



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GUSTAVO GALO MARCHEAFAVE

**METABOLÔMICA EM FOLHAS DE *Coffea arabica* SOB
ESTRESSE HÍDRICO POR IMPRESSÃO DIGITAL
ESPECTROSCÓPICA E CROMATOGRÁFICA**

Londrina
2017

GUSTAVO GALO MARCHEAFAVE

**METABOLÔMICA EM FOLHAS DE *Coffea arabica* SOB
ESTRESSE HÍDRICO POR IMPRESSÃO DIGITAL
ESPECTROSCÓPICA E CROMATOGRÁFICA**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2017

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

Marcheafave, Gustavo Galo.

Metabolômica em folhas de *Coffea arabica* sob estresse hídrico por impressão digital espectroscópica e cromatográfica / Gustavo Galo Marcheafave. - Londrina, 2017.
71 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2017.
Inclui bibliografia.

1. Cafeeiro - Tese. 2. Estresse abiótico - Tese. 3. Metaboloma - Tese. 4. Quimiometria - Tese. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

GUSTAVO GALO MARCHEAFAVE

**METABOLÔMICA EM FOLHAS DE *Coffea arabica* SOB ESTRESSE
HÍDRICO POR IMPRESSÃO DIGITAL ESPECTROSCÓPICA E
CROMATOGRÁFICA**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Mestrado em Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Elen J. R. Sartori Braz
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Audrey A. Stinghen Garcia Lonni
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de Janeiro de 2017.

Dedico este trabalho aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a amizade, comprometimento, conhecimento, discussões e a oportunidade de poder ser orientado pela Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio, a qual sou grande admirador.

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

Agradeço ao Consórcio Brasileiro de Desenvolvimento do Café, Fundação Araucária e CNPq pelos recursos e bolsas de pesquisas que favoreceram a execução deste trabalho.

Agradeço a Dra. Amelia Elena Terrile e Dra. Sabrina Afonso pelos conhecimentos, disciplina e exemplos no começo de minha caminhada.

Em especial aos meus amigos de coração que estiveram presentes ao meu lado incentivando, apoiando, criticando e vivenciando o meu dia-a-dia.

Sem sombra de dúvida agradeço aos meus pais. Guerreiros, companheiros, pessoas que foram responsáveis por grande parte das oportunidades para que até aqui eu estivesse.

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

Agradeço também as Professoras Doutoras Elen J. R. Sartori Braz e Audrey A. Stingham Garcia Lonni por aceitarem contribuir com a discussão do trabalho na defesa de dissertação.

“Os alquimistas fazem isso. Mostram que, quando buscamos ser melhores do que somos, tudo em volta se torna melhor também.”
O alquimista. Paulo Coelho.

MARCHEAFAVE, Gustavo Galo. **Metabolômica em folhas de *Coffea arabica* sob estresse hídrico por impressão digital espectroscópica e cromatográfica.** 2017. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Extratos de folhas de *Coffea arabica* L., cv. Iapar 59 cultivados com irrigação e sem irrigação obtidos por planejamento de misturas foram submetidos à análise metabolômica multicomponente. A impressão digital dos extratos foi obtida por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H e cromatografia líquida de alta eficiência com discriminação dos extratos por métodos quimiométricos. Análise de fatores dos espectros dos extratos mostrou clara discriminação entre as amostras. A principal discriminação entre os extratos foi devido as abundâncias relativas de pigmentos e lipídios que estão anticorrelacionados no conjunto de amostras analisadas. Para discriminação entre cafeeiros por RMN ^1H o gráfico dos loadings mostrou que lactato, arginina e metionina foram os metabólitos de maior peso na discriminação dos extratos das folhas da planta não irrigada. Estes metabólitos são recorrentes de processos fermentativos, deficiência nutricional e precursor de senescência da planta, respectivamente. Na análise de fatores dos extratos pelo processo de separação somente os extratos provenientes do extrator diclorometano/hexano não discriminam a planta em virtude do estresse abiótico. Feofitina *a* e α -caroteno foram otimizados em função do processo de extração pelo planejamento de misturas demonstrando que etanol é o melhor solvente extrator para estes metabólitos. O extrato obtido pelo solvente etanol para folhas de *Coffea arabica* apresentou maior capacidade antioxidante frente aos demais extratos do planejamento de misturas, possuindo a planta irrigada maior capacidade antioxidante do que a planta não irrigada.

Palavras-chave: Cafeeiro. Estresse abiótico. Metaboloma. Quimiometria.

MARCHEAFAVE, Gustavo Galo. **Spectroscopic and chromatographic fingerprinting metabolomics of *Coffea arabica* leaves under water stress**. 2017. 71 p. Dissertation (Master's Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Multicomponent metabolomic analysis of *Coffea arabica* L., cv. Iapar 59 leaves was performed on plant extracts with irrigation and non-irrigation by simplex centroid design. The fingerprint of the extracts was obtained by ^1H nuclear magnetic resonance spectrometry and high performance liquid chromatography with multicomponent discrimination of the extracts by chemometric methods. Factor analysis of extracts' spectra showed clear discrimination between the samples. The main discrimination between extracts was due to the relative abundances of pigments and lipids that are anticorrelated in the analyzed sample set. For discrimination between coffee leaves by ^1H NMR the main loadings graph showed that lactate, arginine and methionine were the most important metabolites in the discrimination of extracts of the non-irrigated plant. These metabolites are originated due to fermentation processes, nutritional deficiency and plant senescence precursor, respectively. In the factor analysis of the extracts by separation processes only extract from dichloromethane/hexane do not discriminate the plant under abiotic stress. The extraction process of feofitin *a* and α -carotene was optimized by mixture design proving that ethanol is the best solvent extractor for these metabolites. The *Coffea arabica* leaves extract obtained with ethanol presented higher antioxidant capacity compared to the other extracts of the mixtures design, with the irrigated plant having a higher antioxidant capacity than the non-irrigated plant.

Key words: Coffee trees. Abiotic stress. Metabolom. Chemometrics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Espaço experimental limitado aos pontos pertencentes ao triângulo para misturas de três componentes.24
- Figura 2** – Média dos espectros de RMN ^1H para o planejamento de misturas de 3 componentes – a) espectro médio de extratos de plantas irrigadas; b) espectro médio de extratos de plantas não irrigadas; c) subtração média dos espectros de RMN de plantas irrigadas e não irrigadas (a-b).....36
- Figura 3** – Impressão Digital Metabolômica RMN ^1H (δ 0,0 – 10,0) (Irr = Plantas irrigadas; Ni = Plantas não irrigadas) utilizados para construção da matriz de dados37
- Figura 4** – Gráfico bidimensional dos escores do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros de ressonância magnética nuclear ^1H para extratos obtidos de acordo com o planejamento de misturas para plantas não irrigadas e irrigadas.38
- Figura 5** – Gráfico do loading da análise de fatores para extratos de folhas de *Coffea Arabica* lapar 59 cultivadas sob irrigação e não irrigação a) Fator 1 b) Fator 2..39
- Figura 6** – Perfil químico do espectro de ressonância magnética nuclear ^1H para extratos etanólicos e hexânicos de folhas de *Coffea arabica* cultivadas sob irrigação. a) δ 10 – 6,5 b) δ 6,5 – 4,0 c) δ 4,0-2,0 d) δ 2,0 - 0,0.....40
- Figura 7** – Gráfico tridimensional dos escores do Fator 1 vs. Fator 2 vs. Fator 3 dos espectros de ressonância magnética nuclear ^1H para extratos obtidos de acordo com o planejamento de misturas para plantas não irrigadas e irrigadas.....42
- Figura 8** – Gráfico do loading da análise de fatores para extratos de folhas de *Coffea Arabica* lapar 59 cultivadas sob irrigação e não irrigação para Fator 3.a) Loading (δ 10,0 – 0,0) b) região de açúcares (δ 5,5 – 3,0). c) regiões de aminoácidos/compostos alifáticos (δ 3,0 – 0,0).....44

Figura 9 –	Análise hierárquica para os espectros de RMN ¹ H para os extratos de folhas de plantas irrigadas e não irrigadas extraídas com a mistura etanol/diclorometano/hexano.	49
Figura 10 –	Representação matricial utilizada na análise de fatores para os dados cromatográficos, linhas representam a absorvância em unidade arbitrária em relação ao tempo de retenção e as colunas representam os extratos.	50
Figura 11 –	Gráfico dos escores da análise de fatores para dados cromatográficos para extratos de folhas de cafeeiros sob irrigação e não irrigação.....	51
Figura 12 –	Conjunto de perfis espectrais para feofitina a obtido por HPLC-DAD de acordo com o planejamento estatístico de misturas de três componentes	52
Figura 13 –	Conjunto de perfis espectrais para α-caroteno obtido por HPLC-DAD de acordo com o planejamento estatístico de misturas de três componentes	53
Figura 14 –	Caracterização espectral por bandas de absorção para a) feofitina a e b) α-caroteno obtidos por separação por HPLC-DAD	54
Figura 15 –	Curva de nível para solvente extrator de feofitina a obtida através da absorvância normalizada à 665 nm dos espectros de absorção DAD obtidos por separação por HPLC.....	57
Figura 16 –	Curva de nível para solvente extrator de α-caroteno a obtida através da absorvância normalizada à 448 nm dos espectros de absorção DAD obtidos por separação por HPLC.....	58
Figura 17 –	Concentrações que causam 50 % de inibição de DPPH (IC ₅₀) para cada extrato de folhas de <i>Coffea arabica</i> cv. Iapar 59 sob irrigação de acordo com o planejamento estatístico de misturas.	59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Planejamento de mistura simplex centroide de 3 componentes para extração.29
- Tabela 2** – Propriedades químicas dos solventes puros e suas misturas de acordo com o planejamento estatístico de misturas – acidez (α), dipolaridade (π), basicidade (β) e polaridade (P).30
- Tabela 3** – Moléculas protonadas características (IES-EM) para extrato de misturas ternária (etanol/diclorometano/hexano) de folhas de *Coffea arabica* sob irrigação e deslocamentos químicos de ^1H para cada metabólito.46
- Tabela 4** – ANOVA para a regressão do modelo cúbico especial para a absorvância normalizada de espectros de feofitina a e α -caroteno de acordo com o planejamento estatístico de misturas.55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

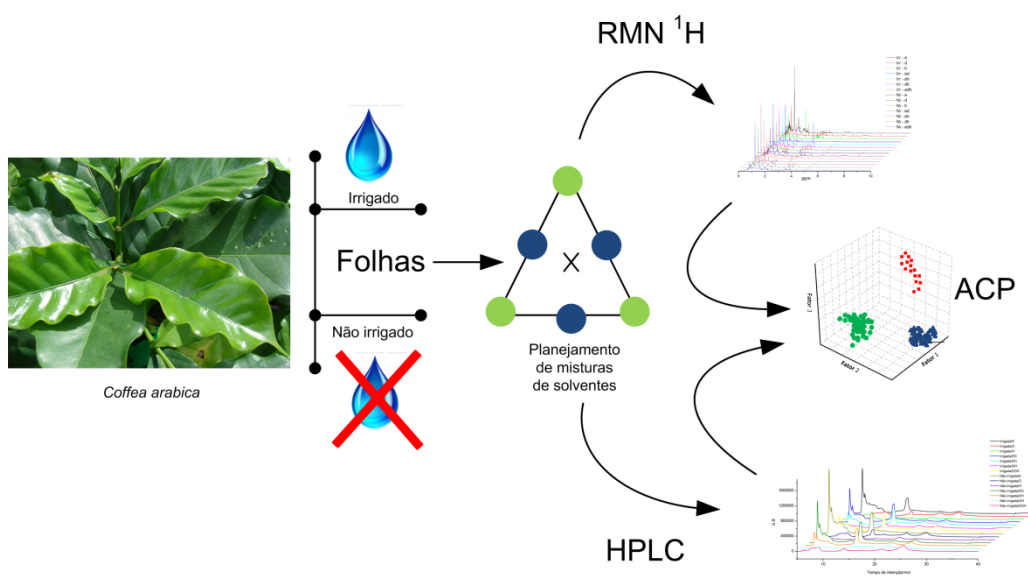
α	Acidicidade
β	Basicidade
δ	Deslocamento químico
π	Dipolaridade
ε	Erro experimental
°C	Grau Celsius
Σ	Somatório
AF	Análise de fatores
ANOVA	Análise de variância
CP	Componente principal
d	Diclorometano
DPPH	2,2 difenil-1-picrihidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido
d6	Deuterado
e	Etanol
h	Hexano
HILIC	Hydrophilic interaction liquid chromatography
HPLC-DAD	High-performance liquid chromatography with photodiode array detection
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
IES-EM	Espectrometria de massa com ionização por electrospray
Irr	Irrigado
MHz	Megahertz
m/z	Razão massa-carga
Ni	Não irrigado
nm	nanômetros
P	Polaridade
ppm	Partes por milhão
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
rpm	Rotações por minuto
TMS	Trimetilsilanol
vs	Versus

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	15
2	PERSPECTIVA TEÓRICA E ATUAL DO TRABALHO	20
2.1	<i>COFFEA ARABICA</i>	20
2.2	MUDANÇAS CLIMÁTICAS	21
2.3	PLANEJAMENTO DE MISTURAS	23
2.4	ANÁLISE EXPLORATÓRIA – ANÁLISE MULTIVARIADA	24
3	DESENVOLVIMENTO	28
3.1	Experimental	28
3.1.1	Planta	28
3.1.2	Preparação do Extrato	28
3.1.3	Medida Espectroscópica de RMN ¹ H	30
3.1.4	Espectrometria de Massas (IES-EM)	30
3.1.5	Análise Cromatográfica	31
3.1.6	Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Sequestro de Radicais Livres (DPPH)	32
3.1.7	Análise Estatística dos Dados de RMN ¹ H e HPLC-DAD	32
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	35
4.2	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	49
4.3	OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO PARA FEOFITINA A E α- CAROTENO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	51
5	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	63

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS



1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento, produção e comercialização de café vem sendo apontado como um fator de risco diante das mudanças climáticas (BUNN et al., 2015; CHEMURA et al., 2016; MARTINS et al., 2014; VILLERS et al., 2009; ZULLO et al., 2011). Modelos de predição já colocam reduções de até 90% na produção em regiões africanas até 2080 em virtude do balanço negativo das alterações climáticas (DAVIS et al., 2012). O aquecimento do sistema global aliado as mudanças nos regimes hídricos diminuirá a produção, reduzirá a qualidade e como consequência mudanças nas localidades adequadas para produção poderão ocorrer em todo o território mundial (OVALLE-RIVERA et al., 2015).

Com as alterações do ambiente de desenvolvimento da planta, estas são expostas a estresses abióticos como temperatura, salinidade, estresse hídrico e toxicidade de metais pesados, que a partir de determinados níveis são fatores de ameaça, afetam o crescimento e limitam a produtividade das culturas (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Com a perda de produtividade estas tensões ameaçam a sustentabilidade de uma das maiores commodities do mundo, o café (LIMA et al., 2013; SANTOS et al., 2011).

Em resposta ao estresse do meio a natureza desenvolveu mecanismos para se adaptar a esta mudança, onde os metabólitos funcionam como reguladores da tolerância ao estresse (PINHEIRO et al., 2004, 2005). Em respostas ao estresse vários mecanismos da planta são regulados como forma de atenuar o efeito do estresse e levar o ajuste da tolerância no meio celular, o que leva a modificações qualitativas ou quantitativas do metaboloma da planta (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). A exploração de variações nos padrões metabólicos em ambientes estressantes é

uma ferramenta promissora para busca por marcadores, elucidação do mecanismo de tolerância ao estresse e melhoramento das culturas (YAMAGUCHI; BLUMWALD, 2005). Com a identificação de alvos moleculares pode-se identificar e selecionar genótipos de café melhor adaptados para o futuro global.

Em matrizes complexas a verificação de mudanças nos perfis metabolômicos pode ser acompanhada por metodologia de impressão digital aliada a quimiometria (SOARES; SCARMINIO, 2008). Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo metodologias analíticas que possam garantir confiabilidade e robustez no processo de obtenção do perfil metabolômico de diversas matrizes por meio de planejamento estatístico de misturas (AFONSO et al., 2015a; JUSTO et al., 2014; MOREIRA; SCARMINIO, 2013; PAULI; SCARMINIO; TAULER, 2016; SOARES; SCARMINIO; BRUNS, 2011). O uso do planejamento no processo extrativo garante a maximização dos perfis químicos do material, uma vez que os constituintes apresentam variações nas propriedades químicas e o planejamento pode contemplar a maior parte destas, como a polaridade dos metabólitos (TERRILE et al., 2016).

O planejamento de misturas para processos extrativos em plantas é uma ferramenta promissora que tem como objetivo obter o maior número possível de metabólitos extraídos de forma ordenada. Isto só é possível devido as diferentes propriedades químicas inerentes de cada solvente extrator que terá assim diferentes interações com o material e por conseguinte variações no perfil extraído. A análise exploratória pode então verificar a correlação entre as variáveis definidas pelos perfis metabolômicos e indicar padrões de reconhecimento mediante a discriminação amostral (AFONSO et al., 2015b).

O objetivo geral deste trabalho foi discriminar impressões digitais de

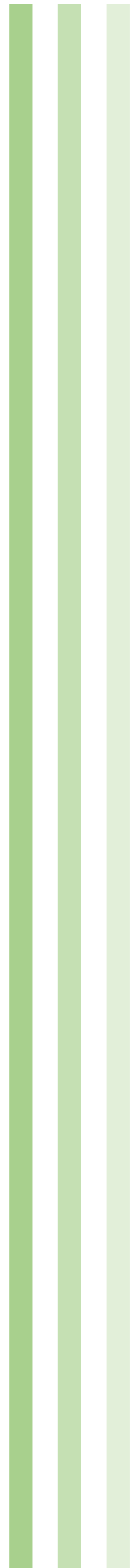
ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e impressões digitais cromatográficas de extratos obtidos de *Coffea arabica* genótipo Iapar 59 cultivados com ausência e presença de irrigação.

Objetivos Específicos

- 1) Utilizar o planejamento estatístico de misturas de 3 componentes para obtenção de extratos em folhas de *Coffea arabica* para verificar a diversidade metabólica extraída;
- 2) Discriminar espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H de extratos multicomponentes de folhas de *Coffea arabica* provenientes de plantas irrigadas e não irrigadas por métodos quimiométricos;
- 3) Inferir sobre a mudança do metaboloma do cafeeiro sobre a perspectiva do estresse abiótico a partir do loading da análise de fatores;
- 4) Discriminar impressões digitais cromatográficas de extratos multicomponentes de folhas de *Coffea arabica* provenientes de plantas irrigadas e não irrigadas por métodos quimiométricos;
- 5) Otimizar a extração de feofitina *a* e α -caroteno por meio de planejamento estatístico de misturas e superfície de resposta;
- 6) Verificar a resposta dos diferentes extratos de folhas de *Coffea arabica* frente a atividade antioxidante pelo método do sequestro de radicais livres do 2,2 difenil-1-picrihidrazil.

CAPÍTULO 2

PERSPECTIVA TEÓRICA E ATUAL DO TRABALHO



2 PERSPECTIVA TEÓRICA E ATUAL DO TRABALHO

2.1 *COFFEA ARABICA*

O cafeeiro (*Coffea sp*) é um arbusto da família Rubiaceae e do gênero *Coffea* L, largamente cultivado em países tropicais. Planta de longevidade perene possui folhas persistentes. Dentre as espécies, *Coffea arabica* L., é conhecida como produtora de cafés de melhor qualidade e corresponde a cerca de 70% de toda produção mundial. De origem afro-tropical, o cafeeiro foi introduzido no país por volta do século XVIII através de localidades oriundas da América Central e Guiana Francesa. O fruto possui grande importância econômica no cenário de agronegócios nacionais, sendo um dos maiores produtos primários de exportação (CAMARGO; CAMARGO, 2001; LASHERMES et al., 1999).

A valorização do café e seu preço agregado está envolta na qualidade do grão. Os fatores que alteram as propriedades sensoriais são: cultivo, manejo da cultura, colheita, industrialização e preparo da bebida. Sua composição química, através dos metabólitos secundários, tem despertado grande interesse de diversas pesquisas que buscam produtos com foco em funções biológicas no ser humano, como os compostos fenólicos (ABRAHÃO et al., 2010).

No Brasil a principal doença que dificulta o desenvolvimento do cafeeiro é a denominada ferrugem. Sua propagação ocorre em clima quente com alta umidade, onde o fungo *Hemileia vastatrix* ataca o cafeeiro depositando seus esporos ('sementes' dos fungos) nas folhas inferiores. Estes, além de provocar lesões e morte dos tecidos da planta, diminui a área foliar, que é tão importante para o equilíbrio e desenvolvimento da planta (SERA et al., 2010a). Em 1992 o Instituto Agrônomo do Paraná recomendou o plantio do cultivar denominado Iapar 59. Este

tem resistência completa e durável à ferrugem permanecendo com boas características agronômicas (SERA et al., 2007).

O cultivar Iapar 59 originou-se do cruzamento entre a cultivar de *Coffea arabica* Villa Sarchi 971/10 e o “Híbrido de Timor” 832/2, realizado no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro em Portugal, onde recebeu a denominação de H361. A geração F2 (H361-4) foi recebida pelo Instituto Agrônomo de Campinas, que a denominou LC 1669. Em 1975, o IAPAR introduziu a geração F3 (LC 1669 Ep.127 c.506), que passou a ser denominada IAPAR 75163. Nos estudos realizados pelo IAPAR, a progênie 75163-22 destacou-se pelas características agronômicas e resistência à ferrugem. Seu desempenho nas regiões de Londrina, Loanda e Carlópolis demonstrou condições para seu lançamento como cultivar, passando a receber a denominação de IAPAR 59 (KITZBERGER; SCHOLZ; BENASSI, 2014; SERA et al., 2010b).

A resistência a ferrugem evita os danos agronômicos e econômicos provocados pela doença com a perda de produção, que pode chegar a 80%, e não há danos à qualidade do grão, uma vez que o desfolhamento provocado pelos fungos impede boa formação dos grãos, além da economia com fungicidas e a predisposição a outras doenças (SERA et al., 2010a).

O cafeeiro Iapar 59 apresenta arquitetura compacta e menor volume de copa, o que o caracteriza como ótimo cafeeiro para plantios adensados, que garantem maior produção (SANTANA; OLIVEIRA; QUADROS, 2004).

2.2 MUDANÇAS CLIMÁTICAS

A partir das mudanças climáticas, a seca tornou-se um grande desafio para a manutenção de *Coffea arabica*, com impactos tanto na viabilidade quanto na

produção de grãos de cafés. Os pequenos produtores dos países em desenvolvimento enfrentam as mudanças climáticas com cautela, uma vez que os recursos são escassos para a implementação de sistemas de manejo pertinentes, constituindo assim um grupo de risco no mercado de agronegócios (BEINING, 2007; CAVATTE et al., 2012).

Em decorrência das previsões estabelecidas tanto para as alterações de temperatura quanto para mudanças no regimes hídricos, espera-se que estas alterações avancem dramaticamente no futuro. Como alternativa para o contexto advindo das mudanças climáticas, o desenvolvimento e estudo de plantas cultivadas sobre mecanismos de resistência a seca é considerada uma estratégia promissora para a produção sustentável em ambientes propícios a seca mantendo o desenvolvimento econômico da cultura (AHMAD; PRASAD, 2012).

O mecanismo de adaptação ecofisiológico ao estresse já é alvo de diversos estudos inerentes ao cafeeiro, entretanto o caráter multidimensional da adapção que envolve toda a composição química do cafeeiro, desde folhas, caules, flores e frutos é insuficiente e em muitos casos desconhecido. O melhoramento genético é uma das ferramentas encontradas para estabelecer culturas que necessitem de menores limites de biodisponibilidade hídrica, entretanto, os pesquisadores ainda tem enfrentado problemas de adaptação das plantas criadas e monitoradas em ambientes controlados, quando submetidas ao campo e a diversos outros estresses ambientais inerentes ao ambiente de cultivo (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008; VARTAPETIAN; JACKSON, 1997).

O estresse hídrico pode ser causado por diversos fatores, sendo os principais: altas temperaturas, radiação solar, baixas quantidades de chuvas, má distribuição de precipitação e intensidades crescentes de déficits de umidade do solo. Em

ambientes com deficit hídrico, o cafeeiro pode enfrentar tanto a baixa disponibilidade de água no solo, como a baixa umidade do ar, o que resulta em maior transpiração e perda de água dos tecidos para a atmosfera.

A primeira resposta ecofisiologica da planta adaptada a seca está o fechamento dos estômatos, que mantém os tecidos hidratados e as funções metabólicas em funcionamento, evitando a dessecação e morte foliar (DE SOUZA et al., 2005; PILLITTERI; DONG, 2013). Dentre os mecanismos de tolerância a seca, alternativas de manejo como a irrigação vem sendo apontadas como estratégias promissoras de adaptação de diversas culturas (AHMAD; PRASAD, 2012; DENNIS et al., 2000).

2.3 PLANEJAMENTO DE MISTURAS

Mistura é a junção de ingredientes diferentes para formação de um produto. Sua característica irá depender da natureza e das proporções relativas de cada ingrediente e não da quantidade total da mistura. A soma das proporções dos componentes da mistura é sempre 100%. Pode-se escrever que para uma mistura de q componentes (BRERETON, 2007; BRUNS; SCARMINIO; NETO, 2006):

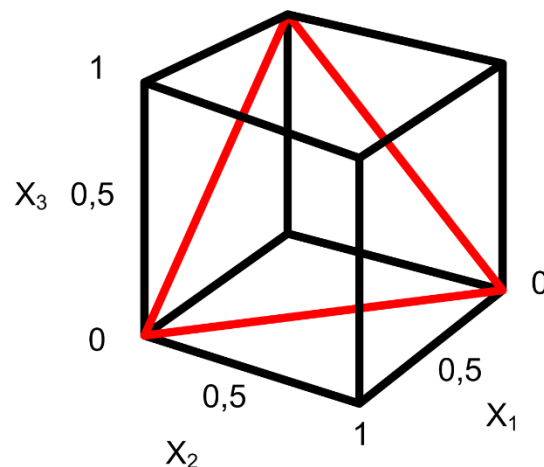
$$\sum_{i=1}^q x_i = 100\% = 1 \quad \text{Eq. 1}$$

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

Para sistemas com três fatores independentes, realiza-se experimentos em qualquer ponto dentro do cubo, Figura 1. Quando se trata de uma mistura de três componentes, os experimentos obedecem à equação $x_1+x_2+x_3=1$, que define um triângulo equilátero inscrito no cubo, Figura 1 (BRUNS; SCARMINIO; NETO, 2006).

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

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



2.4 ANÁLISE EXPLORATÓRIA – ANÁLISE MULTIVARIADA

A análise exploratória tem como objetivo analisar os dados para extrair informações que possam relacionar objetos e variáveis visando maximizar a obtenção de informações ocultas na sua estrutura, além da descoberta de variáveis importantes nas suas tendências de formação de grupamentos. A partir daí pode-se levantar hipóteses e propor modelos não estabelecidos anteriormente (BRERETON, 2007; HENDRIKS et al., 2005). Os dados experimentais são analisados pelos métodos quimiométricos - métodos de reconhecimento de padrão - sendo a análise

de componentes principais uma das ferramentas fundamentais no desenvolvimento da área.

A análise de componente principal (ACP) é um método que tem por finalidade básica a análise dos dados visando sua redução, eliminação de sobreposições e a escolha das formas mais representativas de dados a partir de combinações lineares das variáveis originais. De forma geral é uma maneira de reescrever os dados deixando-os de uma forma mais conveniente para a análise, porém sem perder nenhuma informação química (HÄRDLE; SIMAR, 2003). Neste método, mudam-se os eixos das coordenadas das amostras com a finalidade de reduzir a dimensão do conjunto de dados por meio de combinações lineares das variáveis originais (MILLER; MILLER, 2010). A importância de tais variáveis dá-se pelos loadings.

A primeira componente principal é orientada na direção da maior variância de dados, a segunda componente principal orienta-se de forma que seja perpendicular à primeira e represente a variância máxima não explicada anteriormente. Portanto, cada componente principal é obtida em ordem decrescente de variância (MILLER; MILLER, 2010).

Define-se ACP no espaço das amostras ou das variáveis e sua decomposição é calculada pela diagonalização da matriz de associação \mathbf{XX}^t ou da matriz $\mathbf{X}^t\mathbf{X}$. A matriz $\mathbf{X}_{(n \times m)}$ formada, com n objetos (amostras, compostos químicos, espectros, etc.) e m variáveis (altura de picos cromatográficos, valores de absorbâncias, etc.) é então decomposta no produto de duas novas matrizes menores (HÄRDLE; SIMAR, 2003).

$$\mathbf{X}_{(n \times m)} = \mathbf{T}_{(n \times q)} \times \mathbf{P}_{(q \times m)}^t + \mathbf{E}_{(n \times m)} \quad \text{Eq. 2}$$

onde \mathbf{P} é a matriz dos loadings (pesos) das componentes principais, \mathbf{T} é a matriz dos escores das componentes principais, \mathbf{E} é a matriz dos resíduos. O sobrescrito t indica a transposta da matriz \mathbf{P} , q é um escalar que corresponde à quantidade de componentes principais que serão necessárias para descrever a maior porcentagem da variância dos dados (HÄRDLE; SIMAR, 2003).

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

A matriz \mathbf{P} (loadings) ou \mathbf{T} (escores) pode ainda sofrer uma rotação rígida, denominada varimax. Esta rotação tornará máxima a variância dos loadings das CP's porém sem perder a ortogonalidade.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO



3 DESENVOLVIMENTO

3.1 EXPERIMENTAL

3.1.1 Planta

Folhas de *Coffea arabica* genótipo Iapar 59 foram coletadas em outubro de 2012 de plantas irrigadas e não irrigadas cultivadas por 3 anos no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR, Londrina). As folhas foram coletadas entre as alturas de 40 e 80 centímetros. A secagem das folhas ocorreu com circulação de ar em temperatura ambiente. As folhas foram distribuídas em bandejas e reviradas a cada 24 horas para homogeneizar a secagem. O processo de secagem foi feito durante 15 dias. Após completa secagem as folhas foram trituradas em moinho IKA A11, peneiradas e embaladas a vácuo e armazenados em freezer. A exsicata foi depositada no herbário da Universidade Estadual de Londrina sob número FUEL53777.

3.1.2 Preparação do Extrato

Os extratos foram preparados usando os solventes etanol (e), diclorometano (d) e hexano (h) em diferentes proporções de acordo com o planejamento de misturas simplex centroide, conforme Tabela 1. Os solventes orgânicos utilizados foram de grau analítico sendo etanol Impex (São Paulo, Brasil), diclorometano Alphatec (São Paulo, Brasil) e hexano Anidrol (São Paulo, Brasil). O processo extrativo consiste em 3 solventes puros, três misturas binárias e uma mistura ternária. As extrações foram feitas de forma aleatória incluindo 3 repetições do ponto central. Os solventes foram selecionados baseados no triângulo de seletividade de solventes de Snyder (SNYDER; CARR; RUTAN, 1993). A Tabela 2 apresenta os

parâmetros solvatocrômicos, acidez (α), basicidade (β), dipolaridade (π) e polaridade (P), que são medidas relativas da força e tipo de interação molecular do soluto com os solventes para os 7 pontos do planejamento de misturas de 3 componentes. Os extratos brutos foram preparados a partir de 2.0 g das folhas secas com 60 mL de solvente extrator. O processo extrativo ocorreu sob agitação em Incubadora shaker ACB Labor com velocidade de agitação de 150 rpm e temperatura de 15°C. Após 24 horas o extrato foi filtrado e separado das folhas. Esse procedimento foi repetido por mais três vezes. O volume total de solvente (240 mL) para cada ponto do planejamento de misturas foi evaporado em rotaevaporador rotativo seguido de circulação forçada de ar. Os extratos já secos foram liofilizados.

Tabela 1 – Planejamento de mistura simplex centroide de 3 componentes para extração

Planejamento de misturas	Solventes		
	Etanol	Diclorometano	Hexano
e	1	0	0
d	0	1	0
h	0	0	1
ed	0,50	0,50	0
eh	0,50	0	0,50
dh	0	0,50	0,50
edh	0,333	0,333	0,333

Tabela 2 – Propriedades químicas dos solventes puros e suas misturas de acordo com o planejamento estatístico de misturas – acidez (α), dipolaridade (π), basicidade (β) e polaridade (P)

Planejamento de misturas	Propriedades Químicas			
	α	π	β	P
e	0,39	0,25	0,36	4,30
d	0,27	0,73	0	3,10
h	0,10	0,06	0,03	0,10
ed	0,33	0,49	0,18	3,70
eh	0,25	0,16	0,20	2,20
dh	0,19	0,40	0,02	1,60
edh	0,25	0,35	0,13	2,50

3.1.3 Medida Espectroscópica de RMN ^1H

Os experimentos de RMN ^1H foram realizados a 25°C em Espectrômetro Bruker Modelo Avance III operando a 400 MHz com número de aquisições de 32, tempo de aquisição de 3 minutos e 4 segundos e tempo de espera de 1,0 segundo. Foi utilizada sonda multinuclear inversa de 5 mm (BBI). Os espectros de ressonância foram registradas usando 0,05 g do extrato dissolvido em 0,5 mL do solvente DMSO- d_6 (Sigma Aldrich) usando TMS como referência espectral. A supressão de sinais foi feita para remover deslocamentos químicos de ressonância da água residual.

3.1.4 Espectrometria de Massas (IES-EM)

Foram pesados 3,0 mg do extrato bruto proveniente da mistura ternária (edh) das folhas da planta irrigada dissolvidos em 1,0 mL de metanol LC-MS Fluxa Analytical. Esta solução foi diluída com 0,01 % de ácido fórmico Vetec para obtenção

de uma solução de concentração 1×10^{-6} mg mL⁻¹ do extrato. A solução do extrato diluída foi injetada diretamente na fonte do espectrômetro de massa Bruker, equipado com analisador quadrupólo e ionização por electrospray (IES). A análise foi operada no modo positivo e negativo como forma de avaliar as diferentes propriedades dos compostos presentes no extrato. Os dados foram adquiridos no modo de varredura usando uma gama de m/z de 80 a 1000 Da. As condições da fonte de ionização foram: voltagem capilar de 3 kV, 150 °C de temperatura da fonte, 80 L h⁻¹ de fluxo de gás do cone, 800 L h⁻¹ de fluxo de gás de dessolvatação e 350 °C de temperatura de dessolvatação. O gás de nitrogênio utilizado na nebulização apresentava 99% de pureza. Os dados foram processados usando o software v4.1 MassLynx.

3.1.5 Análise Cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido Finnigan Surveyour Thermo Scientific equipado com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) com monitoração nos comprimentos de onda em 276, 290 e 325 nm. A corrida cromatográfica utilizada neste estudo foi obtida previamente por trabalhos anteriores com algumas modificações (HAMERLY et al., 2015). A eluição em gradiente ocorreu por 60 minutos em ambiente com temperatura controlada de 20°C e fluxo de 600 uL min⁻¹. A fase móvel consistiu de 0,1% de ácido fórmico Vetec em água Ultrapura Milli-Q (A) e 0,1% de ácido fórmico Vetec em acetonitrila J.T.Baker (B). A eluição de gradiente linear foi 2% do eluente B por 2 min; 2-95% de eluente B de 2-26 min; 95% de eluente B de 26-28; 2% do eluente B de 28-60 min. A coluna utilizada foi HILIC Kinetex 2,6 µm 100 Å Phenomenex, com dimensões de 150 mm x 4,6 mm e volume de injeção de 20 µL. 3,0 mg do extrato foram dissolvidos em 1,0 mL de metanol. Foi adicionado 20 µL desta solução em 10 mL da fase móvel

composta por 2% B e 98% A. As amostras foram filtradas em filtro de nylon Chromafil de 0,20 μm e analisadas imediatamente. Os dados foram processados usando o programa ChromQuest 4.2

3.1.6 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Sequestro de Radicais Livres em Extratos de *Coffea Arabica*

A capacidade antioxidante foi avaliada utilizando o método do sequestro de radicais livres do DPPH (2,2 difenil-1-picrihidrazil) (BLOIS, 1958). O extrato seco de folhas de *Coffea arabica* resuspendido em solução hidroalcoólica (1:1) (50 μL) foi adicionado à mistura reacional contendo 1 mL de tampão acetato 0,1M (pH 5,5), 1 mL de etanol e 0,5 mL de solução etanólica de DPPH (250 μM). A mudança na absorbância foi medida em 517nm (espectrofotometro Evolução 60 S Thermo Scientific) após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Os resultados foram determinados em valores de IC_{50} , plotados no software GraphPad Prism, versão 5.01. Todos os ensaios foram realizados em triplicatas.

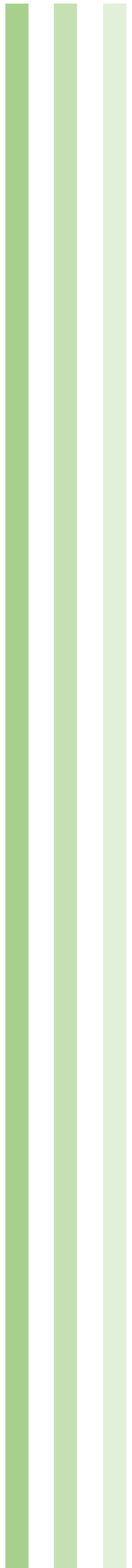
3.1.7 Análise Estatística dos Dados de RMN ^1H e HPLC-DAD

Análise de fatores e análise hierárquica foram utilizados para análise dos dados de RMN e cromatograficos usando o software Statistica 7.0. O software Origin Pro 8 foi usado na plotagem dos gráficos dos loadings. Os espectros RMN de ^1H foram referenciados ao sinal do TMS (δ 0.0). O intervalo de trabalho dos dados espectrais foi de δ 0.0055 – 9.9999. A região de deslocamento químico para o solvente deuterado (δ 2.3900 – 2.5900) foi retirada da matriz de dados para realização da análise de fatores. Pré-processamento (normalização) foi realizado, porém não houve mudança significativa nos escores e loadings da análise de fatores, sendo escolhido assim os dados na sua forma original para desenvolvimento

do trabalho. Os cromatogramas foram analisados no intervalo de tempo de 0 - 40 min.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

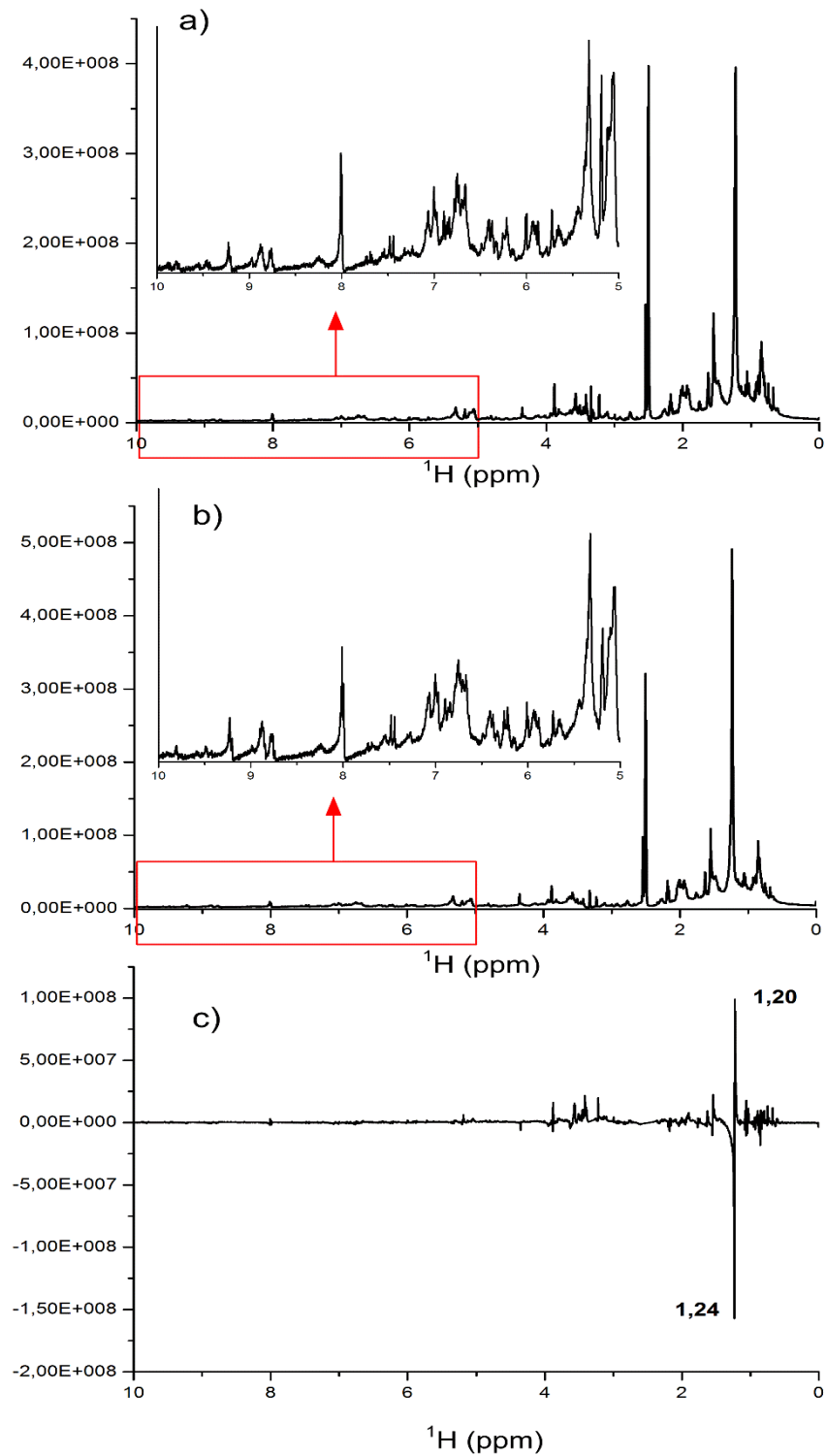


4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ressonância Magnética Nuclear

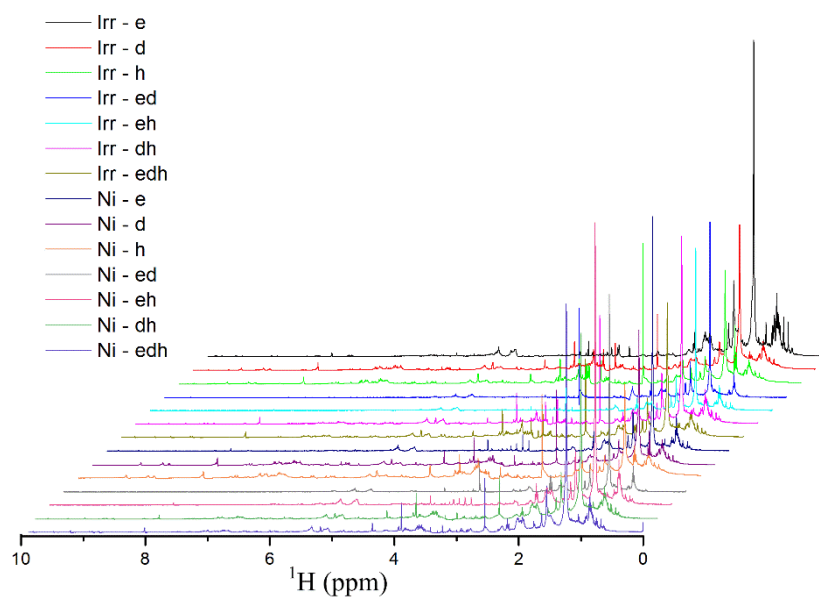
A soma dos perfis dos espectros de RMN ^1H dos extratos de acordo com o planejamento de misturas pode ser considerada uma impressão digital metabolômica global e que carrega o máximo de informação possível. A Figura 2a e 2b mostra o espectro RMN ^1H médio obtido a partir dos extratos de diferentes solventes e diferentes proporções pelo planejamento, Tabela 1, para folhas de plantas irrigadas e não irrigadas, respectivamente. A Figura 2c mostra o sinal resultante da subtração dos dois espectros, mostrando o conjunto de metabólitos que apresentam diferenças nas abundâncias relativas com relação ao estresse hídrico. Observa-se na Figura 2c que a maior variação nas abundâncias relativas encontram-se na faixa de δ 4,0 - 0,5. O sinal em δ 1.21, característico de pigmentos (SINGH, 2012), corresponde ao metabólito majoritário para o conjunto de extratos provenientes da planta irrigada, enquanto o sinal em δ 1.24, característico de lipídios (CALIGIANI et al., 2010; SHUIB et al., 2011; UAWISETWATHANA et al., 2015), corresponde ao metabólito majoritário dos extratos relativos a planta não irrigada.

Figura 2 – Média dos espectros de RMN ^1H para o planejamento de misturas de 3 componentes – a) espectro médio de extratos de plantas irrigadas; b) espectro médio de extratos de plantas não irrigadas; c) subtração média dos espectros de RMN de plantas irrigadas e não irrigadas (a-b)



Considerando a dificuldade para explorar as diferenças na composição química das folhas de cafeeiros submetidos a condições de irrigação e não irrigação usando os espectros médios, a análise de fatores foi aplicada aos dados de impressão digital. Os dados espectrais da Figura 3 foram dispostos em uma matriz de 8.178 linhas e 14 colunas, onde as linhas representam o deslocamento químico do espectro de ressonância magnética nuclear ^1H e as colunas os extratos preparados de acordo com o planejamento estatístico de misturas, sendo 7 extratos provenientes de plantas irrigadas e 7 extratos provenientes de plantas não irrigadas. Os três primeiros fatores explicam 96,07% da variância total dos dados.

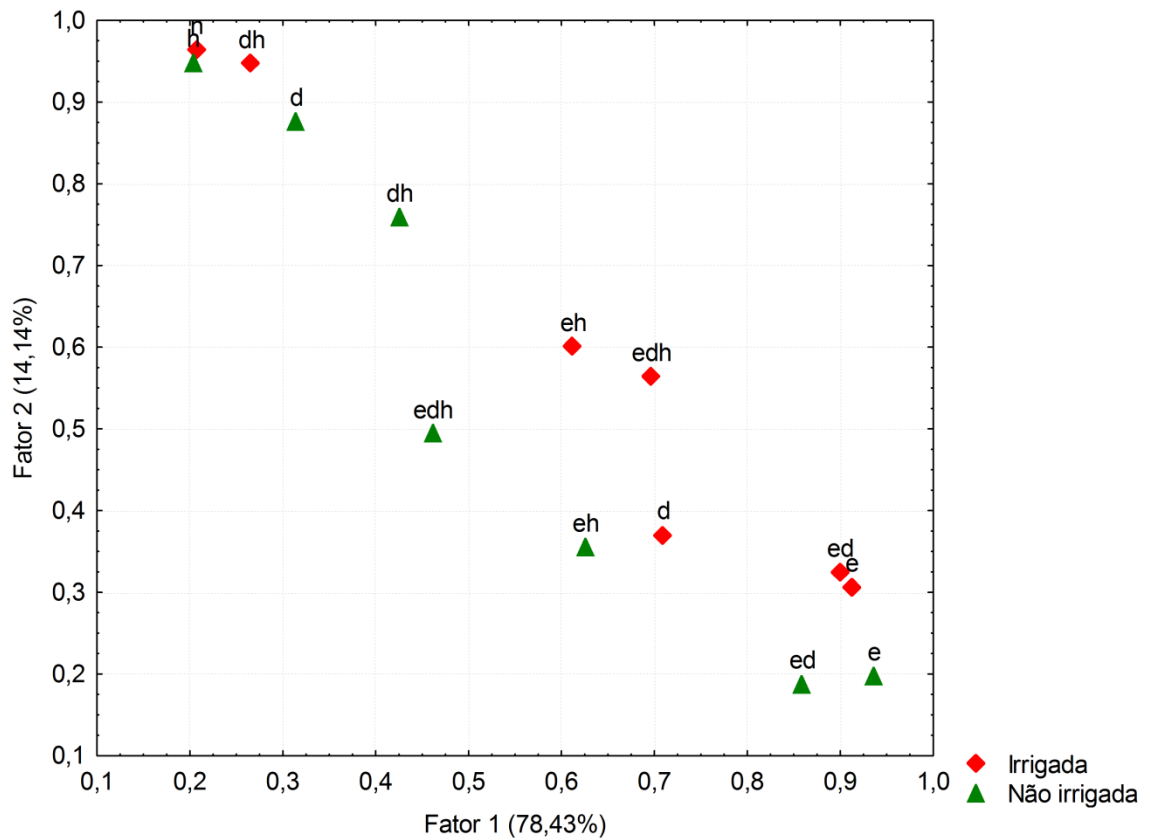
Figura 3 – Impressão Digital Metabolômica RMN ^1H (δ 0.0 – 10.0) (Irr = Plantas irrigadas; Ni = Plantas não irrigadas) utilizados para construção da matriz de dados



Por meio da AF os dados antes de difícil interpretação são projetados em um espaço de dimensão menor, sendo possível identificar diferenças existentes entre as amostras de forma imparcial (GARRETA-LARA et al., 2016). A Figura 4 mostra o gráfico dos escores do Fator 1 vs. Fator 2 responsável por 92,57% da variação total

dos dados. A distribuição dos extratos tanto no escore do Fator 1 e 2 é explicado majoritariamente pela polaridade do solvente extrator. Hexano e suas misturas tem polaridade inferior àquelas obtidas com o solvente etanol. Solventes polares interagem através de forças intermoleculares ou ligações de hidrogênio e extraem preferencialmente compostos polares e hidrofílicos. Já os solventes não polares extraem preferencialmente compostos de baixa polaridade e compostos de caráter hidrofóbico (SCHEEL et al., 2016).

Figura 4 – Gráfico bidimensional dos escores do Fator 1 vs. Fator 2 dos espectros de ressonância magnética nuclear ^1H para extratos obtidos de acordo com o planejamento de misturas para plantas não irrigadas e irrigadas

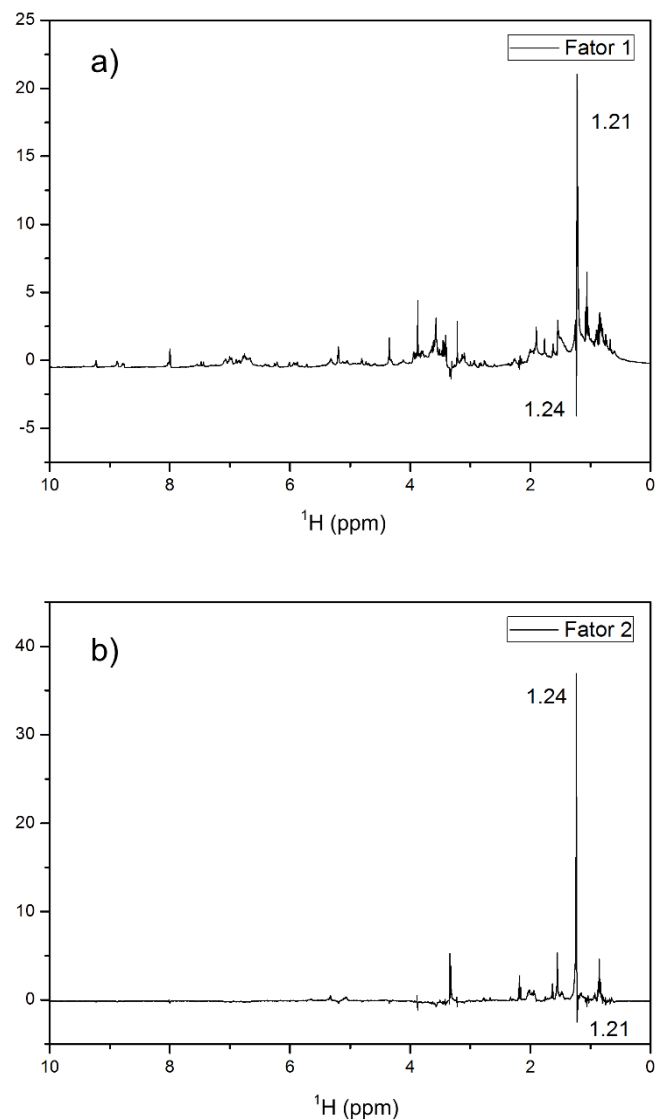


Na Figura 5a observa-se que para o Fator 1 as amostras localizadas na região mais positiva apresentam maior abundância relativa de pigmentos (δ 1.21). Pela Figura 4, na região mais positiva encontram-se os extratos etanólicos e na região menos positiva os extratos hexânicos. Segundo o loading, Figura 5a, a

diferença entre os extratos presentes nesta região deve-se a maior abundância relativa de lipídios (δ 1.24) no extrato hexânico comparado ao etanólico.

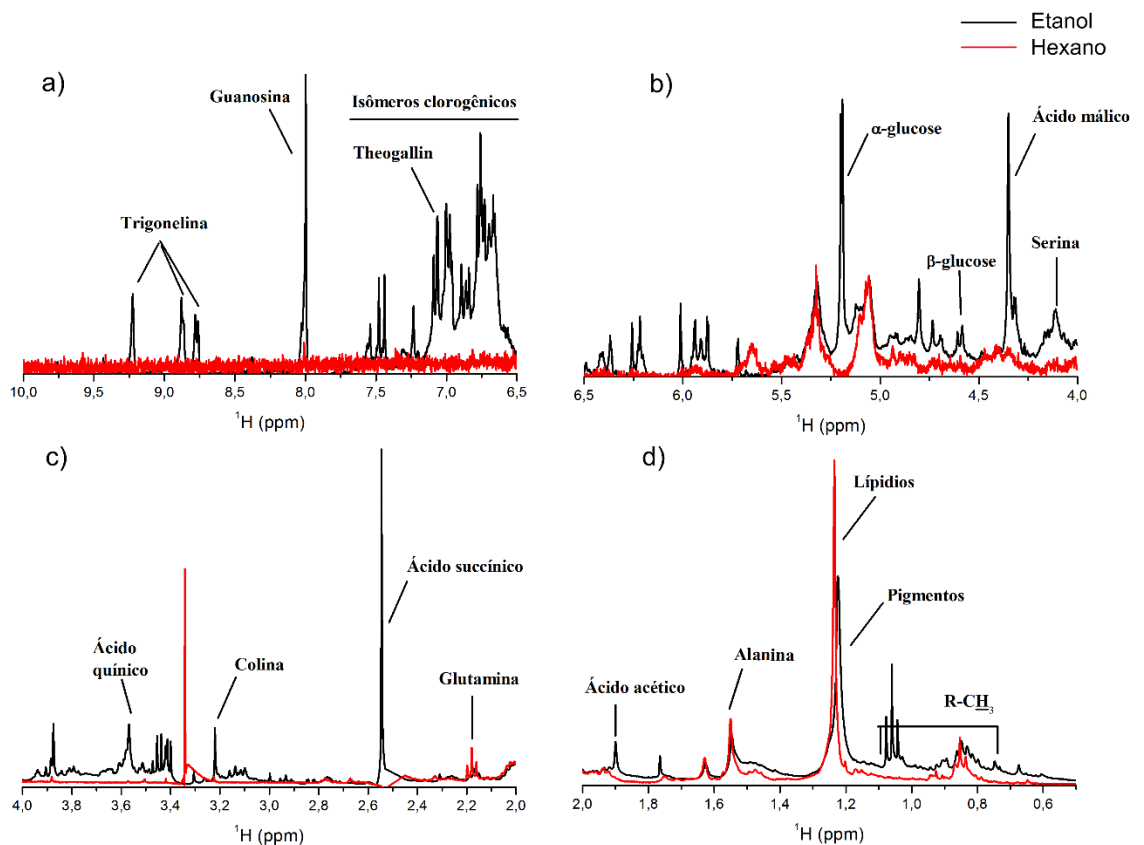
Analisando o Fator 2, Figura 4 e loading, Figura 5b, observou-se os mesmos deslocamentos com pesos opostos na discriminação. Assim, as abundâncias relativas de pigmentos e lipídios estão anticorrelacionados no conjunto de amostras analisadas.

Figura 5 – Gráfico do loading da análise de fatores para extratos de folhas de *Coffea Arabica* Iapar 59 cultivadas sob irrigação e não irrigação a) Fator 1 b) Fator 2



A Figura 6 apresenta os espectros de RMN ^1H para as folhas irrigadas extraídas com hexano um solvente orgânico de baixa polaridade e etanol com alta polaridade. Para facilitar a visualização os espectros foram divididos em 4 faixas (δ 10 - 6.5, δ 6.5 - 4.0, δ 4.0 - 2.0, δ 2.0 - 0.1).

Figura 6 – Perfil químico do espectro de ressonância magnética nuclear ^1H para extratos etanólicos e hexânicos de folhas de *Coffea arabica* cultivadas sob irrigação. a) δ 10 – 6.5 b) δ 6.5 – 4.0 c) δ 4.0-2.0 d) δ 2.0 – 0.1

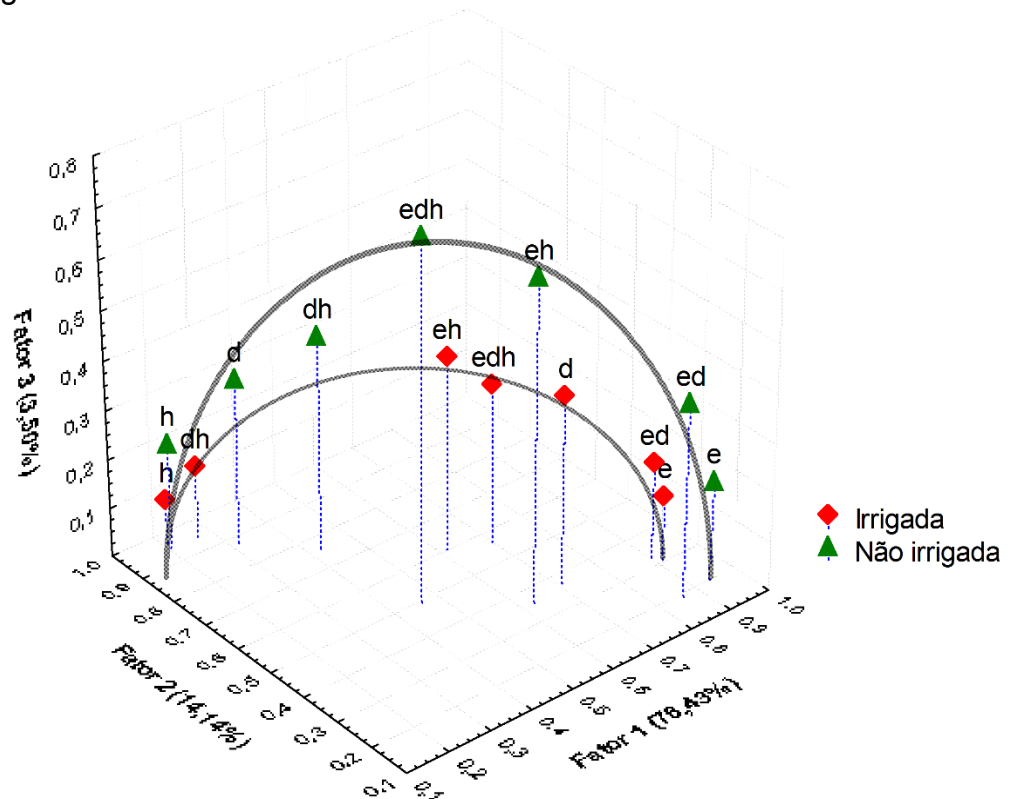


Na Figura 6a observa-se que o espectro do extrato em hexano não apresenta informação química na faixa de deslocamento δ 10.00 – 6.5. Comparado com o extrato em etanol, o extrato hexânico apresenta pouca informação química na extração de metabólitos, devido a sua baixa capacidade de extração de compostos polares. Em compensação na Figura 6b é possível observar um sinal mais intenso

quando comparado ao etanol em torno de δ 5.65. Na Figura 6d observa-se um sinal mais intenso em δ 1.24, característico de estruturas químicas lipídicas $-(CH_2)_n$ (CALIGIANI et al., 2010; SHUIB et al., 2011; UAWISETWATHANA et al., 2015). Já o espectro obtido do extrato etanólico apresenta maior número de sinais, sendo possível verificar deslocamentos químicos característicos de metabólitos primários e secundários, tais como trigonelina δ 8.75; 8.87; 9.22 (KODA et al., 2012; WEI et al., 2010), guanosina δ 8.00 (LOCCI et al., 2011; UAWISETWATHANA et al., 2015), região de isômeros de ácidos clorogênicos δ 7.8-6.1 (BOSCO et al., 1999), theogallin δ 7.08 (GALL; COLQUHOUN; DEFERNEZ, 2004), α -glucose δ 5.20 (KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, 2010; KODA et al., 2012), β -glucose δ 4.61 (KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, 2010; KODA et al., 2012), ácido málico δ 4.33 (KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, 2010), serina δ 4.08 (KUHNEN et al., 2010), ácido quínico δ 3.56 (GALL; COLQUHOUN; DEFERNEZ, 2004), colina δ 3.20 (KODA et al., 2012; WEI et al., 2010), ácido succínico δ 2.54 (CALIGIANI et al., 2010; KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, 2010), glutamina δ 2.16 (KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, 2010; KODA et al., 2012), ácido acético δ 1.90 (CALIGIANI et al., 2010; WEI et al., 2010), alanina δ 1.52 (KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, 2010; KODA et al., 2012; WEI et al., 2010), grupos metil de pigmentos δ 1.21 (SINGH, 2012) e valina, leucina, isoleucina δ 1.08 – 0.70 (KODA et al., 2012; LOCCI et al., 2011; UAWISETWATHANA et al., 2015).

A Figura 7 mostra a projeção dos scores do Fator 1 vs. Fator 2 vs. Fator 3, observa-se que o fator 3 contém metabólitos importantes para discriminar plantas irrigadas e não irrigadas. No Fator 3 os extratos provenientes de plantas irrigadas encontram-se em posição inferior em relação aos extratos de plantas não irrigadas.

Figura 7 – Gráfico tridimensional dos escores do Fator 1 vs. Fator 2 vs. Fator 3 dos espectros de ressonância magnética nuclear ^1H para extratos obtidos de acordo com o planejamento de misturas para plantas não irrigadas e irrigadas

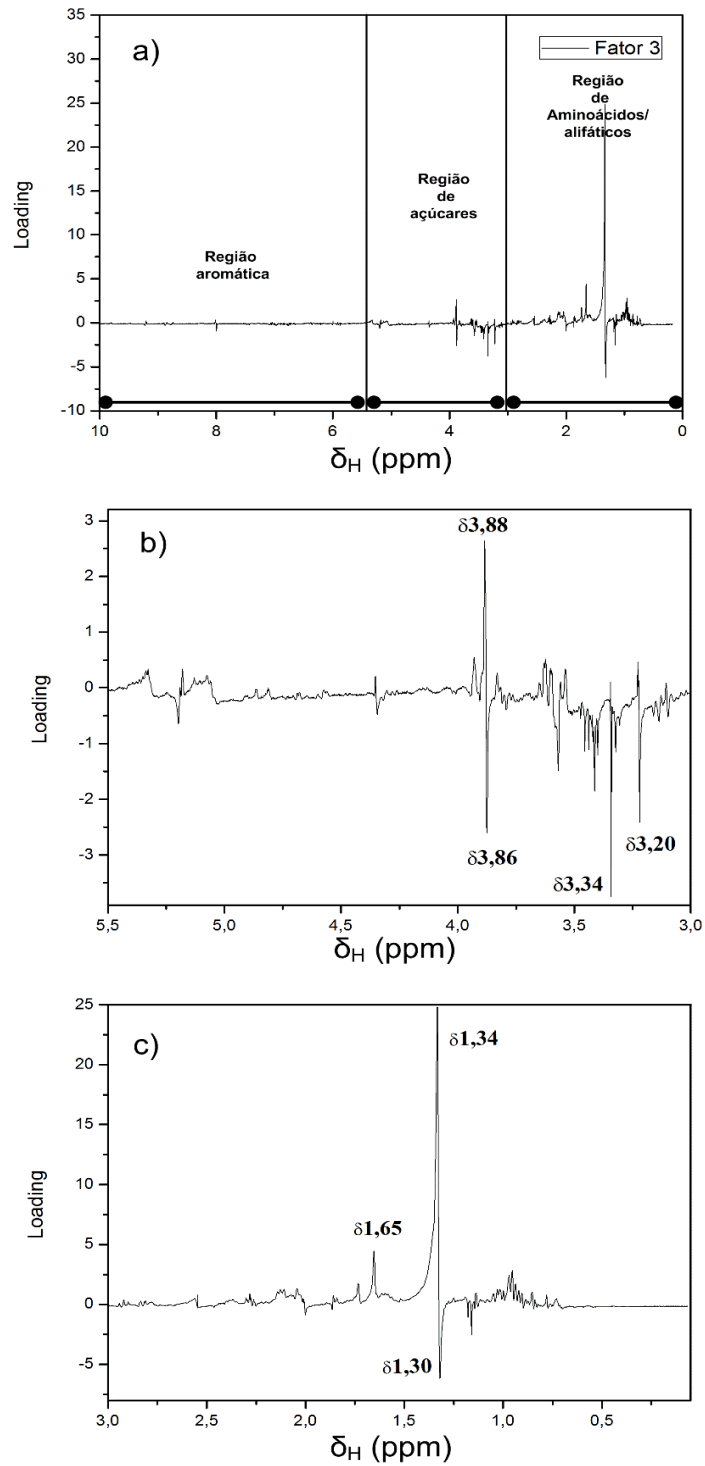


O gráfico dos loadings da análise de fatores para os dados de RMN ^1H para os extratos das folhas coletadas em plantas irrigadas e não irrigadas podem ser divididos em três regiões distintas, sendo regiões de aromáticos (δ 10.0 – 5.5), região de açúcares (δ 5.5 – 3.0) e aminoácidos/compostos alifáticos (δ 3.0 – 0.0) (CALIGIANI et al., 2010; KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, 2010; SHUIB et al., 2011). Na Figura 8, o gráfico do loading do fator 3 mostra maior discriminação nas duas últimas regiões, sendo que este fator é o responsável pela separação das amostras provenientes das diferentes condições de cultivo. Os extratos de folhas cultivadas sob irrigação encontram-se em baixos valores de peso (sentido negativo)

no fator 3 enquanto os extratos de folhas de plantas não irrigadas, tendem para maiores valores positivos neste fator.

De acordo com o gráfico do loading os deslocamentos químicos em δ 1.34 característico do lactato (LIMA et al., 2010), δ 1.65 presente na arginina (KODA et al., 2012) e δ 3.88 característico da metionina (LOCCI et al., 2011) apresentam maiores abundâncias relativas nos extratos de folhas provenientes de plantas não irrigadas. Enquanto para os extratos de folhas de plantas irrigadas, deslocamentos químicos de δ 1.30, 3.20, 3.34 e 3.86 característicos de treonina (KUHNNEN et al., 2010), colina (CALIGIANI et al., 2010), prolina (KODA et al., 2012) e serina (KUHNNEN et al., 2010), respectivamente, apresentam maiores abundâncias relativas para estes extratos.

Figura 8 – Gráfico do loading da análise de fatores para extratos de folhas de *Coffea Arabica* lapar 59 cultivadas sob irrigação e não irrigação para Fator 3. a) Loading (δ 10.0 – 0.0). b) região de açúcares (δ 5.5 – 3.0). c) regiões de aminoácidos/compostos alifáticos (δ 3.0 – 0.0)



A Tabela 3 mostra as razões m/z dos dados da espectrometria de massa de moléculas protonadas (modo positivo ou negativo) característicos dos metabólitos estabelecidos por RMN ^1H para a mistura ternária etanol/diclorometano/hexano para as folhas do cafeeiro irrigado. A presença de massas características juntamente com os deslocamento químicos do RMN permite identificar a presença dos metabólitos nos extratos de interesse. Para os ácidos clorogênicos são encontradas valores $[(M-H)^-, m/z]$ de 325, 337, 353 e 367 característico de isômeros clorogênicos derivados de ácido feruloilquínicos (FQA), ácido cafeoilquínico (CQA) e ácido p-cumaroilquínicos (pCoQA).

Tabela 3 – Moléculas protonadas características (IES-EM) para extrato de misturas ternária (etanol/diclorometano/hexano) de folhas de *Coffea arabica* sob irrigação e deslocamentos químicos característicos de ^1H para cada metabólito

Metabólito	(m/z)	Moléculas des/protonadas	δ (ppm)
Lactato	89	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1.34, 4.22
Alanina	90	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1.52, 3.81
Colina	105	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.20, 4.10
Serina	106	$[\text{M}+\text{H}]^+$	3.88, 4.08
Prolina	116	$[\text{M}+\text{H}]^+$	2.01, 2.32, 3.34, 8.78
Ácido succínico	117	$[\text{M}-\text{H}]^-$	2.56
Treonina	118	$[\text{M}-\text{H}]^-$	1.30, 4.02
Valina	118	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1.08-0.70, 2.27, 3.63
Glutamina	128	$[\text{M}-\text{H}]^-$	2.16
Leucina/ Isoleucina	132	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1.08-0.70
Ácido málico	133	$[\text{M}-\text{H}]^-$	2.66, 2.75, 4.33
Trigonelina	138	$[\text{M}+\text{H}]^+$	8.75, 8.87, 9.22
Metionina	148	$[\text{M}-\text{H}]^-$	2.15, 2.18, 2.66, 3.88
Arginina	175	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1.65, 1.90, 3.23, 3.74, 7.23
α -glucose/ β -glucose	181	$[\text{M}+\text{H}]^+$	5.20/4.61
Ácido Quínico	193	$[\text{M}+\text{H}]^+$	1.90, 1.92, 2.03, 2.04, 3.56, 4.05
Guanosina	284	$[\text{M}+\text{H}]^+$	8.00
Theogallin	345	$[\text{M}+\text{H}]^+$	2.02, 2.15, 2.19, 3.85, 4.22, 5.44, 7.08

A possível presença de lactato nos extratos de folhas de cafeeiros não irrigados pode estar envolvido nas condições de troca de gases pelas vias fisiológicas da planta. Em condições de água insuficiente para a manutenção da planta esta desencadeia o fechamento dos estômatos (MIURA et al., 2013). Os estômatos são responsáveis pelas trocas gasosas e pela transpiração estomática (PILLITTERI; DONG, 2013). Com o fechamento deste, ocorre declínio na taxa de fotossíntese, mas a planta evita a perda de água pela transpiração (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009; RAI, 2002). Em baixos níveis de O_2 a respiração não prossegue pelas vias aeróbicas e processos anaeróbicos começam a ocorrer nas vias metabólicas do piruvato (AHMAD; PRASAD, 2012). O lactato é um destes produtos de processos fermentativos (BAILEY-SERRES; VOESENEK, 2008). O seu acúmulo indica um estresse hipóxico na planta (SOUSA; SODEK, 2002) e em concentração superiores altera o pH do citosol (acidose citosólica) e pode levar a morte celular (VARTAPETIAN; JACKSON, 1997).

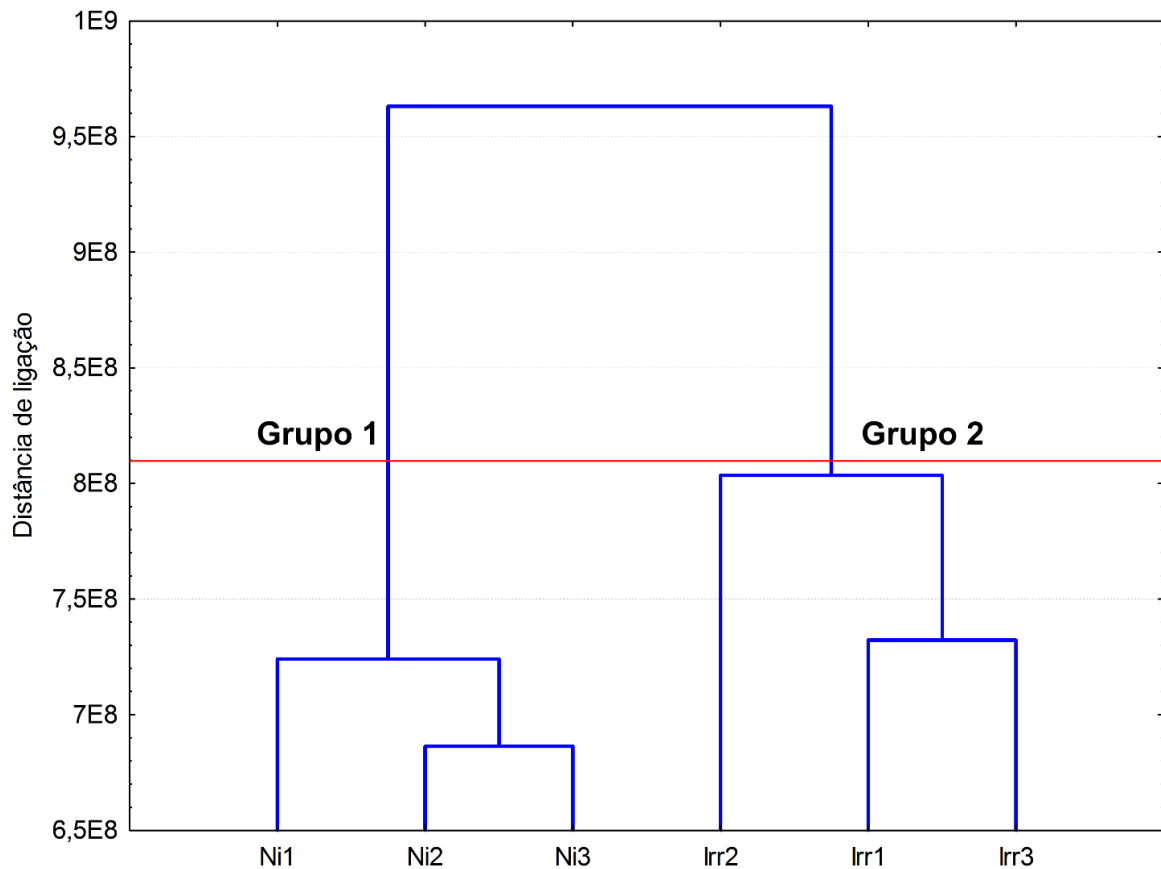
Quanto a arginina, o aumento da abundância relativa em plantas é indício de deficiência de fósforo no metabolismo (RABE; LOVATT, 1984), sendo ainda precursor de metabólitos que são respostas a estresses bióticos e abióticos, como as poliaminas (WINTER et al., 2015). Outro possível metabólito presente dos extratos de folhas de *Coffea arabica* não irrigados é a metionina que é um precursor do etileno em plantas (SAUTER et al., 2013). Os metabólitos da rota de síntese do etileno estão relacionados a fatores estressantes (LYNCH; BROWN, 1997), e na folha exerce função nos processos de senescência e abscisão (BEYER, 1976).

A partir dos espectros e pesos dos loadings das folhas de cafeeiros irrigados ficou evidente que os aminoácidos são majoritários. A regulação de grande parte dos processos fisiológicos é realizado por meio dos aminoácidos (HAYAT et al.,

2012; RAI, 2002). Prolina já foi investigada e verificou-se que sua acumulação está envolvida na disponibilidade de água em folhas de arroz, quanto maior o teor de água, maior o teor de prolina (YANG; WANG; KAO, 2000). A colina, apresenta inúmeras propriedades funcionais inerentes ao vegetal (STOREY; JONES, 1975), sendo que sua biodisponibilidade está envolvida em situações de estresse salino (APSE; BLUMWALD, 2002). Áreas irrigadas são sensíveis a processos de salinização do solo, porém uma série de processos físicos e químicos precisam estar alinhados para ocorrer tal fenômeno, tais como composição da água e manejo da cultura (BOUKSILA et al., 2013). Uma vez salinizado efeitos antagônicos ocorrem no crescimento e desenvolvimento da planta anulando o efeito sinérgico do fornecimento de água (GARRIDO et al., 2014; TRIVELLINI et al., 2014).

Na Figura 7 observa-se que dentre todos os extratos provenientes do planejamento de misturas de solventes como melhor solvente discriminador a mistura ternária é indicada, uma vez que a distância entre os extratos de plantas irrigadas e não irrigadas é maior. As separações dos extratos pela análise de fatores é confirmada pela análise hierárquica apresentada na Figura 9 para as triplicatas da mistura edh. Pelo dendograma dois grupos são formados, sendo o grupo 1 composto pelos espectros dos extratos obtidos das folhas de plantas não irrigadas e o grupo 2 de espectros de extratos de folhas de plantas irrigadas.

Figura 9 – Análise hierárquica para os espectros de RMN ^1H para os extratos de folhas de plantas irrigadas e não irrigadas extraídas com a mistura etanol/diclorometano/hexano

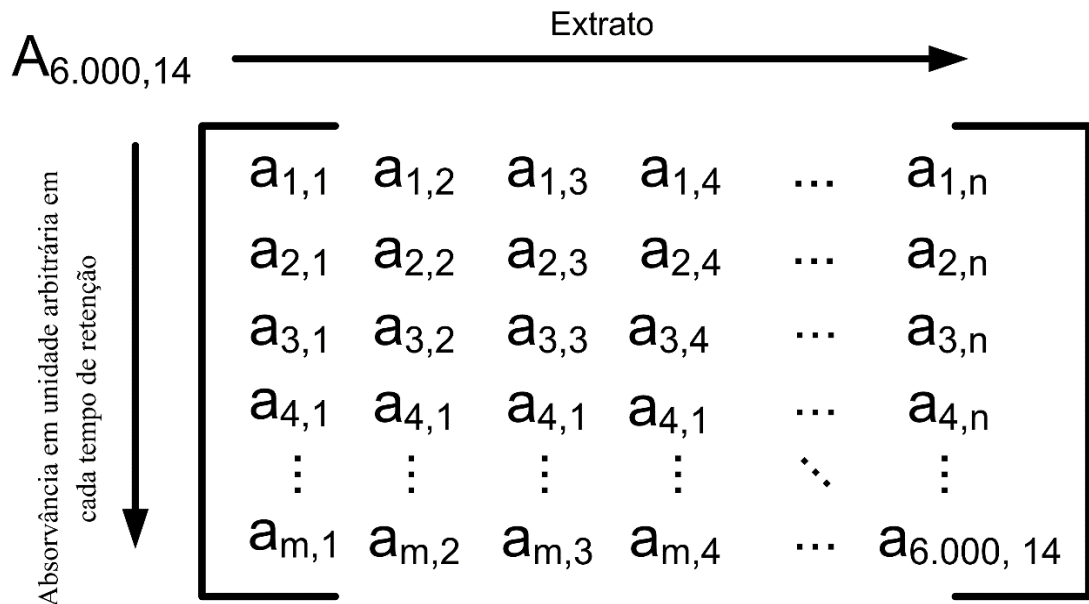


4.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Análise de fatores foi aplicada aos dados de impressão digital cromatográfica para verificar as diferenças no processo de separação entre extratos de folhas de cafeeiros submetidos a condições de irrigação e não irrigação. Os cromatogramas foram organizados em uma matriz de 6.000 linhas e 14 colunas, onde cada linha representa a absorvância em unidade arbitrária em cada tempo de retenção e as colunas os extratos (7 extratos de acordo com o planejamento estatístico de misturas para cada amostra), conforme Figura 10. Estes dados foram sujeitos a

análise de fatores. Os três primeiros fatores explicam 72,75% da variância total dos dados.

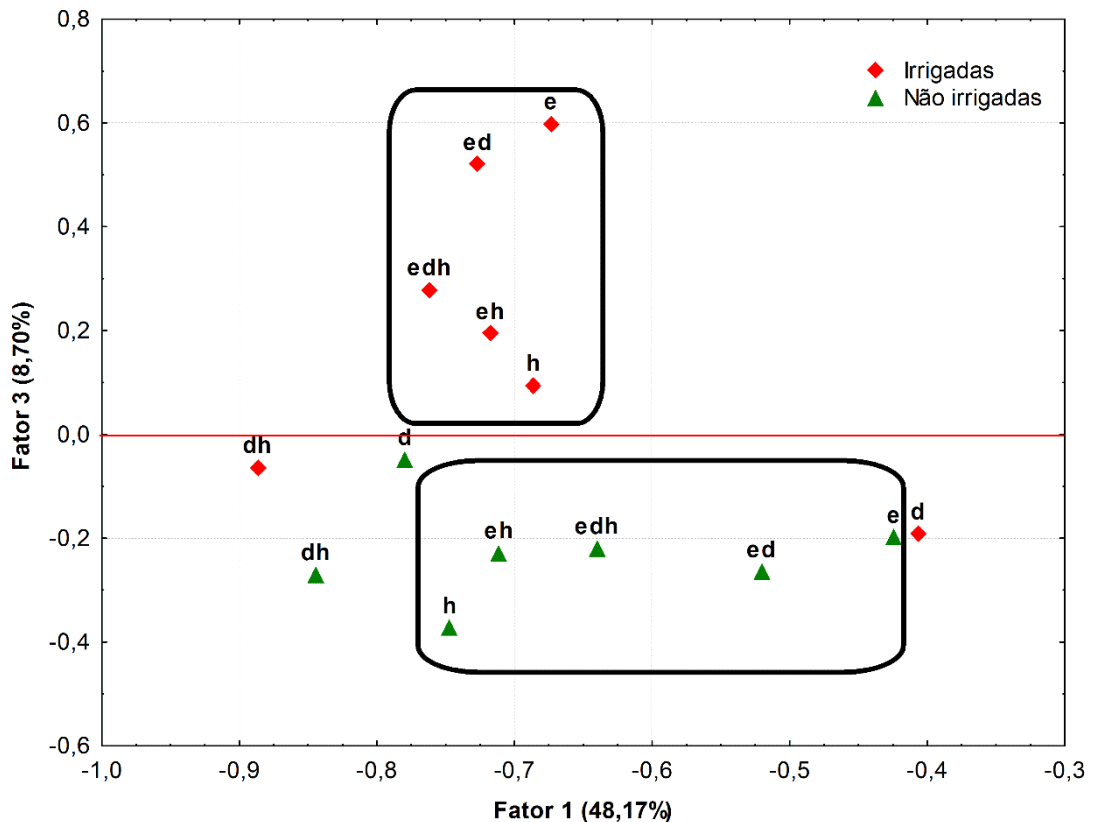
Figura 10 – Representação matricial utilizada na análise de fatores para os dados cromatográficos, linhas representam a absorvância em unidade arbitrária em relação ao tempo de retenção e as colunas representam os extratos



A Figura 11 mostra o gráfico dos escores do Fator 1 vs. Fator 3 responsável por 56,87 % da variação total dos dados. Dois grupos podem ser identificados com características distintas diante do Fator 3. No escore positivo encontram-se os cromatogramas dos extratos do cafeeiro irrigado com os respectivos solventes extratores: e, h, eh, ed e edh. No escore negativo encontram-se todos os cromatogramas dos extratos das amostras do cafeeiro não irrigado. Como solvente extrator discriminante, a mistura diclorometano/hexano não pode ser usada para esta finalidade, uma vez que os cromatogramas destes extratos para a planta irrigada e não irrigada se encontram na mesma região deste fator. Assim, os solventes puros etanol e hexano, as misturas binárias etanol/hexano e etanol/diclorometano e mistura ternária etanol/diclorometano/hexano são os

solventes extratores ideais para discriminar o conjunto de extratos provenientes da planta mediante a separação cromatográfica.

Figura 11 – Gráficos dos escores da análise de fatores para os dados cromatográficos para extratos de folhas de cafeeiros sob irrigação e não irrigação



4.3 OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO PARA FEOFITINA A E α -CAROTENO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS

Considerando que os pigmentos juntamente com os lipídios foram os metabólitos majoritários na diferença da média dos espectros de RMN ^1H para a planta irrigada e não irrigada, investigou-se a presença de espectros com perfis característicos de pigmentos em todos os extratos após a análise cromatográfica. Observou-se a presença de dois perfis espectrais em todos os extratos, porém com abundâncias relativas distintas, conforme Figuras 12 e 13.

Figura 12 – Conjunto de perfis espectrais para feofitina a obtido por HPLC-DAD de acordo com o planejamento estatístico de misturas de três componentes

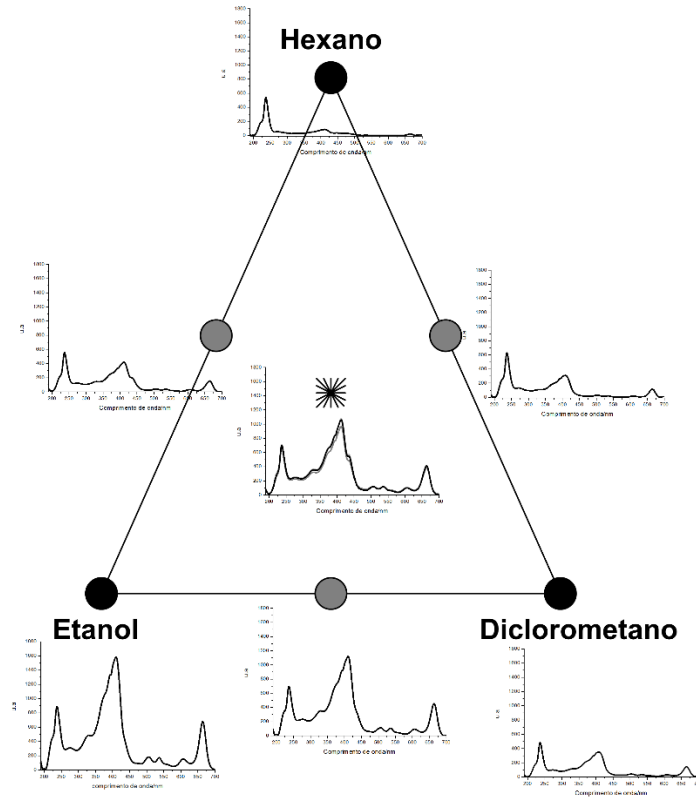
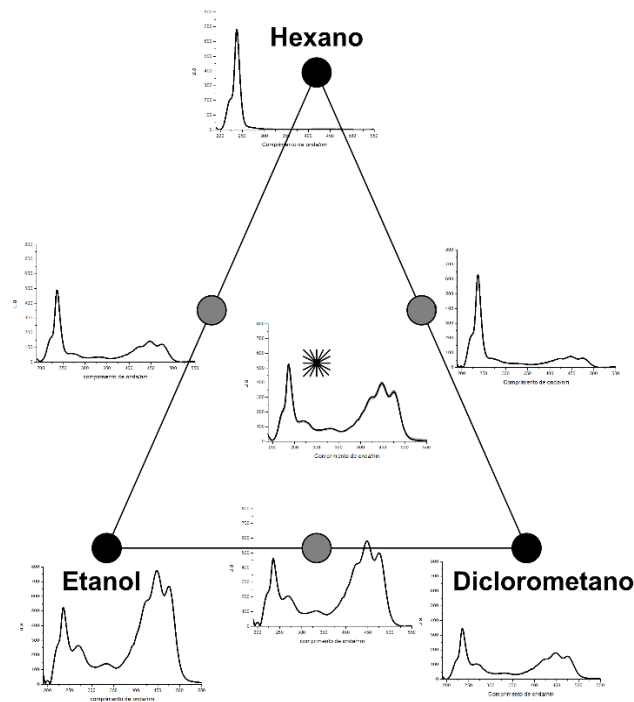


Figura 13 – Conjunto de perfis espectrais para α -caroteno obtido por HPLC-DAD de acordo com o planejamento estatístico de misturas de três componentes

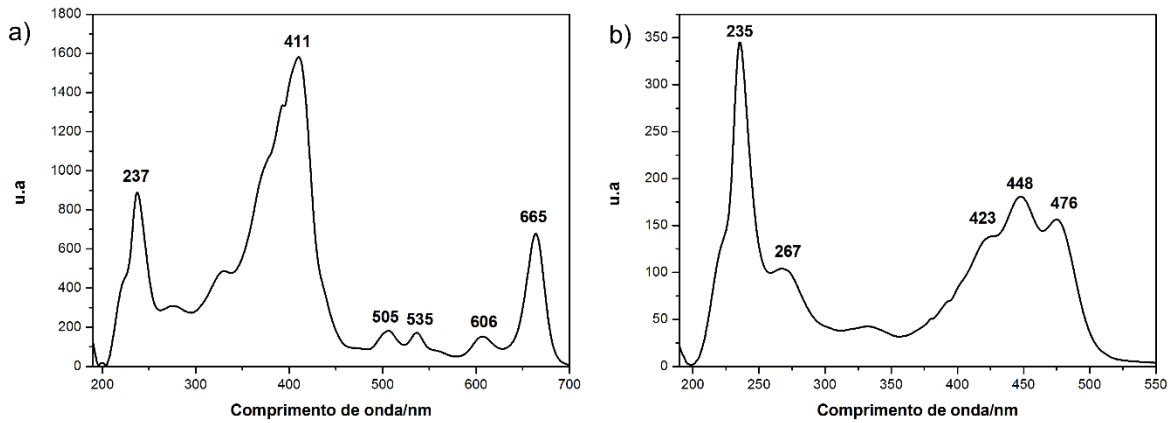


O primeiro espectro presente na Figura 14a apresenta absorvâncias em 237, 411, 505, 535, 606 e 665 nm característicos de feofitina *a*, sendo produto de degradação da clorofila *a*. (PAULI; BRUNS; SPACINO, 2016). O segundo espectro (Figura 14b) apresenta absorvâncias em 235, 267, 423, 448, 476 nm característico de α -caroteno (TAKAICHI, 2000).

Para avaliar o efeito do solvente extrator sobre a abundância relativa dos respectivos metabólitos foi utilizada a absorvância nos comprimentos de onda em 665 e 448 nm para feofitina *a* e α -caroteno, respectivamente. As intensidades em unidades arbitrárias foram normalizadas pelo valor máximo dos elementos, de acordo com a equação 3:

$$f(x) = \frac{x}{\text{máximo}} \quad \text{Eq. 3}$$

Figura 14 – Caracterização espectral por bandas de absorção para a) feofitina a e b) α -caroteno obtidos por separação por HPLC-DAD



Com os dados normalizados, os valores foram analisados em conjunto em função da composição do solvente extrator para otimizar a extração dos pigmentos. Modelos lineares, quadráticos e cúbicos foram avaliados, sendo que os dois primeiros apresentaram falta de ajuste para o modelo estabelecido. A significância da regressão para o modelo cúbico especial foi feita através da ANOVA, de acordo com a Tabela 4. No nível de 95 % de confiança para ambas as regressões $F_{cal} > F_{crit}$, considerando significativas as regressões. Para a falta de ajuste do modelo $F_{cal} < F_{crit}$, assim não apresentam falta de ajuste.

Tabela 4 – ANOVA para a regressão do modelo cúbico especial para a absorvância normalizada de espectros de feofitina *a* e α -caroteno de acordo com o planejamento estatístico de misturas

<i>Equação</i>	<i>Fonte de variação</i>	<i>SQ</i>	<i>g. l.</i>	<i>MQ</i>	<i>F_{cal}</i>
1	Regressão	0,7665	4	0,1916	171,5384
	Resíduos	0,0045	4	0,0012	
	Falta de ajuste	0,0039	2	0,001934	6,4476
	Erro Puro	0,00060	2	0,0003	
	Total	0,7710	8	0,0963	
	% de variação explicada	99,42			
	% máxima de variação explicável	99,92			
2	Regressão	0,8315	5	0,1663	662,3620
	Resíduos	0,0007	3	0,0003	
	Falta de ajuste	0,0004	1	0,0004	2,1159
	Erro Puro	0,0004	2	0,0002	
	Total	0,8322	8	0,1040	
	% de variação explicada	99,92			
	% máxima de variação explicável	99,95			

Valores da distribuição F no nível de 95% de confiança para os modelos quadrático e cúbico especial: $F_{4,4,5\%} = 6,39$; $F_{5,3,5\%} = 9,01$; $F_{2,2,5\%} = 19,00$; $F_{1,2,5\%} = 18,51$.

Os modelos cúbicos para feofitina *a* e α -caroteno são respectivamente:

$$\hat{y}_{\text{feofitina } a} = 1,0194e + 0,2428d + 0,0434h - 1,2057eh + 7,7957edh \quad \text{Eq. 4}$$

$(\pm 0,0304)$ $(\pm 0,0282)$ $(\pm 0,0304)$ $(\pm 0,1598)$ $(\pm 0,7050)$

$$\hat{y}_{\text{alfa-caroteno}} = 1,0000e + 0,2260d + 0,0003h + 0,5401ed - 1,2674eh + 4,8399edh \quad \text{Eq. 5}$$

$(\pm 0,0158)$ $(\pm 0,0144)$ $(\pm 0,0144)$ $(\pm 0,0765)$ $(\pm 0,0765)$ $(\pm 0,3722)$

Para feofitina dentre as misturas binárias somente o extrator etanol/hexano é significativo, possuindo coeficiente negativo, que sugere efeito antagônico no processo extrativo. Dentre os puros etanol e diclorometano são significativos. Para o α -caroteno os coeficientes das misturas binárias etanol/diclorometano e etanol/hexano são significativos, sendo que este último apresenta também efeito antagônico. Os coeficientes lineares etanol e diclorometano foram significativos. Para ambos, os coeficientes da mistura ternária foi significativo. Os erros padrões estimados para os modelos estão entre parênteses abaixo de cada coeficiente. Ambos os metabólitos apresentam comportamentos semelhantes frente a extração pelos solventes, tendo maior abundância relativa os extratos preparados em etanol. Assim, as superfícies de resposta devem ter comportamento similar, como é visto nas Figuras 15 e 16.

As superfícies são mostradas em função dos solventes extratores: etanol, hexano e diclorometano. As curvas preveem rendimentos máximos quando utilizado etanol puro como solvente extrator, ou misturas com maior volume de etanol.

Figura 15 – Curva de nível para abundância relativa de feofitina *a* obtida através da absorvância normalizada à 665 nm dos espectros de absorção DAD obtidos por separação por HPLC

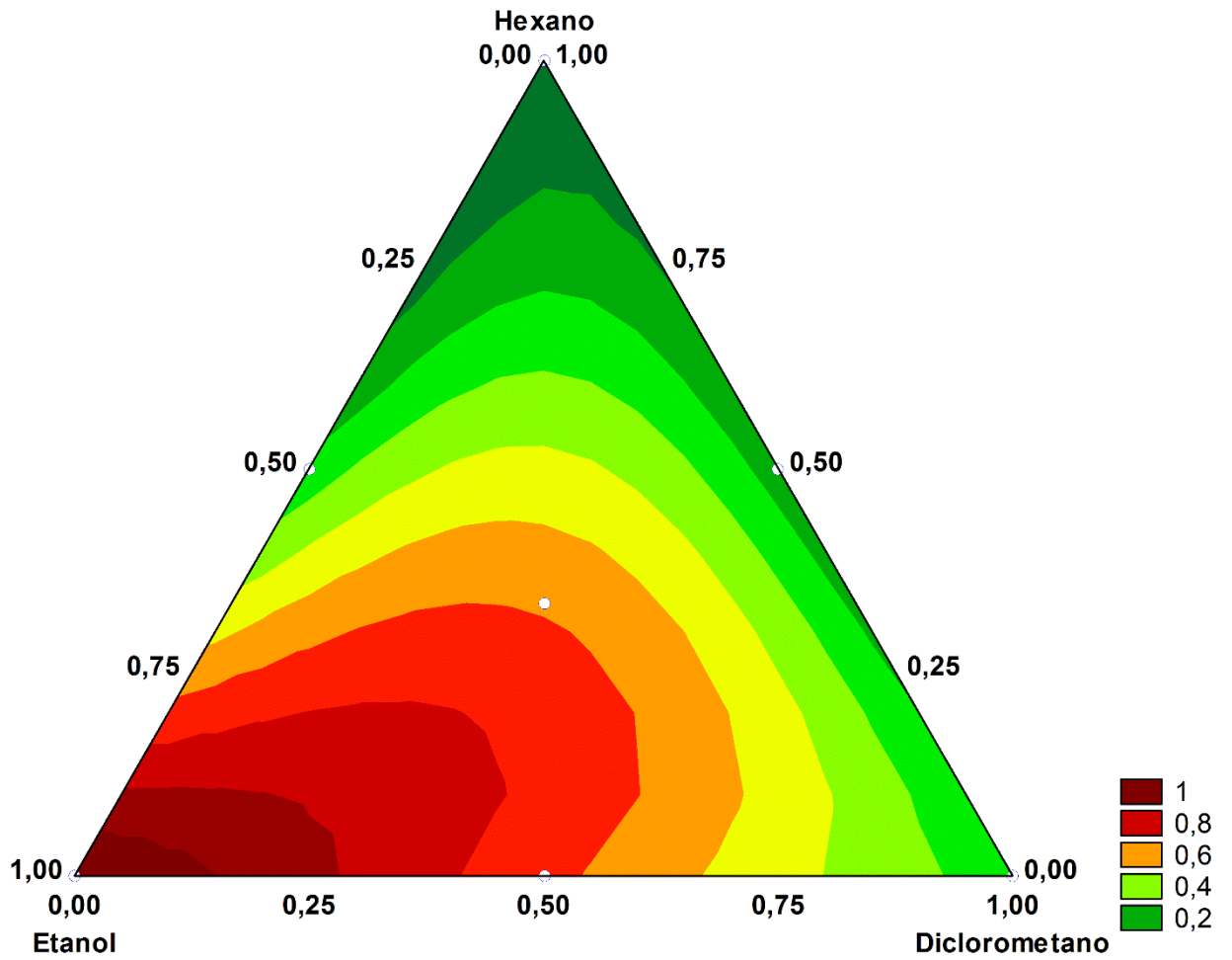
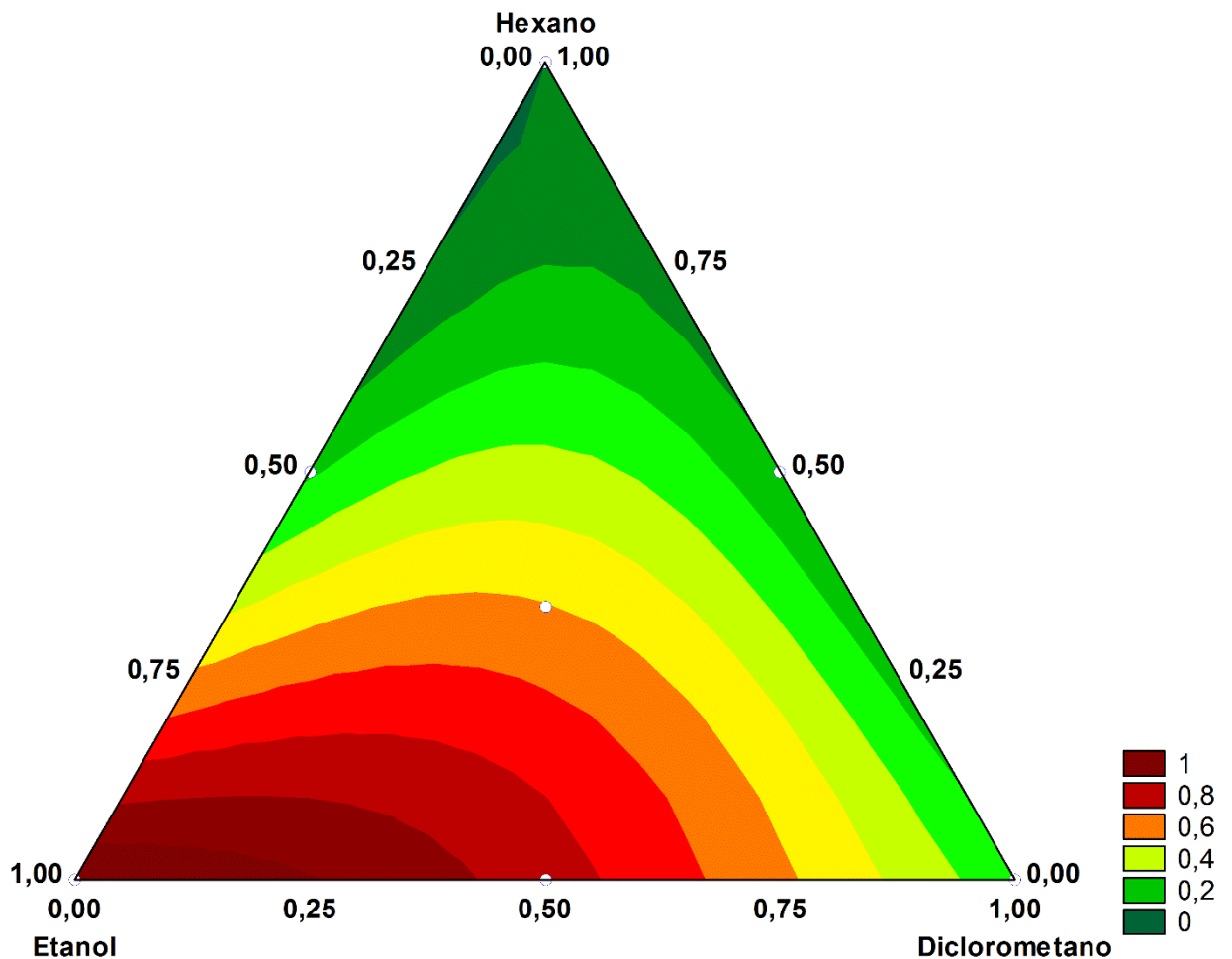


Figura 16 – Curva de nível para abundância relativa de α -caroteno a obtida através da absorvância normalizada à 448 nm dos espectros de absorção DAD obtidos por separação por HPLC

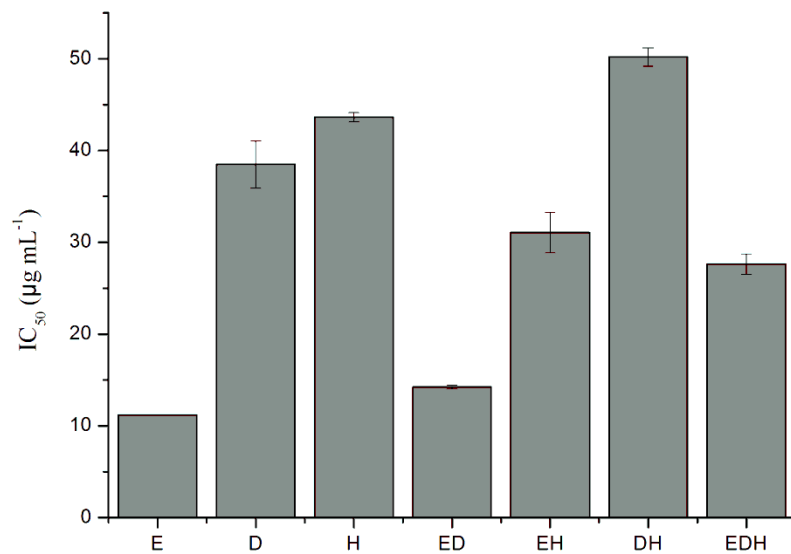


Considerando que os pigmentos são frações não fenólicas, mas possuem propriedades antioxidantes promissoras (MANIMALA; MURUGESAN, 2014; MEKNI et al., 2013), determinou-se a atividade antioxidante pelo método DPPH nos extratos de *Coffea arabica* para a planta irrigada.

A Figura 17 mostra o efeito da composição do sistema extrator sobre a inibição de DPPH (IC_{50}) para os extratos das folhas de *Coffea arabica* cultivar lapar 59. Analisando o efeito do solvente, o extrato da mistura diclorometano/hexano (1:1) foi o que apresentou pior capacidade antioxidante, seguido dos extratos em diclorometano e hexano puros. A melhor atividade antioxidante é obtida pelo extrato

etanólico seguida da mistura etanol/diclorometano (1:1). A maior abundância relativa de pigmentos não fenólicos no extrato etanólico pode ser uma das atribuições a melhor capacidade antioxidante.

Figura 17 – Concentrações que causam 50 % de inibição de DPPH (IC_{50}) para cada extrato de folhas de *Coffea arabica* cv. Iapar 59 sob irrigação de acordo com o planejamento estatístico de misturas



Assim, a capacidade antioxidante para os extratos obtidos com o solvente etanol puro foi comparado entre as plantas irrigadas e não irrigadas. O extrato da planta não irrigada apresentou capacidade antioxidante de $19,82 \pm 0,04 \mu\text{g mL}^{-1}$ e para a planta irrigada de $11,18 \pm 0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$. Comparando as médias experimentais, obtém-se $t_{\text{calc}} = 252$ e $t_{4,95\%} = 2,78$, sendo assim $t_{\text{calc}} > t_{\text{crit}}$, o que sugere que as médias da capacidade antioxidante para IC_{50} tem diferença significativa entre si.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO



5 CONCLUSÃO

O perfil químico de extratos de folhas de cafeeiros expostos a diferentes condições de manejo, foi discriminado por meio da impressão digital metabolômica associada a análise multivariada.

A impressão digital por ressonância magnética nuclear mostrou que as abundâncias relativas de pigmentos e lipídios são anticorrelacionados. A impressão digital obtida com o extrato preparado com a mistura ternária (etanol/diclorometano/hexano) foi o melhor discriminador entre as folhas de cafeeiros irrigados e não irrigados. O gráfico do loading mostrou que os aminoácidos foram os principais metabólitos para diferenciação dos extratos. A planta não irrigada mostrou indícios de processos anaeróbicos, de envelhecimento e deficiência nutricional, justificado por sinais característicos de metabólitos como lactato, metionina e arginina, cujo efeito é antagônico ao desenvolvimento da planta. O processo de irrigação aumenta o estresse salino com a presença de sinais característico de colina. Por outro lado diminui os níveis de metabólitos antagônicos, o que sugere melhor desenvolvimento da planta ao ambiente.

A otimização por superfície de resposta mostrou que o maior rendimento de feofitina *a*, α -caroteno e atividade antioxidante total, foram obtidos em extratos preparados em etanol. O cafeeiro irrigado apresentou melhor capacidade antioxidante total quando comparado com o cafeeiro não irrigado.

CAPÍTULO 6

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 2, p. 414–420, 2010.
- AFONSO, S. et al. Seasonal effects on HPLC-DAD-UV and UPLC-ESI-MS fingerprints and analgesic activities of *Vernonia condensata* baker extracts. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 2, p. 350–358, 2015a.
- AFONSO, S. et al. Discrimination of *Annona muricata* and *Rollinia mucosa* extracts by using multivariate curve resolution and partial least-squares regression of liquid chromatography-diode array data. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, n. 11, p. 2241–2248, 2015b.
- AHMAD, P.; PRASAD, M. N. V. **Abiotic Stress Responses in Plants: Metabolism, Productivity and Sustainability**. 1th. ed. New York: Springer New York, 2012.
- APSE, M. P.; BLUMWALD, E. Engineering salt tolerance in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 146–150, 2002.
- BAILEY-SERRES, J.; VOESENEK, L. A. C. J. Flooding Stress: Acclimations and Genetic Diversity. **Annu. Rev. Plant Biol**, v. 59, p. 313–39, 2008.
- BEINING, A. M. **Ecophysiological diversity of wild Coffea arabica populations in Ethiopia: Drought adaptation mechanisms**. [s.l.] der Rheinischen Friedrich-Wilherlms-Universität Bonn, 2007.
- BEYER, E. M. A potent inhibitor of ethylene action in plants. **Plant physiology**, v. 58, n. 3, p. 268–271, 1976.
- BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199–1200, 1958.

BOSCO, M. et al. High-resolution ^1H NMR investigation of coffee. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 6, p. 869–878, 1999.

BOUKSILA, F. et al. Assessment of soil salinization risks under irrigation with brackish water in semiarid tunisia. **Environmental and Experimental Botany**, v. 92, p. 176–185, 2013.

BRERETON, R. G. **Applied Chemometrics for Scientists**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2007.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. DE B. **Statistical design — Chemometrics**. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, 2006.

BUNN, C. et al. Multiclass classification of agro-ecological zones for arabica coffee: An improved understanding of the impacts of climate change. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.

CALIGIANI, A. et al. ^1H NMR fingerprinting of soybean extracts, with emphasis on identification and quantification of isoflavones. **Nutrients**, v. 2, n. 3, p. 280–289, 2010.

CAMARGO, Â. P. DE; CAMARGO, M. B. P. DE. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Agrometeorologia**, v. 60, n. 1, p. 65–68, 2001.

CAVATTE, P. C. et al. Functional analysis of the relative growth rate , chemical composition , construction and maintenance costs , and the payback time of *Coffea arabica* L . leaves in response to light and water availability. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 8, p. 3071–3082, 2012.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009.

CHEMURA, A. et al. Bioclimatic modelling of current and projected climatic suitability of coffee (*Coffea arabica*) production in Zimbabwe. **Regional Environmental Change**, v. 16, n. 2, p. 473–485, 2016.

DAVIS, A. P. et al. The Impact of Climate Change on Indigenous Arabica Coffee (*Coffea arabica*): Predicting Future Trends and Identifying Priorities. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–13, 2012.

DE SOUZA, C. R. et al. Control of stomatal aperture and carbon uptake by deficit irrigation in two grapevine cultivars. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 106, n. 2–3 SPEC. ISS., p. 261–274, 2005.

DENNIS, E. S. et al. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. **Journal of experimental botany**, v. 51, n. 342, p. 89–97, 2000.

GALL, G. LE; COLQUHOUN, I. J.; DEFERNEZ, M. Metabolite profiling using ¹H NMR spectroscopy for quality assessment of green tea, *Camellia sinensis* (L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 692–700, 2004.

GARRETA-LARA, E. et al. Metabolic profiling of *Daphnia magna* exposed to environmental stressors by GC–MS and chemometric tools. **Metabolomics**, v. 12, n. 5, p. 1–14, 2016.

GARRIDO, Y. et al. Physiological, phytochemical and structural changes of multi-leaf lettuce caused by salt stress. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 8, p. 1592–1599, 2014.

HAMERLY, T. et al. Untargeted metabolomics studies employing NMR and LC-MS reveal metabolic coupling between *Nanoarchaeum equitans* and its archaeal host *Ignicoccus hospitalis*. **Metabolomics**, v. 11, p. 895–907, 2015.

HÄRDLE, W.; SIMAR, L. **Applied Multivariate Statistical Analysis**. 1. ed. Berlin: Method e Data Technologies, 2003.

HAYAT, S. et al. Role of proline under changing environments: a review. **Plant signaling & behavior**, v. 7, n. 11, p. 1–11, 2012.

HENDRIKS, M. M. W. B. et al. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, n. 1, p. 53–64, 2005.

JUSTO, R. et al. Open column, reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection and chemometric strategy for investigation of metabolic fingerprints of complex systems. **Anal. Methods**, v. 6, n. 24, p. 9567–9574, 2014.

KIM, H. K.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R. NMR-based metabolomic analysis of plants. **Nat. Protoc.**, v. 5, n. MARCH 2010, p. 536–549, 2010.

KITZBERGER, C. S. G.; SCHOLZ, M. B. DOS S.; BENASSI, M. DE T. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. **Food Research International**, v. 61, p. 61–66, 2014.

KODA, M. et al. NMR-based metabolic profiling of rice wines by F 2-selective total correlation spectra. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 19, p. 4818–4825, 2012.

KUHNEN, S. et al. Metabolic fingerprint of Brazilian maize landraces silk (stigma/styles) using NMR spectroscopy and chemometric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 4, p. 2194–2200, 2010.

LASHERMES, P. et al. Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 261, n. 1, p. 259–266, 1999.

LIMA, M. R. M. et al. NMR metabolomics of esca disease-affected *Vitis vinifera* cv. Alvarinho leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 14, p. 4033–4042, 2010.

LIMA, R. B. et al. Heat stress causes alterations in the cell-wall polymers and anatomy of coffee leaves (*Coffea arabica* L.). **Carbohydrate Polymers**, v. 93, n. 1, p. 135–143, 2013.

LOCCI, E. et al. ¹H NMR metabolite fingerprint and pattern recognition of mullet (*Mugil cephalus*) bottarga. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 17, p. 9497–9505, 2011.

LYNCH, J.; BROWN, K. M. Ethylene and plant responses to nutritional stress. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 3, p. 613–619, 1997.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: an overview. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139–58, 2005.

MANIMALA, M. R. A.; MURUGESAN, R. In vitro antioxidant and antimicrobial activity of carotenoid pigment extracted from *Sporobolomyces sp.* isolated from natural source. **Journal of Applied and Natural Science**, v. 6, n. 2, p. 649–653, 2014.

MARTINS, L. D. et al. Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea spp.* plants. **Climatic Change**, v. 126, p. 365–379, 2014.

MEKNI, M. et al. Phenolic , non-phenolic compounds and antioxidant activity of pomegranate flower , leaf and bark extracts of four Tunisian cultivars. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 17, p. 1100–1107, 2013.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 6. ed. England: Pearson, 2010.

MIURA, K. et al. SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis*. **Plant Journal**, v. 73, n. 1, p. 91–104, 2013.

MOREIRA, I.; SCARMINIO, I. S. Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. **Talanta**, v. 107, p. 416–22, 30 mar. 2013.

OVALLE-RIVERA, O. et al. Projected shifts in *Coffea arabica* suitability among major global producing regions due to climate change. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–14, 2015.

PAULI, E. D.; BRUNS, E.; SPACINO, I. UV-Vis spectral fingerprinting and chemometric method applied to the evaluation of *Camellia sinensis* leaves from different harvests. **Analytical Methods**, v. 8, p. 7537–7544, 2016.

PAULI, E. D.; SCARMINIO, I. S.; TAULER, R. Analytical investigation of secondary metabolites extracted from *Camellia sinensis* L. leaves using a HPLC-DAD-ESI/MS data fusion strategy and chemometric methods. **Journal of Chemometrics**, v. 30, n. 2, p. 75–85, 2016.

PILLITTERI, L. J.; DONG, J. Stomatal Development in *Arabidopsis*. **American Society of Plant Biologists**, v. 11, n. 1, p. 2–26, jan. 2013.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance in relation to protection against oxidative stress in clones of *Coffea canephora* subjected to long-term drought. **Plant Science**, v. 167, n. 6, p. 1307–1314, 2004.

PINHEIRO, H. A. et al. Drought tolerance is associated with rooting depth and stomatal control of water use in clones of *Coffea canephora*. **Annals of Botany**, v. 96, n. 1, p. 101–108, 2005.

RABE, E.; LOVATT, C. J. De novo arginine biosynthesis in leaves of Phosphorus-Deficient Citrus and Poncirus species. **Plant Physiology**, v. 76, n. 3, p. 747–752, 1984.

RAI, V. K. Role of amino acids in plant responses to stresses. **Biologia Plantarum**, v. 4, p. 481–487, 2002.

SANTANA, M. S.; OLIVEIRA, C. A. DA S.; QUADROS, M. Crescimento inicial de duas cultivares de cafeeiro adensado influenciado por níveis de irrigação localizada. **Engenharia Agrícola**, v. 24, n. 3, p. 644–653, 2004.

SANTOS, T. B. DOS et al. Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 49, n. 4, p. 441–448, 2011.

SAUTER, M. et al. Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. **The Biochemical Journal**, v. 451, n. 2, p. 145–154, 2013.

SCHEEL, G. L. et al. Environmental stress evaluation of *Coffea arabica* L. leaves from spectrophotometric fingerprints by PCA and OSC–PLS–DA. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016.

SERA, G. H. et al. Selection for Durable Resistance to Leaf Rust using Test- Crosses on IAPAR-59 and Tupi IAC 1669-33 cultivars of *Coffea arabica*. **Brazilian Archives of biology and technology**, v. 50, n. 4, p. 565–570, 2007.

SERA, G. H. et al. Resistência à ferrugem alaranjado em cultivares de café. **Coffee Science**, v. 5, n. 1, p. 59–66, 2010a.

SERA, G. H. et al. Seleção para a resistência em progênies das cultivares de café IPR 99 e IPR 107. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 547–554, 2010b.

SHUIB, N. H. et al. Discrimination of young and mature leaves of *Melicope ptelefolia* using ¹H NMR and multivariate data analysis. **Food Chemistry**, v. 126, n. 2, p. 640–645, 2011.

SINGH, S. Isolation and identification of pigment molecules from leaves of *Prosopis juliflora*. **International research journal of pharmacy**, v. 3, n. 4, p. 150–152, 2012.

SNYDER, L. R.; CARR, P. W.; RUTAN, S. C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. **Journal of Chromatography A**, v. 656, n. 1–2, p. 537–547, 1993.

SOARES, D. X.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Mixture designs for exploring class diversity and metabolite fingerprinting: An efficient column chromatographic strategy. **Analytica Chimica Acta**, v. 702, n. 2, p. 288–294, 2011.

SOARES, P. K.; SCARMINIO, I. S. Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus *Bauhinia*. **Phytochemical Analysis**, v. 19, n. 1, p. 78–85, 2008.

SOUSA, C. A. F. DE; SODEK, L. The metabolic response of plants to oxygen deficiency. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 14, n. 142, p. 83–94, 2002.

STOREY, R.; JONES, R. G. W. Betaine and choline levels in plants and their relationship to NaCl stress. **Plant Science Letters**, v. 4, p. 161–168, 1975.

TAKAICHI, S. Characterization of carotenes in a combination of a C18 HPLC column with isocratic elution and absorption spectra with a photodiode-array detector. **Photosynthesis Research**, v. 65, p. 93–99, 2000.

TERRILE, A. E. et al. Chemometric Analysis of UV Characteristic Profile and Infrared Fingerprint Variations of *Coffea arabica* Green Beans under Different Space Management Treatments. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 7, p. 1254–1263, 2016.

TRIVELLINI, A. et al. Effect of salt stress in the regulation of anthocyanins and color of Hibiscus flowers by digital image analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 6966–6974, 2014.

UAWISETWATHANA, U. et al. Quantitative ¹H NMR metabolome profiling of Thai Jasmine rice (*Oryza sativa*) reveals primary metabolic response during brown planthopper infestation. **Metabolomics**, v. 11, n. 6, p. 1640–1655, 2015.

VARTAPETIAN, B. B.; JACKSON, M. B. Plant adaptations to anaerobic stress. **Annals of botany**, v. 79, p. 3–20, 1997.

VILLERS, L. et al. Impactos del cambio climático en la floración y desarrollo del fruto del café en Veracruz, Mexico. **Interciencia**, v. 34, n. 5, p. 322–329, 2009.

WEI, F. et al. Complex mixture analysis of organic compounds in green coffee bean extract by two-dimensional NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 857–865, 2010.

WINTER, G. et al. Physiological implications of arginine metabolism in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. July, p. 1–14, 2015.

YAMAGUCHI, T.; BLUMWALD, E. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 12, p. 615–620, 2005.

YANG, C. W.; WANG, J. W.; KAO, C. H. The relation between accumulation of abscisic acid and proline in detached rice leaves. **Biologia Plantarum**, v. 43, n. 2, p. 301–304, 2000.

ZULLO, J. et al. Potential for growing Arabica coffee in the extreme south of Brazil in a warmer world. **Climatic Change**, v. 109, n. 3–4, p. 535–548, 2011.