo com a polaridade. No gráfico do escore para o Fator 1, Figura 6, nota-se um comportamento decrescente (demarcado pela linha tracejada) para os valores mais positivos, ao contrário do Fator 2 que exibe em valores mais positivos uma maior polaridade.

**Figura 6** – Representação gráfica dos escores do Fator 1 *versus* Fator 2 para os espectros em ultravioleta-visível de todos os extratos



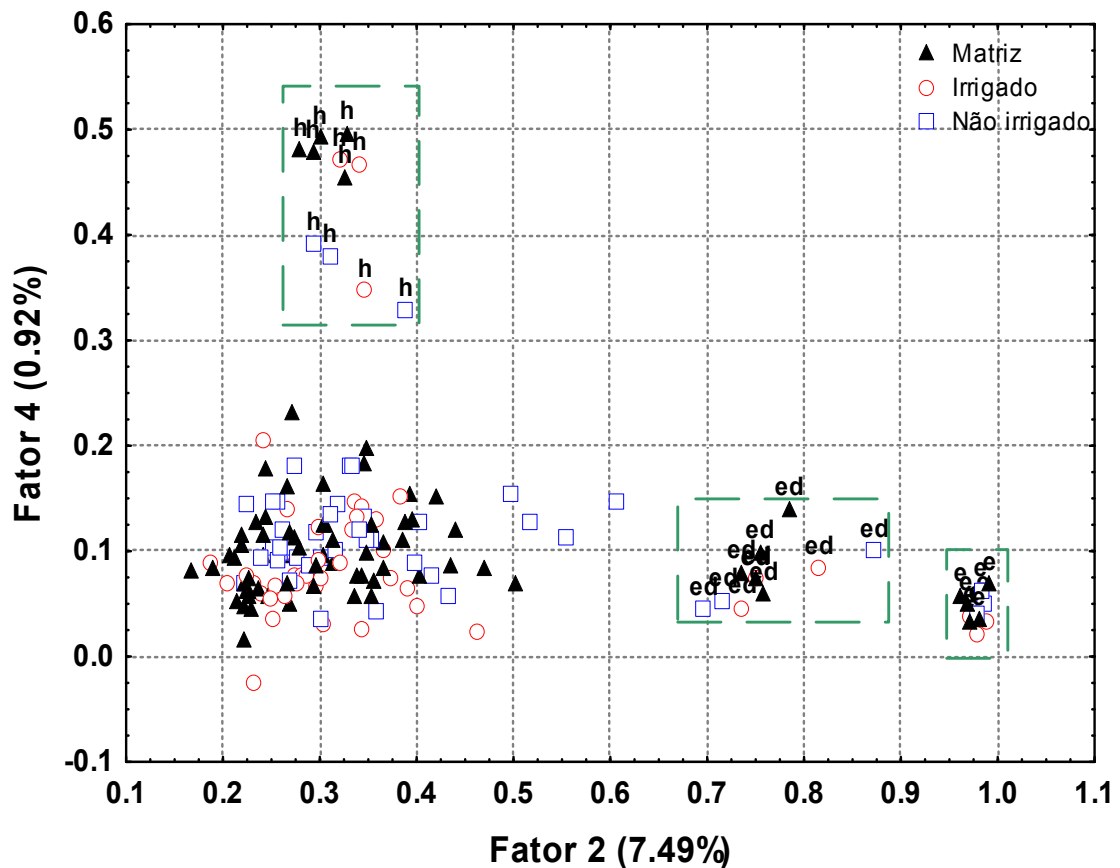
Na projeção gráfica dos “loadings” do primeiro fator também existem informações relevantes, Figura 7. Na região do visível, 370-750 nm, os “loadings” organizam-se semelhantes a absorbâncias de sistemas de ligações duplas conjugadas de pigmentos, principalmente à feofitina a (410, 505, 535, 607 e 665 nm)<sup>69</sup>. Como as substâncias responsáveis pela absorção e transferência de energia luminosa nos organismos autótrofos são os pigmentos, já era esperado encontrar indícios nos extratos. Entretanto, a identificação dos pigmentos sobre a única base de espectros de absorção, apresenta grandes restrições. A sobreposição das bandas de absorbância dos pigmentos presentes dificulta a identificação e estimativa da concentração individual e é muito menos eficaz, especialmente se o número de pigmentos é maior do que três.<sup>28</sup> De acordo com a Figura 7, quanto mais positivo os valores dos escores, Figura 6, maior a concentração de metabólitos extraídos, principalmente clorofilas e carotenóides.

**Figura 7** – Projeção gráfica dos “loadings” para o primeiro fator que explica 88.51% da variância total, dos espectros em ultravioleta-visível de todos os extratos.



A Figura 8 mostra a projeção do Fator 2 com o Fator 4, no qual é possível ver a formação de grupos distintos, demarcados pela área tracejada. O segundo fator separa os extratos preparados em etanol e a mistura binária etanol:diclorometano (1:1 v/v), localizados na região mais positiva. O Fator 4 diferencia os extratos preparados em hexano também na região mais positiva. O restante dos extratos encontra-se em regiões menos positivas e/ou próximos de zero.

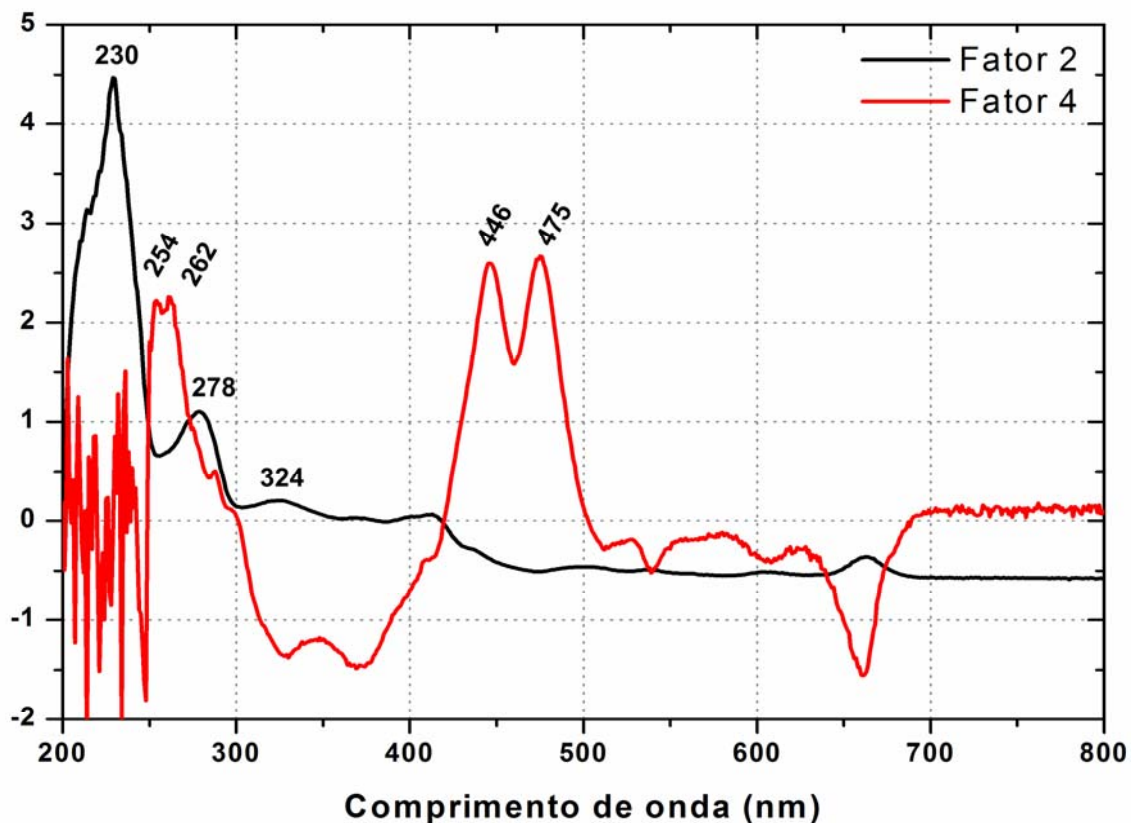
**Figura 8** – Representação gráfica dos escores do Fator 2 *versus* Fator 4 para os espectros em ultravioleta-visível de todos os extratos.



O gráfico dos loadings dos Fatores 2 e 4, Figura 9, mostra as variáveis com maior influência na discriminação dos extratos. Os resultados sugerem que existem diferenças nas composições químicas das amostras em relação ao agente extrator. Observa-se que os valores positivos do fator 2 estão localizados nos comprimentos de onda de 230, 278 e 324 nm influenciando na separação dos grupos de extratos obtidos em etanol e mistura binária etanol:diclorometano (1:1 v/v). O grupo de extratos obtidos com hexano, posicionados na parte positiva do

Fator 4, são mais influenciados por metabólitos com absorção nos comprimentos de onda de 254, 262, 446 e 475 nm. Esta interessante diferenciação por solventes ocorre devido os mesmos apresentarem propriedades distintas capazes de influenciar na eficiência da extração e garantir o maior ou menor número de metabólitos extraídos.

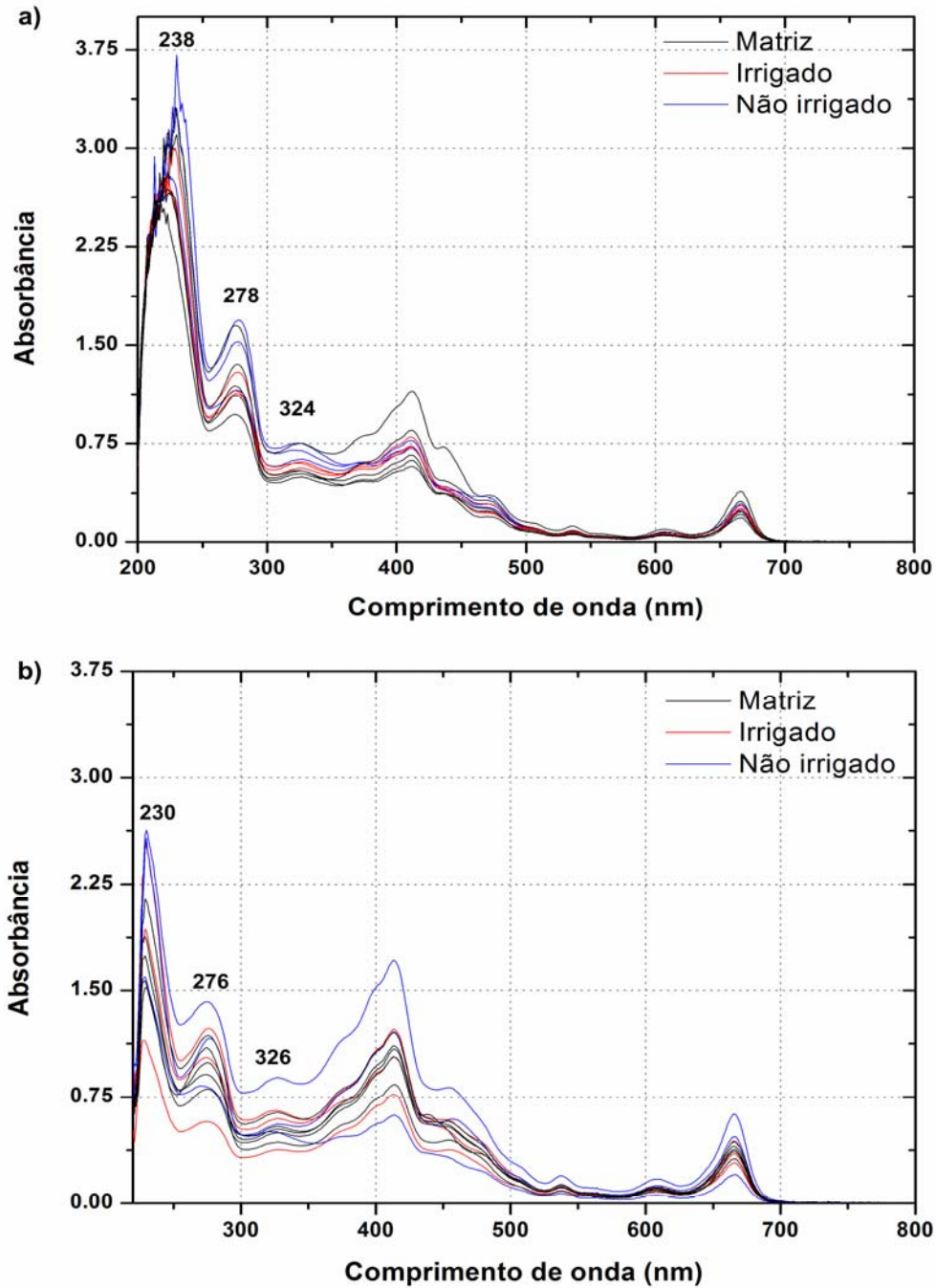
**Figura 9** – Representação gráfica dos “loadings” para o segundo (preto) e quarto (vermelho) fator dos espectros em ultravioleta-visível de todas as amostras.



Utilizando as informações dos escores, Figura 8, e “loadings”, Figura 9, é possível determinar nos espectros na região UV-Vis dos extratos obtidos, quais picos de absorbância os diferem dos demais. Os espectros dos extratos obtidos com etanol e mistura binária etanol:diclorometano (1:1 v/v) como solvente, Figura 10, exibem altos valores de absorbância nas regiões de comprimento de onda de 230 e 278 nm possivelmente provenientes de um acúmulo de compostos metilxantínicos devido a formação e degradação da cafeína. Em espécimes de *Coffea arábica*, a cafeína está presente em folhas em concentrações que variam de 0.8% a 1.9% em peso seco.<sup>26</sup> As amostras também absorvem na região de 324 nm podendo ser um indicio de compostos fenólicos, como ácidos clorogênicos. Os mesmos contêm duas

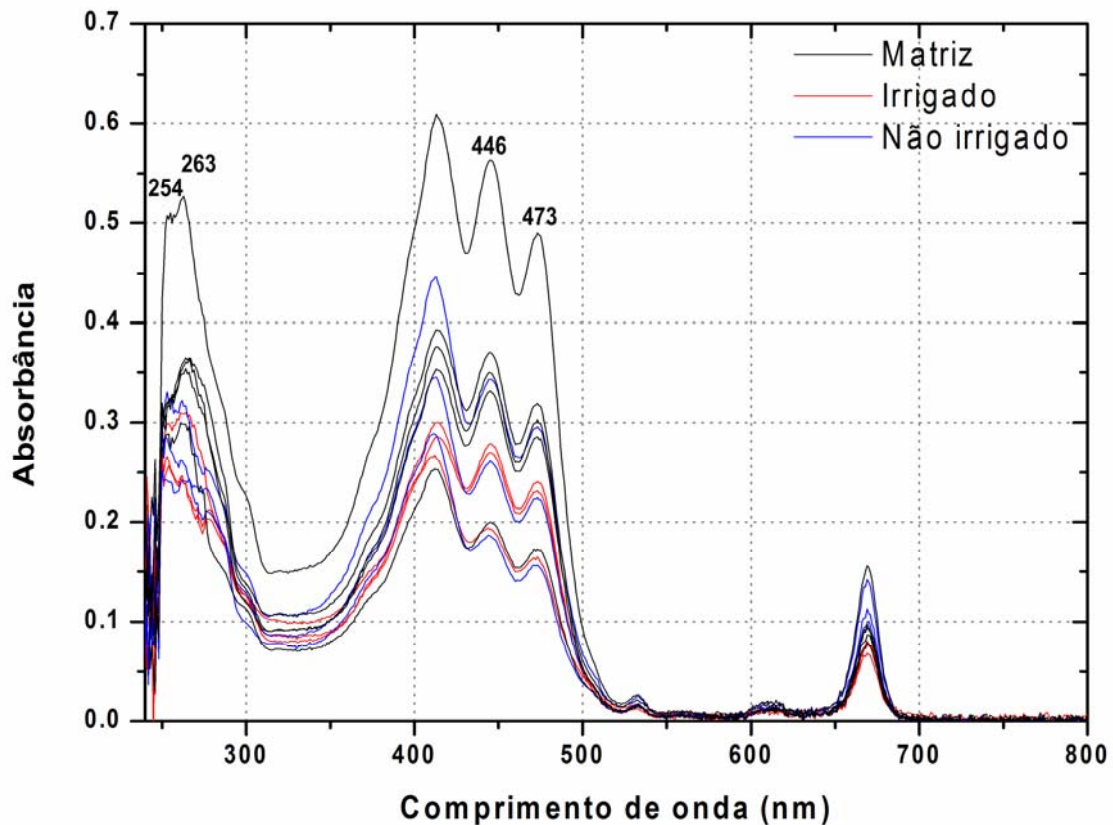
bandas espectroscópicas características no UV-Vis: a primeira aparece entre 280 nm devido à presença de anel aromático (sendo válida para todos os compostos fenólicos) e a segunda é uma banda longa situada no intervalo de 300-360 nm.<sup>73</sup>

**Figura 10** – Projeção gráfica dos espectros em radiação ultravioleta-visível dos extratos obtidos com a) etanol e b) mistura binária etanol:diclorometano (1:1 v/v) como solventes.



Em relação a pigmentos, o espectro de absorção de um extrato é útil, quando existe um domínio de um pigmento ou se vários compostos têm espectros semelhantes. Este é o caso dos extratos obtidos com hexano, Figura 11. Na região de 250-270 nm, os extratos apresentam elevada absorvidade em 254 e 263 nm, que corresponde a dienos conjugados e a trienos, respectivamente. O pico largo em torno de 390-500 nm pode refletir a presença de carotenoides, que conferem a coloração alaranjada ao extrato. O fato de existir absorvidade em 535-670 nm (compostos relacionados com clorofila) comprova existir uma maior concentração de carotenoides nestes extratos.<sup>28, 70</sup>

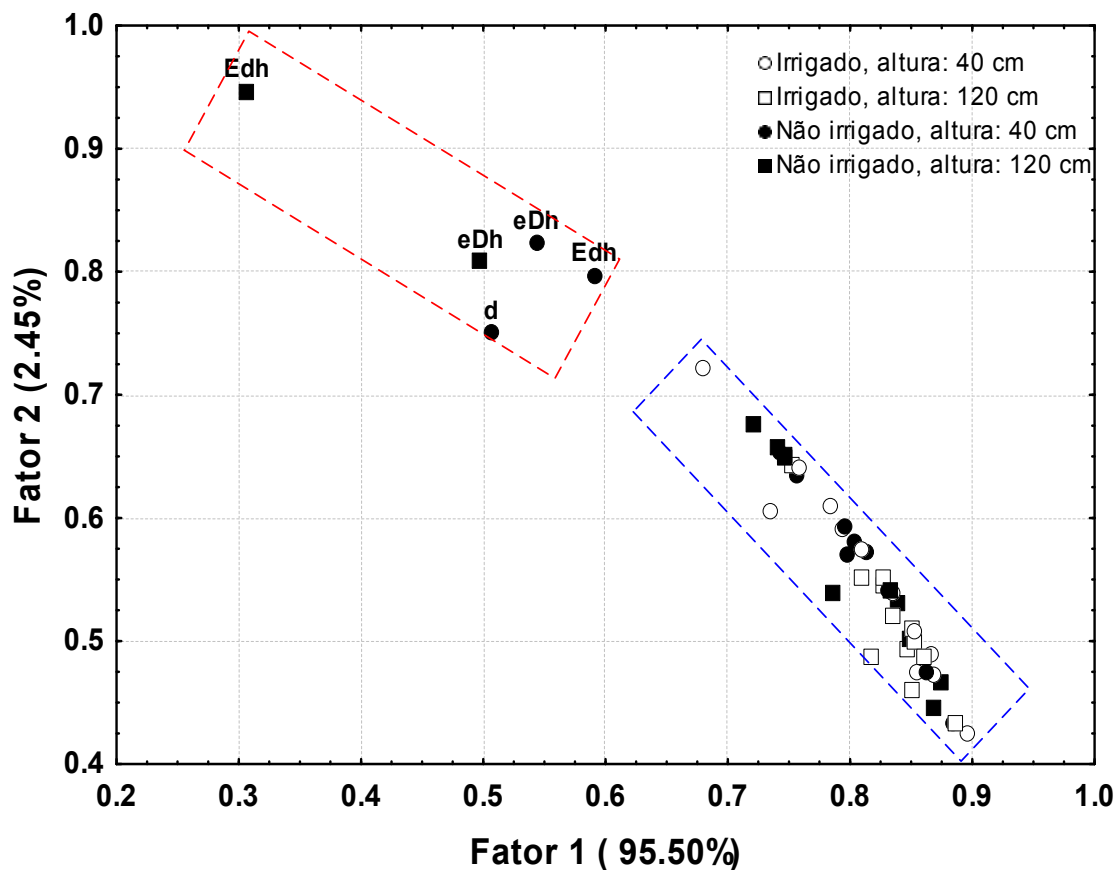
**Figura 11** – Projeção gráfica dos espectros em radiação ultravioleta-visível dos extratos obtidos com hexano como solvente extrator.



Com intuito de verificar o efeito da luminosidade e do estresse hídrico das plantas de mesma idade, foram analisadas as amostras de plantas irrigadas e não irrigadas coletadas em menor (40 cm) e maior altura (120 cm). Considerando que amostras extraídas em etanol, hexano e etanol:diclorometano (1:1 v/v) apresentaram diferenças pelas propriedades do solvente (parâmetros solvatocrômicos), estes extratos foram retirados da matriz de dados para análise dos

extratos restantes. A matriz  $48 \times 601$  foi submetida à análise de AH e ACP, onde cinco fatores explicam 99.11% da variância total. O primeiro e segundo fatores tem porcentagem de variância conjunta de 97.95%, e apresentaram informações químicas relacionadas ao estresse hídrico, Figura 12. Observa-se neste gráfico a formação de 2 grupos distintos: um grupo contendo apenas extratos não irrigados obtidos com diclorometano e as misturas ternárias etanol:diclorometano:hexano ( $\frac{2}{3}$ ,  $\frac{1}{6}$ ,  $\frac{1}{6}$  v/v/v) e etanol:diclorometano:hexano ( $\frac{1}{6}$ ,  $\frac{2}{3}$ ,  $\frac{1}{6}$  v/v/v) como solvente (Grupo I) e outro grupo contendo as demais amostras (Grupo II).

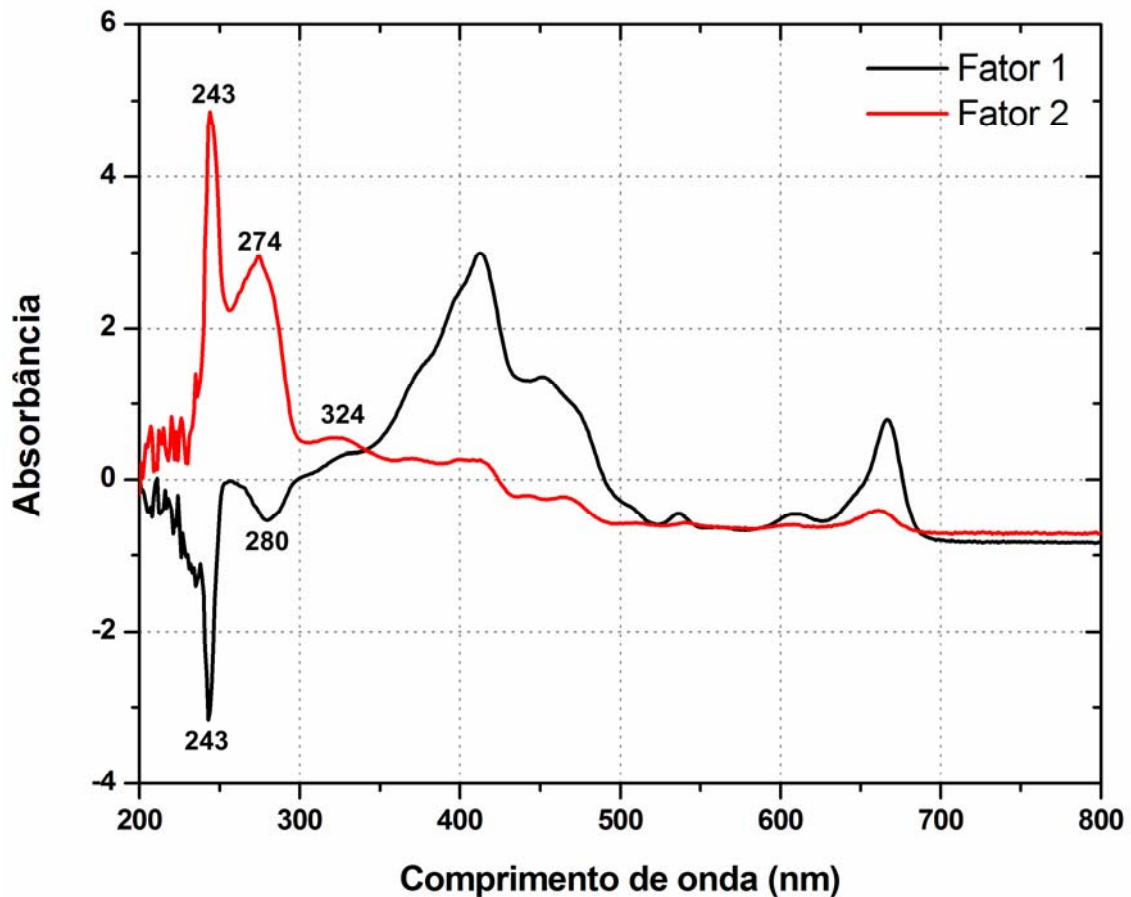
**Figura 12** – Representação gráfica dos escores do Fator 1 versus Fator 2 para os espectros em ultravioleta-visível dos extratos irrigados e não irrigados de altura inferior e superior. Os grupos distintos localizam-se nas áreas demarcadas.



O primeiro fator distingue o Grupo I, localizando-o na região menos positiva e mais positiva do Fator 2. O segundo fator localiza o Grupo II em sua região menos positiva e mais positiva no Fator 1. O gráfico dos “loadings” dos Fatores 1 e 2 estão apresentados na Figura 13. Na imagem podemos visualizar quais os

comprimentos de onda que explicam a distinção entre os dois grupos mostrados na Figura 12. Observa-se que os altos valores positivos do primeiro fator estão localizados nos comprimentos de onda de 243, 274 e 324 nm. Já o segundo fator apresenta altos valores negativos em 243 e 280 nm e altos valores positivos nas regiões de 390-500 nm e de 535-670 nm possivelmente de clorofilas e carotenóides, respectivamente. Os valores próximos de 243 e 275 nm, possivelmente de cafeína e/ou compostos metilxantínicos, são os que discriminam o Grupo I das demais amostras.

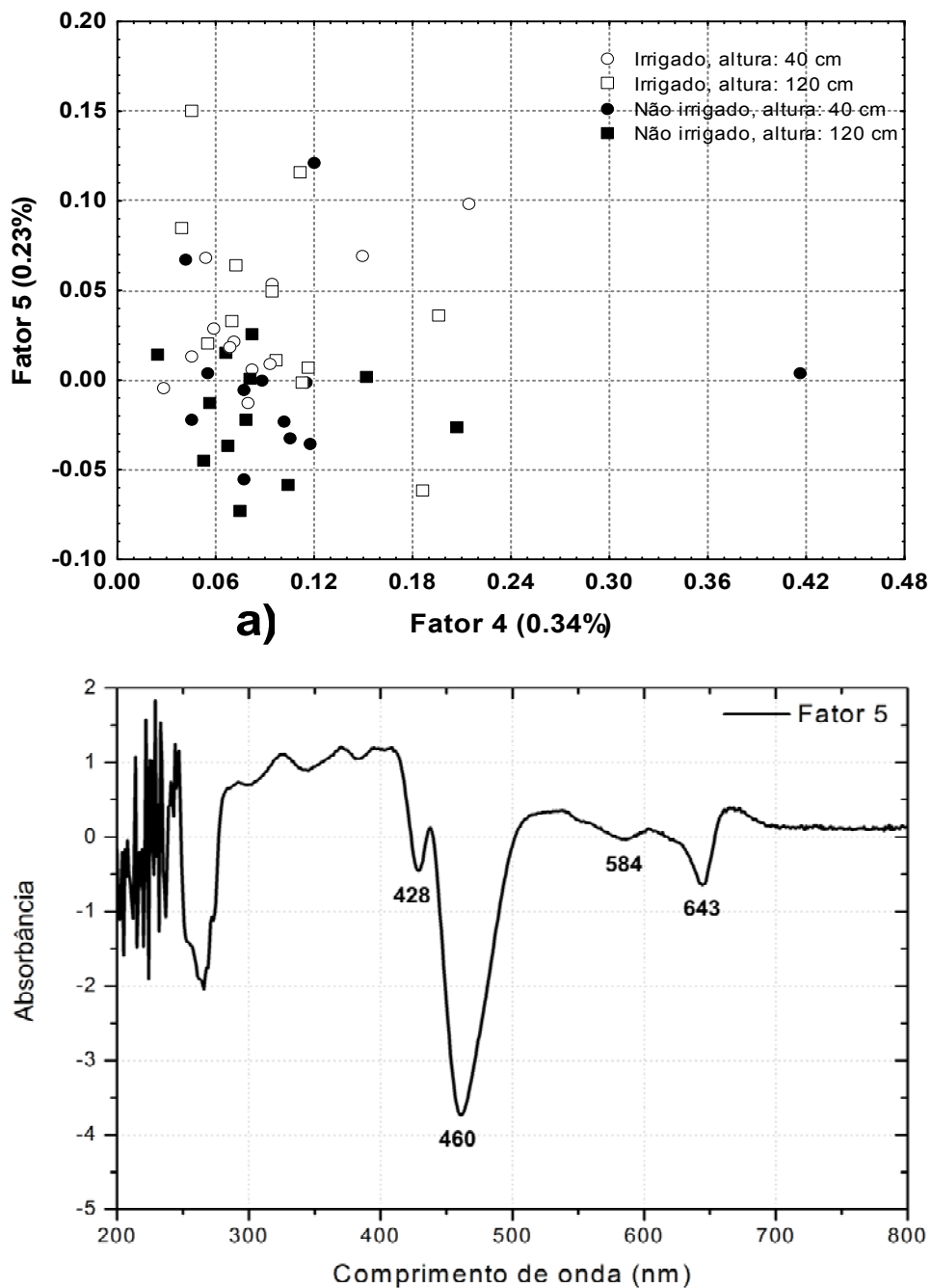
**Figura 13** – Representação gráfica dos “loadings” do Fator 1 e Fator 2 para os espectros em ultravioleta-visível de amostras irrigada e não irrigadas.



Apesar do quinto fator apresentar menor variância total explicada, 0.23%, considerando os cinco primeiros fatores da matriz de dados, ele apresentou informações importantes na diferenciação dos extratos entre amostras irrigadas e não irrigadas, Figura 15a. É possível observar maior número de amostras não irrigadas na região negativa e amostras irrigadas na região positiva do fator. A

análise das variáveis de peso do Fator 5, Figura 15b, mostra que esta diferenciação é devido a metabólitos que absorvem nos comprimentos de onda de 428, 460, 584 e 643 nm. De acordo com a literatura, e discutido anteriormente, estes valores são atribuídos a pigmentos como clorofilas e carotenoides.<sup>26</sup>

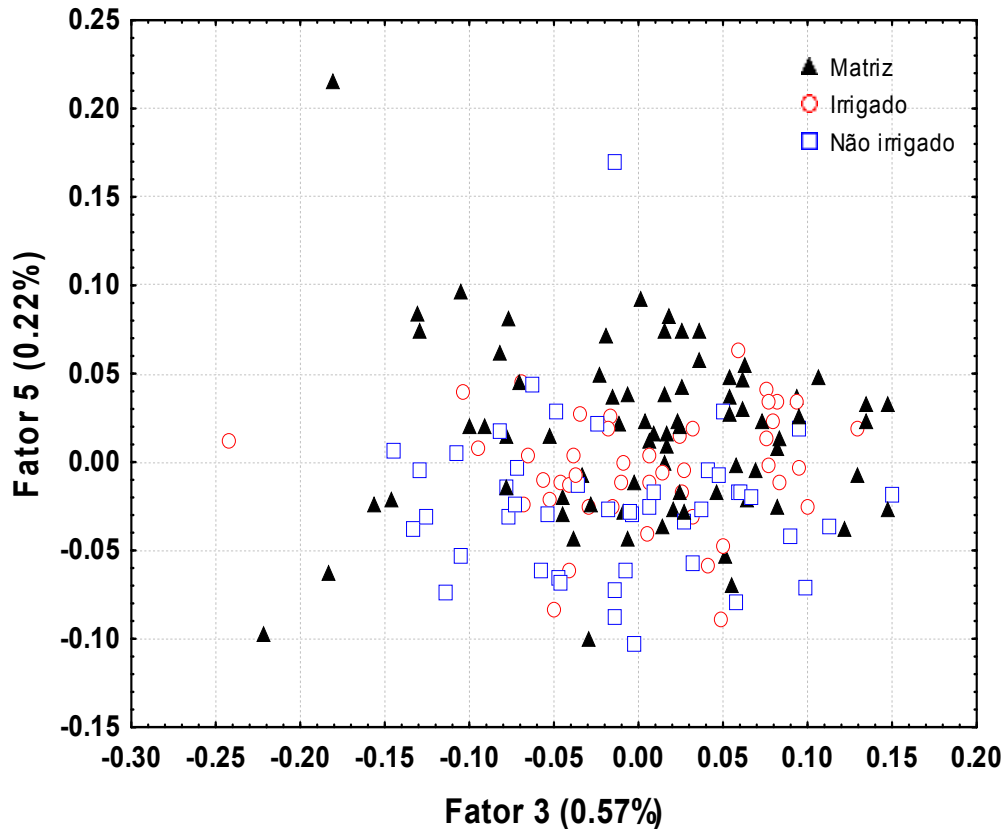
**Figura 14** – Representação gráfica em ultravioleta-visível para extratos de plantas irrigadas e não irrigadas a) dos escores dos Fatores 4 e 5 e b) “loadings” do Fator 5.





maioria dos extratos irrigados encontra-se em regiões mais próximas de zero, ou seja, o Fator 5 separa os extratos das plantas não irrigadas da planta matriz.

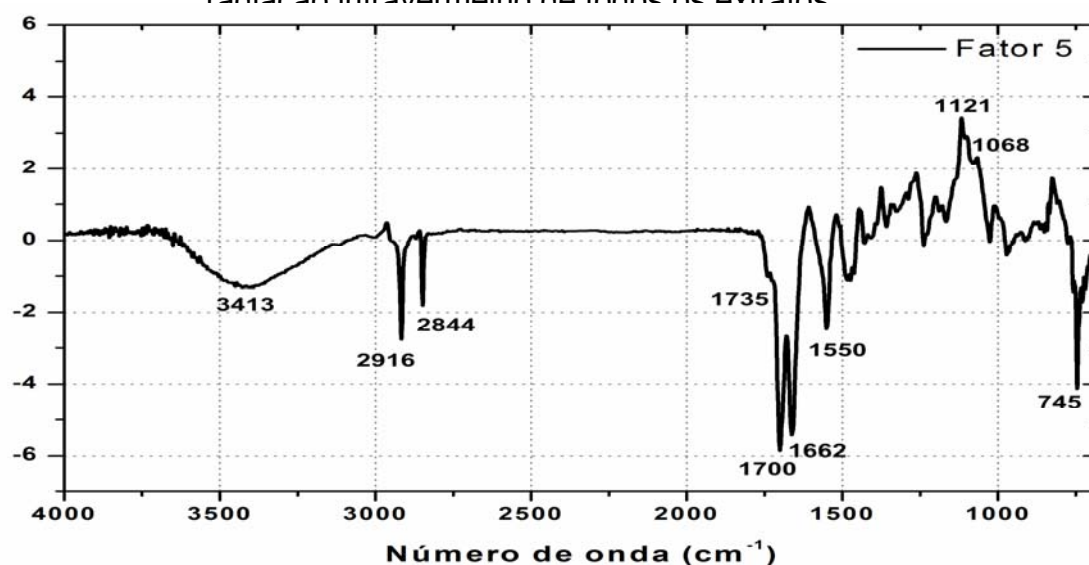
**Figura 16** – Representação gráfica dos escores do Fator 3 *versus* Fator 5 dos espectros em radiação infravermelho de todos os extratos.



Para verificar a influência destas separações utilizou-se a representação gráfica do “loading” do Fator 5, conforme Figura 17. É possível observar a influencia da separação pelos valores negativos do Fator 5, localizados em 3413, 2916, 2844, 1735, 1700, 1662, 1550 e 745  $\text{cm}^{-1}$  e por valores positivos em 1121, 1068 e 810  $\text{cm}^{-1}$ . A região em torno 3413  $\text{cm}^{-1}$  é característica de vibrações de deformação axial da ligação O-H (n O-H) de álcoois e fenóis (3650-3100  $\text{cm}^{-1}$ ), podendo ter contribuições de absorções provenientes de vibrações de deformação axial da ligação N-H de aminas (3500-3310  $\text{cm}^{-1}$ ) e amidas (3500-3060  $\text{cm}^{-1}$ ). As bandas presentes em 2916 e 2844  $\text{cm}^{-1}$  são compatíveis com o estiramento de  $\text{C}_{\text{sp}^3}\text{-H}$  em alcanos (2950-2850  $\text{cm}^{-1}$ ), H-CO de aldeídos alifáticos (2900-2700  $\text{cm}^{-1}$ ) e N- $\text{CH}_3$  de aminas alifáticas (2820-2780  $\text{cm}^{-1}$ ). A região entre 1800-1700 possui picos de 1740  $\text{cm}^{-1}$  e 1700  $\text{cm}^{-1}$ , indicando a presença de grupamento de carbonila (C=O)

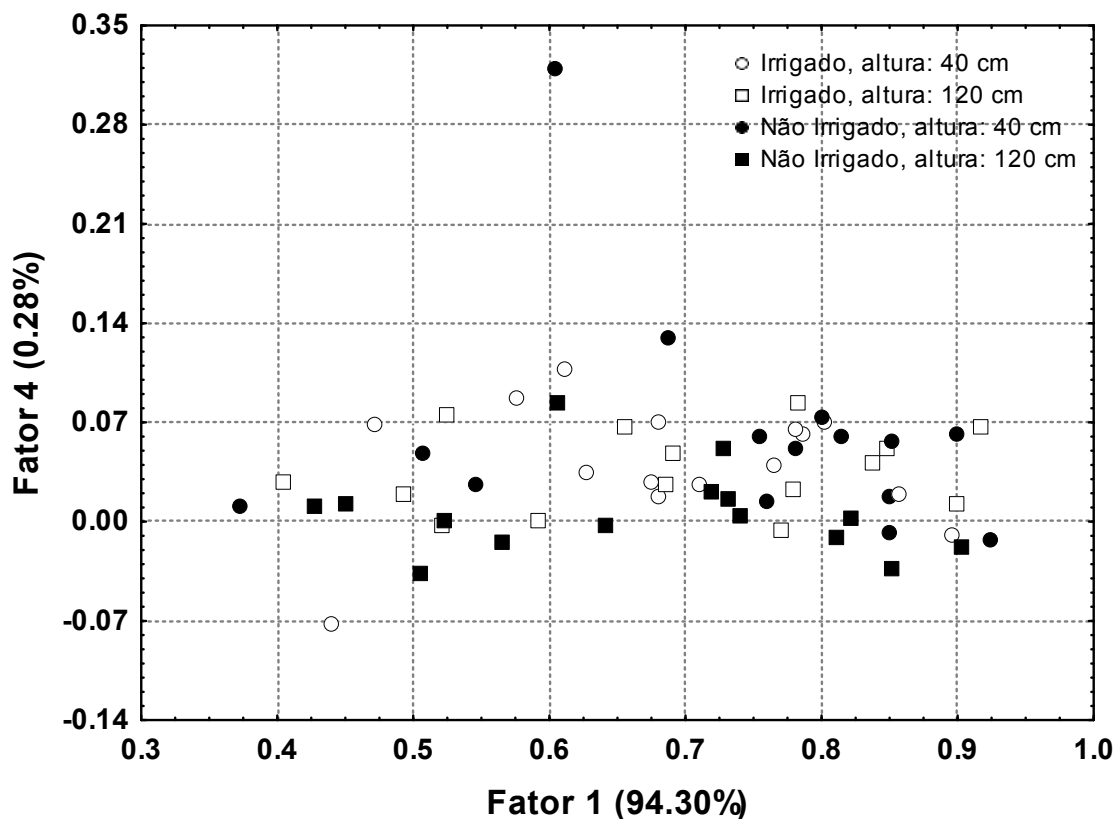
que podem estar associados a grupos funcionais de aldeídos ( $1740-1720\text{ cm}^{-1}$ ), cetonas ( $1770-1700\text{ cm}^{-1}$ ) ácidos carboxílicos ( $1760-1660\text{ cm}^{-1}$ ). As bandas presentes na região de  $1673-1401\text{ cm}^{-1}$  podem indicar a presença de estiramento de C=C em compostos aromáticos ( $1600-1450\text{ cm}^{-1}$ ), alcenos alifáticos ( $1695-1540\text{ cm}^{-1}$ ), deformação angular CH de éteres ( $1475-1440\text{ cm}^{-1}$ ), aminas e iminas ( $1496-1445\text{ cm}^{-1}$ ), podendo ainda ter contribuição de absorções de estiramento do grupo carbonila em amida secundária trans ( $\sim 1540\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento do grupo CN em alquiminas ( $1690-1470\text{ cm}^{-1}$ ) e de deformação angular NH em aminas ( $1650-1550\text{ cm}^{-1}$ ). A região entre  $1400-1027\text{ cm}^{-1}$  contém bandas características correspondentes ao estiramento de CN em aminas terciárias ( $1230-1030\text{ cm}^{-1}$ ), aminas aromáticas ( $1360-1250\text{ cm}^{-1}$ ), estiramento de CO em fenóis ( $1300-1140\text{ cm}^{-1}$ ), éteres ( $1150-1070\text{ cm}^{-1}$ ), éster ( $1275-1020\text{ cm}^{-1}$ ) e ácido ( $1320-1210\text{ cm}^{-1}$ ), podendo ainda ter contribuições de deformações angulares CH em alcanos ( $1310-1175\text{ cm}^{-1}$ ), éteres ( $1406-1372\text{ cm}^{-1}$ ), entre outros. Em regiões de baixa frequência de absorção existem muitas possibilidades, por exemplo, vibrações de deformação angular fora do plano da ligação C-H de hidrocarbonetos aromáticos ( $900-675\text{ cm}^{-1}$ ) e de alcenos ( $1000-650\text{ cm}^{-1}$ ). Podem ser ainda vibrações de deformação angular simétrica fora do plano das ligações N-H de aminas ( $909-667\text{ cm}^{-1}$ ) e amidas ( $800-677\text{ cm}^{-1}$ ).<sup>71</sup> Considerando estas atribuições e os resultados anteriores acredita-se que a discriminação ocorrida é provocada pela presença de compostos metilxantínicos e principalmente por pigmentos.

**Figura 17** – Representação gráfica dos “loadings” do Fator 5 dos espectros em radiação infravermelha de todos os extratos



Para verificar o efeito da luminosidade e do stress hídrico também foram analisadas somente as amostras de plantas irrigadas e não irrigadas em 40 e 120 cm de altura. A matriz de dados com dimensão  $60 \times 1672$  foi autoescalada e submetida à análise de fatores com variância total explicada de 99.38% com cinco fatores. Na projeção gráfica dos escores do Fator 1 *versus* Fator 4, Figura 18, visualiza-se uma discreta discriminação entre os extratos irrigados e não irrigados pelo quarto fator a partir do valor 0,03.

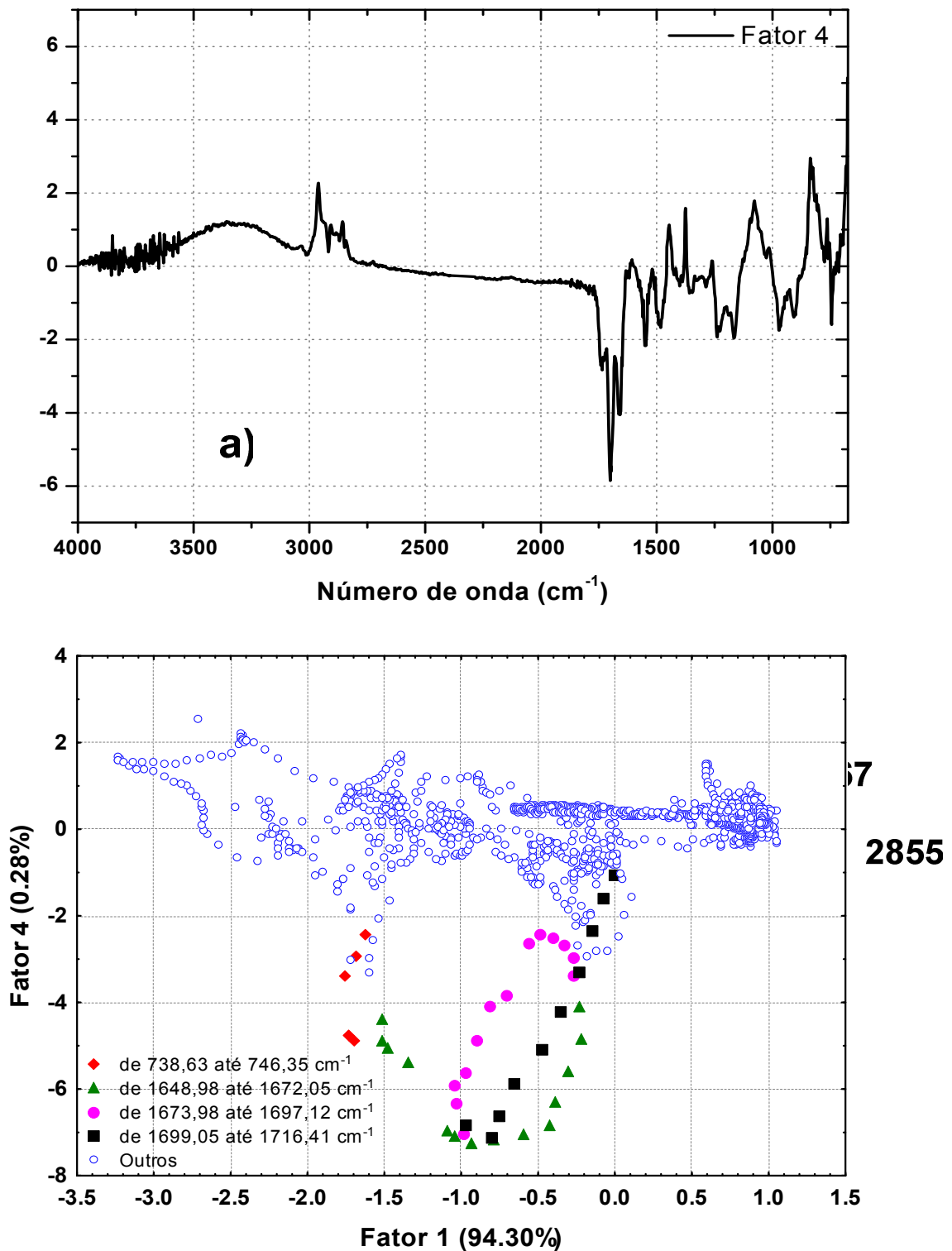
**Figura 18** – Projeção gráfica dos escores do Fator 1 *versus* Fator 4 para os espectros em radiação infravermelho dos extratos irrigados e não irrigados de altura inferior e superior.



O gráfico dos “loadings” do Fator 4, Figura 19a, localiza a separação nos valores positivos de 3330, 2967, 2855, 1080 e 840  $\text{cm}^{-1}$  para as amostras na região mais positiva do escore. Para a região mais negativa do escore os valores negativos das variáveis de peso se encontram em 1735, 1700, 1662, 1550 e 745. A representação gráfica dos “loadings” do Fator 1 *versus* Fator 4, Figura 19b, confirmam que as bandas de maiores influências, responsáveis pela discriminação dos extratos estão nas regiões de: 738,63-746,35  $\text{cm}^{-1}$ , 1646,98-1672,05  $\text{cm}^{-1}$ ,

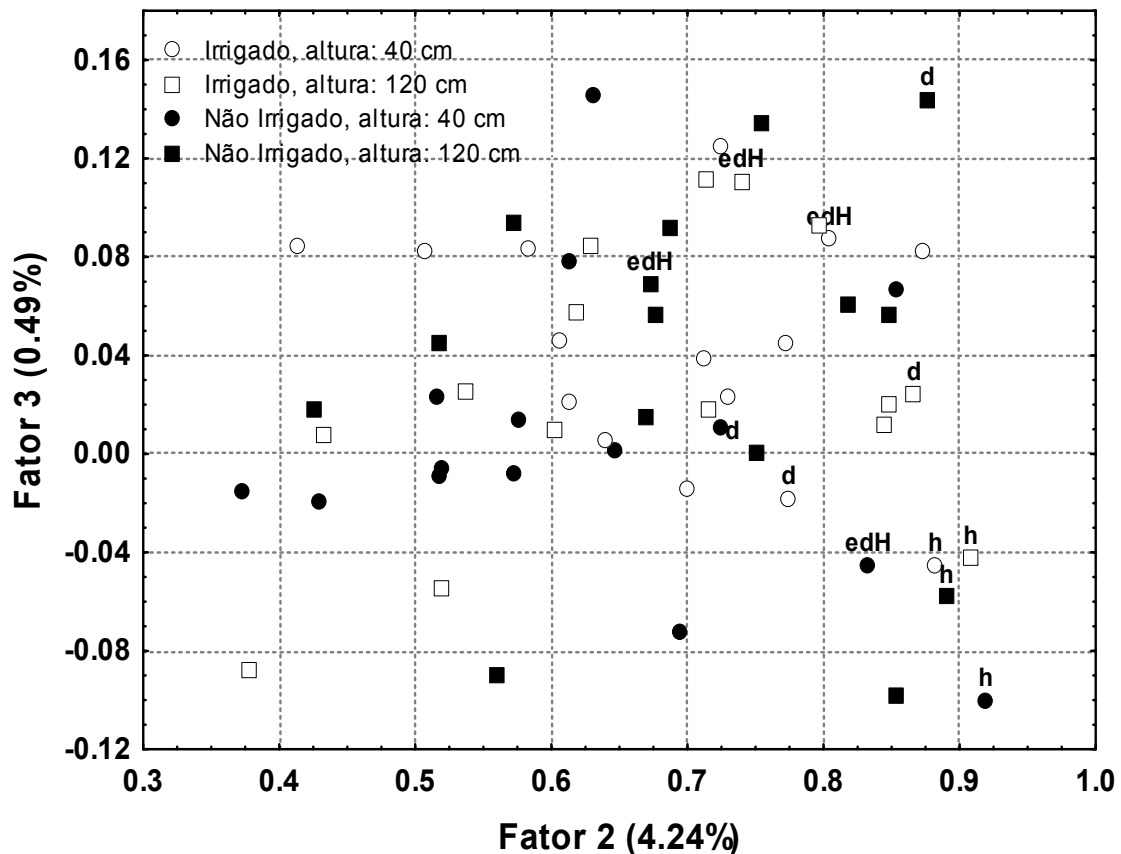
1673,98-1697,12  $\text{cm}^{-1}$  e 1699,05-1716,41  $\text{cm}^{-1}$ . Estes valores podem ser referentes a compostos metilxantínicos, fenólicos, pigmentos e entre outros.

**Figura 19** – Representações gráficas dos “loadings” para os espectros em radiação infravermelho a) do Fator 4 e b) dos Fatores 1 versus 4 dos extratos irrigados e não irrigados de altura inferior e superior.



No gráfico dos escores do Fator 2 *versus* Fator 3, Figura 20, observa-se que os extratos se apresentam de forma dispersa ao longo dos fatores e, em determinados solventes como diclorometano e mistura etanol:diclorometano:hexano (edH,  $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v), também há separação pela diferença entre alturas. Os extratos em hexano, contrariando a observação da dispersão das amostras ao longo do fator, encontram-se distribuídos em ambos os fatores. Estas informações estão amplamente relacionadas à quantidade de compostos e suas concentrações nos extratos obtidos com diferentes solventes.

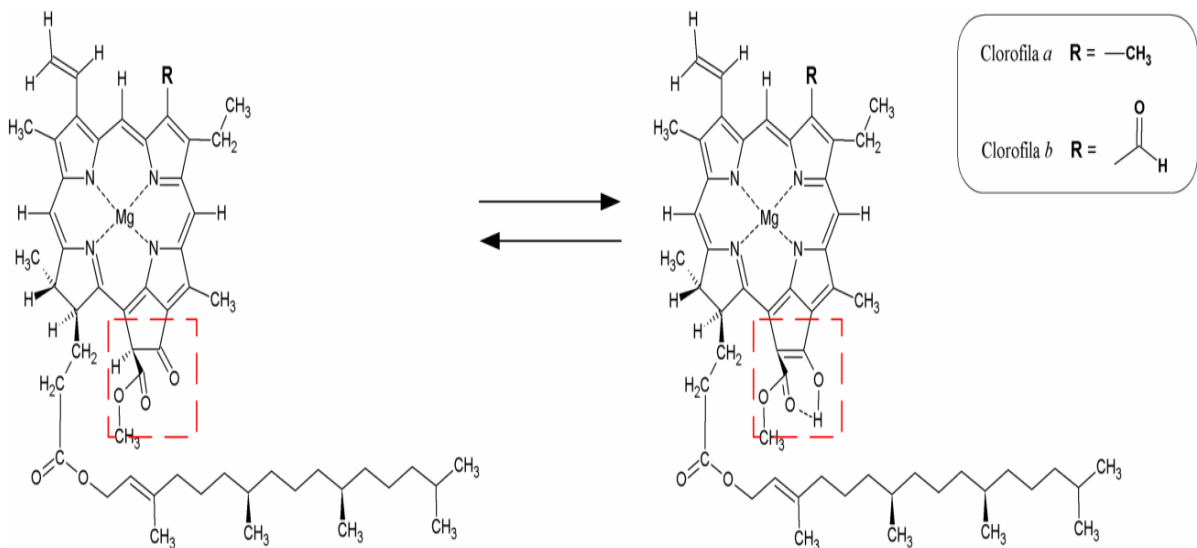
**Figura 20** – Gráfico dos escores dos Fatores 2 *versus* 3 para os espectros em radiação infravermelho dos extratos irrigado e não irrigado de altura inferior e superior.



Os espectros de infravermelho da clorofila *a* e *b* na região de 1550 a 1750  $\text{cm}^{-1}$  já são bem estabelecidos. Estudos mais detalhados dos espectros indicam a existência de um tautomerismo ceto-enólico no anel isocíclico representado na Figura 21, formando dupla ligação C=C, em torno de 1650  $\text{cm}^{-1}$ . A clorofila *a* em solventes polares apresenta as seguintes atribuições: banda de

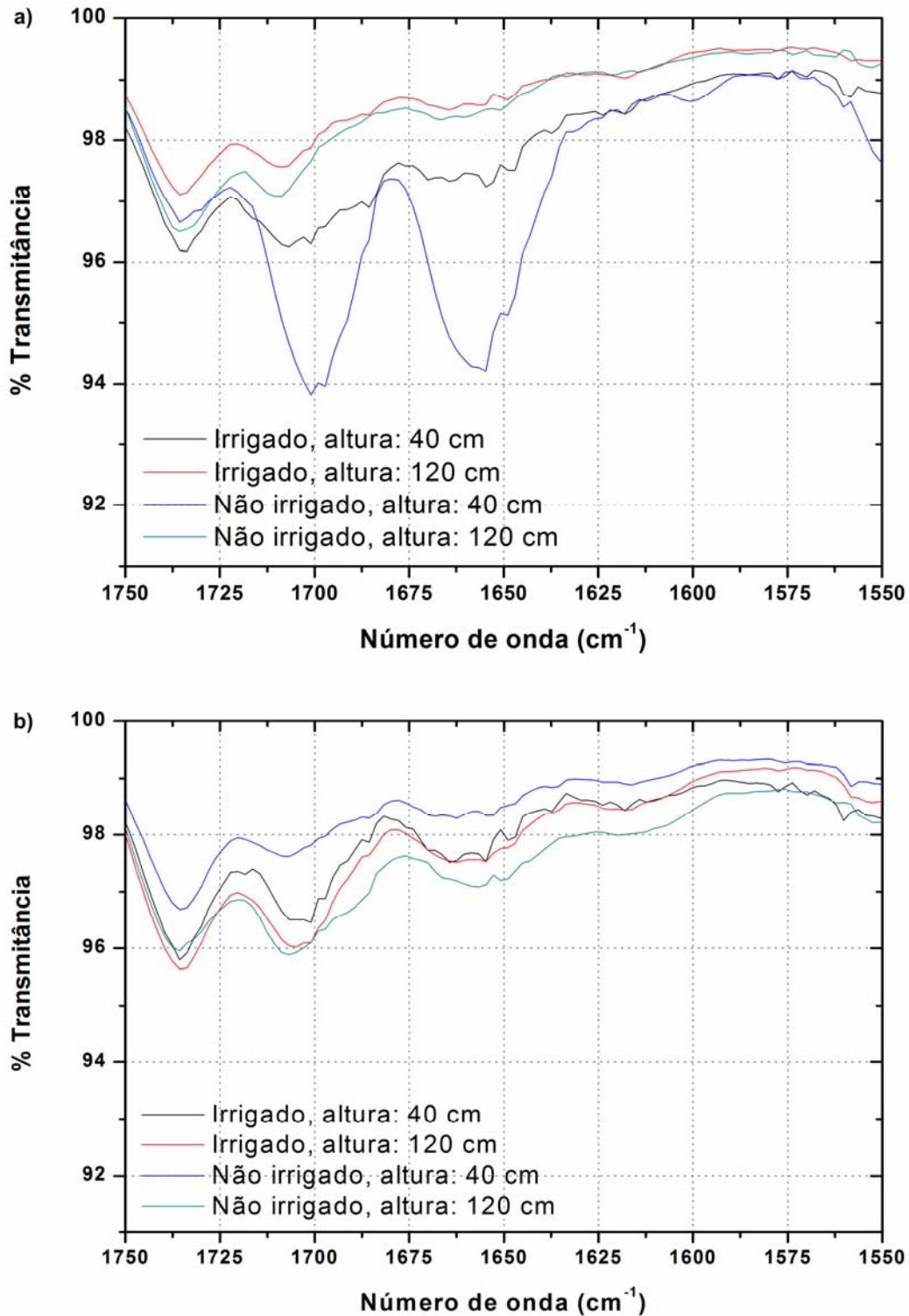
absorção em  $1735\text{ cm}^{-1}$  proveniente das absorções dos dois ésteres carbonilos, banda de absorção próxima de  $1700\text{ cm}^{-1}$  originada da cetona e banda de absorção próxima a  $1610\text{ cm}^{-1}$  referente vibrações estruturais de  $\text{C}=\text{C}$  ou  $\text{C}=\text{N}$ . Para clorofila *b*, em solventes polares, podem-se fazer as atribuições: em  $1735\text{ cm}^{-1}$  surge a banda de absorção proveniente dos ésteres, a cetona proveniente do anel isocíclico absorve próxima a  $1700\text{ cm}^{-1}$ , a banda em torno de  $1660\text{ cm}^{-1}$  relativo ao aldeído e banda de absorção próxima a  $1610\text{ cm}^{-1}$  referente vibrações estruturais de  $\text{C}=\text{C}$  ou  $\text{C}=\text{N}$ .<sup>72</sup>

**Figura 21** – Equilíbrio ceto-enólico e estrutura química da clorofila *a* e clorofila *b*.



Para os extratos com diclorometano como solvente, apresentados na Figura 22a, foi possível visualizar as bandas de absorção da clorofila *a* e *b* como também outras, podendo ser de produtos de degradação da clorofila (clorofilida, feofitina e etc.), carotenoides ou até mesmo alcaloides xantínicos. Entretanto é possível visualizar diferenças entre as amostras de 40 e 120 cm de altura, concordando então com o resultado da análise do Fator 3. Para os extratos obtidos na mistura de solventes edH ( $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v), a diferença é mais sutil, necessitando maiores estudos, Fig.22b.

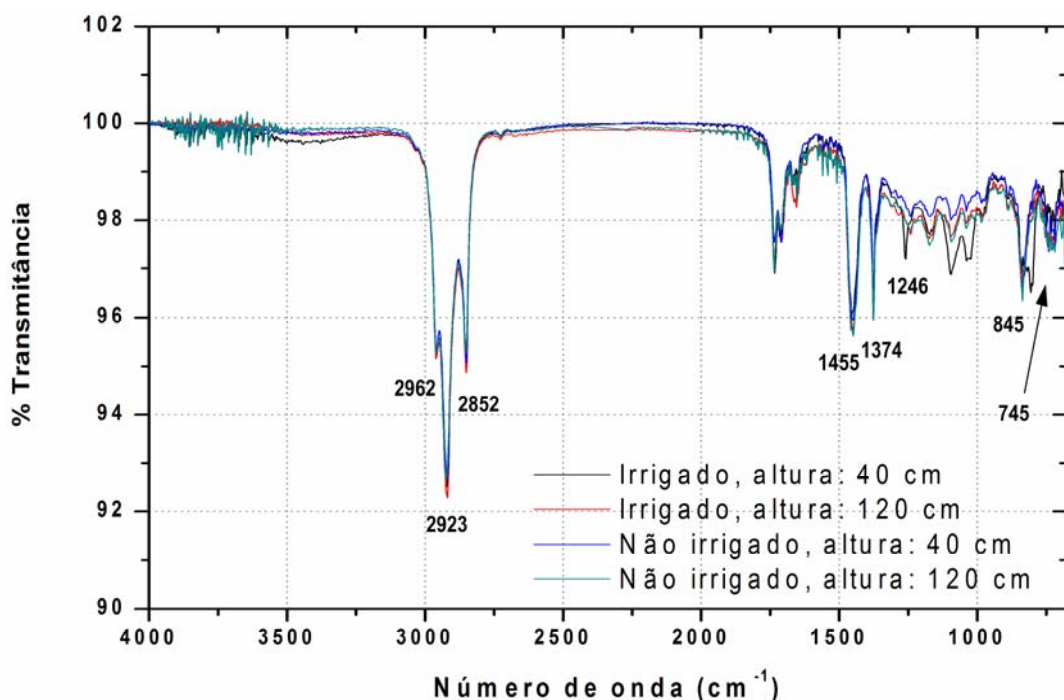
Figura 22 – Espectros em radiação infravermelho obtidos a partir dos extratos de a) diclorometano, e b) da mistura de solventes edH ( $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v).



Os extratos preparados em hexano são muito semelhantes e não servem para a discriminação por altura e por estresse hídrico. Observando os espectros de infravermelho, Figura 23, nota-se que os perfis são muito similares a

carotenoides (principalmente  $\beta$ -caroteno)<sup>73</sup>, cafeína e derivados nos extratos. Na natureza, o  $\beta$ -caroteno é encontrado em todas as plantas verdes e está sempre associado à clorofila. A estrutura básica é um esqueleto tetraterpeno simétrico formado da ligação calda a calda de duas moléculas de difosfato de geranilgeranilo com grupamentos periféricos compostos de um anel seis membros.<sup>28,74</sup> Por ter grupos periféricos ligados a átomos de carbono, a molécula eleva os estiramentos simétricos e assimétricos como também os modos de flexões classificados como modos perimetrais. Os estiramentos simétricos e assimétricos de  $\text{CH}_3$  encontram-se constantemente na região de  $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$  e foram denominados, neste caso, em  $2852 \text{ cm}^{-1}$  e  $2962 \text{ cm}^{-1}$ . A banda de maior absorção em  $2923 \text{ cm}^{-1}$  referente ao estiramento  $-\text{C}-\text{H}$ . A deformação simétrica do  $\text{CH}_3$  ocorre em torno de  $1370 \text{ cm}^{-1}$ , a deformação assimétrica em torno de  $1450 \text{ cm}^{-1}$  e a vibração do estiramento  $\text{C}-\text{CH}_3$  tem absorção em torno de  $1250 \text{ cm}^{-1}$ . As bandas em  $845 \text{ cm}^{-1}$  e em torno de  $740 \text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas às vibrações “wagging” fora do plano. Outras bandas de absorção características não foram visualizadas por pequenas intensidades ou possíveis sobreposições de bandas.<sup>73</sup> Considerando que os solventes hexano, diclorometano e etanol:diclorometano:hexano ( $1/6:1/6:2/3$ , v/v/v) foram os melhores discriminadores, este extratos foram analisados por CLAE – DAD.

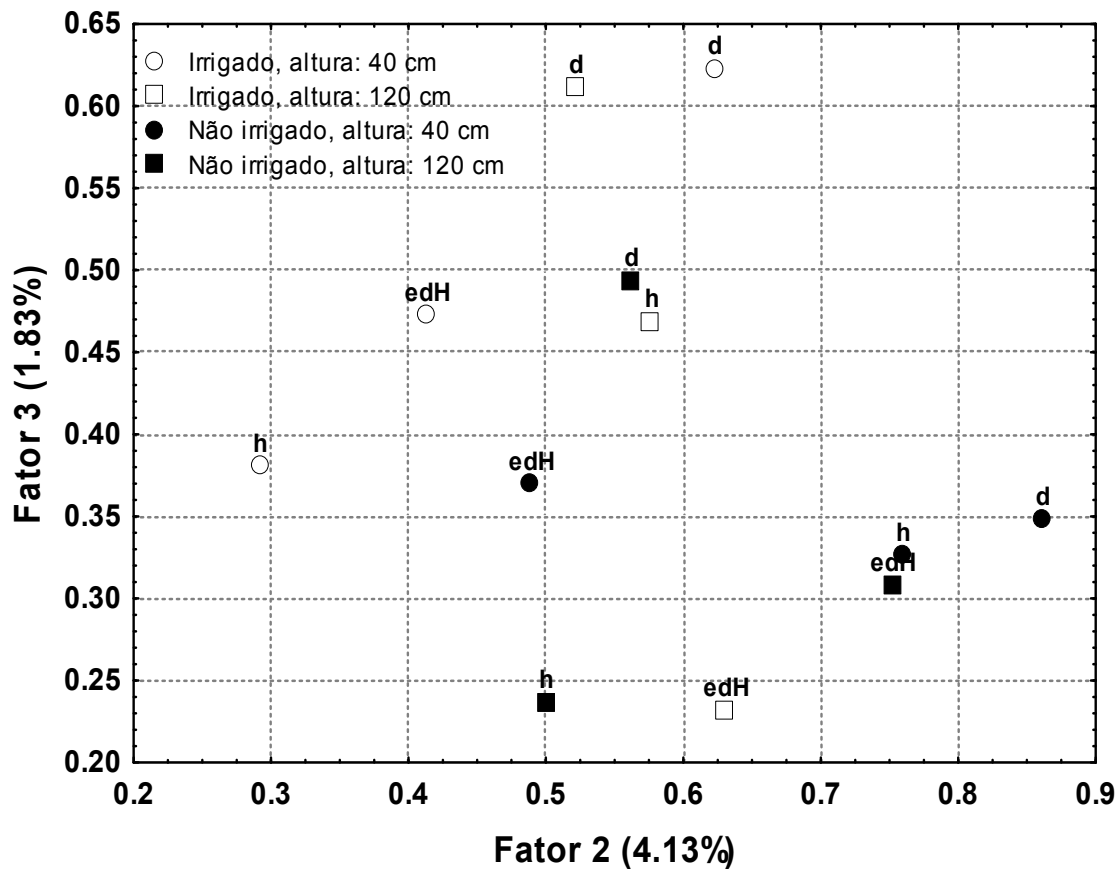
**Figura 23** – Espectros de infravermelho dos extratos obtidos em hexano para amostras irrigadas e não irrigada de alturas inferiores e superiores.



### 4.3 ANÁLISE EXPLORATÓRIA CROMATOGRÁFICA

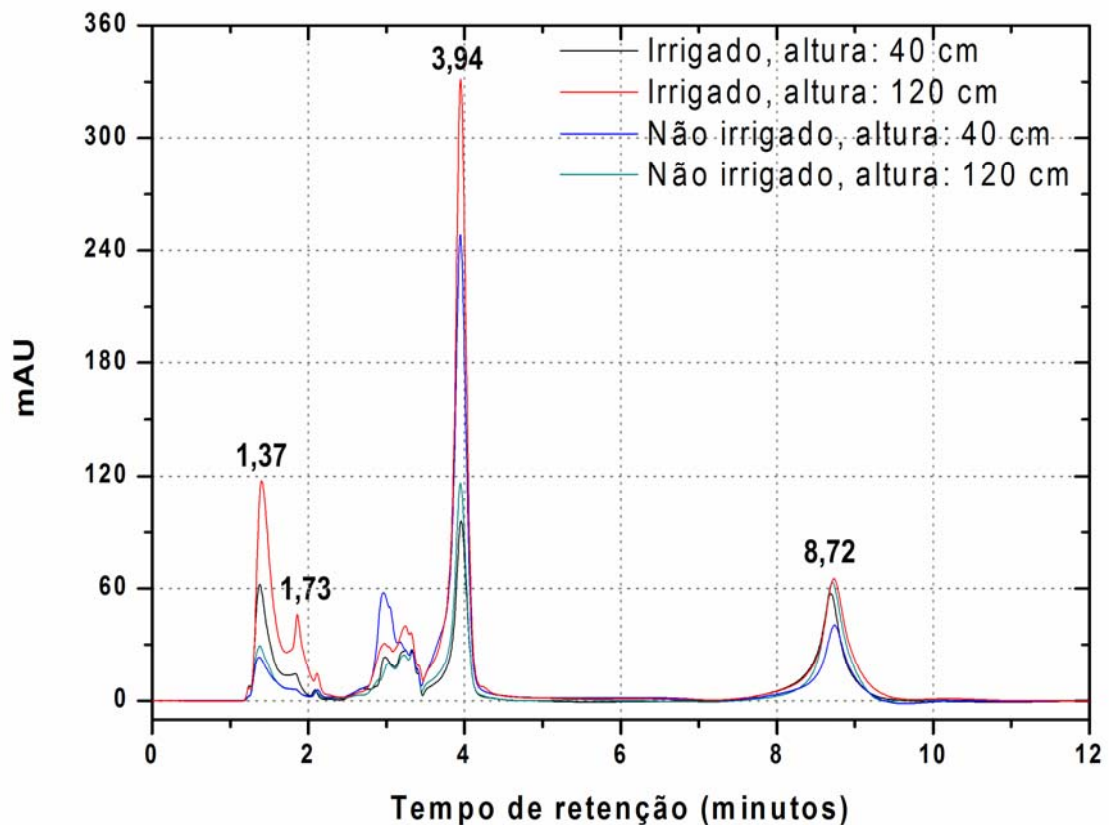
Pelas análises dos dados espectroscópicos anteriormente descritos, foram escolhidos os extratos para análise por CLAE-DAD. Os extratos de plantas irrigadas e não irrigadas, com alturas de 40 e 120 cm, obtidos com os solventes hexano, diclorometano e mistura etanol:diclorometano:hexano ( $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) foram selecionados. A matriz de dados dos cromatogramas monitorados em 276 nm, de dimensão  $12 \times 1410$  foi autoescalada e sujeita a análise hierárquica e análise de fatores, onde cinco fatores explicaram 99,38% da variância dos dados. A Figura 24 mostra a projeção dos escores do Fator 2 com o Fator 3, com variância conjunta explicada de 5.96%.

**Figura 24** – Representação gráfica dos escores cromatográficos em 276 nm dos Fatores 2 *versus* 3 dos extratos selecionados, que explicam 5.96% da variância total.



Os extratos obtidos em hexano apresentaram separações tanto no Fator 2 quanto no Fator 3. Ao analisar os cromatogramas dos extratos obtidos em hexano, Figura 25, nota-se que as amostras que ficaram na região menos positiva do Fator 2 exibem menores sinais nos picos cromatográficos no tempo de retenção de 3,94 minutos, entretanto as de 120 cm tem valores próximos concordando com o sinal cromatográfico em 8,72 minutos. O interessante do Fator 3 é que existe discriminação entre as amostras irrigadas e não irrigadas nos cromatogramas, mostrando uma possível separação devido ao déficit hídrico nos tempos de retenção de 1,37 e 1,73 minutos.

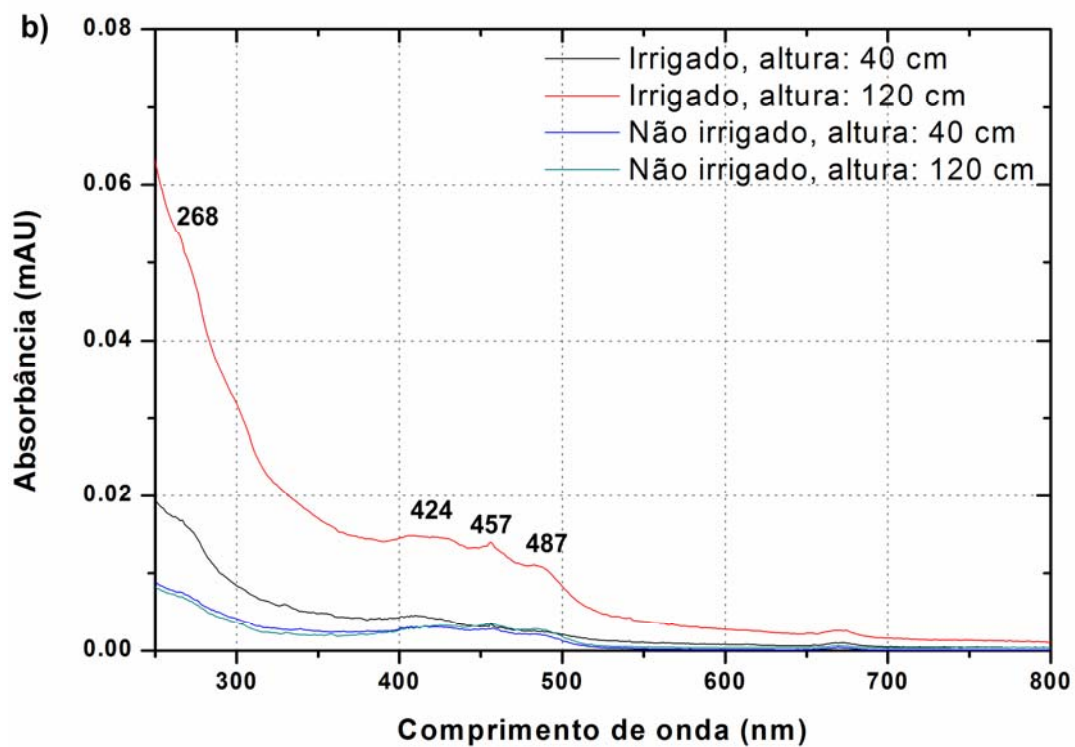
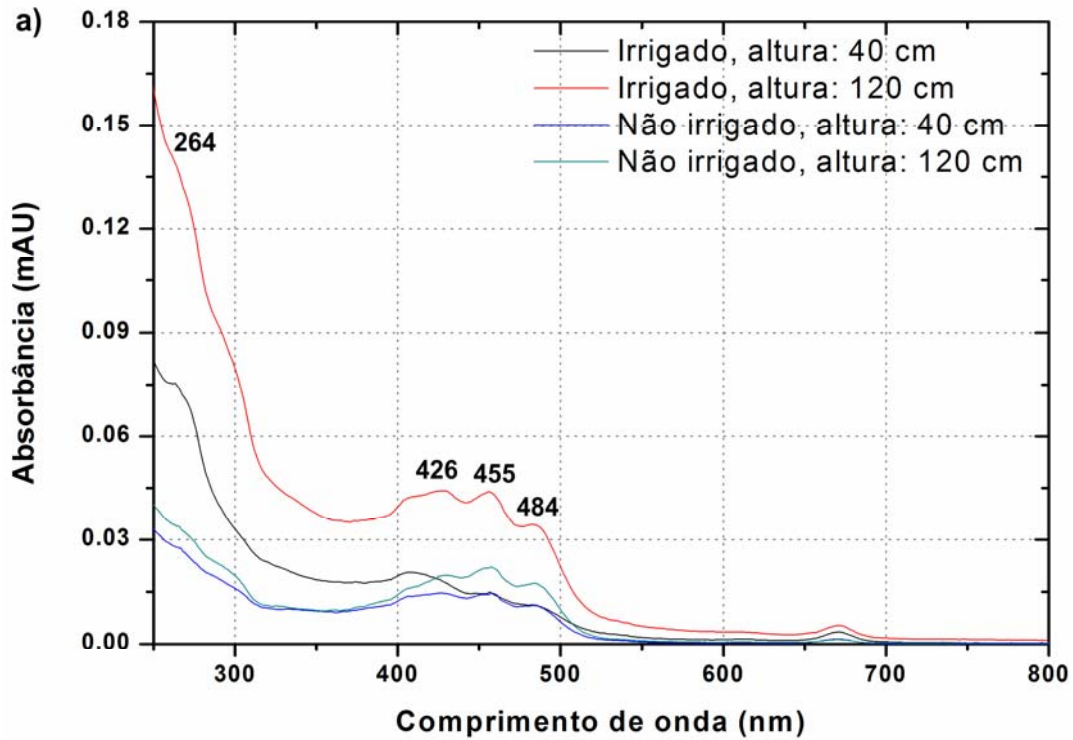
**Figura 25** – Cromatogramas dos extratos obtidos com hexano como solvente.



Pela análise dos espectros DAD, é possível distinguir os compostos que influenciam na discriminação. Os espectros dos sinais cromatográficos nos tempos de retenção próximos a 1,37 e 1,73 minutos apresentam similaridades a espectros de pigmentos, especificadamente a carotenóides<sup>75</sup> menos polares (carotenos), Figura 26, corroborando com os espectros obtidos em

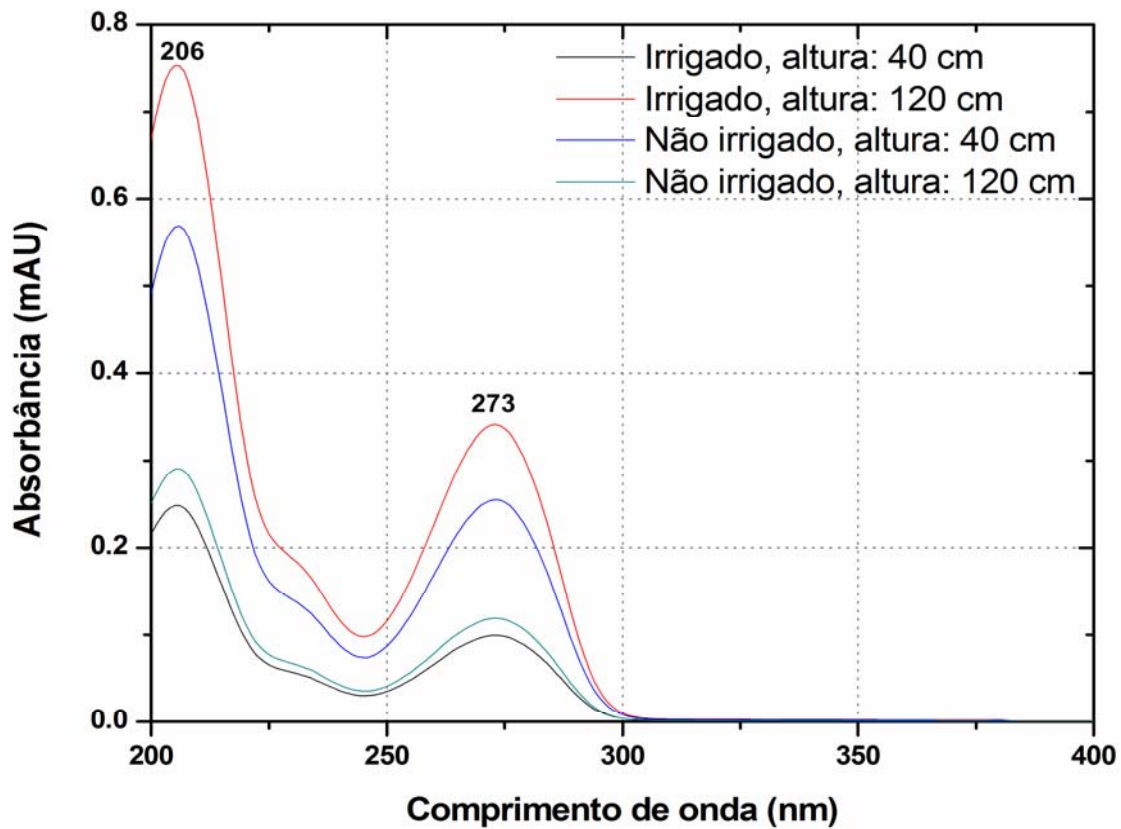
espectrofotometria UV-Vis. Em ambos os casos os irrigados quando comparados aos respectivos não irrigados, apresentam maior intensidade de sinal.

**Figura 26** – Espectros DAD dos extratos obtidos com hexano como solvente para os tempos de retenção de a) 1,36 minutos e b) 1,73 minutos.



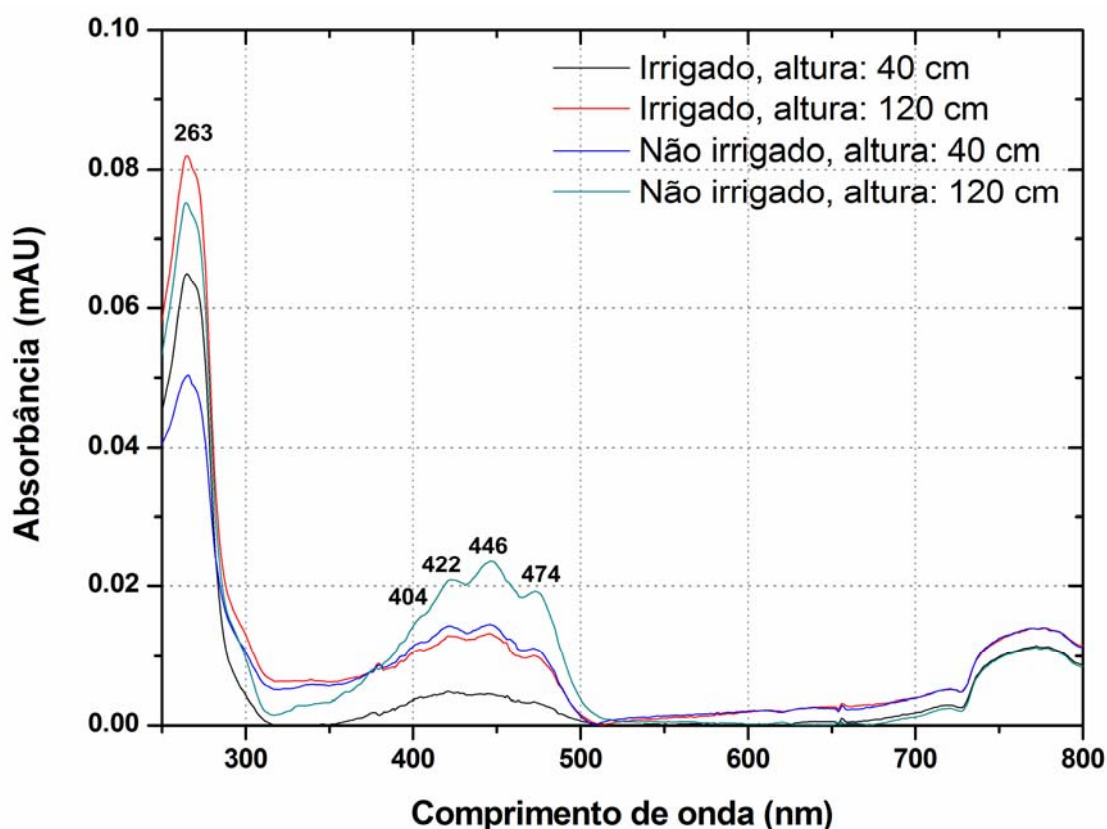
Supõe-se que os espectros dos extratos referentes aos picos cromatográficos em torno de 3,94 minutos são da molécula de cafeína, Figura 27.<sup>76,77</sup> Os espectros concordam com a separação obtida pelo segundo fator que difere os extratos: irrigado de altura superior e não irrigado de altura inferior dos extratos irrigado de altura inferior e não irrigado de altura superior.

**Figura 27** – Espectros DAD dos extratos obtidos com hexano como solvente para o tempo de retenção de 3,94 minutos.



Em 8,72 minutos os espectros DAD, Figura 28, novamente apresentam perfil semelhante a carotenoides, entretanto com características polares (xantofilas). As xantofilas apresentam estrutura molecular semelhante a carotenos, mas contêm átomos de oxigênio, enquanto carotenos são puramente hidrocarbonetos sem oxigênio.<sup>75</sup> Quando comparados entre alturas, os extratos de 120 cm apresentam maiores absorbâncias. Em ambos os casos os irrigados quando comparados aos respectivos não irrigados, apresentam menor intensidade de sinal.

**Figura 28** – Espectros DAD dos extratos obtidos com hexano como solvente para o tempo de retenção de 8,72 minutos.

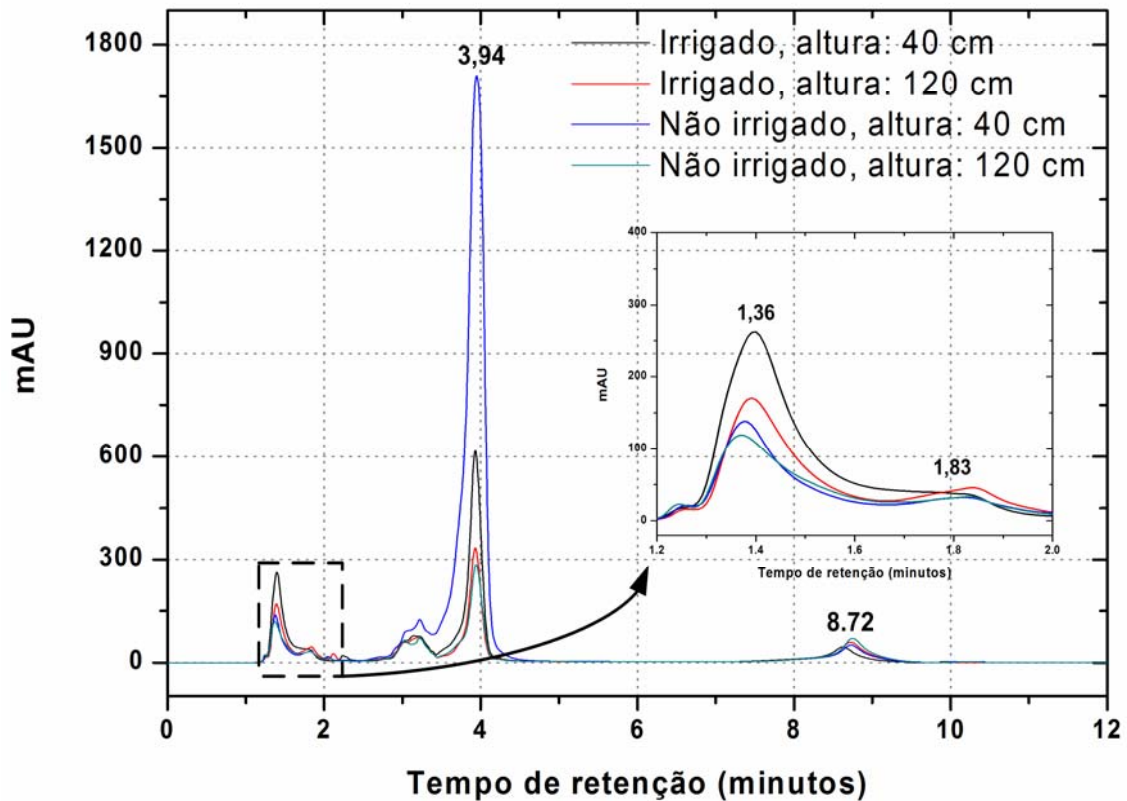


Determinadas xantofilas, contendo o grupamento epóxido, são responsáveis por dissipar o excesso de radiação absorvida pelo mecanismo de extinção não-fotoquímica, regulando e protegendo a fotossíntese em ambientes onde a absorção de energia da luz é superior a capacidade de utilização. Este mecanismo envolve a extinção de clorofilas no estado excitado de singleto através da conversão interna para o estado fundamental (decaimento não radioativo), dissipando inofensivamente o excesso de energia na forma de calor por meio de vibrações moleculares.<sup>78</sup>

Com solvente diclorometano, observou-se que no Fator 2 os extratos de 40 cm de altura estão localizados em valores mais positivos. Isto se deve pelos mesmos conterem maiores intensidades de sinal no tempo de retenção em torno de 3.94 minutos e menos compostos extraídos em 8,72 minutos, quando comparados com os cromatogramas das amostras de 120 cm de altura, Figura 29. Pelo terceiro fator houve uma tendência das amostras irrigadas estarem em valores mais positivos do que as não irrigadas. Novamente observa-se na região entre 1,25 a

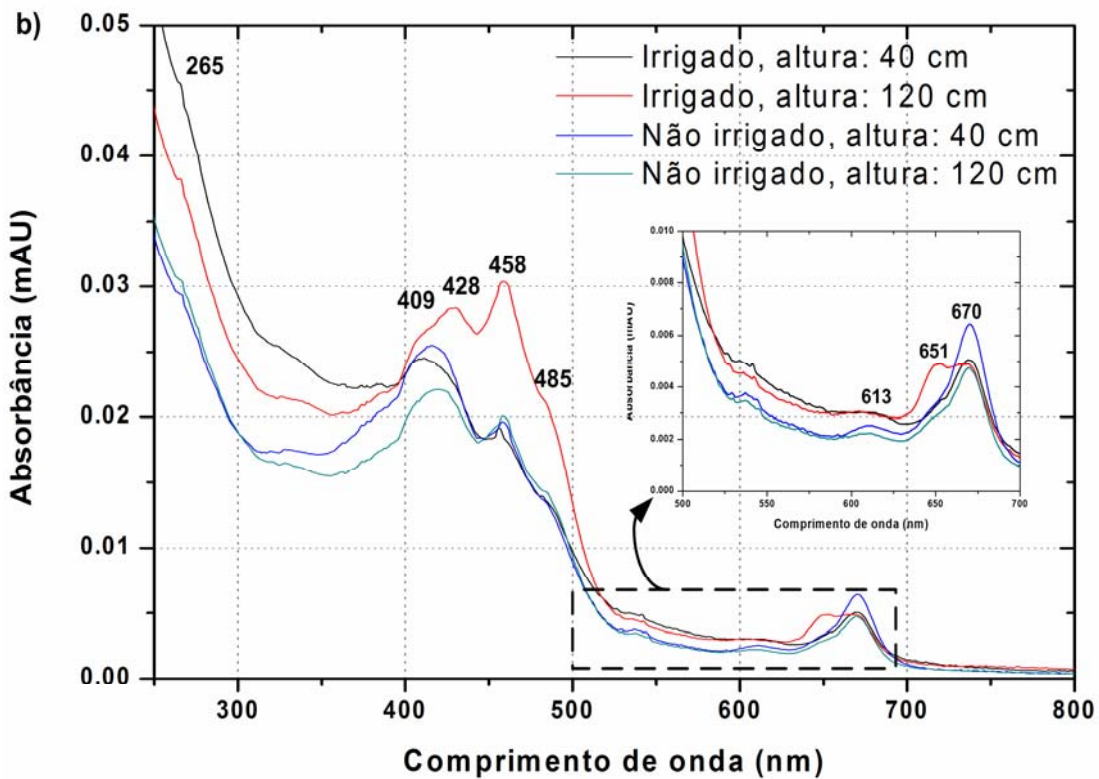
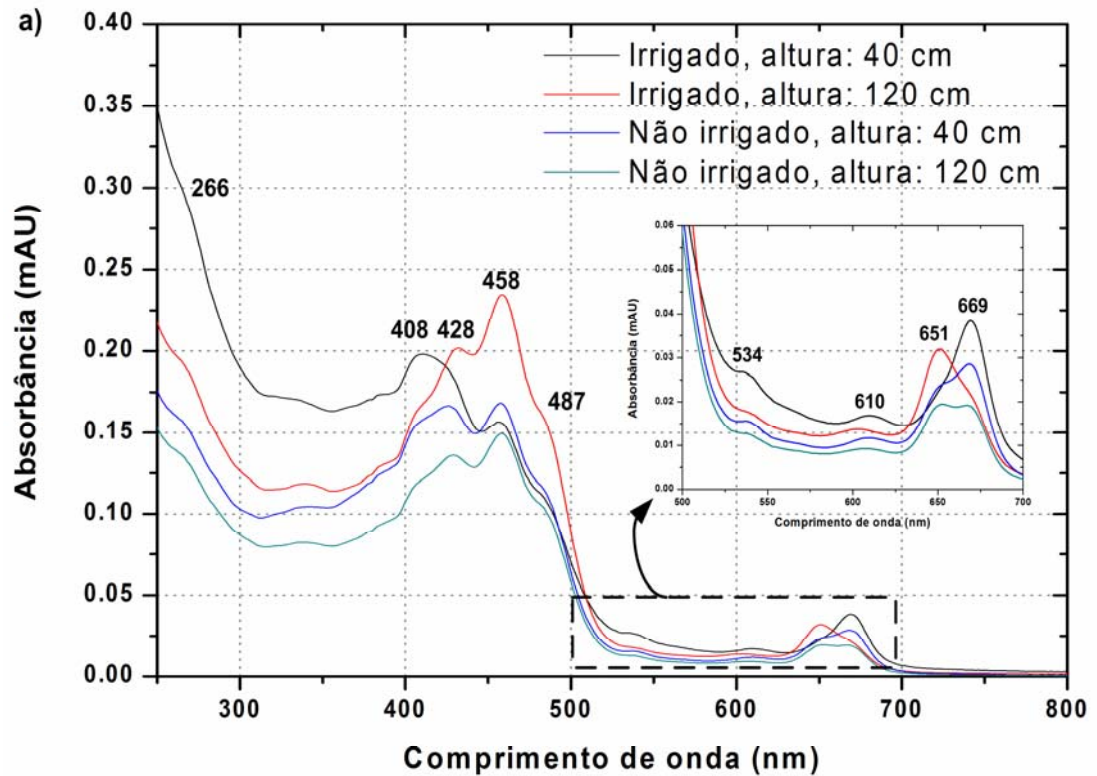
2,00 minutos nos cromatogramas que os extratos irrigados contêm maiores intensidades de sinais do que os extratos não irrigados.

**Figura 29** – Cromatogramas dos extratos obtidos com diclorometano como solvente, com destaque e ampliação da faixa de 1,25-2,00 minutos.



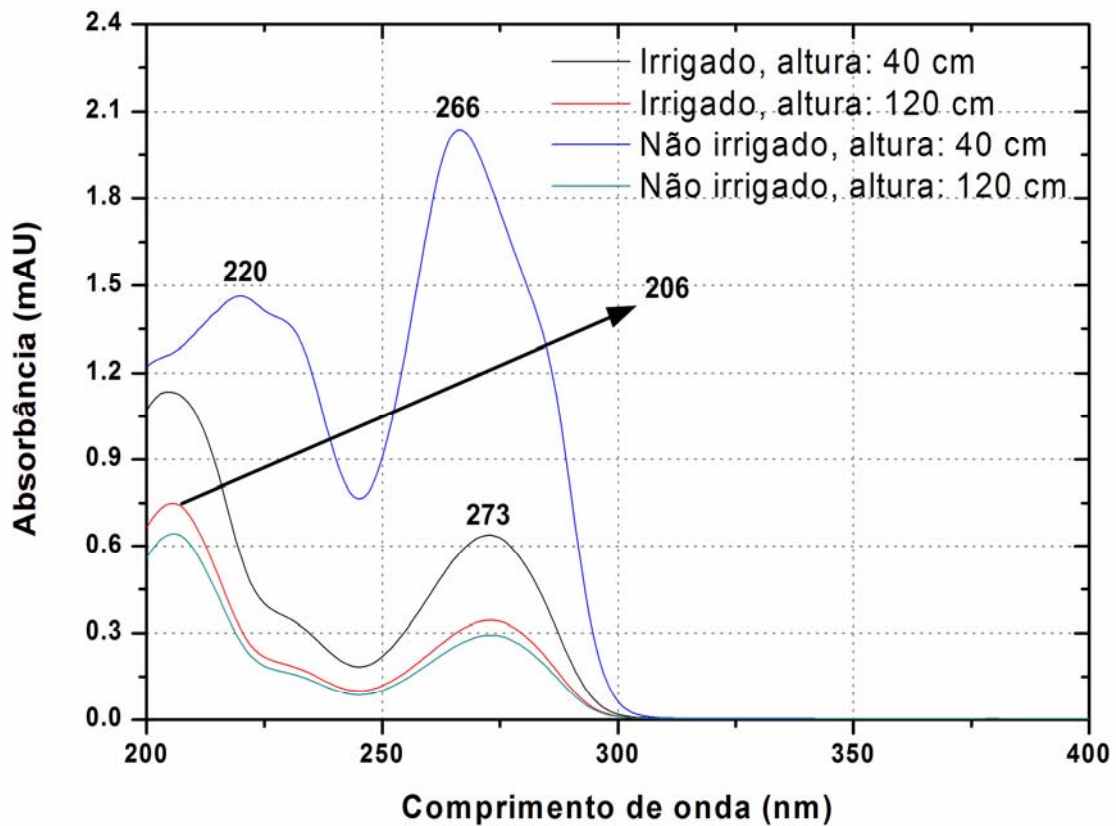
Pigmentos como clorofilas, carotenoides e derivados são estimados neste intervalo, no entanto seus espectros DAD estão sobrepostos, dificultando a classificação, Figura 30. As clorofilas e seus epímeros têm duas bandas de absorção características na região do visível por suas deslocalizações eletrônicas do tipo  $\pi$  nas extremidades do esqueleto dos anéis tetrapirrólicos: uma “azul” (450-495 nm) e outra vermelha (620-750 nm). Nos espectros DAD, estas bandas podem estar localizadas em 428 e 669 nm para a clorofila *a*, e para a clorofila *b* localizam-se em 458 e 651 nm. Semelhantes às clorofilas, os derivados de “metalizados” (que contém o íon magnésio) apresentam bandas no UV-Vis com comprimentos de onda similares nas mesmas regiões, pois mantêm o esqueleto porfirínico inalterado.<sup>69</sup>

**Figura 30** – Espectros DAD dos extratos obtidos com diclorometano como solvente para os tempos de retenção de a) 1,36 minutos e b) 1,82 minutos.



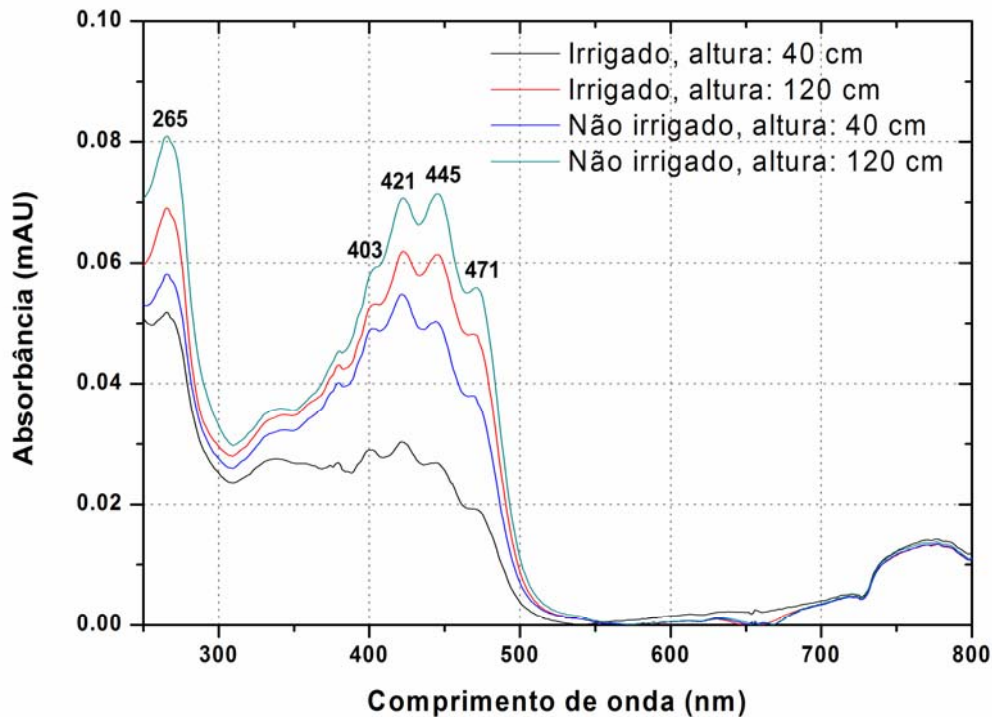
Para os extratos obtidos com diclorometano como solvente, a maioria dos espectros DAD em 3,94 minutos contém o mesmo perfil que os dos extratos anteriores no mesmo tempo de retenção. Entretanto, para a amostra não irrigada inferior (40 cm) visualizou-se bandas espectroscópicas bem distintas, Figura 31. Conforme literatura, as bandas espectroscópicas em 220 e 266 nm podem referir à xantina em sua forma neutra.<sup>76,77</sup>

**Figura 31** – Espectros DAD dos extratos obtidos com diclorometano como solvente para o tempo de retenção de 3,94 minutos.



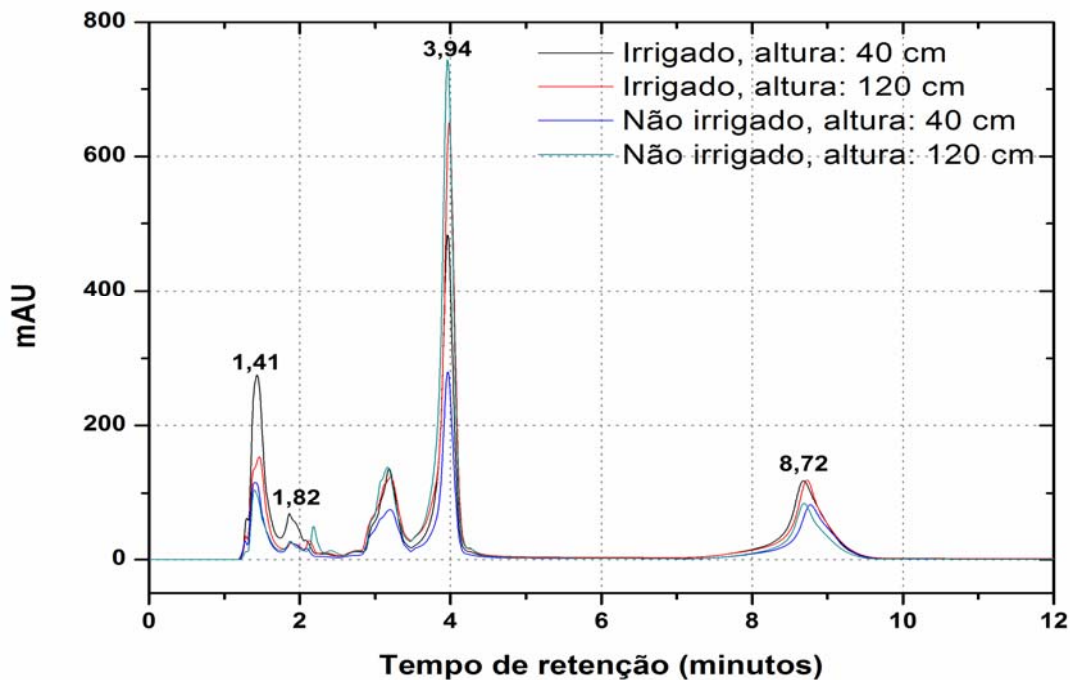
No tempo de retenção de 8,72 minutos, os espectros DAD apresentaram novamente perfis semelhantes a xantofilas, Figura 32. Os extratos de altura superior (120 cm) apresentaram maior intensidade de absorbância quando comparados aos de altura inferior (40 cm). Ao comparar o estresse hídrico, os extratos não irrigados apresentaram maiores absorbância quando comparadas aos seus respectivos irrigados.

**Figura 32** – Espectros DAD dos extratos obtidos com diclorometano como solvente para o tempo de retenção de 8,72 minutos.



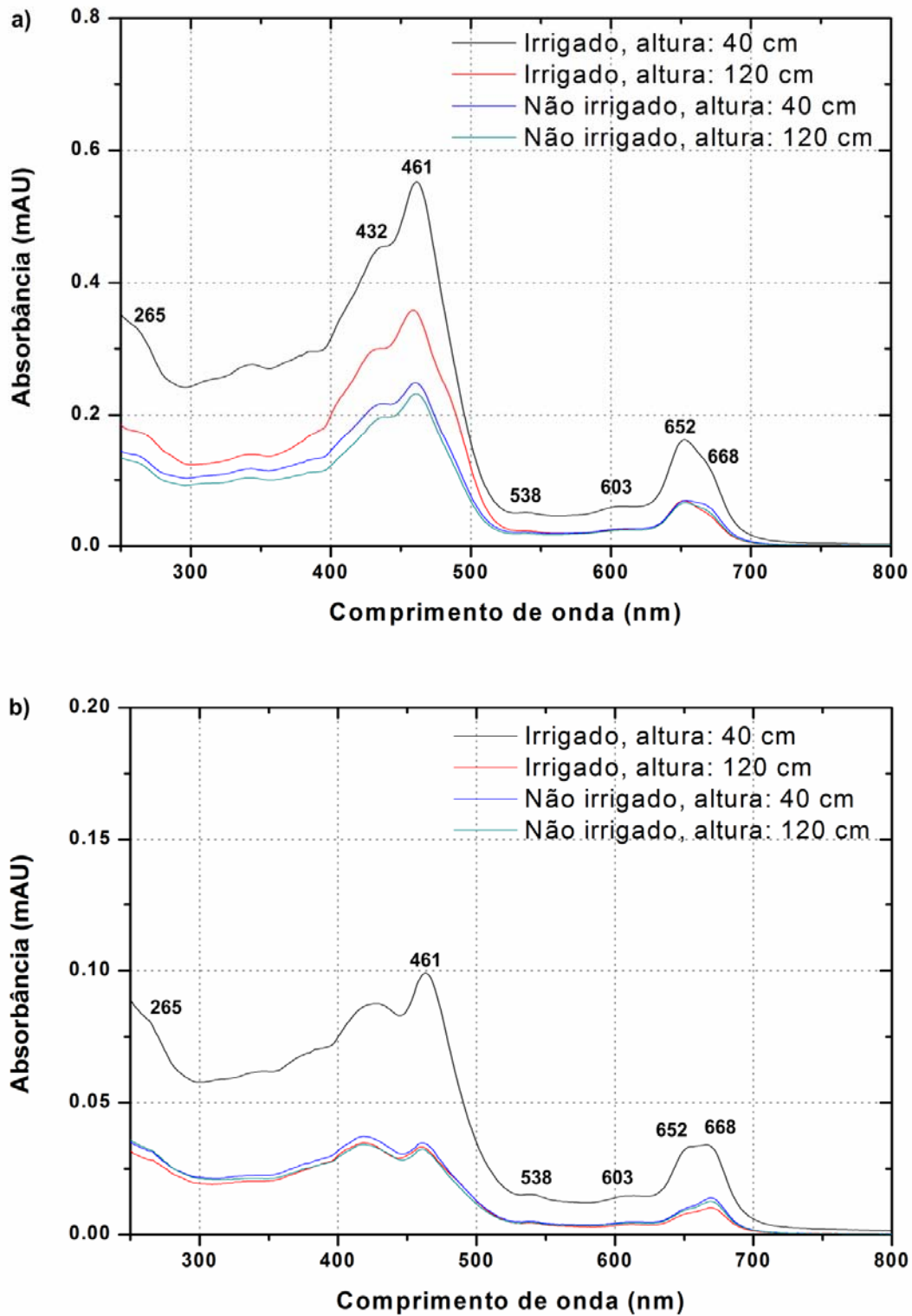
Para a mistura etanol:diclorometano:hexano (edH,  $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) houve separação entre altura dos extratos, pelo fator 2. Os extratos com 120 cm de altura estão localizados em mais positivos, enquanto que os de 40 cm de altura estão localizados em menos positivos. Neste caso a intensidade do pico cromatográfico em 3,94 minutos são maiores para as amostras de 120 cm, Figura 33. A informação do Fator 3 é confirmada pela presença de maiores absorbâncias nos espectros DAD para os tempos de retenção de 1,25-2,00 minutos e em 8,72 minutos nos extratos irrigados, comparados aos não irrigados, que estão relacionados a pigmentos.

**Figura 33** – Cromatogramas dos extratos obtidos com etanol:diclorometano:hexano (edH,  $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) como solvente.



Com a adição de etanol a extração de clorofilas e derivados foi maior, como mostrado na Figura 34a, possibilitando visualizar claramente um perfil diferente dos apresentados anteriormente, em 1.41 minutos. Novamente houve diferença na extração de compostos entre amostras irrigadas e não irrigadas, tendo maiores valores de absorbância para extratos irrigados. Quando comparado entre alturas, as alturas inferiores (40 cm) apresentaram maiores valores de absorbância que as alturas superiores (120 cm). Em 1.82 minutos, Figura 34b, os espectros apresentam-se sobrepostos, entretanto apresentam bandas que possivelmente sejam de epímeros de clorofilas e clorofilidas. Comparado ao anterior, na região de 8.72 minutos, houve uma inversão: os extratos irrigados apresentaram maiores sinais cromatográficos que os extratos não irrigados.

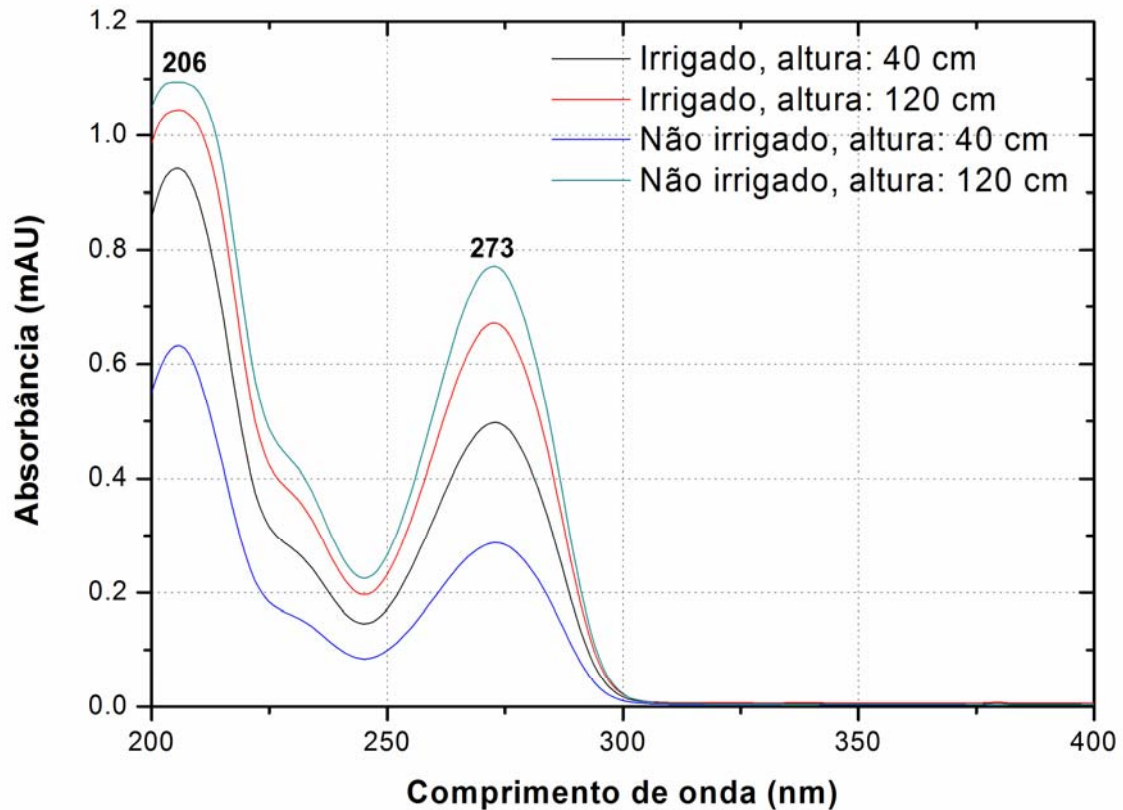
**Figura 34** – Espectros DAD dos extratos obtidos com mistura etanol:diclorometano:hexano (edH,  $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) como solvente para os tempos de retenção de a) 1.41 minutos e b) 1.82 minutos.



Contrariando as observações realizadas nos extratos obtidos com diclorometano e hexano como solvente, e corroborando com o segundo fator, os

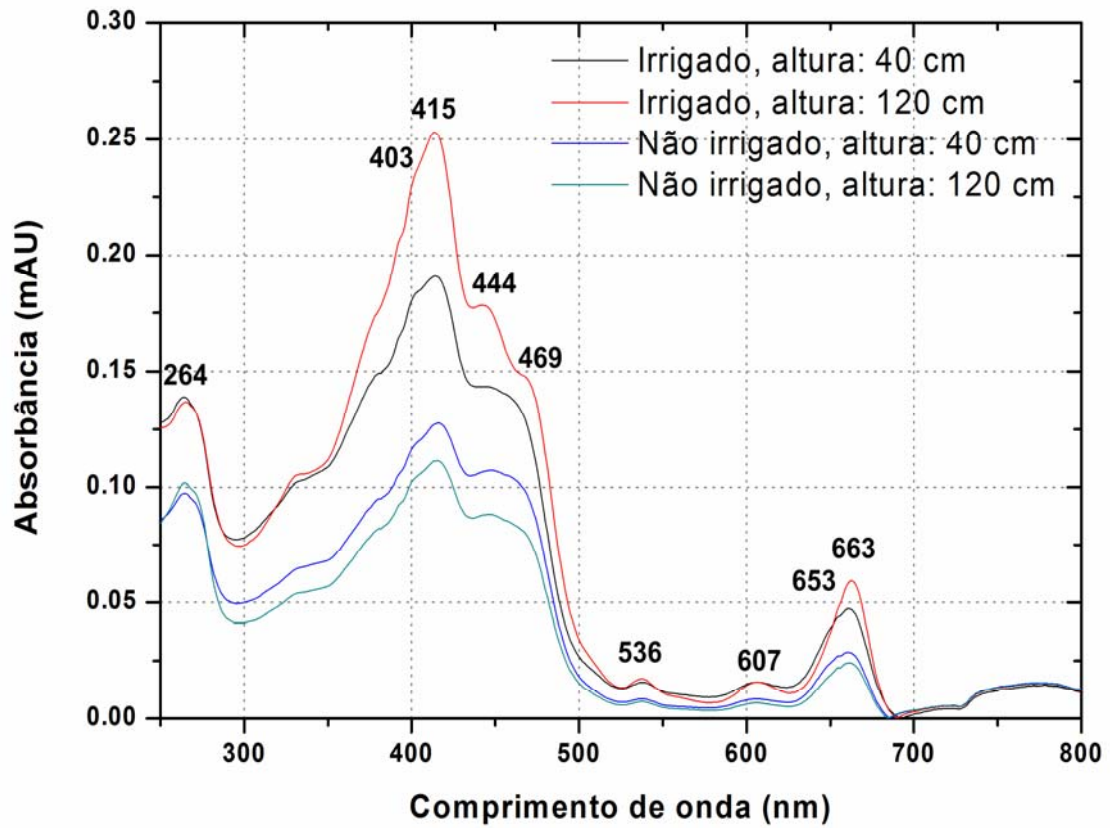
espectros DAD das amostras com mistura etanol:diclorometano:hexano (edH,  $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) como solvente no tempo de retenção de 3,94 minutos, Figura 35, também mostra perfil característico da molécula de caféina.

**Figura 35** – Representação gráfica espectrais dos extratos obtidos com etanol:diclorometano:hexano (edH,  $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) como solvente para o tempo de retenção de 3,94 minutos.



Os espectros DAD em 8,72 minutos, Figura 36, corroboram com as informações cromatográficas no sentido que os extratos irrigados apresentam maiores absorbâncias. Admite-se que os sinais espectroscópicos refiram-se a feofitinas, uma vez que são menos polares do que xantofilas e as suas respectivas clorofilas.<sup>79</sup>

**Figura 36** – Espectros DAD dos extratos obtidos com etanol:diclorometano:hexano (edH,  $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) como solvente para o tempo de retenção de 8,72 minutos.





# **CAPÍTULO V**

# **CONCLUSÃO**

## 5 CONCLUSÃO

Pela análise exploratória dos espectros em UV-Vis foi possível identificar perfis na região do visível, entre 370-750 nm, semelhantes a absorbância a pigmentos.

Os extratos obtidos em hexano, etanol e mistura binária etanol:diclorometano como solventes apresentaram discrepâncias dentre os espectros em UV-Vis em relação aos demais extratos, demonstrando diferenciações na extração de compostos.

Ao realizar o estudo exploratório nos espectros em UV-Vis apenas nas amostras irrigadas e não irrigadas, e na ausência dos extratos supracitados, permitiu-se identificar um perfil discriminatório relacionado a compostos metilxantínicos e a pigmentos.

Dos espectros em IV, pela análise de componentes principais, verificou-se diferenças entre extratos de plantas matrizes e não irrigadas, justificando-se por perfis vibracionais em determinados comprimentos de onda possivelmente de compostos metilxantínicos, fenólicos, pigmentos e derivados.

Nos espectros em infravermelho para extratos irrigados e não irrigados observou-se discreta separação influenciada principalmente pelas regiões de:  $738,63-746,35\text{ cm}^{-1}$ ,  $1646,98-1672,05\text{ cm}^{-1}$ ,  $167,98-1697,12\text{ cm}^{-1}$  e  $1699,05-1716,41\text{ cm}^{-1}$ .

O estudo exploratório dos espectros em infravermelho permitiu discriminar os extratos hexânicos das demais amostras devido a baixíssima extração de clorofila e derivados, viabilizando a caracterização de carotenóides por suas bandas espectrais. Observou-se também que clorofilas e derivados são altamente influenciados pelo solvente extrator.

A fase móvel unida à coluna cromatográfica selecionada demonstraram eficiência na separação de vários compostos presentes nos extratos permitindo maiores informações sobre o comportamento vegetal em relação ao déficit hídrico e sua arquitetura.

Existem evidências, na região com tempo de retenção entre 1,25-2,00 minutos, de que as amostras irrigadas nos extratos selecionados apresentam maiores concentrações de pigmentos.

Os espectros DAD no tempo de retenção em 8,72 minutos nas

amostras obtidas com hexano e diclorometano como solventes, demonstrando que os extratos não irrigados e alturas superiores possuem maiores absorvências quando comparado a seus respectivos pares. O constatado não é evidenciado para os extratos obtidos com a mistura etanol:diclorometano:hexano (edH,  $\frac{1}{6}:\frac{1}{6}:\frac{2}{3}$ , v/v/v) como solvente pois o perfil espectral novamente se assemelha a compostos com esqueleto porfirínico.

No tempo de retenção de 3,94 minutos, os espectros DAD para a maioria dos extratos, com exceção da amostra não irrigada com 40 cm de altura, demonstraram perfis semelhantes a molécula de cafeína. Lamentavelmente não foi possível inferir algum comportamento em relação às variáveis especuladas (estresse hídrico e arquitetura vegetal) pois os resultados de absorvência divergiram entre os solventes selecionados.



# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

1. SCARMINIO, I. S.; MOREIRA, I.; Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. **Talanta**, v.107, p. 416-422, 2013.
2. SCARMINIO, I. S.; MOREIRA, I.; HATUMURA, P. H.; SCHEEL, G. L.; Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arábica*. **Química Nova**, v. 37, p. 39-43, 2014.
3. NOGUEIRA, A. M.; CARVALHO, S. P.; BARTHOLO, G. F.; MENDES, A. N. G.; Avaliação da produtividade e vigor vegetativo de linhagens das cultivares Catuaí Vermelho e Catuaí Amarelo (*Coffea Arabica L.*) plantadas individualmente e em diferentes combinações. **Ciências e Agrotecnologia**, v.29, p. 27-33, 2005.
4. BOTELHO, C.E.; REZENDE, J.C.; CARVALHO, G. R.; CARVALHO, A. M. de; ANDRADE, V. T.; BARBOSA, C. R.; Adaptabilidade e estabilidade fenotípica de cultivares de café arábica em Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.45, p. 1404-1411, 2010.
5. CARVALHO, A.M. de; PEREIRA, A.A.; CARVALHO, G.R.; MENDES, A.N.G.; BOTELHO, C.E.; Avaliação de progênies de cafeeiros obtidas do cruzamento entre 'Catuaí' e 'Híbrido de Timor'. **Scientia Agraria**, v.9, p.249-253, 2008.
6. CAMARGO, Â. P. de; CAMARGO, M. B. P.; Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, v. 60, p. 65 -68 2001.
7. CRISOSTO, C. H.; GRANTZ, D. A.; MEINZER, F. C.; Effects of water déficit on flower opening in coffee (*Coffea Arábica L.*). **Tree Physiology**, v.10, p. 127-139, 1992.
8. CUSTÓDIO, A. A. de P.; REZENDE, F. C.; FARIA, M. A.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, R. J.; SCALCO, M. S.; Florescimento da lavoura cafeeira sob diferentes manejos de irrigação. **Coffe Science**, v. 7, p. 20-30, 2012.
9. DAMATTA, F. M.; RAMALHO, J. D. C.; Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, p. 55–81, 2006.

10. DAMATTA, F. M.; RONCHI, C. P.; MAESTRI, M.; BARROS, R. S.;  
Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.19, p. 485-510, 2007.
11. NUNES, M. A.; Significance of plant water deficits to growth and yield: a review. **Journal of Coffee Research**, v.6, p.4-21, 1976.
12. MAESTRI, M.; BARROS, R. S.; Coffe. In: Alvin, P. T.; KOZLOWSKI, F. (Ed.)  
Ecophysiology of Tropical Crops. New York: Academic Press, p. 249-278, 1977.
13. BARROS, R. S.; MAESTRI, M.; Floração do café – uma revisão. **Revista Ceres**, v.25, p. 467-479, 1978.
14. KUMAR, D.; Some aspects of the physiology of Coffe arábica L.: a review. **Kenia Coffe**, v.44, p. 9 – 47, 1979.
15. ALVIM, P. de T.; Coffe. In: HAVELY, A. B. (Ed.). Handbook of flowering. Boca Raton, Florida: CRC, v.2, p.247, 1985.
16. RENA, A. B.; MAESTRI, M.; Fisiologia do cafeeiro. **Informe Agropecuário**, v.11, p. 26-40, 1985.
17. RENA, A. B.; BARROS, R. S.; MAESTRI, M. et al.; Coffee. In: SCHAFTER, B.; ANDERSON, P. C. (Ed.). Handbook of environmental physiology of fruits crops: subtropical and tropical crops. Boca Raton, Florida: CRC, v.2, p. 101-113, 1994.
18. BARROS, R. S.; MAESTRI, M.; RENA, A. B.; **Tropical Ecology**, v.36, p. 1-19, 1995.
19. SANTINATO, R.; FERNANDES, A. L. T.; FERNANDES, D. R.; Irrigação na cultura do café. **Arbore**, p.146, 1997.
20. RENA, A.B.; MAESTRI, M. Relações hídricas no cafeeiro. In: ITEM: Irrigação & tecnologia moderna. Brasília: ABID, 2000. p. 34-41.
21. CARR, M. K. V.; The water relations and irrigation requirements of coffee. **Experimental Agriculture**, v.37, p. 1-36, 2001.
22. DELAROZA, F.; RAKOCEVIC, M.; MALTA, G. B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; Spectroscopic and Chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arábica* leaves subject to diferente light

- conditions and plant phenophases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, p. 1-10, 2014.
23. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 1090, 2004.
24. GOBBO, L. N.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
25. ROSEMEYER, H. The chemodiversity of purine as a constituent of natural products. **Chemistry & Biodiversity**, v.1, n.3, p. 361-401, 2004.
26. ASHIHARA, H.; SANO, H.; CROZIER, A. Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. **Phytochemistry**. v.69, p. 841-856, 2008.
27. FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.23-36, 2006.
28. SCHOEFS, B. Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, p. 361-371, 2002.
29. CARTER, G. A.; KNAPP, A. K. Leaf optical properties in higher plants linking spectral characteristics to stress and chlorophyll concentration. **American Journal of Botany**, v.88, n.4, p.677-684, 2001.
30. ESSLINGER, S.; RIEDL, J.; FAUHL – HASSEK, C. Potential and limitations of non-targeted fingerprinting for authentication of food in official control. **Food Research International**, v.60, p.189-20, 2014.
31. REN, Y.; ZHANG, P.; YAN, D.; WANG, J.; DU, X.; XIAO, X. A strategy for the detection of quality fluctuation of Chinese herbal injection on chemical fingerprinting combined with biological fingerprinting. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.56, n.2, p.346-442, 2011.
32. LONGOBARDI, F.; VENTRELLA, A.; BIANCO, A.; CATUCCI, L.; CAFAGNA, I.; GALLO, V.; MASTRORILLI, P.; AGOSTIANO, A. Non-targeted <sup>1</sup>H NMR fingerprinting and multivariate statistical analyses for the characterisation of the geographical origin of Italian sweet cherries. **Food Chemistry**, v. 141, n.3, p.3028-3033, 2013.

33. ROSSI, D.; GUERRINI, A.; MAIETTI, S.; BRUNI, R.; PAGANETTO, G.; POLI, F.; SCALVENZI, L.; RADICE, M. SARO, K. SACCHETTI, G. Chemical fingerprinting and bioactivity of Amazonian Ecuador *Croton lechleri* Müll. Arg. (Euphorbiaceae) stem bark essential oil: A new functional food ingredient? **Food Chemistry**, v.126, n.3, p. 837-848, 2011.
34. OLIVEIRA, D. N.; CHATARINO, R. R. Direct metabolic fingerprinting of olive oils using STELDI-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.38, p.131-134, 2015.
35. GRAUWET, T.; VERVOOT, L.; COLLE, I.; VAN LOEY, A.; HENDRICKX, M. From fingerprinting to kinetics in evaluating food quality changes. **Trends in Biotechnology**, v. 32, n.3, p.125-131, 2014.
36. ELLIS, D. I., DUNN, W. B., Metabolic: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v.24, p. 285-291, 2005.
37. GIOVANNETTI, R. The use of spectrophotometry UV – Vis for the study of porphyrins. In: Jamal, U. *Macro to nano spectroscopy*. InTech, p. 87-108, 2012.
38. VALLADÃO, F. N.; MIRANDA, R.R.S; VALE, F. A.; VALLADÃO, S. A.; SILVA, G. D. F.; DUARTE, L. P.; OKANO – CARVALHO, R. M.; MESSIAS, M. C. T. B.; FILHO, S. A. V Four brazilian *Maytenis salicifolia* Reissek (Celastraceae) groups studied by TLc and UV/VIS spectrophotometry. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.19, n.3, p.733-739, 2009.
39. WOLFENDER, J. L. HPLC in Natural Product Analysis: The Detection Issue. **Planta Medica**, v.75, n. 7, p 719-734, 2008.
40. MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. **Química Nova**, v. 21, n. 4, p.467-469, 1998.
41. SENA, M.M.; POPPI, R.J.; FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI. P.J. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 547-556, 2000.
42. CAMPA, C.; MONDOLOT, L.; RAKOTONDRAVAO, A.; BIDEL, L. P. R.; GARGADENNEC, A.; COUTURON, E.; FISCA, P. L.; RAKOTOMALALA, J. J.; ALLEMAND, C. J.; DAVIS, A. P.; A survey of mangiferin and hidroxycinnamic acid ester accumulation on coffee (*Coffea*) leaves: biological implications and uses. **Annals of Botany**, v. 110, p. 595-613, 2012.

43. CHAVES, J. C. D.; MIYAZAWA, M.; BLOCH, M. F.; YAMAKAMI, J. K.; Estimativa do teor de cafeína nas sementes de café baseada na sua concentração nas folhas de mudas e de plantas adultas. **Acta Scientiarum**, v. 26, p. 287-292, 2004.
44. MONDOLOT, L.; LA FISCA, P.; BUATIOIS, B.; TALANSIER, E.; DE KOCHKO, A.; CAMPA, C. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. **Annals of Botany**, v. 98, p. 33-40, 2006.
45. LONNI, A. A. S. G.; LONGHINI, R.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P.; SCARMINIO, I. S.; Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. **Analytica Chimica Acta**, v.719, p. 57-60, 2012.
46. GARCIA, L. M. Z.; PAULI, E. D.; CÂMARA, C. A. P.; SCARMINIO, I. S.; NIXDORF, S. L.; Chemometric Evaluation of Adulteration Profile in Coffee due to Corn and Husk by Determining Carbohydrates using HPAEC – PAD. **Journal of Chromatographic Science**, v.47, p.825-832, 2009.
47. DELAROZA, F.; SCARMINIO, I. S.; Mixture design optimization of extraction and mobile phase media for fingerprint analysis of *Bauhinia variegata L.* **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 6 – 7, p. 1034-1041, 2008.
48. BRERETON, R. G. The evolution of chemometrics. **Analytical Methods**, v. 5, p. 3785-3789, 2013.
49. NETO, B.B.; SCARMÍNIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de Quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.
50. HORKE, P. K. The evolution of chemometrics. **Analytical Chimica Acta**, v. 500, p. 365-377, 2013.
51. NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. 4 ed. Bookman, Porto Alegre, p. 315-346, 2010.
52. SCHEFFE, H. The Simplex-Centroid Design for Experiments with Mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v.25, n.2, p.235-263, 1963.
53. CALADO, V.; MONTGOMERY, D. Planejamento de Experimentos usando o Statistica. 1 ed. E-papers, Rio de Janeiro, p.159-164, 2003.

54. BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. Chemometrics: a practical guide. John Wiley & Sons Ltd. Nova Iorque, p. 26, 1998.
55. SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de Quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 223-229, 2012.
56. HENDRICKS, M.M.W.B. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, n.1, p. 53-54, 2005.
57. CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 481-487, 2007.
58. LYRA, W. S.; DA SILVA, E. C.; DE ARAÚJO, M. C. U.; FRAGOSO, W. D.; VERAS, G. Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1594-1597, 2010.
59. KUMAR, N.; BANSAL, A.; SARMA, G. S.; RAWAL, R. K. Chemometrics tools in analytical chemistry: an overview. **Talanta**, v.123, p. 186-199, 2014.
60. HENDRIKS, M. M. W. B.; EEUWIJK, F. A.; JELLEMA, R. H.; WESTERHUIS, J. A.; REIJMERS, T. H.; HOEFSLOOT, H. C. J.; SMILDE, A. K. Data – processing strategies for metabolomics studies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 1685-1698, 2011.
61. RISVIK, H. Principal component Analysis (PCA) & NIPALS algorithm. p. 1-6, 2007. Disponível em: < [http://folk.uio.no/henninri/pca\\_module/pca\\_nipals.pdf](http://folk.uio.no/henninri/pca_module/pca_nipals.pdf) >.
62. ABDUL-WAHAB, SABAH A.; BAKHEIT, CHARLES S.; AL-ALAWI, SALEH M. Principal component and multiple regression analysis in modelling of ground-level ozone and factors affecting its concentrations. **Environmental Modelling & Software**, v. 20, n.10, p. 1263-1271, 2005.
63. REYMENT, R.; JÖRESKOG, K. G. Applied factor analysis in the natural Science. 2 ed. Editora Universidade de Cambridge, Cambridge, p. 71 – 88, 1996.

64. SEIDEL, E. J.; JÚNIOR, F. J. M.; ANAUJI, H. P.; NOAL, M. R. C. Comparação entre o método Ward e o método K – médias no agrupamento de produtores de leite. **Ciência e Natura**, v.30, n.1, p.7-15, 2008.
65. PIELOU, E. C. The interpretation of ecological data: a primer on classification and ordination. John Wiley & Sons Inc., Nova Iorque, p. 13 – 72, 1984.
66. SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. Introduction of the Modern Liquid Chromatography. 3. ed. John Wiley & Sons, Inc., p. 883, 2010.
67. MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3 ed. Fortaleza: UFC, p.28, 2009.
68. PALAMAREVA, M. D.; PALAMAREV, H. E. Microcomputer-aided characterization of mobile phases for normal-phase liquid-solid chromatography based on Snyder's theory and data. **Journal of Chromatography**, v. 477, n.2, p. 235 – 248, 1989.
69. MILENKOVIC, S.M.; ZVEZDANOVIC, J. B.; ANDELKOVIC, T. D.; MARKOVIC, D. Z. The Identification of Chlorophyll and Its Derivates in Pigment Mixtures: HPLC-Chromatography, Visible and Mass Spectroscopy Studies. **Advanced Technologies**, v.1, n.1, p.16-24, 2012.
70. SOLOVCHENKO, A. E.; MERZLYAK, M. N.; Screening of visible and UV radiation as a photoprotective mechanism in plants. **Russian Journal of Plants Physiology**, v. 55, n. 66, p. 719 – 737, 2008.
71. PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. Introduction to spectroscopy. 4ª edição, Brooks/Cole CENGAGE Learning, Belmont, p.31-86, 2009.
72. SCHWARTZ, S. J.; LORENZO T. V. Chlorophylls in Foods. **Food Science and Nutrition**, v.29, n.1, p. 1 – 17, 1990.
73. MARSHELL, J. Fourier transform infrared spectra of freshly isolated  $\beta$  – carotene. **Asian Journal of Chemistry**, v. 10, n.1, p. 29 – 34, 1998.
74. LANFER-MARQUEZ, U. M. O papel da clorofila na alimentação humana: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.3, p. 227-242, 2003.

75. CUTTRISS, A.; POGSON, B. Carotenoids. In: DAVIES, K. M. Plant Pigments and their Manipulation. Blackwell Publishing, 1 ed., Nova Zelândia, p. 57-65, 2004.
76. YAMAGUCHI, K. Spectral Data of Natural Products. Elsevier Publishing Company, p. 725, 1970.
77. PFLEIDERER, W.; NÜBEL, G. Purine II, Zur Struktur des Xanthines und seiner N-Methyl-Derivate. **Justus Liebigs Annalen der Chemie**, v.647, n.1, p.155-160, 1961.
78. MÜLLER, P.; LI, X.; NIYOGI, K. K. Update on Photosynthesis: Non-Photochemical Quenching, a Response to Excessive Light Energy. **Plant Physiology**, v.125, n.4, p. 1558-1566, 2001.
79. MANGOS, T. J.; BERGER, R. J. Determination of Major Chlorophyll Degradation Products. **European Food Research and Technology**, v.204, n.5, p.345-350, 1997.