



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FILIPPE CORRÊA GUIZELLINI

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE *Coffea arabica* POR
MÉTODO PARAFAC E ESTUDO MICROBIOLÓGICO**

Londrina
2015

FILIFE CORRÊA GUIZELLINI

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE *Coffea arabica* POR
MÉTODO PARAFAC E ESTUDO MICROBIOLÓGICO**

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

Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino
Scarminio

Coorientadora: Profa. Dra. Patricia Kaori
Soares

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G969a Guizellini, Filipe Corrêa.
Análise exploratória de *Coffea arabica* por método PARAFAC e estudo microbiológico / Filipe Corrêa Guizellini. – Londrina, 2015.
82 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.
Coorientador: Patricia Kaori Soares.
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. Fungos – Culturas e meios de culturas – Teses. 4. Método de decomposição – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Soares, Patricia Kaori. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

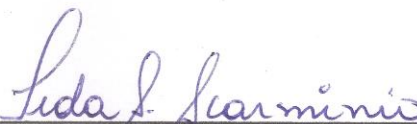
CDU 543.42

FILIPPE CORRÊA GUIZELLINI

**ANÁLISE EXPLORATÓRIA DE *Coffea arabica* POR MÉTODO
PARAFAC E ESTUDO MICROBIOLÓGICO**

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

BANCA EXAMINADORA

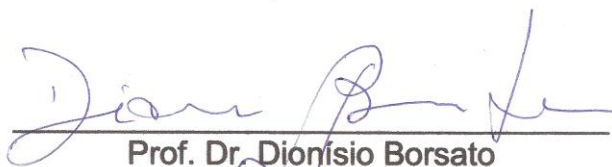


Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino
Scarminio

Universidade Estadual de Londrina - UEL



Prof. Dr. Roy Edward Bruns
Universidade Estadual de Campinas -
UNICAMP



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

Londrina, 30 de março de 2015.

Dedico este trabalho às professoras orientadora, Ieda Spacino Scarminio, coorientadora, Patricia Kaori Soares, e Maria Inês Rezende.

AGRADECIMENTOS

Agradeço às orientadoras não só pela orientação neste trabalho, mas sobretudo pela acolhida, amizade, compreensão e competência.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química.

Aos técnicos e colaboradores dos laboratórios de Química e Bioquímica.

Aos amigos dos laboratórios de Quimiometria em Ciências Naturais e aos do de Bioquímica.

Aos membros da banca, professores Dr. Roy E. Bruns e Dr. Dionísio Borsato, por terem aceito o convite e pela disposição.

Aos órgãos, CAPES, CNPq, Fundação Araucária, IAPAR e ao Consórcio Pesquisa Café, que apoiaram, financiaram e depositaram confiança no projeto.

Gostaria de agradecer também ao meu pai, Marcelo, minha mãe, Sandra e meu irmão, Rodrigo, que contribuíram com incentivos, carinho, compreensão e muita persistência.

À uma pessoa muito especial que sempre acreditou em mim e que, com palavras de amor e amizade, me motivou até o fim. Obrigado Polyana.

“Na ciência as idéias frequentemente surgem bem antes da tecnologia necessária para explorá-las.”
(BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

GUIZELLINI, Filipe Corrêa. **Análise exploratória de *Coffea arabica* por método PARAFAC e estudo microbiológico**. 2015. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Duas cultivares de *Coffea arabica*, Bourbon e IPR101 foram analisadas. Os extratos foram preparados com base em um planejamento experimental do tipo centroide simplex com 4 componentes, etanol, acetato de etila, diclorometano e hexano e analisados por HPLC-DAD. Os dados tridimensionais obtidos foram decompostos pelo método PARAFAC. Para as duas cultivares o melhor modelo PARAFAC apresentou 3 fatores. Em ambos os casos o fator 1 conseguiu discriminar os extratos obtidos em acetato de etila, cujo perfil espectrofotométrico ainda não foi identificado. O fator 2 indicou que os extratos em etanol puro e suas misturas binárias foram mais eficientes na extração dos ácidos clorogênicos enquanto que o fator 3 permitiu identificar a cafeína e trigonelina, sendo a maior concentração nas misturas *edh* e *eadh* para as cultivares Bourbon e IPR101, respectivamente. A microflora natural do *C. arabica* foi isolada e purificada, entretanto não notou-se a degradação da cafeína no meio específico. Observou-se que as condições são desfavoráveis para o crescimento dos microrganismos em meio contendo cafeína. A análise espectrofotométrica na região do UV-vis confirmou que não houve degradação da cafeína. A cultivar Bourbon apresentou uma microflora de fácil isolamento em meios comuns para fungos filamentosos, bactérias e leveduras em relação a IPR101. Esta última é uma cultivar melhorada vegetalmente portanto mais resistente.

Palavras-chave: Cultivares de *Coffea*. Métodos de decomposição. Planejamento de misturas. HPLC-DAD. Cafeína demetilase. Espectros UV-Vis.

GUIZELLINI, Filipe Corrêa. **PARAFAC HPLC-DAD exploratory analysis of *Coffea arabica* and microbiological study**. 2015. 82 p. Dissertation (Master in Chemistry) - State University of Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Two cultivars of *Coffea arabica*, Bourbon and IPR101 were analyzed. The extracts were prepared according to a simplex centroid design with four components, ethanol, ethyl acetate, dichloromethane, and hexane. Multiway data were obtained by HPLC-DAD analysis of the fifteen different mixtures. The PARAFAC method was used to investigate the chromatographic fingerprint. For both cultivars a PARAFAC model with three factors was chosen. For both cases, factor 1 was able to discriminate mixtures containing ethyl acetate as solvent. Factor 2 indicated that mixtures in pure ethanol and binary mixtures containing ethanol was the most efficient in extracting chlorogenic acids and factor 3 identified caffeine through spectrophotometric profile in all mixtures. Higher concentration of caffeine was obtained by the ternary mixture of solvents ethanol, dichloromethane and hexane for Bourbon cultivar and by the quaternary mixture for the IPR101 cultivar. Trigonelline was extracted in both cultivars. The natural microflora of *C. arabica* was isolated and purified, however was not noticed caffeine degradation in a specific medium. It was observed that the conditions are unfavorable to the growth of microorganisms in a medium containing caffeine and analysis by spectrophotometric technique in UV-vis region revealed no caffeine degradation. The variety Bourbon presented an easy isolation of microflora in common media for filamentous fungi, bacteria, and yeasts, whereas in IPR101 plant breeding is more resistant to development of the coffee leaf rust.

Key words: *Coffea* cultivars. Decomposition methods. Mixture design. HPLC-DAD. Caffeine demethylase. UV-Vis spectra.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- Exemplo de gráfico tridimensional de dados obtidos por HPLC-DAD.	22
Figura 2	- Planejamento experimental do tipo Centroide-Simplex com 4 componentes ²⁴	23
Figura 3	- Decomposição de matriz de três modos pelo método PARAFAC em uma soma de produtos em tríades de vetores chamados de loadings ²⁸	24
Figura 4	- Matrizes plotadas empregando software MATLAB 6.5 utilizadas para aplicação do PARAFAC nos extratos da cultivar Bourbon.	30
Figura 5	- Matrizes plotadas empregando software MATLAB 6.5 utilizadas para aplicação do PARAFAC nos extratos da cultivar IPR101.	31
Figura 6	- Loadings dos modos A, B e C para o primeiro fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.	35
Figura 7	- Cromatogramas das extratos da cultivar Bourbon no comprimento de onda de 210 nm.	36
Figura 8	- Espectros correspondentes ao tempo de retenção 3,41 minutos dos extratos da cultivar Bourbon.	36
Figura 9	- Loadings dos modos A, B e C para o segundo fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.	37
Figura 10	- Espectros correspondentes ao tempo de retenção de 2,48 minutos dos extratos da cultivar Bourbon contendo o solvente extrator etanol na sua composição.	38
Figura 11	- Loadings dos modos A, B e C para o terceiro fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.	39

Figura 12	- Espectros correspondentes ao tempo de retenção de 3,70 minutos dos extratos da cultivar Bourbon.	40
Figura 13	- Espectros correspondentes aos tempos de retenção de 2,21 e 4,56 minutos dos extratos da cultivar Bourbon.	41
Figura 14	- Loadings dos modos A, B e C para o primeiro fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.	42
Figura 15	- Loadings dos modos A, B e C para o segundo fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.	43
Figura 16	- Loadings dos modos A, B e C para o terceiro fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.	43
Figura 17	- Loadings dos modos A, B e C para o quarto fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.	44
Figura 18	- Loadings dos modos A, B e C para o primeiro fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.	45
Figura 19	- Cromatogramas dos extratos da cultivar IPR101 no comprimento de onda de 210 nm.	47
Figura 20	- Espectros correspondentes ao tempo de retenção de 3,41 minutos dos extratos da cultivar IPR101.	48
Figura 21	- Loadings dos modos A, B e C para o segundo fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.	49
Figura 22	- Espectro correspondente ao tempo de retenção de 2,45 minutos dos extratos da cultivar IPR101.	50
Figura 23	- Loadings dos modos A, B e C para o terceiro fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.	51
Figura 24	- Espectro correspondente ao tempo de retenção de 3,70 e 4,56 minutos dos extratos da cultivar IPR101.	52

Figura 25	- Espectro correspondente ao tempo de retenção de 2,16 minutos dos extratos contendo etanol na mistura extratora da cultivar IPR101.	53
Figura 26	- Loadings dos modos A, B e C para o primeiro fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.	55
Figura 27	- Loadings dos modos A, B e C para o segundo fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.	55
Figura 28	- Loadings dos modos A, B e C para o terceiro fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.	56
Figura 29	- Loadings dos modos A, B e C para o quarto fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.	56
Figura 30	- Ilustração dos procedimentos de (A) isolamento, (B) estrias múltiplas e purificação e (C) estoque.	68
Figura 31	- Ilustração dos procedimentos de pré análise de amostras biológicas para detecção, separação e quantificação de metabólitos contendo meio de cultivo.	69
Figura 32	- Proposta de via de N-demetilação para a degradação da cafeína por <i>P. putida</i> CBB5 ¹⁴	70
Figura 33	- Esquema de plaqueamento para isolamento de microflora natural dos grãos de café.	72
Figura 34	- Processo de (A) isolamento, (B) repique e (C) purificação das cepas da cultivar Bourbon em meio PDA para fungos filamentosos.	74
Figura 35	- Estoque das cepas purificadas em meios PDA (A) e YEPD (B).	75
Figura 36	- Procedimentos de seleção de microrganismo capaz de degradar a cafeína.	76
Figura 37	- Espectro da cafeína comparando o controle e o inoculado.	77
Figura 38	- Screening em meios de cultivo específicos para fungos filamentosos, leveduras e bactérias para as cultivares Bourbon e IPR101.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição das misturas extratoras em termos de proporção.	28
Tabela 2 -	Valores de CORCONDIA, variância explicada e número de iterações para modelos PARAFAC contendo de 1 a 5 fatores para os extratos das cultivares Bourbon e IPR101.	33
Tabela 3 -	Composição dos meios de cultivo utilizados para isolamentos da microflora.	71
Tabela 4 -	Composição do meio utilizado para isolamento e seleção das cepas.....	73

LISTA DE SIGLAS

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
NMR	<i>(Nuclear Magnetic Resonance)</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC	<i>(High Performance Liquid Chromatography)</i>
DAD	Detector de Arranjo de Fotodiodos
PAD	<i>(Photodiode Array Detector)</i>
CLUE	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
UPLC	<i>(Ultra Performance Liquid Chromatography)</i>
EM	Espectrometria de Massa
MS	<i>(Mass Spectrometry)</i>
PARAFAC	Análise dos Fatores Paralelos <i>(Parallel Factor Analysis)</i>
ACP	Análise de Componentes Principais
PCA	<i>(Principal Components Analysis)</i>
AH	Análise Hierárquica
HA	<i>(Hierarchical Analysis)</i>
BDA	Batata Dextrose Ágar
PDA	<i>(Potato Dextrose Agar)</i>
YEPD	Extrato de Levedura-Peptona-Dextrose <i>(Yeast Extract-Peptone-Dextrose)</i>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - IMPRESSÃO DIGITAL CROMATOGRÁFICA DO *Coffea arabica* POR ANÁLISE MULTIDIMENSIONAL UTILIZANDO MÉTODO PARAFAC

1	INTRODUÇÃO	16
2	MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS	21
2.1	PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURAS	21
2.2	MÉTODOS DE DECOMPOSIÇÃO DE DADOS	23
3	EXPERIMENTAL.....	28
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
4.1	ANÁLISE DO TENSOR DE DADOS TRIDIMENSIONAL.....	32
4.2	ANÁLISE DOS MODELOS DO PARAFAC	33
4.2.1	Cultivar Bourbon	33
4.2.2	Cultivar IPR101	45
	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS.....	59

CAPÍTULO II - ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA ENZIMA CAFEÍNA DEMETILASE EM *Coffea arabica*

1	INTRODUÇÃO	64
2	MICROFLORA DO <i>C. arabica</i>.....	67
2.1	TÉCNICAS DE ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO.....	67
2.2	SELEÇÃO DE CEPAS CAPAZES DE DEGRADAR A CAFEÍNA	69
3	EXPERIMENTAL.....	71

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
	CONCLUSÃO	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	82

CAPÍTULO I

IMPRESSÃO DIGITAL CROMATOGRÁFICA DO *Coffea arabica* POR ANÁLISE MULTIDIMENSIONAL UTILIZANDO O MÉTODO PARAFAC



“Man with cuboid” de Escher simboliza um analista de multi-modos intrigado com um problema aparentemente insolúvel dos três modos. Cortesia da Fundação M.C. Escher.

Destaques

- Os extratos foram preparados utilizando planejamento de misturas Centroid-Simplex.
- O método PARAFAC foi aplicada em dados tridimensionais fornecidos por HPLC-DAD.
- Para ambas as cultivares, o melhor modelo PARAFAC apresentou três fatores.
- O primeiro fator foi capaz de discriminar os extratos em relação aos extratos em acetato de etila.
- O segundo fator que indica os extratos em etanol puro e misturas binárias de etanol contendo que extraem ácidos clorogênicos.
- O terceiro fator identifica cafeína por meio do perfil espectrofotométrico presente em todos os extratos.

1 INTRODUÇÃO

Considerada uma das espécies vegetais de maior importância econômica, o café apresenta um comércio internacional que envolve cerca de 500 milhões de pessoas em sua gestão. Segundo o Ministério da Agricultura (MAPA) com a colaboração da Secretaria de Produção e Agroenergia (SPA), da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) e dados da Organização Internacional de Café (OIC), a produção nacional em 2014 foi de 45,35 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado, sendo o seu cultivo em uma área total de 1,95 milhões de hectares, dos quais 70% são provenientes de pequenas propriedades com aproximadamente 10 hectares. Portanto, a produtividade do Brasil em 2014 foi de 23,3 sacas por hectare, o que corresponde a 31,94% da produção mundial¹.

Uma das espécies economicamente mais importantes é o café arábica (*C. arabica*), a qual é caracterizada pela difícil manipulação gênica, seu florescimento é influenciado por diversos fatores ambientais como deficiência hídrica, radiação solar, temperatura, vento e umidade relativa do ar, e também por outros fatores como interação entre culturas, época de poda e recepa ou colheita tardia¹. Além de afetar diretamente a produção de frutos e, conseqüentemente, a concentração dos principais metabólitos, os quais estão diretamente associados à qualidade do produto final, estas variáveis ainda exercem uma grande influência na incidência de pragas e doenças, dentre elas a ferrugem da folha do cafeeiro (*Coffee Leaf Rust* – CLR), em todas as fases fenológicas do cafeeiro de forma que muitos estudos de melhoramento vegetal são realizados para solucionar esses problemas.

Os grãos de *C. arabica* cru contém uma enorme variedade de compostos químicos, que se distinguem entre produtos intermediários e de metabolismo primário. Esses compostos são usados como marcadores taxonômicos, e os chamados “metabólitos secundários” contribuem para odores específicos, gostos e cores das espécies^{2,3}. Muitos desses compostos, mesmo após os processos de torrefação, interferem no *flavour* da bebida, ou seja, em seu aroma e sabor⁴, dos quais se destacam os alcaloides^{5,6} e os ácidos clorogênicos⁷. Dentre os alcaloides encontram-se os de base purínica, dos quais as metilxantinas fazem parte e atuam principalmente no sistema nervoso central².

A análise metabolômica, também conhecida como fenotipagem metabólica ou simplesmente *metabolomics* em inglês, tem como foco as interações complexas dos componentes de um sistema biológico e destaca-o como um todo ao invés de apenas seus elementos particionados, resultando num aspecto distinto a respeito do equilíbrio celular⁸⁻¹⁰. Além disso, utilizam-se técnicas modernas para analisar amostras com a finalidade de procurar uma descrição analítica, caracterizando e quantificando todos componentes de baixo peso molecular de uma amostra biológica^{11,12}.

Para que se possa analisar um sistema biológico, é necessário conhecer como seus processos de regulação celular funcionam, e com isso, a análise metabolômica visa distinguir os chamados produtos finais desses processos, ou ainda, os metabólitos, os quais são considerados a resposta final desse sistema perante estímulos ou alterações genéticas ou ambientais^{13,14}. A grande dificuldade em se trabalhar com metabólitos, e o que desafia os atuais procedimentos analíticos, resume-se em seu alto dinamismo no tempo e espaço, o qual torna

possível a existência de uma quantidade muito abrangente de formas e estruturas^{14,15}.

Apesar dos principais metabólitos serem provenientes do sistema endógeno, algumas amostras biológicas podem apresentar interferentes de fontes exógenas (microbioma, dieta, medicamentos, etc) e, portanto, prover resultados não verdadeiros durante uma análise¹², por isso há a necessidade em estabelecer padrões para se estudar certos sistemas biológicos.

O estudo através da análise metabolômica apresenta duas vertentes, o perfil metabolômico (*metabolomic profile*) e a impressão digital metabolômica (*metabolomic fingerprint*). O objetivo da análise metabolômica por meio do perfil metabolômico é analisar apenas um grupo de metabólitos, enquanto que na impressão digital metabolômica a intenção não é identificar cada um dos metabólitos observados, mas sim comparar padrões ou impressões digitais de metabólitos que variam em resposta a algum tipo de doença, mudanças no meio ambiente, melhoramento vegetal ou alterações genéticas¹⁶.

Uma vez quantificados, os metabólitos são definidos como metaboloma da amostra, ou seja, as concentrações destes metabólitos em função do tempo. Pode-se pensar como um impressão digital metabolômica que representa o estado do organismo naquele período, ou seja, quantificar metabólitos de forma temporal com a intenção de acompanhar o desenvolvimento do sistema perante um estímulo quantificável¹².

A impressão digital metabolômica pode ser obtida através de técnicas espectroscópicas ou cromatográficas e dessa forma são denominadas como impressão digital espectroscópica ou cromatográfica.

O perfil metabolômico é considerado uma das análises mais holísticas e, duas técnicas são amplamente empregadas, a espectroscopia de massa (MS) e a ressonância magnética nuclear (NMR). Devido ao progresso e sofisticação dessas técnicas, cada vez mais o estudo metabolômico é impulsionado, e com isso, é acrescentada precisão, exatidão e sensibilidade à detecção e separação dos componentes metabólicos^{10,17}.

A impressão digital é uma ferramenta poderosa para o controle de qualidade de medicamentos à base de plantas¹⁸, e conta com técnicas de separação analítica, e as mais comumente utilizadas são as cromatográficas. Atualmente, as técnicas espectroscópicas acopladas às cromatográficas têm explicado sistemas complexos com propriedade, e quando se unem à ferramentas estatísticas, são capazes de reduzir grandes quantidades de informações químicas e biológicas em características singulares e precisas para cada sistema. Algumas das técnicas cromatográficas frequentemente utilizadas são as líquidas de alto desempenho (HPLC ou UPLC), pois têm uma elevada capacidade adaptativa e com estas técnicas quase todos metabólitos podem ser elucidados^{19,20}.

A cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC pode ser considerada atualmente a técnica de separação mais empregada para análise metabolômica. Os mais diversos tipos de detectores podem ser acoplados à HPLC para esta finalidade, os mais comuns são o espectrômetro de massa (HPLC-MS)²¹, o de arranjo de diodos (HPLC-DAD)²².

Algumas das ferramentas quimiométricas como análise de componentes principais (PCA) e análise hierárquica (HA) para dados multi-modos podem auxiliar às técnicas hífenadas descrevendo o melhor modelo que os dados obtidos dessas técnicas fornecem. Entretanto, essas ferramentas atuam em apenas

duas dimensões possibilitando a análise individual de cada amostra. Para que se possa analisar o conteúdo todo de todas amostras, dois métodos quimiométricos de ordem superior em três dimensões mostram-se muito atrativos para desenvolvimento e aplicação, a análise dos fatores paralelos (PARAFAC) e os métodos de Tucker.

Diante do exposto, o trabalho teve como objetivo obter as impressões digitais metabolômicas de duas cultivares de *C. arabica*: Bourbon e IPR101 por HPLC-DAD e analisar os dados multidimensionais usando o método PARAFAC.

2 MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS

2.1 PLANEJAMENTO ESTATÍSTICO DE MISTURAS

Nas análises metabolômicas por HPLC, na maioria das vezes, são empregadas misturas de solventes para facilitar ou melhorar a separação de solutos entre a fase estacionária e a fase móvel. Essa versatilidade permite variar a seletividade e aumentar a eficiência da separação de acordo com as necessidades.

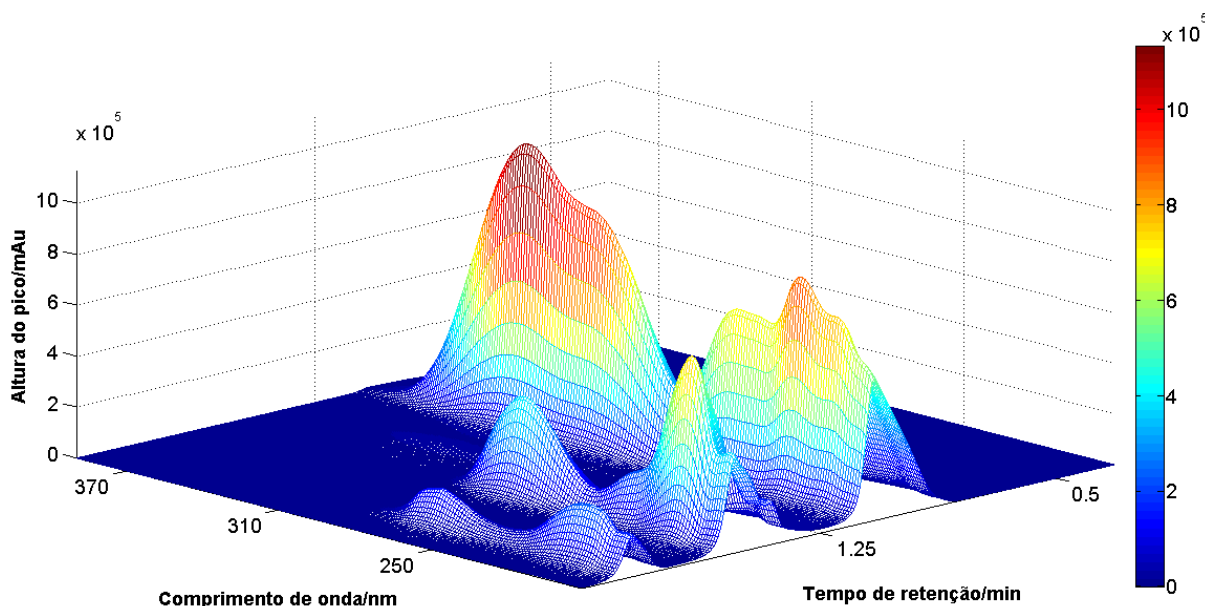
A composição da mistura empregada é um grau de liberdade adicionado à escolha de diversos solventes disponíveis. Podem ser empregadas de forma isocrática ou em gradiente de eluição, fazendo com que o tempo necessário para uma separação eficiente seja reduzido sem afetar a resolução²³.

A utilização de diversos solventes na composição da fase móvel, da mesma forma que se utilizam misturas de solventes na extração, possibilita maximizar a eficiência da extração de um maior número de compostos químicos da planta. A maneira mais indicada para se explorar como os solventes ou a mistura dos mesmos se comportam diante de um sistema de amostras biológicas, utiliza-se um planejamento de misturas²⁴, o qual permite explorar várias combinações de solventes extratores para uma única amostra.

Nesse mesmo aspecto, para obter uma boa impressão digital metabolômica se faz necessário associar o preparo da amostra com o emprego das técnicas avançadas de separação e identificação. E, para que toda a informação contida nos dados seja aproveitada de forma eficiente e interpretada de forma correta, um gama diverso de ferramentas quimiométricas podem ser utilizadas.

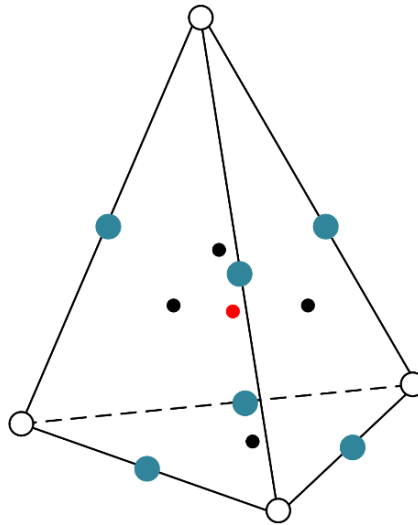
Dados cromatográficos obtidos por meio da técnica HPLC-DAD fornecem uma superfície como resultado, ou seja, fornecem como resposta uma matriz de dados, a qual gera dados de segunda ordem para cada amostra. No caso de um detector por arranjo de diodos²⁵, é possível obter os valores de absorvância em função do tempo de corrida e em diferentes comprimentos de onda para cada amostra como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Exemplo de gráfico tridimensional de dados obtidos por HPLC-DAD.



Além das técnicas analíticas utilizadas para obtenção da impressão digital, tem-se o planejamento experimental, no qual permite explorar condições diferentes para amostras de um sistema biológico em estudo. Como exemplo, um planejamento muito utilizado para modelagem é o do tipo Centroide-Simplex²⁴ com 4 componentes, como mostrado na Figura 2.

Figura 2 - Planejamento experimental do tipo Centroide-Simplex com 4 componentes²⁴.



Na Figura 2, os vértices do tetraedro (○) correspondem aos solventes puros, o centro das arestas (●) correspondem às misturas binárias com os dois componentes dos vértices em proporções iguais, os pontos no centro das faces dos triângulos (●) correspondem às misturas ternárias com os três componentes dos vértices em proporções iguais e o ponto no centro do tetraedro (●) corresponde ao ponto central, isto é, à mistura contendo os quatro solventes em proporções iguais.

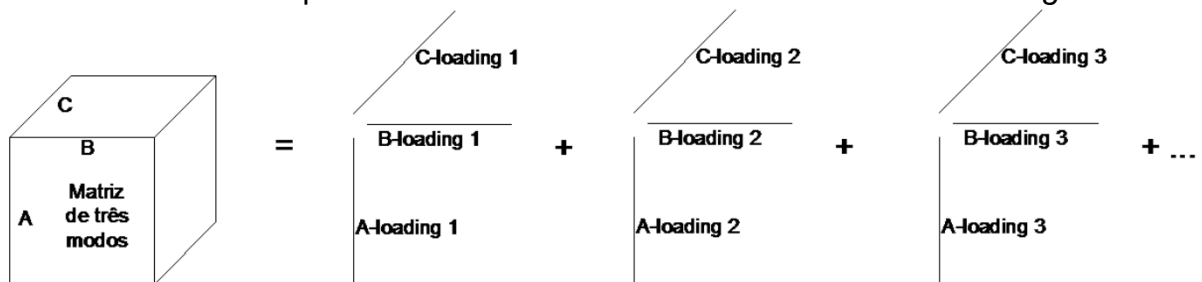
2.2 MÉTODOS DE DECOMPOSIÇÃO DE DADOS

Alguns instrumentos proveem dados de ordem superior, ou ainda um tensor de ordem superior²⁶, como resposta para cada amostra. Para as técnicas hífenadas, tais como cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD), o método mais utilizado atualmente é a análise dos fatores paralelos (PARAFAC)²⁷,

Figura 3, ou o método Tucker3, mais indicado quando o objetivo for executar a análise exploratória²².

O PARAFAC e o Tucker3 são os dois métodos de decomposição de dados multidimensionais mais importantes. Esses métodos basicamente decompõem o arranjo do tensor \underline{X} em um certo número de *loadings* que vão descrever toda a informação dos dados de uma forma mais compacta e conveniente para a análise do que os dados originais²⁷.

Figura 3 - Decomposição de matriz de três modos pelo método PARAFAC em uma soma de produtos em tríades de vetores chamados de *loadings*²⁸.



Uma particularidade do método Tucker3 é que o arranjo do tensor \underline{X} pode ser decomposto com diferentes números de fatores em cada um dos modos. Essa propriedade é muito viável em casos onde um dos modos possui um número muito menor de níveis com relação ao número de níveis de outros modos²⁹.

$$\underline{X} = \underline{A} \underline{G} (\underline{C} \otimes \underline{B})^t + \underline{E} \quad (1)$$

Como se observa na Eq. (1), no método Tucker3 o tensor \underline{X} é decomposto nas matrizes \underline{A} ($I \times D$), \underline{B} ($J \times E$) e \underline{C} ($K \times F$) que contêm os pesos (“loadings”) do modelo relativos às três dimensões dos dados, respectivamente, e uma matriz central \underline{G} ($D \times EF$) de elementos pesos para todas as interações entre um fator de um certo modo com todos os fatores dos outros modos e, por este

motivo, mais variância é explicada pelo modelo Tucker3 em comparação com o modelo de tamanho semelhante do PARAFAC e, portanto, pode-se dizer que o modelo é mais atrativo quando se trata de exploração dos dados^{26,30}.

Uma das justificativas para o desenvolvimento e utilização de métodos multi-modos é a que, seus modelos propõem solução única e, matematicamente, isso significa que os modelos não podem ser rotacionados sem perda de ajuste. Em alguns casos, a unicidade pode ser denominada cromatografia computadorizada (*computer chromatography*)³¹, a qual pode ser usada para separar matematicamente compostos ou classe de compostos em um conjunto de amostras, dispensando o emprego de técnicas cromatográficas mais sofisticadas e reduzindo o consumo de produtos químicos e tempo.

Estas propriedades tornam esses métodos muito atrativos²⁷, e ainda segundo Bro (1998)³¹, em sua tese, descreveu que o método PARAFAC, particularmente, “fornece modelos parcimoniosos, portanto, robusto e interpretável, possibilitando melhores previsões e possibilidades para explorar os dados”. Uma vez que o modelo não pode ser rotacionado, a única coisa que pode variar é a ordem e a escala dos fatores.

Por isso, uma característica intrínseca de modelos bi- e trilineares é a de que não há maneira de se saber se um fator é primeiro, terceiro ou quinto, e também identificar uma escala. Sendo assim, nos modelos multilineares os fatores específicos são identificados após o ajuste do modelo²⁷.

Segundo Harshman e Lundy³² e Reis³³ o “PARAFAC determina a orientação do eixo único, buscando alongamento ou contração proporcional sistemática das distâncias ao longo de um conjunto consistente de direções no espaço de fatores”.

No método PARAFAC, um tensor de dados tridimensionais $\underline{\mathbf{X}}$ ($I \times J \times K$) com elementos x_{ijk} é decomposto em três matrizes de *loadings*, \mathbf{A} ($I \times F$), \mathbf{B} ($J \times F$) e \mathbf{C} ($K \times F$) cujos elementos são a_{if} , b_{jf} e c_{kf} , respectivamente e F é o número de fatores escolhidos. Um modelo trilinear é ajustado de forma a minimizar a soma dos quadrados dos resíduos, e_{ijk} . O modelo é representado de acordo com a Eq. (2)²⁸:

$$\underline{\mathbf{X}} = \sum_{f=1}^F a_f \otimes b_f \otimes c_f \quad (2)$$

A determinação da complexidade do modelo, isto é, do número de fatores, é um dos passos mais importantes na análise dos dados e não há para isso um critério absoluto. Várias ferramentas podem ser utilizadas para esta finalidade, citando como exemplo, a variância explicada pelo modelo, o conhecimento químico do sistema, validação cruzada^{34,35} e o método de diagnóstico de consistência do núcleo (CORCONDIA)³⁶.

O CORCONDIA é baseado na interpretação do PARAFAC como um modelo Tucker3 restrito. A consistência do núcleo é sempre menor ou igual a 100% podendo inclusive ter valores com sinal negativo. Um valor próximo ou igual a 100% pode ser interpretado como “muito trilinear”, enquanto que um valor próximo de 50% indica um modelo com número excessivo de fatores ou então que o modelo é tendencioso e inconsistente. Um valor próximo de zero ou negativo indica um modelo completamente inválido³⁶. Em outras palavras, quanto maior o valor de consistência do núcleo, melhor será o ajuste do modelo.

Para avaliar modelos PARAFAC com diferentes complexidades e definir o que melhor se ajusta ao sistema proposto, utiliza-se o valor de consistência

do núcleo. E para calcular modelos PARAFAC faz-se necessário o uso de programas com linguagem computacional adequada e uma interface que permita explorar e visualizar o conjunto de dados coletados, como o MATLAB[®] ³⁷, equipado com uma coleção de funções e algoritmos capazes de propor o melhor modelo de um conjunto de dados multi-modos baseado em diversos modelos multilineares³⁸.

3 EXPERIMENTAL

A preparação dos extratos de café foi baseada em um planejamento experimental do tipo Centróide-Simplex^{24,39} com 4 componentes, *e* (etanol), *a* (acetato de etila), *d* (diclorometano) e *h* (hexano) devido aos parâmetros de solubilidade desses solventes^{40,41}, e a partir do planejamento obteve-se 15 misturas diferentes nas composições dos solventes extratores, cujas proporções podem ser vistas na **Tabela 1**.

Tabela 1 - Composição das misturas extratoras em termos de proporção.

Extratos	Solventes			
	Etanol	Acetato de etila	Diclorometano	Hexano
<i>e</i>	1	0	0	0
<i>a</i>	0	1	0	0
<i>d</i>	0	0	1	0
<i>h</i>	0	0	0	1
<i>ea</i>	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0	0
<i>ed</i>	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$	0
<i>eh</i>	$\frac{1}{2}$	0	0	$\frac{1}{2}$
<i>ad</i>	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$	0
<i>ah</i>	0	$\frac{1}{2}$	0	$\frac{1}{2}$
<i>dh</i>	0	0	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{2}$
<i>ead</i>	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0
<i>eah</i>	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$
<i>edh</i>	$\frac{1}{3}$	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
<i>adh</i>	0	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$	$\frac{1}{3}$
<i>eadh</i>	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{4}$

Neste trabalho foram analisados os dados de HPLC-DAD de extratos de grãos crus de duas diferentes cultivares de *C. arabica* cedidas pelo Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), a cultivar Bourbon vermelho e uma cultivar desenvolvida pelo próprio IAPAR, denominada IPR101. Na cultivar Bourbon não há cruzamento com outras cultivares, ou seja, é *arabica* pura e foi usada como

referência. A cultivar IPR101 originou-se do cruzamento da cultivar Catuaí x Sarchimor, com genes S_H2 e S_H3 que são resistentes a ferrugem.

Os extratos foram preparados e analisados por Moreira e Scarminio (2013)^{40,41}. Das nove fases móveis testadas, a escolhida para empregar o método PARAFAC na análise da impressão digital metabolômica foi a fase móvel composta por 26% de acetonitrila, 51% de água e 23% de metanol, porque apresentou maior quantidade de picos nos cromatogramas nos comprimentos de onda monitorados.

Neste trabalho, modelos PARAFAC com diferentes complexidades foram calculados e o melhor modelo foi escolhido utilizando os valores de consistência do núcleo, variância explicada e iterações entre as variáveis dos modelos. Os modelos PARAFAC foram calculados usando o programa MATLAB 6.5³⁷ equipado com o pacote N-way toolbox para MATLAB versão 2.11³⁸ usando o tensor de dados originais para os extratos das cultivares Bourbon e IPR101. O pacote N-way toolbox está disponível para download em <http://www.models.life.ku.dk/nwaytoolbox/download>.

As matrizes utilizadas para aplicação dos modelos consistem em matrizes de ordem superior e têm como variáveis 300 valores de absorvância em função do tempo de retenção e 211 valores de absorvância em função do comprimento de onda para 15 extratos. A Figura 4 mostra o comportamento dos extratos da cultivar Bourbon perante às condições em cada ponto do planejamento e a Figura 5 mostra para os extratos da cultivar IRP101.

Figura 4 - Matrizes plotadas empregando software MATLAB 6.5 utilizadas para aplicação do PARAFAC nos extratos da cultivar Bourbon.

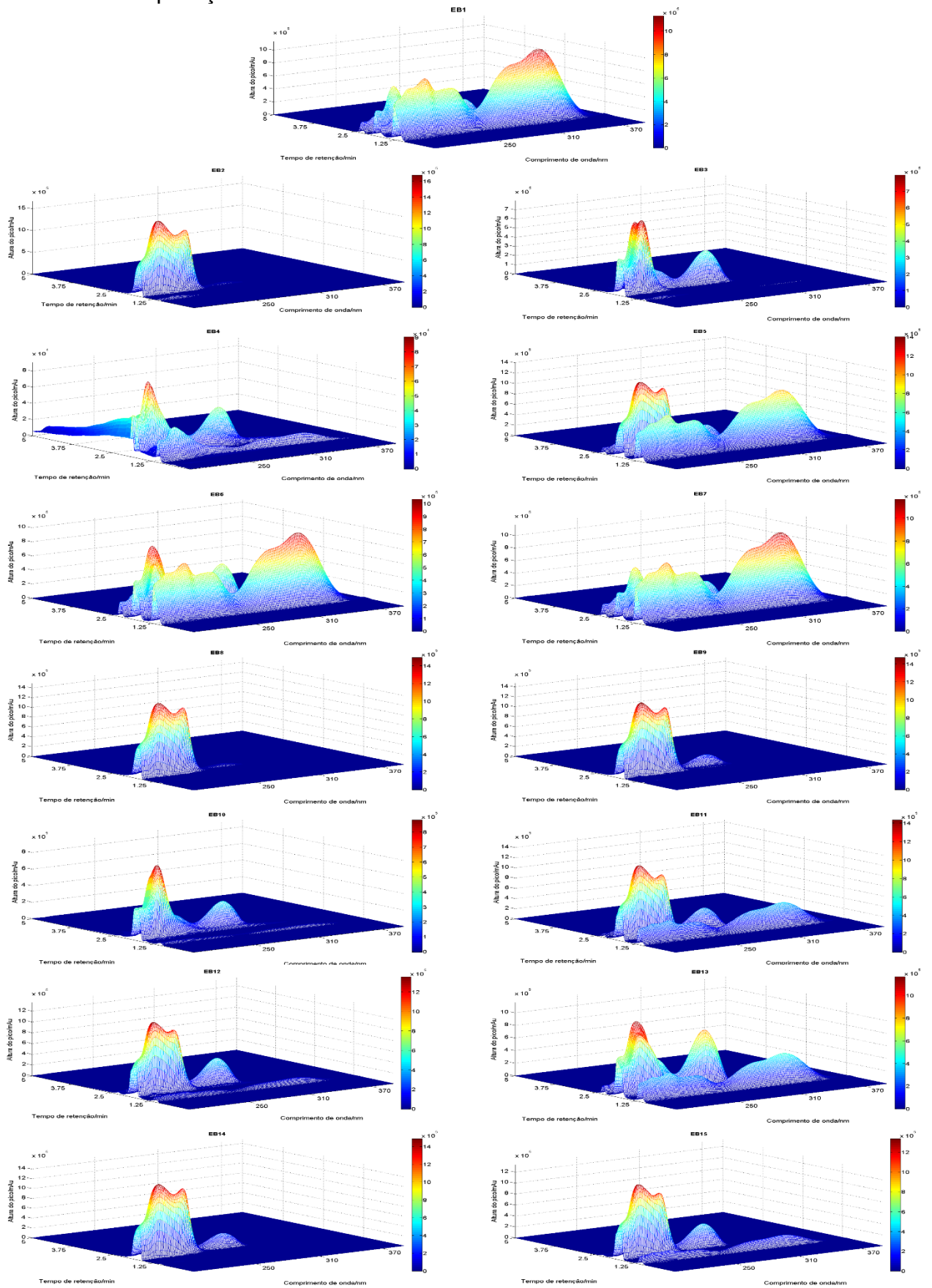
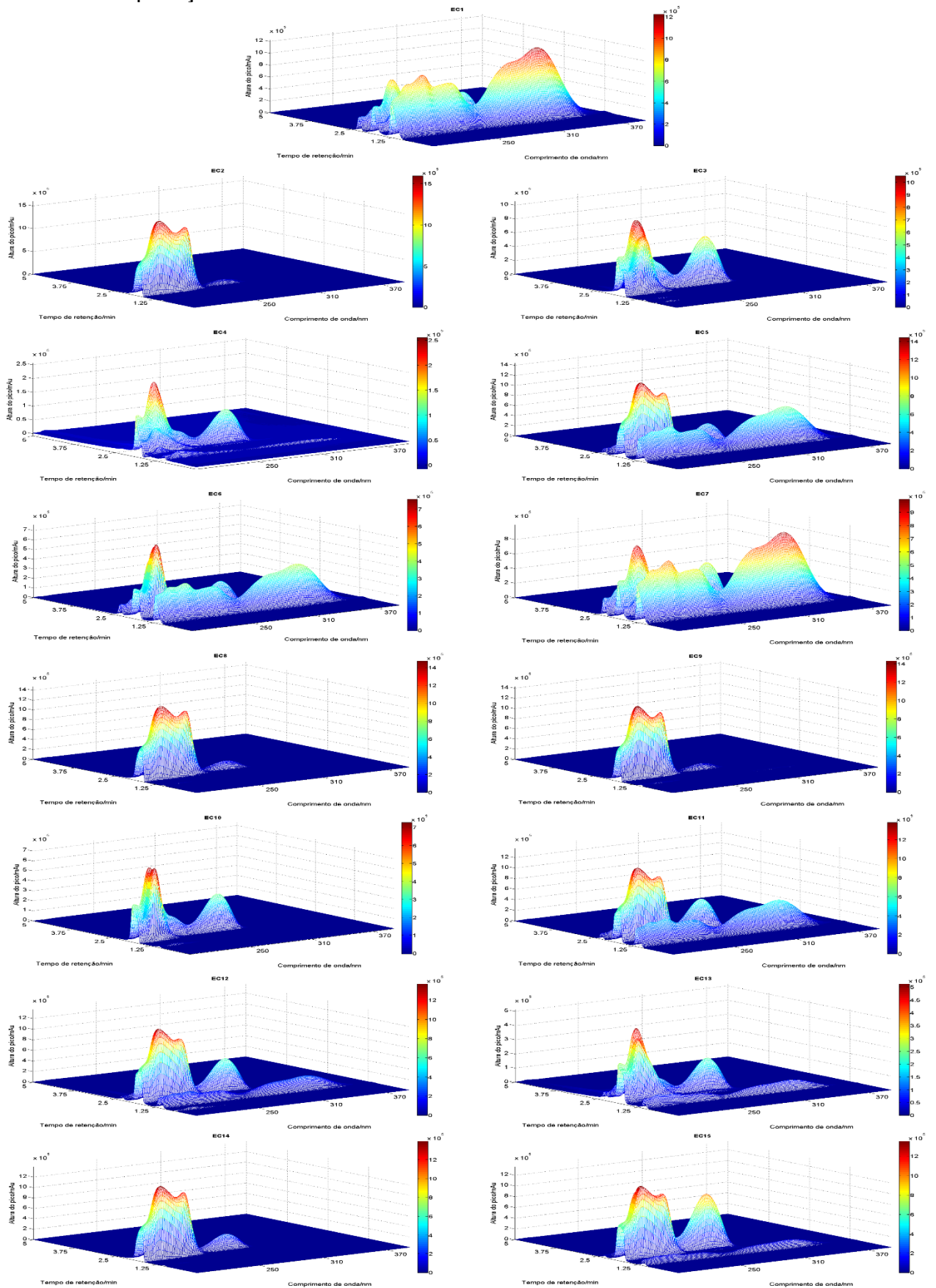


Figura 5 - Matrizes plotadas empregando software MATLAB 6.5 utilizadas para aplicação do PARAFAC nos extratos da cultivar IPR101



4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DO TENSOR DE DADOS TRIDIMENSIONAL

Os tensores de dados tridimensionais originais para os dois conjuntos de amostras utilizados para a análise continham 300 valores de absorvância em função do tempo de retenção (modo A), que corresponde a um tempo de retenção de 5 minutos, 211 valores de absorvância em função do comprimento de onda (modo B) que corresponde a um intervalo espectral de 190 a 400 nm para 15 extratos (modo C).

Todos os tensores para extratos das cultivares Bourbon e IPR101 foram centrados na média em cada um dos modos, simultaneamente em dois modos e nos três modos, porém, não houve diferença com relação aos resultados obtidos com os tensores originais, de forma que para as análises foram usados os tensores originais.

Uma vez que optou-se por não utilizar pré-processamento, os tensores de dados originais foram submetidos ao teste com o algoritmo CORCONDIA para modelos contendo de 1 a 5 fatores. Os resultados para os extratos das duas cultivares são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de CORCONDIA, variância explicada e número de iterações para modelos PARAFAC contendo de 1 a 5 fatores para os extratos das cultivares Bourbon e IPR101.

Amostra	N. fatores	1	2	3	4	5
Bourbon	CORCONDIA (%)	100	100	98,68	0,08	0,04
	Variância explicada (%)	65,11	91,34	96,13	97,70	98,51
	Nº de iterações	6	2	10	20	363
IPR101	CORCONDIA (%)	100	100	99,20	17,06	19,68
	Variância explicada (%)	68,07	89,17	94,95	97,32	98,17
	Nº de iterações	5	2	7	252	122

Os valores de CORCONDIA e a porcentagem de variância explicada foram avaliados para as duas cultivares, e os melhores modelos seriam aqueles contendo 2 ou 3 fatores. Nos dois casos o modelo com 1 fator apresenta um CORCONDIA de 100%, porém a variância explicada não chega a 69%, para os modelos com 2 fatores o valor do CORCONDIA tem seu valor máximo e uma porcentagem de variância explicada aceitável e os modelos com 3 fatores apresenta um valor de CORCONDIA muito próximo de 100% e explicam 5% a mais da variação dos dados. Com relação ao número de iterações, são aceitáveis para os modelos com até 3 fatores. Assim, os modelos PARAFAC contendo 2 e 3 fatores para as duas cultivares foram obtidos e avaliados, sendo que o modelo com 3 fatores mostrou-se mais informativo tanto para a Bourbon como para a IPR101.

4.2 ANÁLISE DOS MODELOS DO PARAFAC

4.2.1 Cultivar Bourbon

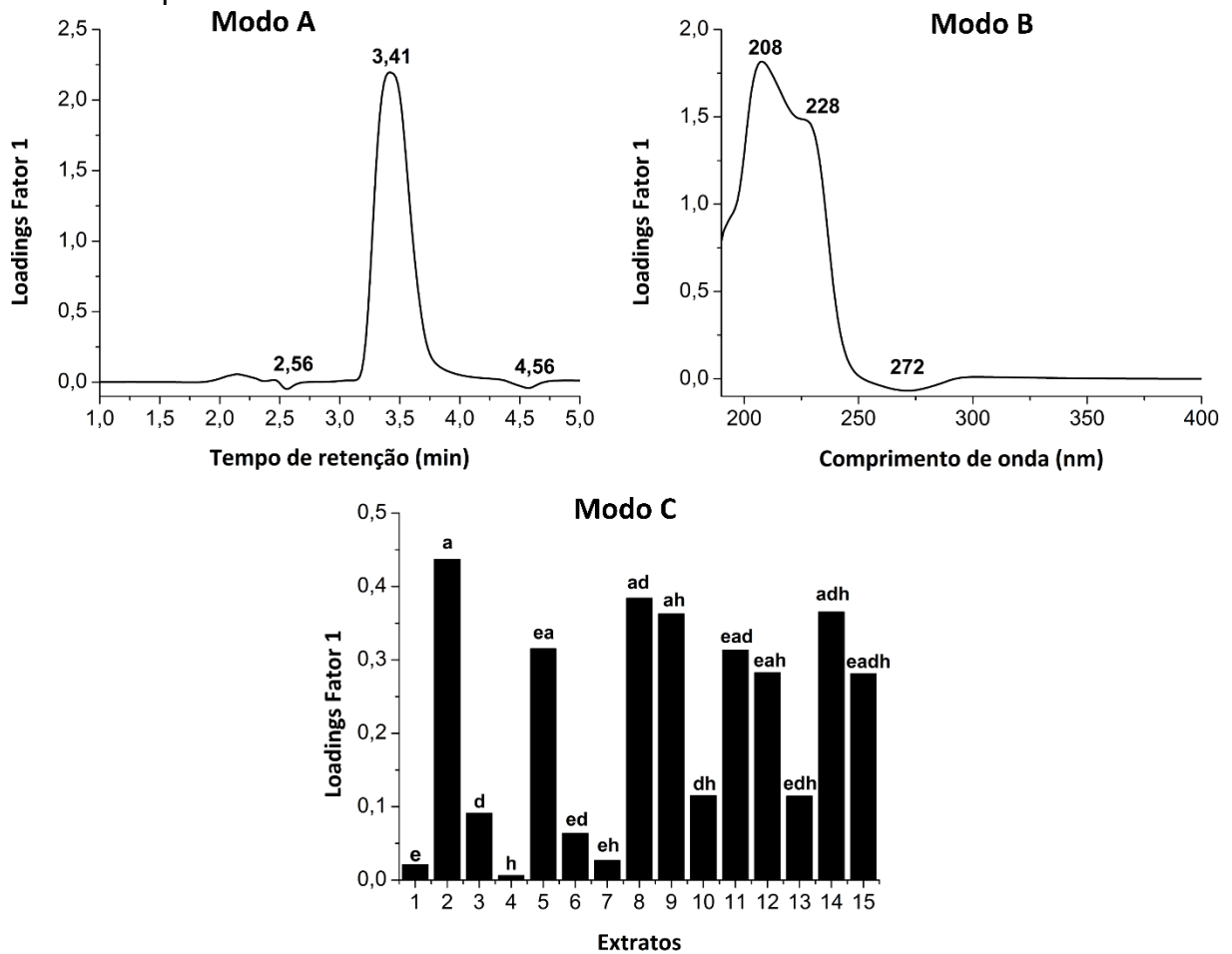
Para os extratos da cultivar Bourbon foi escolhido um modelo PARAFAC com 3 fatores para os dados tridimensionais de cromatografia líquida de

alta eficiência acoplado com arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD). A Figura 6 mostra os *loadings* dos modos A, B e C para o primeiro fator.

Os *loadings* do modo A do primeiro fator, mostram um pico com maior peso e valor positivo no tempo de retenção de 3,41 minutos e dois picos com valores negativos nos tempos de retenção de 2,56 e 4,56 minutos. No modo B, o perfil espectral apresenta máximos com valores positivos nos comprimentos de onda de 208 e 228 nm e com valor negativo em 272 nm. No modo C é possível verificar que os extratos com maiores valores de *loadings* apresentam na composição da mistura o solvente extrator acetato de etila, em seguida, com valores intermediários de *loadings* têm-se os extratos contendo o solvente diclorometano e as misturas que apresentaram os menores pesos foram etanol, hexano e etanol-hexano.

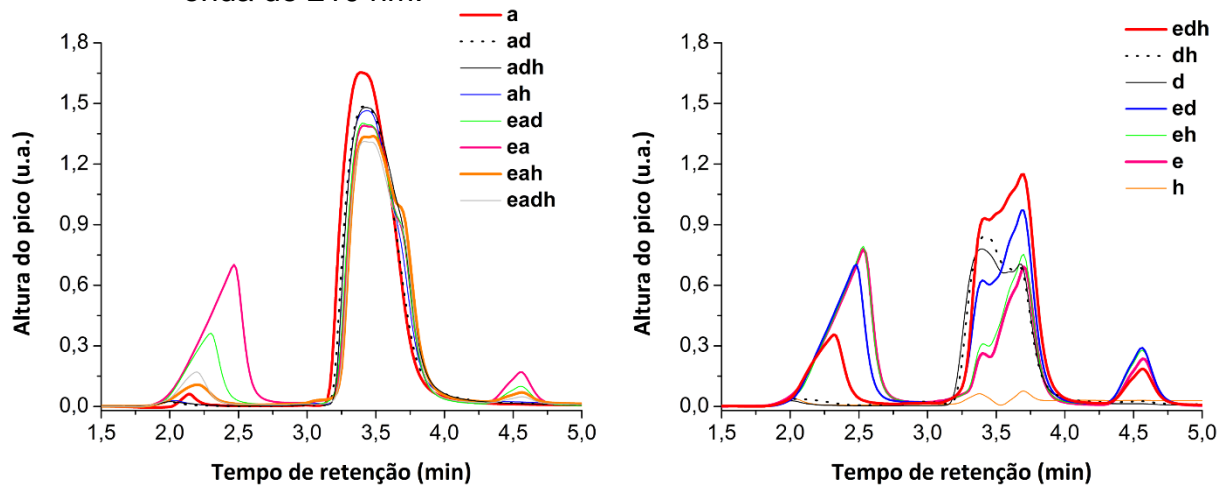
A análise conjunta dos *loadings* do primeiro fator, indica que os extratos contendo acetato de etila em sua composição extratora devem apresentar uma maior quantidade extraída do composto representada pelo pico em 3,41 minutos e o perfil espectral deste composto pode apresentar máximos nos comprimentos de onda de 208 e 228 nm aproximadamente. Já os extratos com menor peso devem estar associados aos compostos que apresentaram os menores pesos no fator 1, que correspondem ao tempo de retenção de 2,56 e 4,56 minutos.

Figura 6 - Loadings dos modos A, B e C para o primeiro fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.



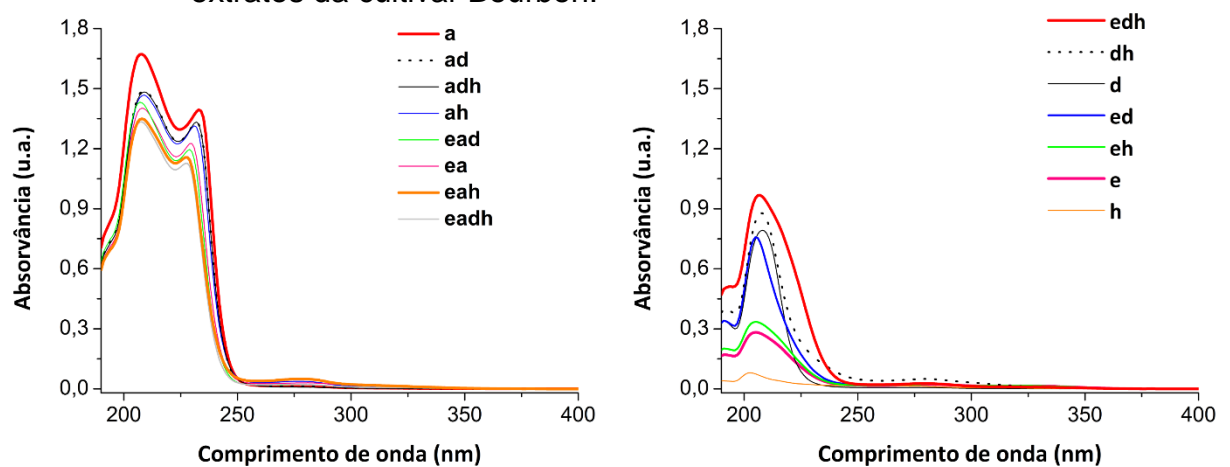
Para verificar como o modelo descreveu os dados, recorreu-se a análise visual dos cromatogramas das 15 extratos da cultivar Bourbon obtidos no comprimento de onda de 210 nm, os quais revelam que os extratos contendo acetato de etila na sua composição apresentam o pico em 3,41 minutos, enquanto os outros apresentam um perfil cromatográfico de sobreposição de pico, como pode ser observado na Figura 7.

Figura 7 - Cromatogramas das extratos da cultivar Bourbon no comprimento de onda de 210 nm.



Para confirmar estes resultados foram plotados os espectros DAD correspondentes ao tempo de retenção de 3,41 minutos, que são apresentados na Figura 8. É possível verificar que para os extratos que contém acetato de etila como um dos solventes extratores em sua composição, o espectro apresenta o perfil muito semelhante aos *loadings* do modo B do primeiro fator, enquanto os outros apresentam um perfil espectral com apenas um máximo em torno de 208 nm.

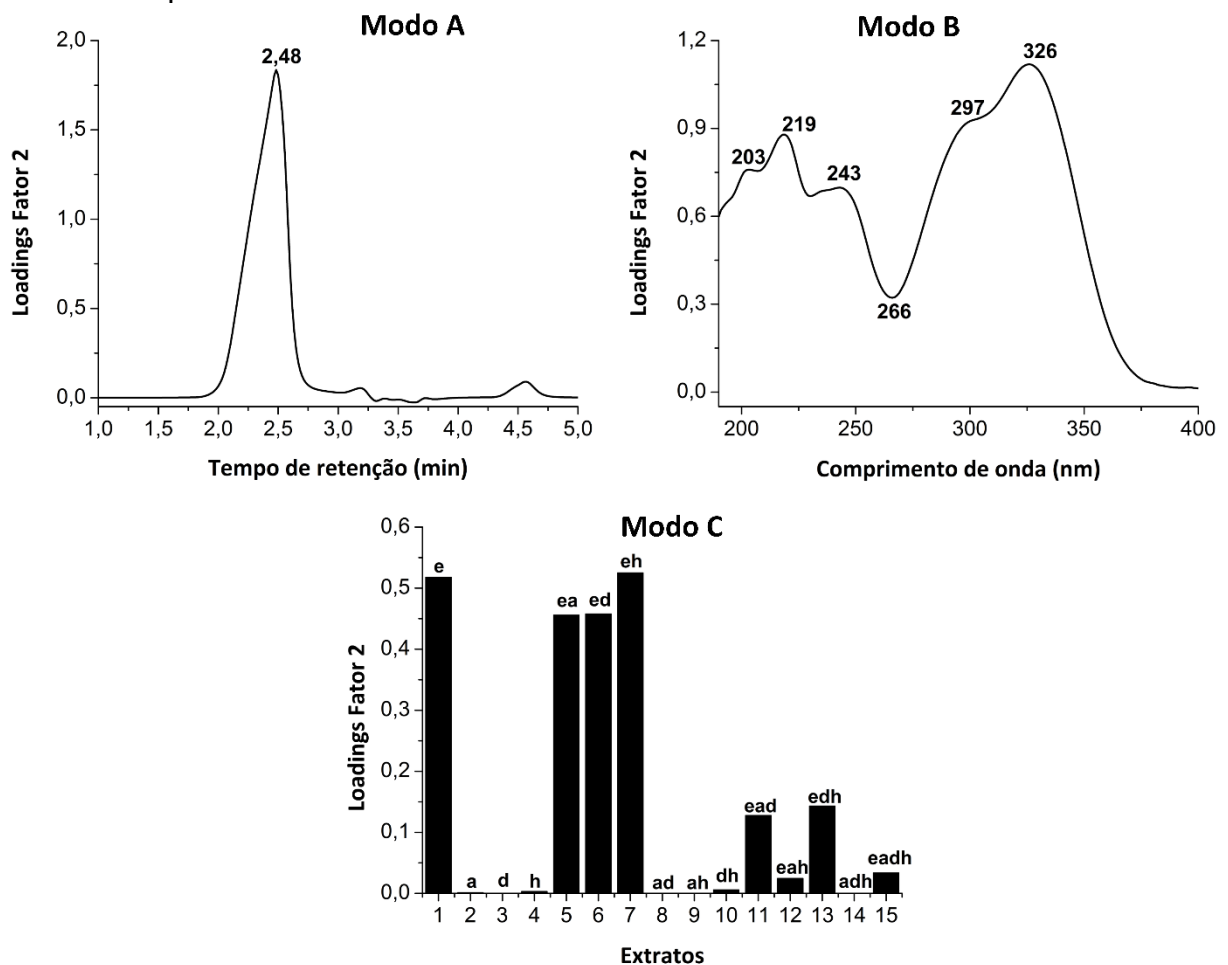
Figura 8 - Espectros correspondentes ao tempo de retenção 3,41 minutos dos extratos da cultivar Bourbon.



Na Figura 9 observa-se o segundo fator para os modos A, B e C, na qual os *loadings* do modo A apresentam apenas um pico com maior peso de valor

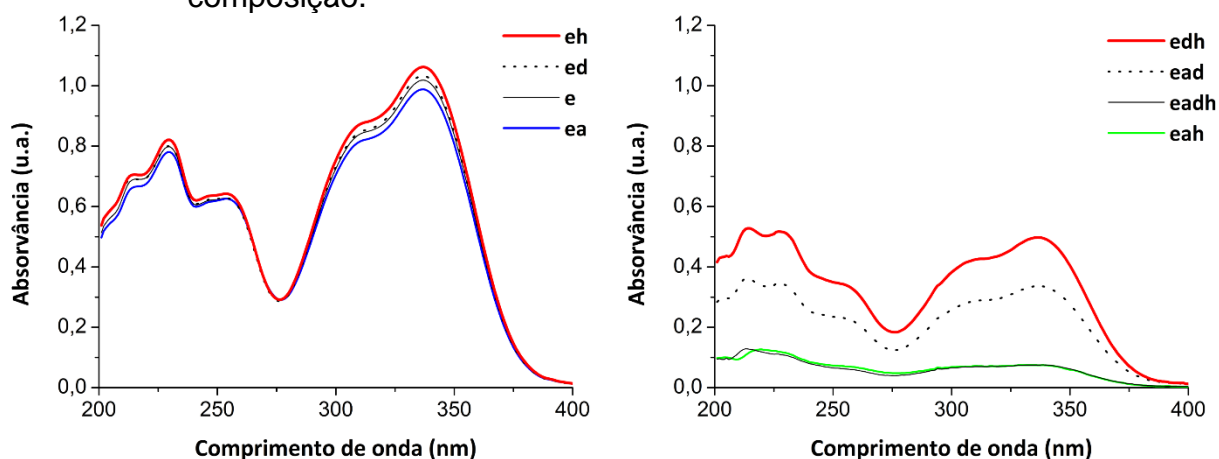
positivo no tempo de retenção de 2,48 minutos, já os *loadings* do modo B mostram uma série de comprimentos de onda máximos, todos com valores positivos em 203, 219, 243, 297 e 326 nm, os quais são máximos característicos da classe de compostos de ácidos clorogênicos. Os *loadings* do modo C evidentemente separam os extratos contendo o solvente extrator etanol na composição da mistura do restante dos extratos que apresentaram pesos bem próximos de zero. Os extratos contendo etanol puro e misturas binárias contendo etanol apresentaram maior peso do que os extratos preparados com misturas ternárias e quaternárias.

Figura 9 - *Loadings* dos modos A, B e C para o segundo fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.



O segundo fator indica que esses extratos contendo etanol apresentam o pico em aproximadamente 2,48 minutos, o que é confirmado pelos cromatogramas apresentados na Figura 7, onde também é possível verificar um certo deslocamento desse pico. Para confirmar os comprimentos de onda máximos indicados pelo modo B os espectros DAD referentes ao composto ou mistura de compostos com tempo de retenção de 2,48 minutos são apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Espectros correspondentes ao tempo de retenção de 2,48 minutos dos extratos da cultivar Bourbon contendo o solvente extrator etanol na sua composição.

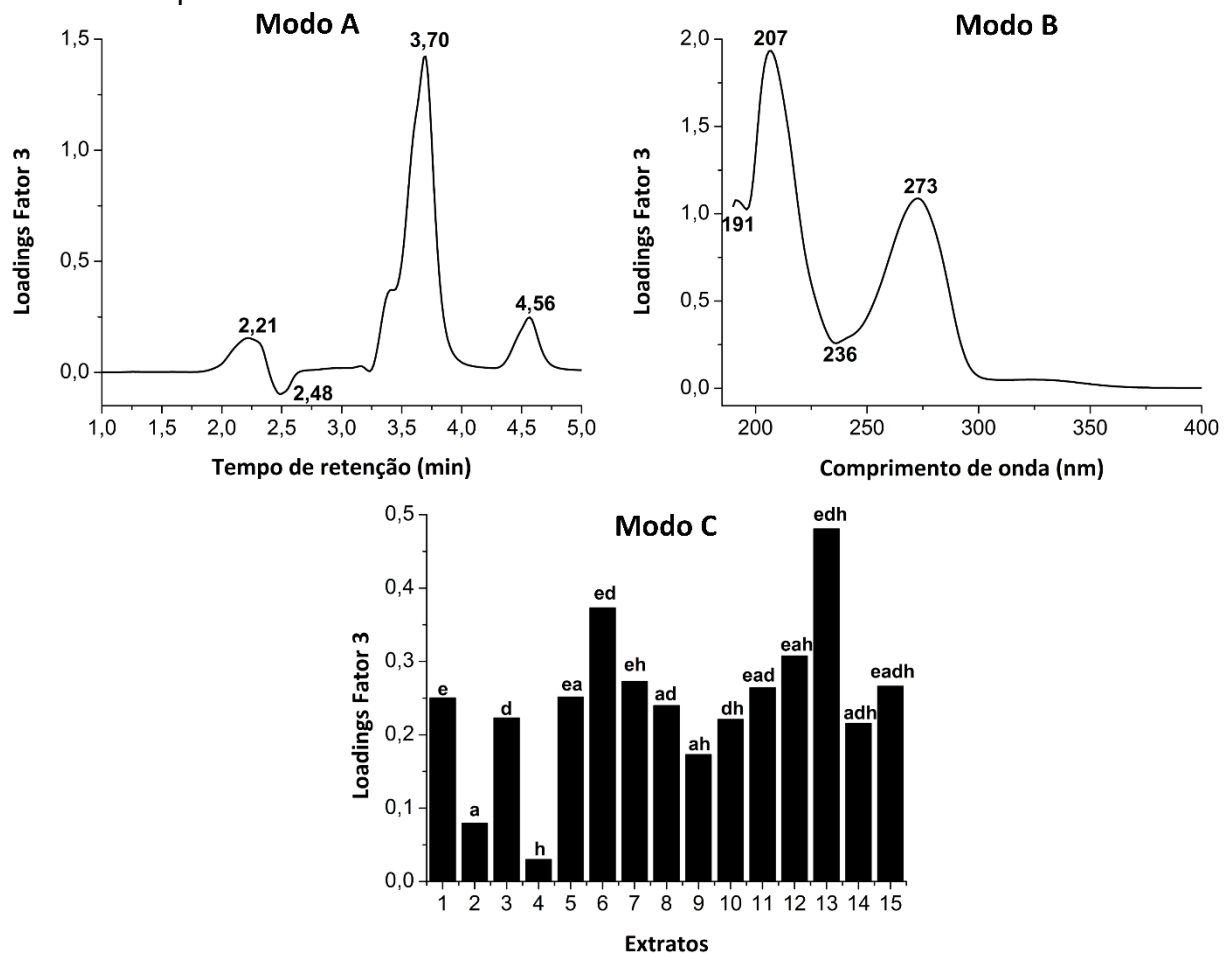


Os espectros DAD dos extratos com etanol puro e as misturas binárias apresentam o mesmo perfil espectral do modo B do segundo fator e os extratos de misturas ternárias e quaternárias apresentam um perfil semelhante, porém com uma absorvância bem inferior.

A Figura 11 mostra os três modos para terceiro fator do modelo PARAFAC, dos quais os *loadings* do modo A indicam 3 picos com valores positivos, sendo a de maior peso no tempo de retenção de 3,70 minutos e outras em 2,21 e 4,56 minutos, com valor negativo apenas um pico com baixo peso no tempo de retenção de 2,48 minutos. Os *loadings* do modo B apresentam apenas picos com valores positivos e máximos em 207 e 273 nm, os quais são máximos característicos

da classe de compostos de metilxantinas (cafeína, teobromina, teofilina, etc.). Já nos *loadings* do modo C é possível verificar que os extratos etanol-diclorometano e etanol-diclorometano-hexano apresentam os maiores pesos, e com valores intermediários, entre 0,25 e 0,35 estão localizadas as outros extratos contendo etanol em sua composição e o restante dos extratos apresentam valores de *loadings* abaixo de 0,25. No fator 3 não há tanta discrepância com relação aos *loadings* do modo C como nos fatores 1 e 2.

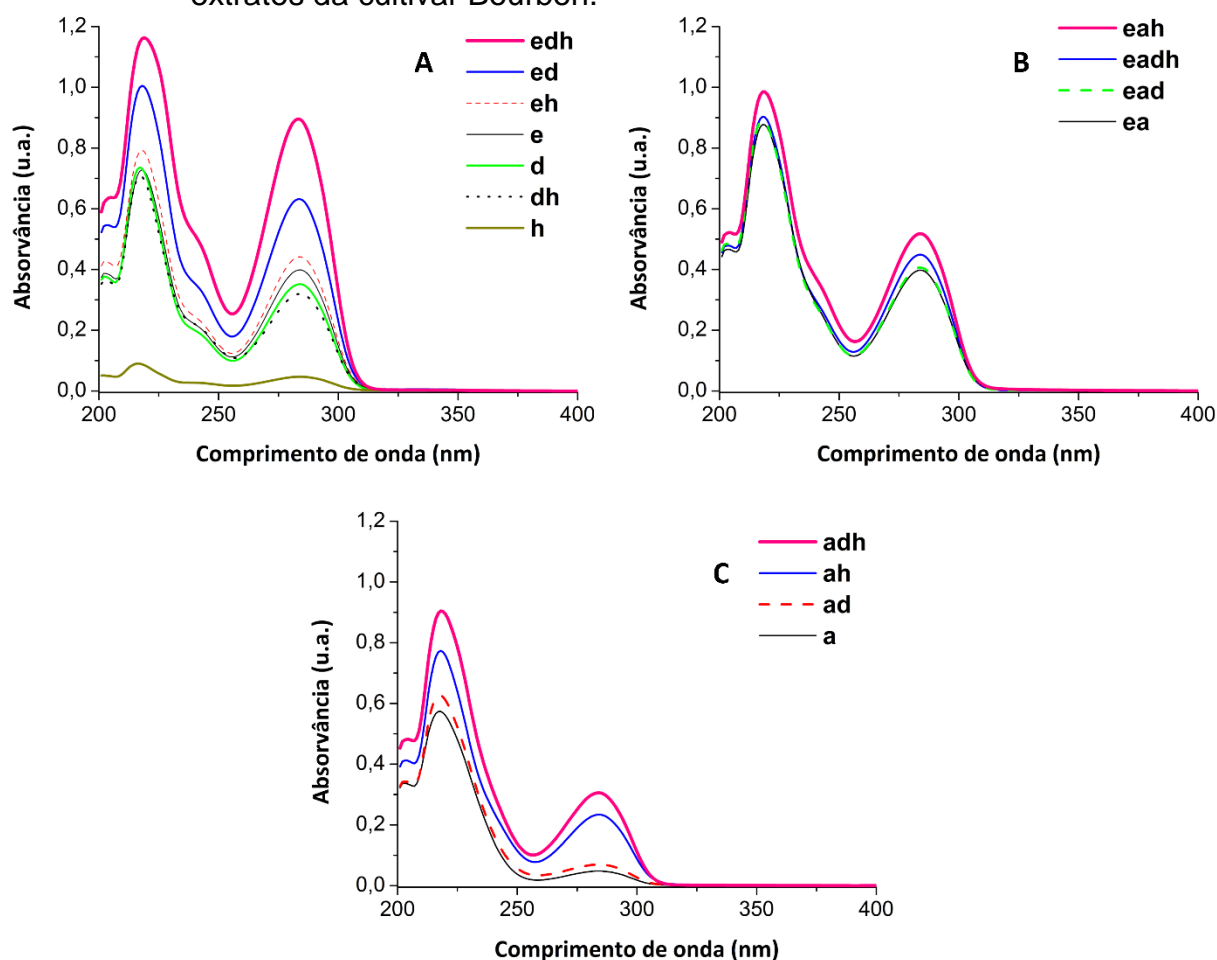
Figura 11 - *Loadings* dos modos A, B e C para o terceiro fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.



Esta combinação indica que os extratos em etanol-diclorometano e etanol-diclorometano-hexano devem apresentar uma maior quantidade do composto

com tempo de retenção em 3,70 minutos. Pela Figura 7 é possível ver que esses extratos e os que contém etanol apresentam um pico diferente daqueles dos outros extratos no mesmo tempo de retenção. Para avaliar se os compostos eram diferentes, os espectros DAD originais referentes ao tempo de retenção de 3,70 minutos foram plotados para todas os extratos, e são apresentados na Figura 12.

Figura 12 - Espectros correspondentes ao tempo de retenção de 3,70 minutos dos extratos da cultivar Bourbon.

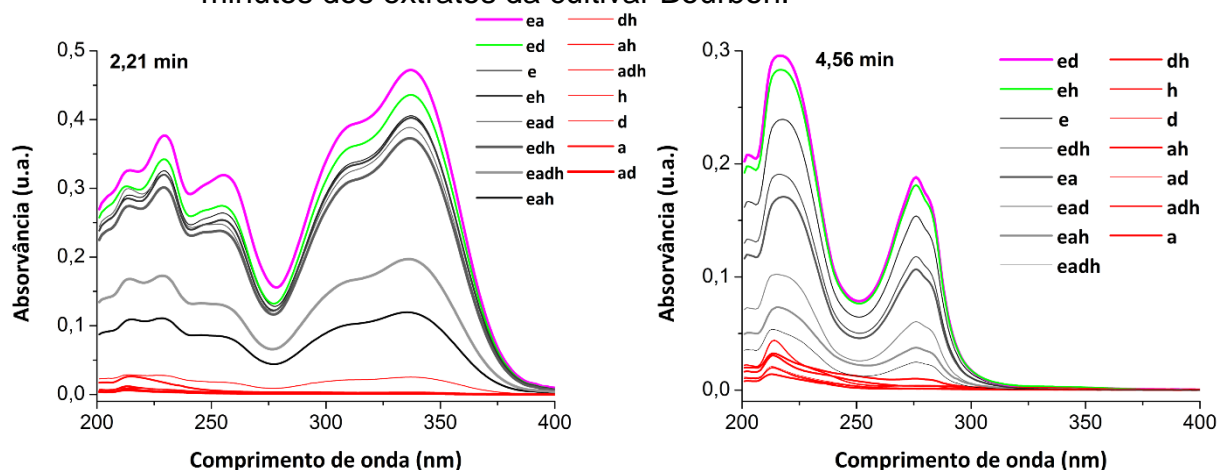


Na Figura 12A é possível ver que os extratos em etanol-diclorometano-hexano (---) e etanol-diclorometano e (---) apresentam uma maior absorvância, seguidos dos extratos em etanol-hexano, etanol, diclorometano, diclorometano-hexano e hexano, e na Figura 12B e 12C pelas misturas extratoras

contendo acetato de etila, e o que se observa é que quando a mistura contém etanol e acetato de etila (12B) o espectro apresenta um ombro próximo de 245 nm bem como na Figura 12A.

Para avaliar se os picos indicados pelo modo A do fator 3 nos tempos de retenção de 2,21 e 4,56 minutos apresentavam o mesmo perfil espectral do modo B do fator 3, seus espectros DAD foram plotados e apresentados na Figura 13.

Figura 13 - Espectros correspondentes aos tempos de retenção de 2,21 e 4,56 minutos dos extratos da cultivar Bourbon.

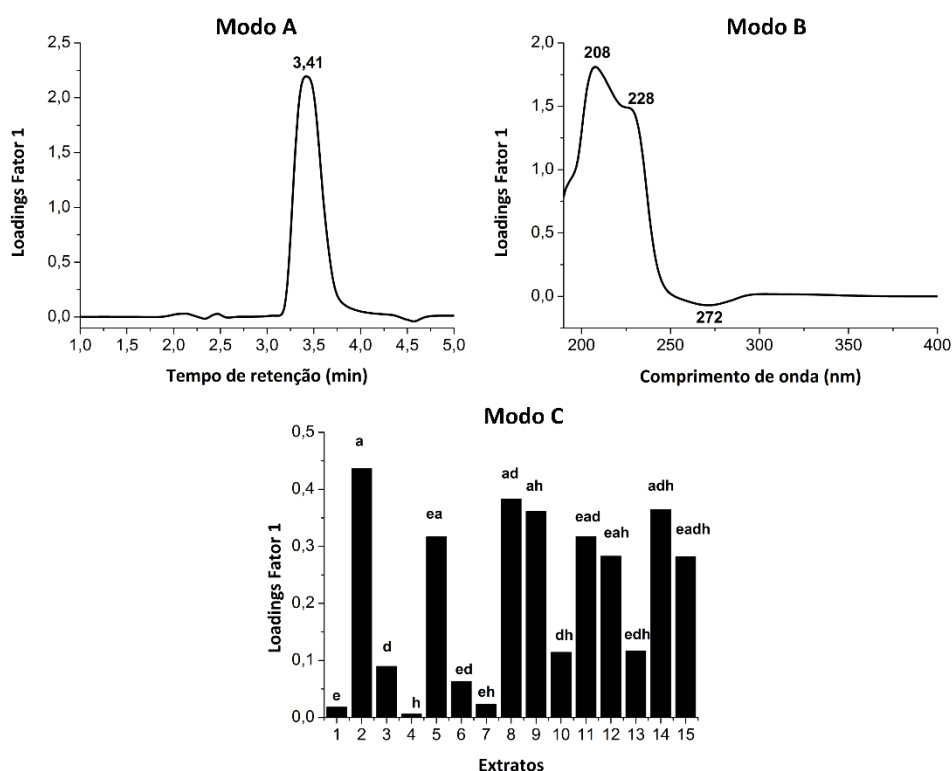


A Figura 13 indica que os extratos contendo etanol na mistura extratora também apresentam maior absorvância para os compostos representados pelos picos com tempo de retenção de 2,21 e 4,56 minutos, porém o perfil espectral do composto com tempo de retenção de 2,21 minutos é mais semelhante ao perfil espectral dos *loadings* do modo B do fator 2, que estavam associados ao pico com tempo de retenção de 2,48 minutos, indicando que existem dois compostos com esse perfil e confirmando o que Moreira e Scarminio⁴⁰ afirmaram quando observaram dois compostos com esse perfil. Já o perfil espectral do composto com tempo de retenção de 4,56 minutos é bem similar aos *loadings* do modo B do fator 3.

A diferença desses espectros DAD com relação aos apresentados na Figura 12 é que estes apresentam um ombro no comprimento de onda de 282 nm, o qual é característico da trigonelina, entretanto o modelo não consegue separar esse composto devido ao seus valores de absorvância serem muito baixos.

E portanto, para reafirmar que o modelo proposto com três fatores é o suficiente para explicar o sistema, aplicou-se um modelo PARAFAC com quatro fatores e a Figura 14 mostra o primeiro fator, a Figura 15 o segundo, a Figura 16 o terceiro e a Figura 17 o quarto.

Figura 14 - *Loadings* dos modos A, B e C para o primeiro fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.



Observa-se nas Figuras 14, 15 e 16 que para os três primeiros fatores do modelo com quatro fatores e os três fatores do modelo adotado mostrado nas Figuras 6, 9 e 11 apresentam valores de *loadings* e perfis idênticos.

Figura 15 - Loadings dos modos A, B e C para o segundo fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.

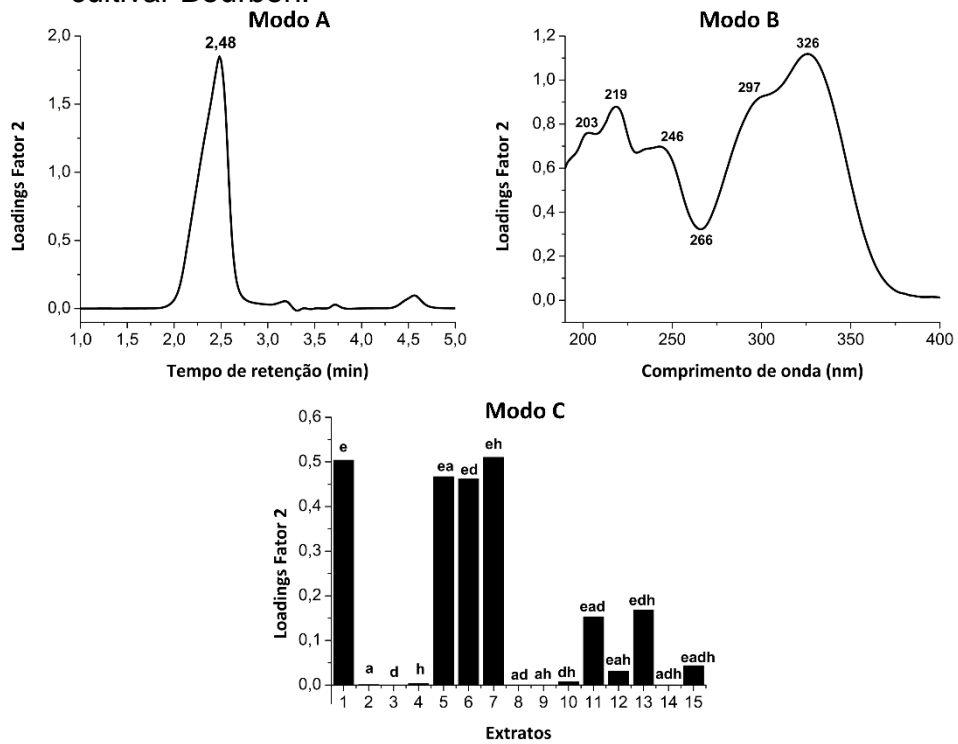


Figura 16 - Loadings dos modos A, B e C para o terceiro fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.

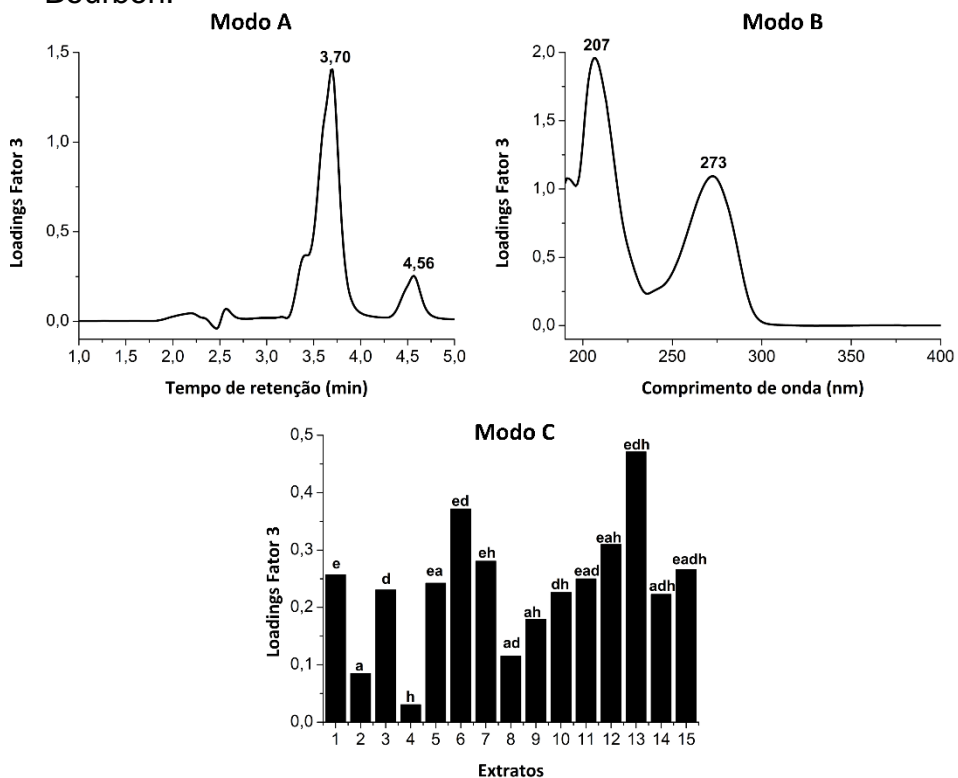
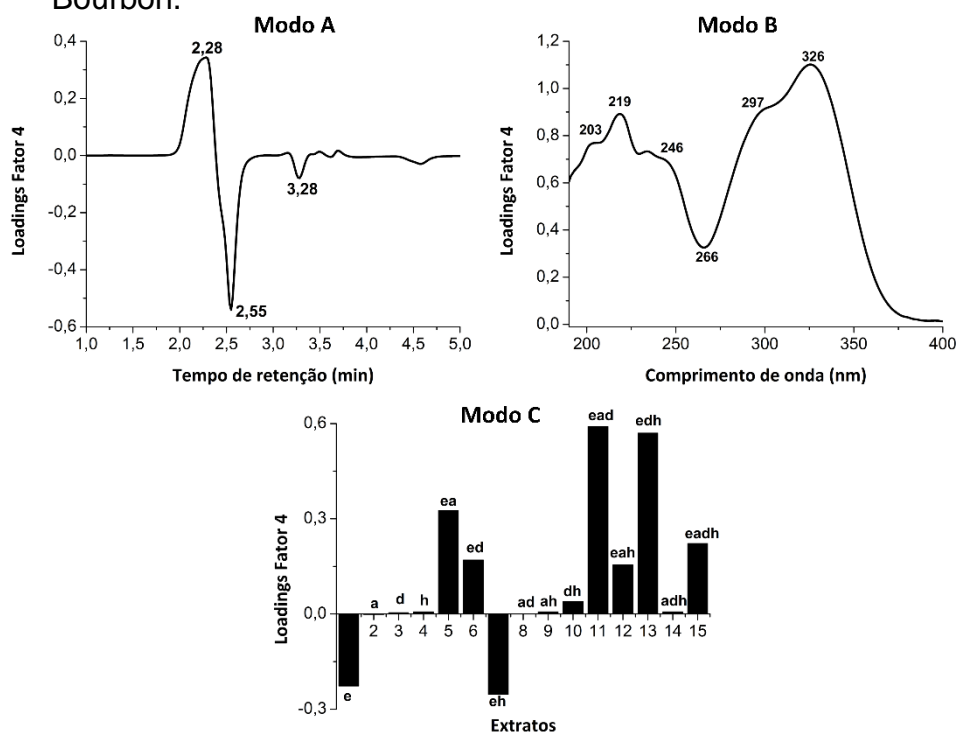


Figura 17 - *Loadings* dos modos A, B e C para o quarto fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar Bourbon.

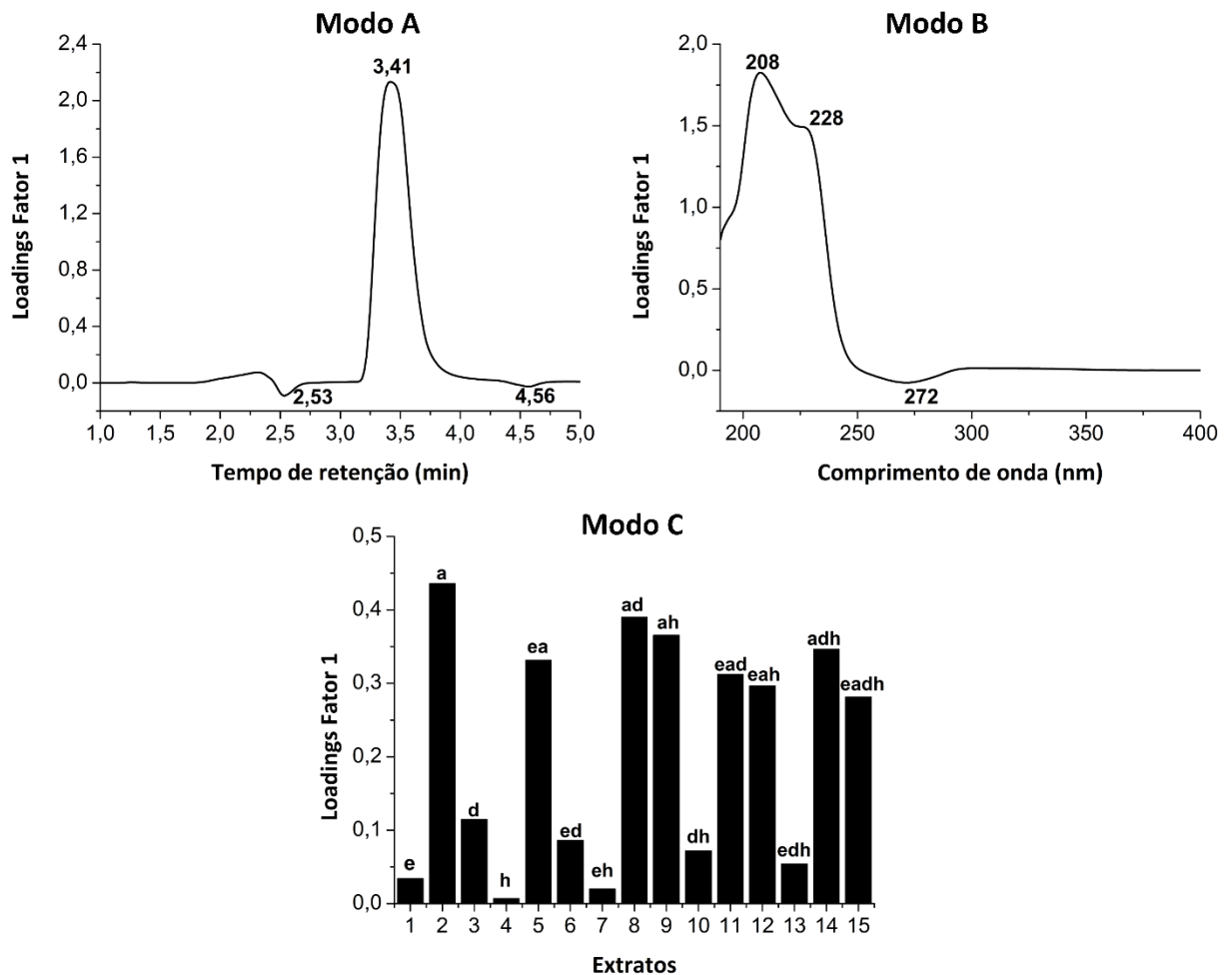


Quando observa o quarto fator na Figura 17, nota-se que o perfil proposto no Modo B é muito semelhante ao explicado pelo Modo B do segundo fator na Figura 15. Quando se analisa conjuntamente os três modos para segundo e quarto fator, observa-se que o solvente puro etanol e a mistura binária etanol-hexano conseguem extrair maior quantidade do composto com perfil dos modos B e num tempo de retenção de 2,48 minutos. As mesmas misturas conseguem extrair um composto em 2,55 minutos com o mesmo perfil espectral daquele em 2,28 minutos. Os mesmos perfis também são obtidos com outras misturas extratoras como *ead*, *edh*, *ea*, *eadh*, *ed* e *eah*.

4.2.2 Cultivar IPR101

Como se observa na Tabela 2, os valores de CORCONDIA e variância explicada para a cultivar IPR101 são aceitáveis e o modelo PARAFAC mostra-se mais eficiente com três fatores, por isso o tratamento parte dessa condição. Para a cultivar IPR101, assim como para a Bourbon, foi escolhido um modelo PARAFAC com 3 fatores para os dados tridimensionais de cromatografia líquida de alta eficiência acoplado com arranjo de fotodiodos (HPLC-DAD). A Figura 18 mostra os *loadings* dos modos A, B e C para o primeiro fator escolhido.

Figura 18 - *Loadings* dos modos A, B e C para o primeiro fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.

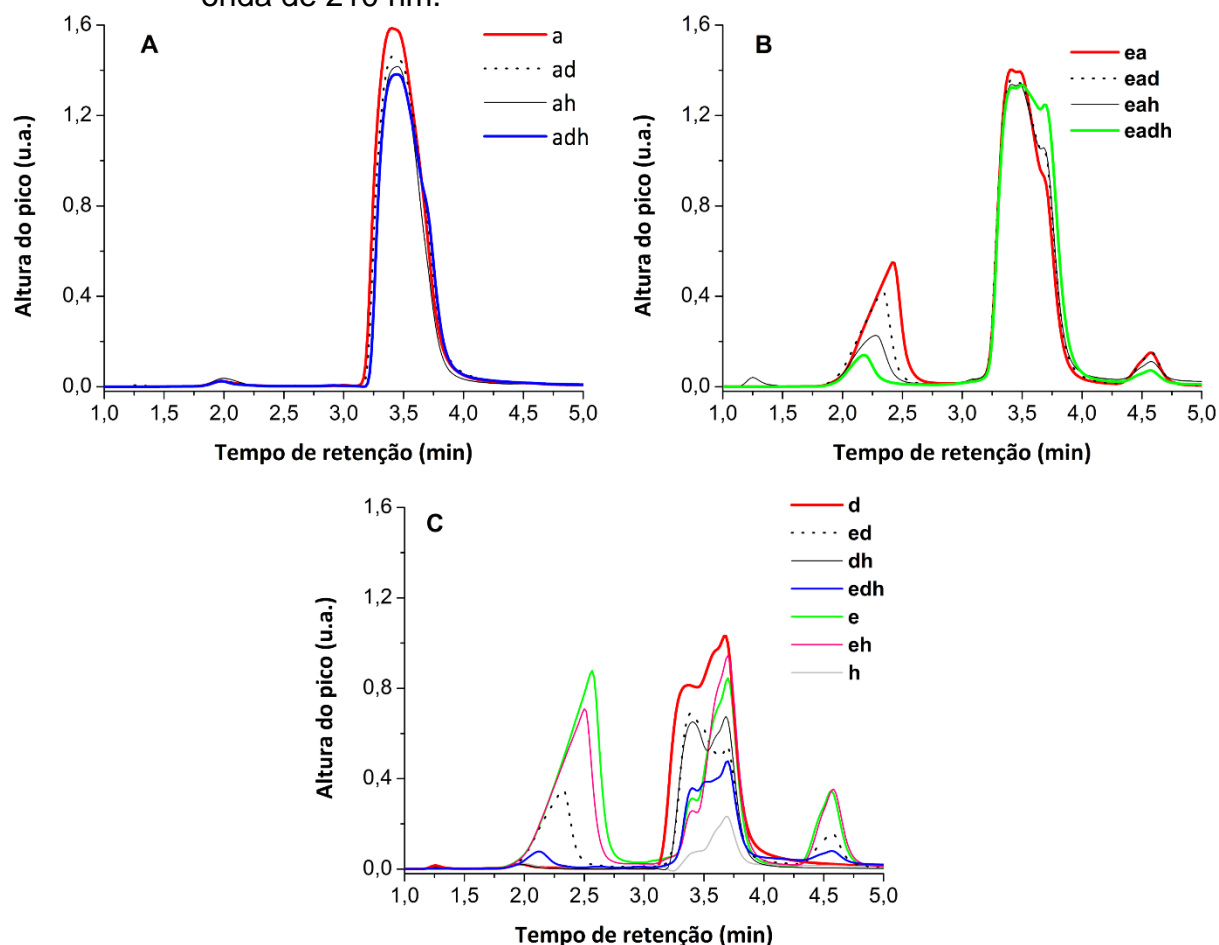


Analisando os *loadings* do primeiro fator, tem-se no modo A apenas um pico com maior peso e valor positivo no tempo de retenção de 3,41 minutos e dois picos com valores negativos nos tempos de retenção de 2,53 e 4,56 minutos. No modo B, o perfil espectral apresenta máximos com valores positivos nos comprimentos de onda de 208 e 228 nm e com valor negativo em 272 nm. Enquanto que, no modo C é possível verificar que os extratos com maiores valores de *loadings* apresentam na composição da mistura o solvente extrator acetato de etila, em seguida, com valores intermediários de *loadings* têm-se os extratos contendo o solvente diclorometano e as misturas que apresentaram os menores pesos foram etanol, hexano e etanol-hexano.

A análise conjunta dos *loadings* do fator 1 indicam que os extratos contendo acetato de etila em sua composição extratora devem apresentar uma maior quantidade extraída do composto representada pelo pico em 3,41 minutos e o perfil espectral deste composto pode apresentar máximos nos comprimentos de onda de 208 e 228 nm aproximadamente. Já os extratos com menor peso devem estar associadas aos compostos que apresentaram os menores pesos no fator 1, que correspondem ao tempo de retenção de 2,53 e 4,56 minutos.

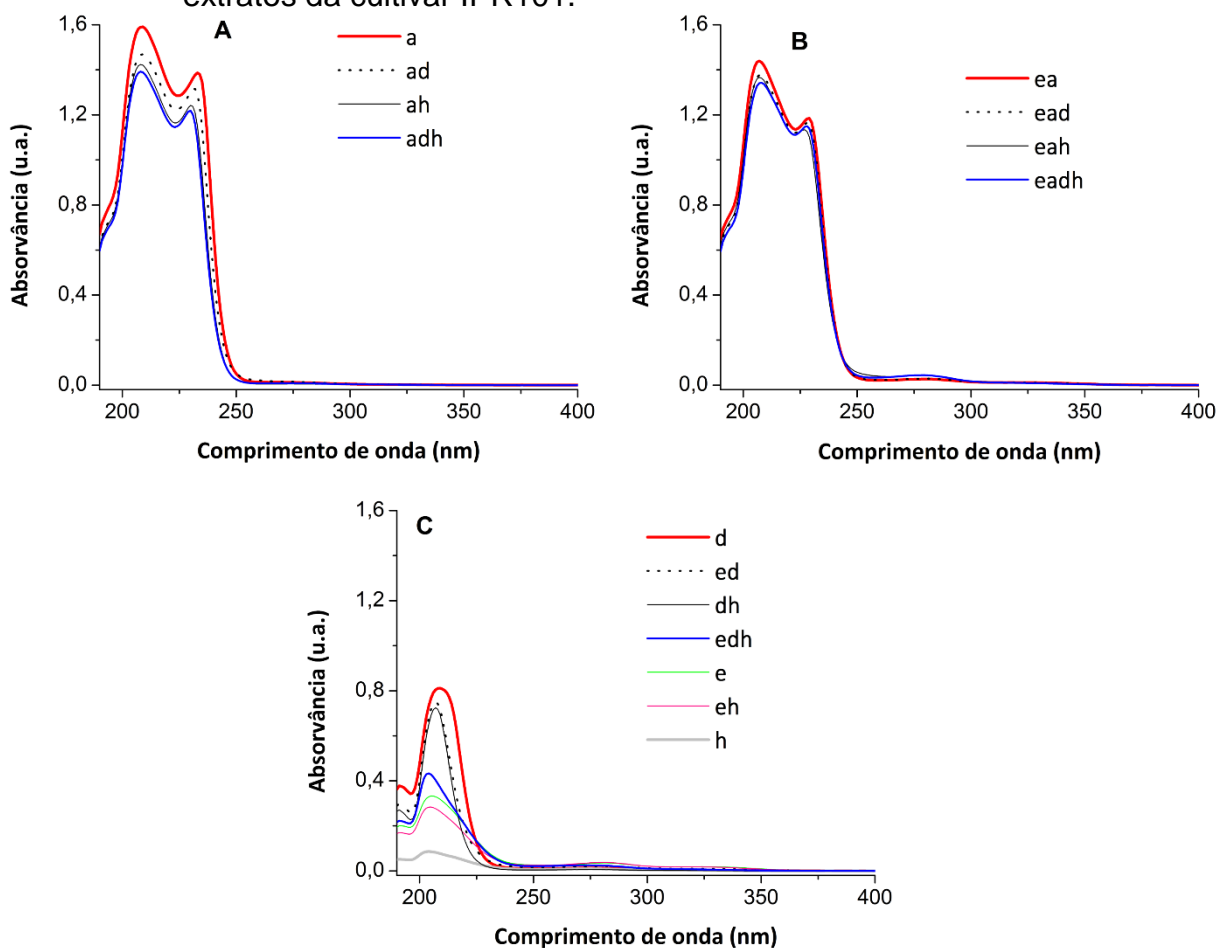
A análise visual dos cromatogramas das 15 extratos da cultivar IPR101 obtidas no comprimento de onda de 210 nm mostra que os extratos contendo acetato de etila na sua composição apresentam o pico em 3,41 minutos. Quando analisa a mistura de solventes extratores que contêm etanol e acetato de etila em sua composição, nota-se a presença de um ombro no tempo de retenção de 3,68 minutos sugerindo sobreposição dos picos nessa região. Os cromatogramas podem ser vistos na Figura 19.

Figura 19 - Cromatogramas dos extratos da cultivar IPR101 no comprimento de onda de 210 nm.



Para confirmar estes resultados, os espectros DAD correspondentes ao tempo de retenção de 3,41 minutos foram plotados e são apresentados na Figura 20. É possível verificar que para os extratos que contém acetato de etila como um dos solventes extratores em sua composição, o espectro apresenta o perfil muito semelhante aos *loadings* do fator 1 do modo B, enquanto os outros extratos apresentam um perfil espectral com apenas um máximo em torno de 208 nm.

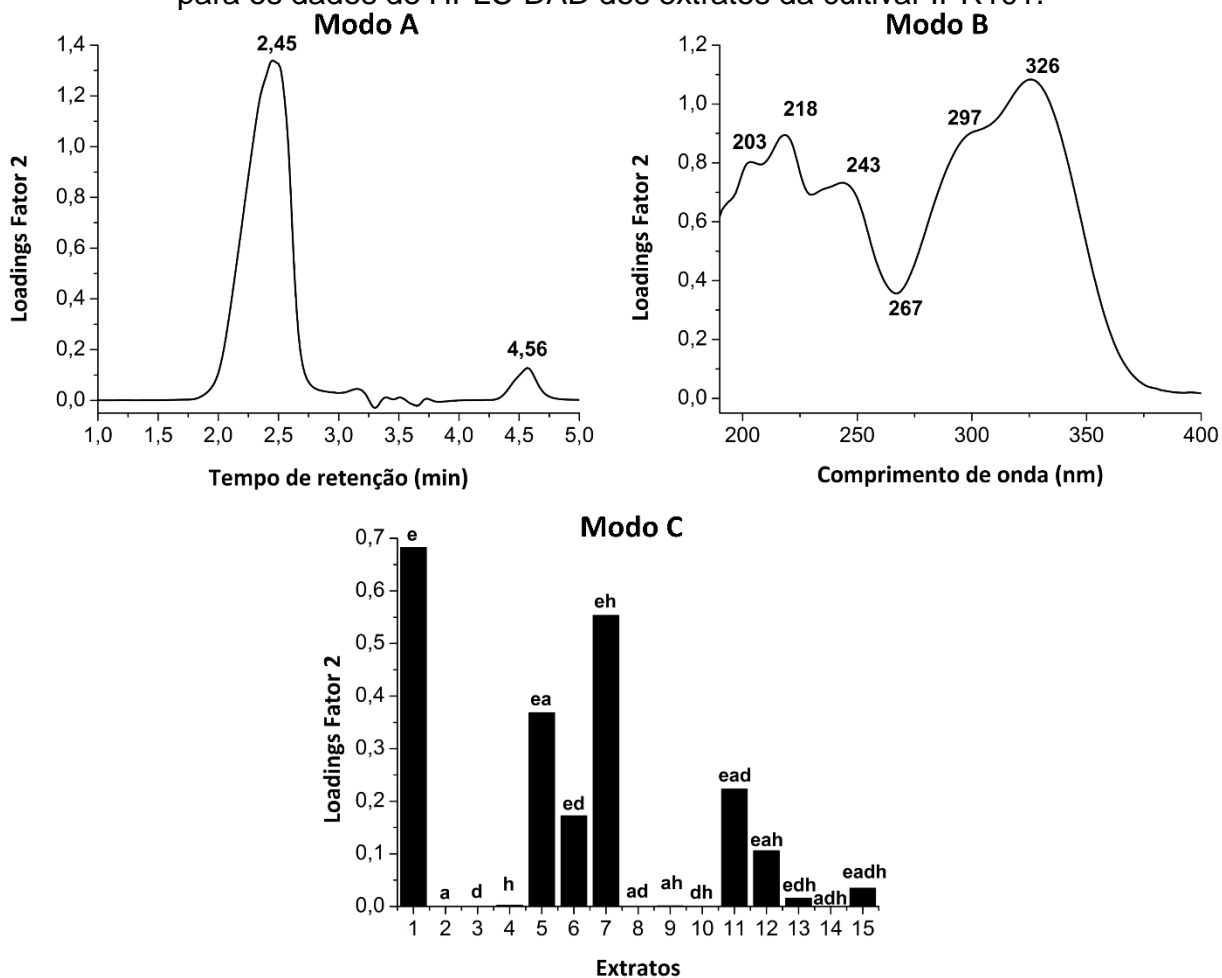
Figura 20 - Espectros correspondentes ao tempo de retenção de 3,41 minutos dos extratos da cultivar IPR101.



Para o segundo fator, Figura 21, os *loadings* do modo A apresentam apenas um pico com maior peso de valor positivo no tempo de retenção de 2,45 minutos, enquanto que os *loadings* do modo B apresentam uma série de comprimentos de onda máximos, todos com valores positivos em 203, 218, 243, 297 e 326 nm, e novamente, assim como na cultivar Bourbon, são máximos característicos da classe de compostos de ácidos clorogênicos. Fica evidente que a análise dos *loadings* do modo C demonstram que os extratos contendo o solvente extrator etanol na composição da mistura são separados do restante, as quais apresentam pesos bem próximos de zero. Os extratos com etanol puro e misturas

binárias contendo etanol apresentaram maior peso do que os extratos preparados com misturas ternárias e quaternárias.

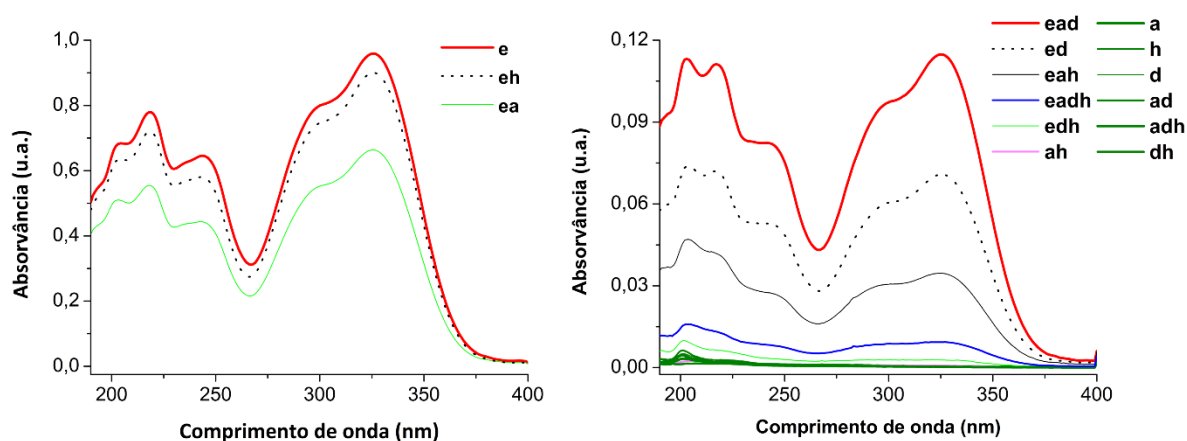
Figura 21 - *Loadings* dos modos A, B e C para o segundo fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.



Analisando conjuntamente o fator 2, nota-se que os extratos contendo etanol apresentam o pico em aproximadamente 2,45 minutos, o que pode ser confirmado pelos cromatogramas apresentados na Figura 19, nos quais também é possível verificar um certo deslocamento desse pico. Para confirmar os comprimentos de onda máximos indicados pelo modo B os espectros DAD referentes ao composto ou mistura de compostos com tempo de retenção de 2,45 minutos foram plotados e são apresentados na Figura 22.

Os espectros DAD dos extratos com etanol puro e as misturas binárias etanol-acetato de etila e etanol-hexano apresentam o mesmo perfil espectral do modo B do fator 2 e o extrato de mistura binária etanol-diclorometano, os de misturas ternárias e quaternárias apresentam um perfil semelhante, porém com uma absorvância bem inferior.

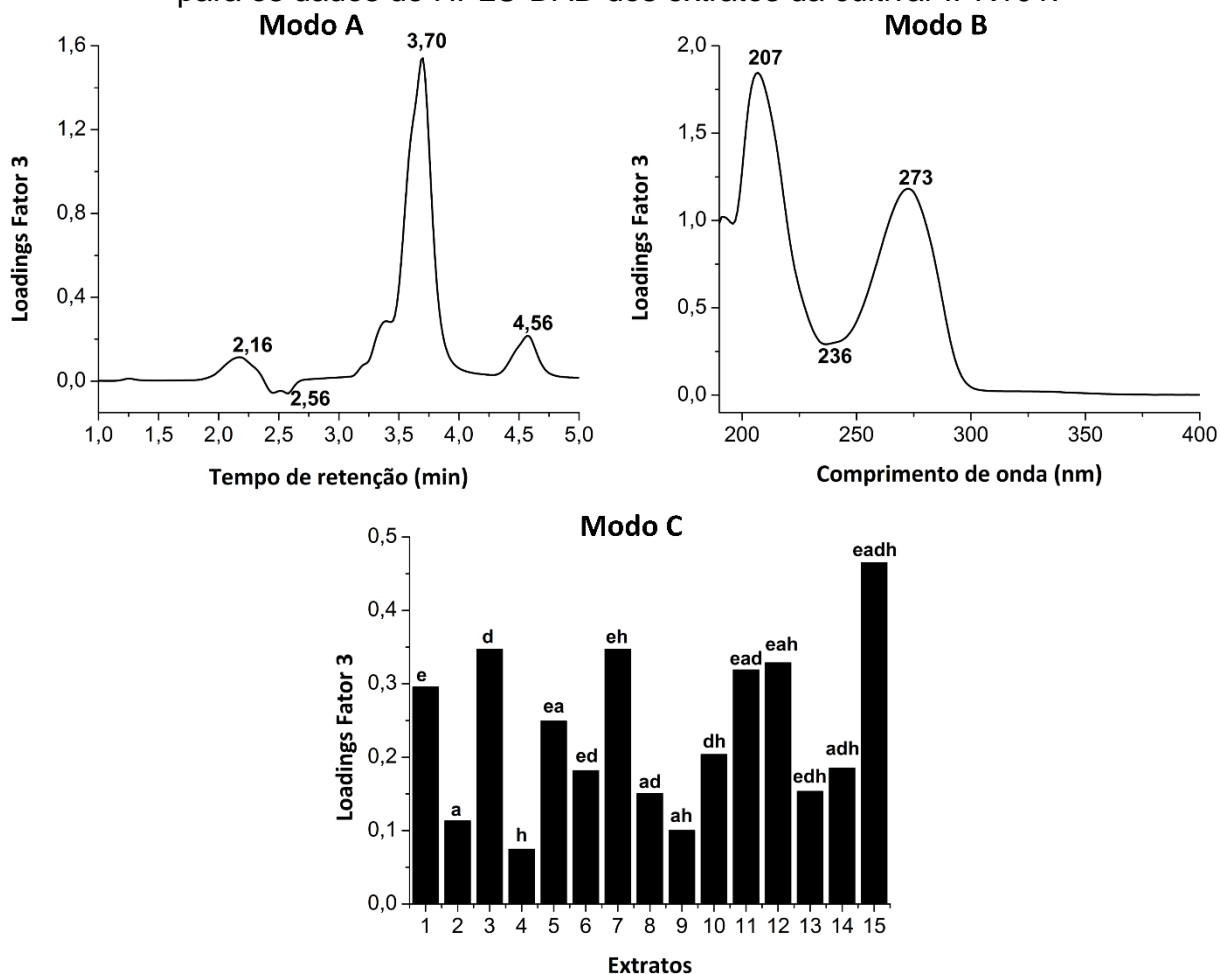
Figura 22 - Espectro correspondente ao tempo de retenção de 2,45 minutos dos extratos da cultivar IPR101.



Analisando agora o terceiro fator na Figura 23, no modo A apenas 3 picos são indicados com valores positivos, sendo a de maior peso no tempo de retenção de 3,70 minutos e outras em 2,16 e 4,56 minutos, e com valor negativo apenas um pico com baixo peso no tempo de retenção de 2,56 minutos. Os *loadings* do modo B, igualmente a cultivar Bourbon, apresentam apenas picos com valores positivos e máximos em 207 e 273 nm, os quais são máximos característicos da classe de compostos de metilxantinas (cafeína, teobromina, teofilina, etc.). Já nos *loadings* do modo C é possível verificar que o extrato etanol-acetato de etila-diclorometano-hexano apresenta o maior peso, e com valores intermediários, entre 0,25 e 0,35 estão localizados os extratos em diclorometano, etanol-hexano, etanol-acetato de etila-hexano, etanol-acetato de etila-diclorometano e etanol, e o restante

dos extratos (*dh*, *adh*, *ed*, *edh*, *ad*, *a*, *ah* e *h*) apresentam valores de *loadings* abaixo de 0,25. No fator 3 não há tanta discrepância com relação aos *loadings* do modo C como nos fatores 1 e 2.

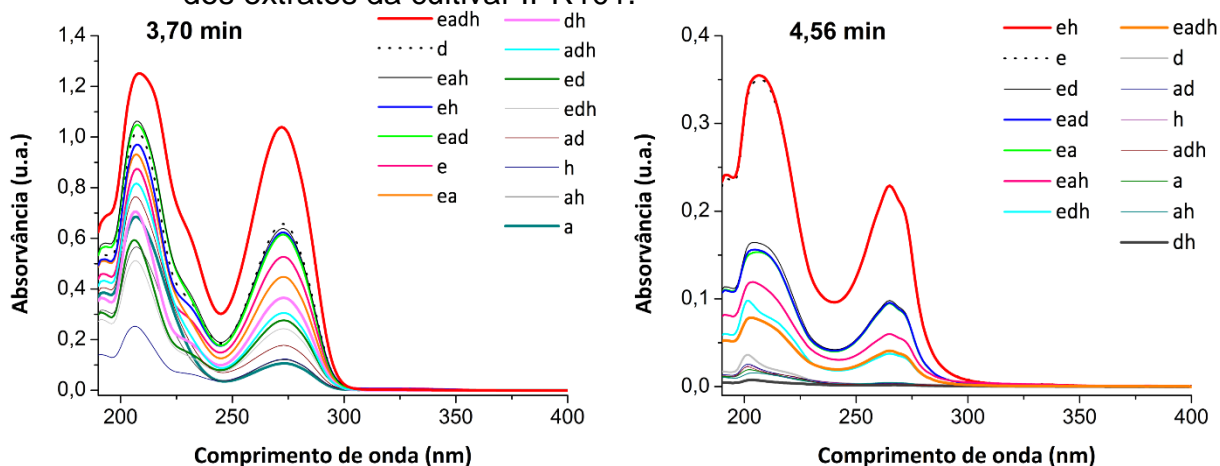
Figura 23 - *Loadings* dos modos A, B e C para o terceiro fator do modelo PARAFAC para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.



Esta combinação indica que o extrato etanol-acetato de etila-diclorometano-hexano deve apresentar uma maior quantidade do composto com tempo de retenção em 3,70 minutos. Pela Figura 19 é possível ver que esse extrato e os que contêm etanol e acetato de etila em sua composição extratora apresentam um pico sobreposto em 3,70 minutos em relação aos dos outros extratos no mesmo tempo de retenção. Para avaliar se os compostos são diferentes, os espectros DAD

referentes ao tempo de retenção de 3,70 e 4,56 minutos foram plotados para todos os extratos, e são apresentados na Figura 24.

Figura 24 - Espectro correspondente ao tempo de retenção de 3,70 e 4,56 minutos dos extratos da cultivar IPR101.

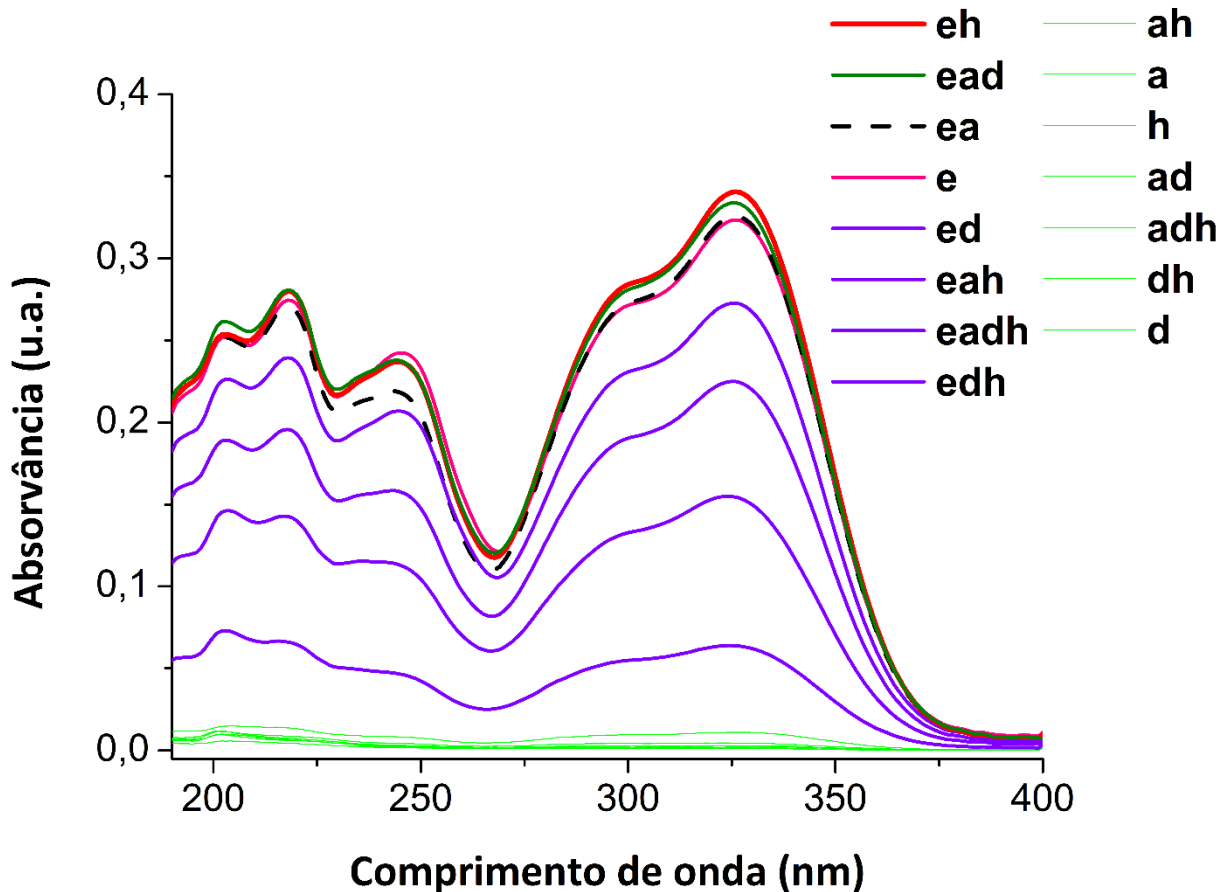


Nota-se que, ao analisar o perfil espectrofotométrico dos extratos em 3,70 minutos, como mostrado na Figura 24, confirma-se a análise conjunta dos três modos do terceiro fator que a maior concentração do composto extraído é dada pela mistura quaternária que aparece como um pico sobreposto em B na Figura 19 nas misturas de solventes extratores contendo etanol e acetato de etila. E que em 4,56 minutos encontra-se outro composto, entretanto diferentemente da encontrada no modo B do terceiro fator da Figura 23, esse espectro apresenta um ombro no comprimento de onda de 282 nm, o qual é característico da trigonelina, e novamente o modelo não consegue separar esse composto devido ao seus valores de absorvância serem muito baixos, assim como na cultivar Bourbon apresentada na Figura 13 no tempo de retenção de 4,56 minutos.

A Figura 25 mostra os espectros DAD obtidos dos extratos preparados em etanol e suas misturas no tempo de retenção 2,16 minutos. Observa-se um perfil espectral igual do composto descrito na Figura 22 e no modo B do

segundo fator, Figura 21. Como os tempos de retenção para o mesmo perfil são diferentes podemos inferir que existem dois compostos com o mesmo perfil, sendo um mais predominante no tempo de retenção de 2,45 minutos do que o outro em 2,16 minutos.

Figura 25 - Espectro correspondente ao tempo de retenção de 2,16 minutos dos extratos contendo etanol na mistura extratora da cultivar IPR101.



Novamente, para a cultivar IPR101, para ratificar que o modelo proposto com três fatores é o suficiente para explicar o sistema, aplicou-se um modelo PARAFAC com quatro fatores e a

Figura 26 mostra o primeiro fator, a Figura 27 o segundo, a Figura 28 o terceiro e a Figura 29 o quarto, e a análise conjunta possibilita inferir que o modelo traz informação química e separa compostos de uma classe para os extratos da cultivar IPR101.

Figura 26 - *Loadings* dos modos A, B e C para o primeiro fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.

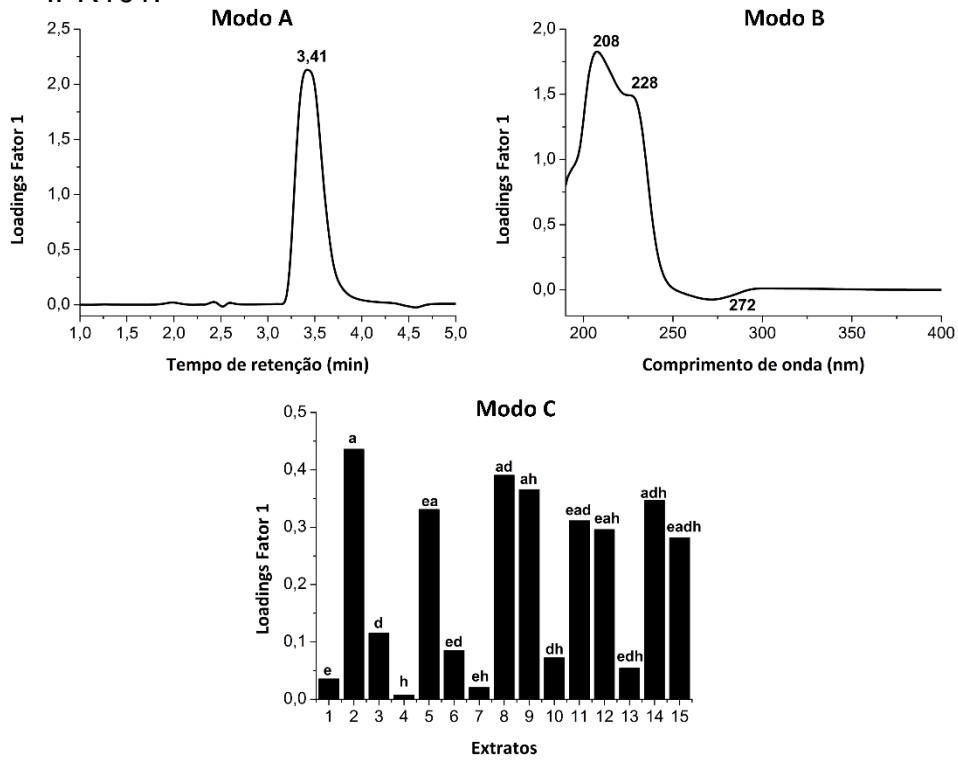


Figura 27 - *Loadings* dos modos A, B e C para o segundo fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.

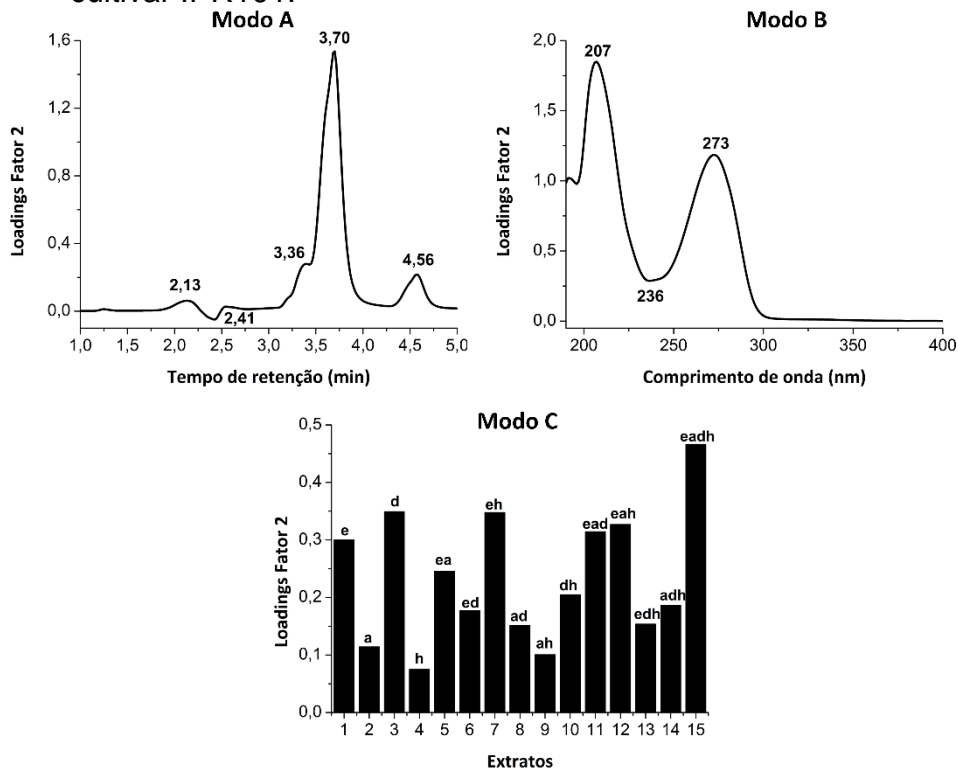


Figura 28 - *Loadings* dos modos A, B e C para o terceiro fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.

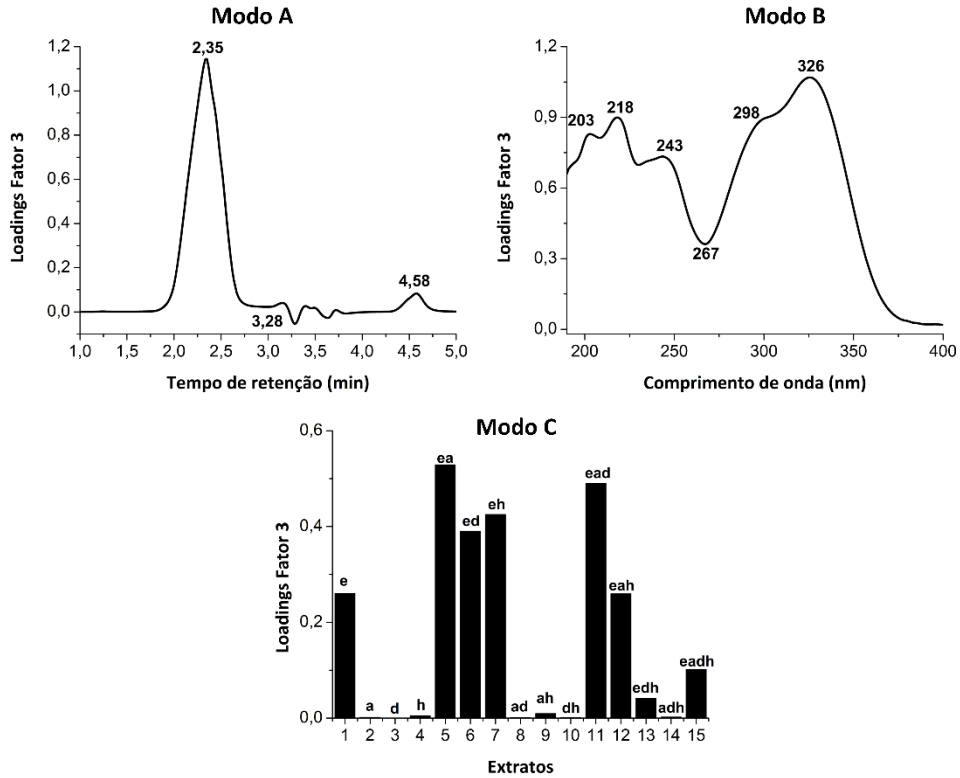
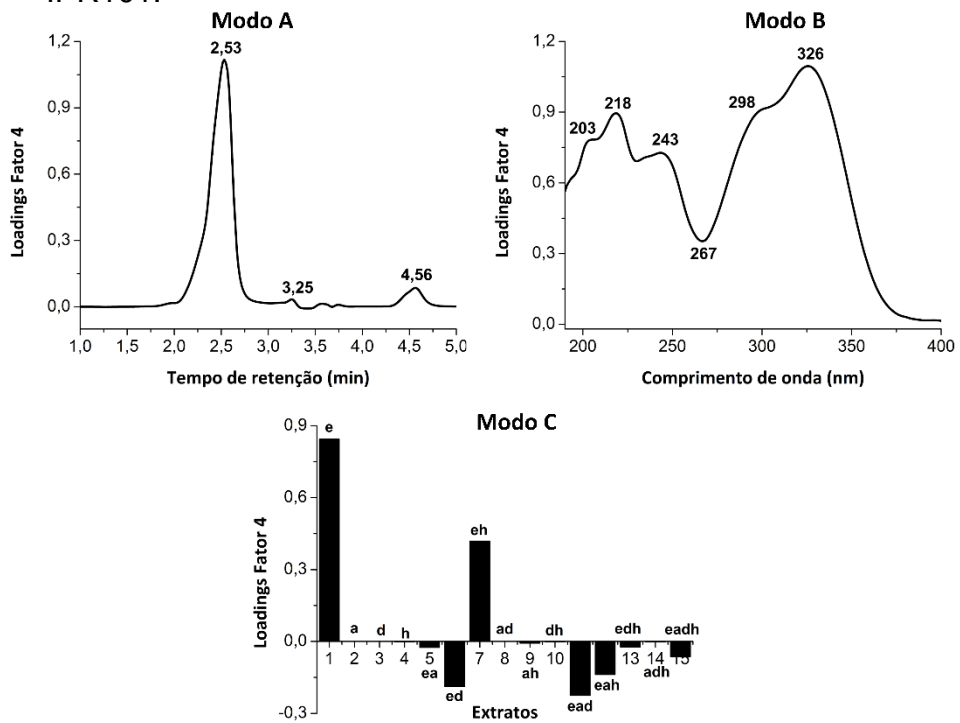


Figura 29 - *Loadings* dos modos A, B e C para o quarto fator do modelo PARAFAC com 4 fatores para os dados de HPLC-DAD dos extratos da cultivar IPR101.



Quando observa o quarto fator na Figura 29, nota-se que o perfil proposto no Modo B é muito semelhante ao explicado pelo Modo B do terceiro fator na Figura 28. Quando analisa conjuntamente os três modos para terceiro e quarto fator, observa-se que o solvente puro e as misturas contendo etanol conseguem extrair maior quantidade do composto com perfil dos modos B e num tempo de retenção de 2,35 e 2,53 minutos, concordando com os resultados obtidos por Moreira e Scarminio⁴⁰.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir que, para ambas as cultivares o melhor modelo PARAFAC apresentou 3 fatores, porque apresentaram valores aceitáveis de consistência e de variância explicada. Entretanto, quando utilizado um modelo PARAFAC com 4 fatores, observou-se que quimicamente o modelo mostra a existência de mais de um composto apesar de não ser recomendado matematicamente por seus valores de consistência serem menores que 20%. No caso da cultivar Bourbon, o segundo e o quarto fator conseguem separar dois perfis de ácidos clorogênicos em três tempos de retenção (2,28, 2,48 e 2,55 minutos) e para a IPR101, o terceiro e o quarto fator explicam dois perfis de ácidos clorogênicos em dois tempos de retenção (2,35 e 2,53 minutos).

Em ambos os casos o fator 1 do modelo PARAFAC conseguiu discriminar os extratos com relação aos obtidos em acetato de etila, cujo perfil espectrofotométrico ainda não foi identificado, o fator 2 indicou que os extratos em etanol puro e as misturas binárias contendo etanol foram mais eficientes na extração dos ácidos clorogênicos⁷ e o fator 3 permitiu identificar o perfil espectral da metilxantina^{42,43} presente em todos os extratos, sendo a maior concentração nas misturas etanol-diclorometano-hexano e etanol-acetato de etila-diclorometano-hexano para as cultivares Bourbon e IPR101, respectivamente, e prever a maior concentração de trigonelina⁴²⁻⁴⁵ na mistura etanol-diclorometano para a Bourbon e nos solventes extratores etanol e etanol-hexano para a IPR101.

REFERÊNCIAS

1. NASCIMENTO, Luís Marques do; SPEHAR, Carlos Roberto; SANDRI, Delvio. Produtividade de cafeeiro orgânico no cerrado após a poda sob diferentes regimes hídricos. **Coffee Science**, v. 9, n. 3, p. 354-365, 2014.
2. CROZIER, Alan; CLIFFORD, Mike N.; ASHIHARA, Hiroshi (Eds.). **Plant secondary metabolites occurrence, structure and role in the human diet**. John Wiley & Sons, 2008.
3. BENNETT, Richard N.; WALLSGROVE, Roger M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.
4. SCHOLZ, Maria Brígida dos Santos et al. Atributos sensoriais e características físico-químicas de bebidas de cultivares de café do IAPAR. **Coffee Science**, v. 8, n. 1, p. 6-16, 2013.
5. POMPELLI, Marcelo F. et al. The effect of light and nitrogen availability on the caffeine, theophylline and allantoin contents in leaves of *Coffea arabica* L. **Aims Environmental Science**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2014.
6. DELAROZA, Fernanda et al. Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 1929-1938, 2014.
7. BELAY, Abebe; GHOLAP, A. V. Characterization and determination of chlorogenic acids (CGA) in coffee beans by UV-Vis spectroscopy. **African Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 234-240, 2009.
8. LIU, Jun-Yan et al. Metabolic profiling of murine plasma reveals an unexpected biomarker in rofecoxib-mediated cardiovascular events. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 39, p. 17017-17022, 2010.
9. BASANTA, Maria et al. Non-invasive metabolomic analysis of breath using differential mobility spectrometry in patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy smokers. **Analyst**, v. 135, n. 2, p. 315-320, 2010.
10. ZHANG, Aihua et al. Modern analytical techniques in metabolomics analysis. **Analyst**, v. 137, n. 2, p. 293-300, 2012.
11. NICHOLSON, Jeremy K.; LINDON, John C. Systems biology: Metabonomics. **Nature**, v. 455, n. 7216, p. 1054-1056, 2008.
12. KOSMIDES, Alyssa K. et al. Metabolomic fingerprint: challenges and opportunities. **Critical Reviews™ in Biomedical Engineering**, v. 41, n. 3, 2013.
13. FIEHN, Oliver et al. Metabolite profiling for plant functional genomics. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 11, p. 1157-1161, 2000.

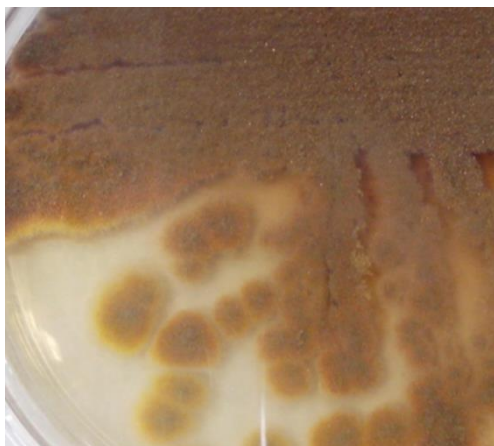
14. GOMEZ-CASATI, Diego F.; ZANOR, Maria I.; BUSI, María V. Metabolomics in plants and humans: applications in the prevention and diagnosis of diseases. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
15. STITT, Mark; FERNIE, Alisdair R. From measurements of metabolites to metabolomics: an 'on the fly' perspective illustrated by recent studies of carbon-nitrogen interactions. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 136-144, 2003.
16. CUBERO-LEON, Elena; PEÑALVER, Rosa; MAQUET, Alain. Review on metabolomics for food authentication. **Food Research International**, v. 60, p. 95-107, 2014.
17. SMILDE, Age K. et al. Characterizing the precision of mass-spectrometry-based metabolic profiling platforms. **Analyst**, v. 134, n. 11, p. 2281-2285, 2009.
18. ZHANG, Jin-lan et al. Chemical fingerprint and metabolic fingerprint analysis of Danshen injection by HPLC–UV and HPLC–MS methods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 36, n. 5, p. 1029-1035, 2005.
19. HARRIS, Cory S. et al. A single HPLC-PAD-APCI/MS method for quantitative comparison of phenolic compounds found in leaf, stem, root and fruit of *Vaccinium angustifolium*. **Phytochemical Analysis**, v. 18, n. 2, p. 161-169, 2007.
20. OMS-OLIU, G.; ODRIOZOLA-SERRANO, I.; MARTÍN-BELLOSO, O. Metabolomics for assessing safety and quality of plant-derived food. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 1172-1183, 2013.
21. PASSARI, Livia Maria Zambrozi Garcia; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. Experimental designs characterizing seasonal variations and solvent effects on the quantities of coumarin and related metabolites from *Mikania laevigata*. **Analytica Chimica Acta**, v. 821, p. 89-96, 2014.
22. SOARES, Patricia Kaori; BRUNS, Roy Edward; SCARMINIO, Ieda Spacino. Principal component and Tucker3 analyses of high performance liquid chromatography with diode-array detection fingerprints of crude extracts of *Erythrina speciosa* Andrews leaves. **Analytica Chimica Acta**, v. 736, p. 36-44, 2012.
23. KIRKLAND, Joseph J.; SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC Method Development**. 2. ed. Nova Iorque: John Wiley & Sons Inc., 800 p., 1997.
24. BRUNS, Roy E.; SCARMINIO, Ieda Spacino; BARROS NETO, Benicio de. **Statistical design-chemometrics**. Elsevier, 422 p., 2006.
25. WIBERG, Kent; JACOBSSON, Sven P. Parallel factor analysis of HPLC-DAD data for binary mixtures of lidocaine and prilocaine with different levels of chromatographic separation. **Analytica Chimica Acta**, v. 514, n. 2, p. 203-209, 2004.

26. SENA, Marcelo M.; TREVISAN, Marcello G.; POPPI, Ronei J. PARAFAC: uma Ferramenta Quimiométrica para Tratamento de Dados Multidimensionais. Aplicações na Determinação Direta de Fármacos em Plasma Humano por Espectrofluorimetria. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 910-920, 2005.
27. BRO, Rasmus. PARAFAC. Tutorial & applications. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. Philadelphia, v. 38, n. 2, p. 149-171, out. 1997.
28. SMILDE, Age; BRO, Rasmus; GELADI, Paul. **Multi-way analysis: applications in the chemical sciences**. Nova Iorque: John Wiley & Sons, 396 p., 2004.
29. KIERS, Henk A. L.; KINDEREN, Albert der. A fast method for choosing the numbers of components in Tucker3 analysis. **British Journal of Mathematical and Statistical Psychology**, v. 56, n. 1, p. 119-125, 2003.
30. LOUWERSE, D. J.; SMILDE, A. K. Multivariate statistical process control of batch processes based on three-way models. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 7, p. 1225-1235, 2000.
31. BRO, Rasmus. **Multi-way Analysis in the Food Industry: Models, Algorithms & Applications**. 1998. 312 f. Tese (Doutorado em Filosofia – Ph. D.) – Universidade de Amsterdã, Departamento de Ciência dos Alimentos e Laticínios, Amsterdã. 1998.
32. HARSHMAN, Richard A.; LUNDY, Margaret E. PARAFAC: Parallel factor Analysis. **Computational Statistics & Data Analysis**, Holanda do Norte, v. 18, n. 1, p. 39-72, 1994.
33. REIS, Marlon Martins dos. **Desenvolvimento e Aplicação de Métodos Quimiométricos de Ordem Superior**. 2002. 139 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas. 2002.
34. STANIMIROVA, I. et al. N-way exploration of environmental data obtained from sequential extraction procedure. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 96, n. 2, p. 203-209, 2009.
35. KROONENBERG, Pieter M. **Applied Multiway Data Analysis**. 1. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2008.
36. BRO, Rasmus; KIERS, Henk A. L. A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. **Journal of chemometrics**, v. 17, n. 5, p. 274-286, 2003.
37. MATHWORKS. **MATLAB 6.5**. Natick, MA, 2000.
38. ANDERSSON, Claus A.; BRO, Rasmus. The *N*-way Toolbox for MATLAB. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 52, n. 1, p. 1-4, 2000.

39. BARROS NETO, Benício de; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2001. 401 p.
40. MOREIRA, Ivanira; SCARMINIO, Ieda Spacino. Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. **Talanta**, v. 107, p. 416-422, 2013.
41. MOREIRA, Ivanira. **Análise Exploratória de Cultivares de *Coffea arabica* por Impressão Digital Espectroscópica e Cromatográfica**. 2013. 115 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
42. VAN DER VOSSSEN, Herbert A. M. Agronomy I: Coffee breeding practices. In: CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. (Eds.). **Coffee, recent developments**. 1. ed. Oxford: Blackwell Science, 2001. p. 184-201.
43. BELAY, Abebe et al. Measurement of caffeine in coffee beans with UV/vis spectrometer. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 310-315, 2008.
44. MOORES, R. G.; GREININGER, D. M. Determination of trigonelline in coffee. **Analytical Chemistry**, v. 23, n. 2, p. 327-331, 1951.
45. BERKING, S. Homarine (N-methylpicolinic acid) and trigonelline (N-methylnicotinic acid) appear to be involved in pattern control in a marine hydroid. **Development**, v. 99, n. 2, p. 211-220, 1987.
46. BARROS NETO, Benício de; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy E. 25 anos de quimiometria no Brasil. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1401-1406, 2006.

CAPÍTULO II

ANÁLISE EXPLORATÓRIA DA ENZIMA CAFEÍNA DEMETILASE EM *Coffea arabica*



Células replicadas de espécie característica de fungo isoladas e purificadas de grãos crus de *C. arabica*.

Destaques

- A microflora das cultivares de *C. arabica* foi isolada em três meios de cultivo: DYG'S, YEPD e PDA.
- A purificação das cepas ocorreu durante dois meses.
- Para analisar a capacidade de degradação da cafeína, a microflora foi transferida para meio líquido.
- A incubação ocorreu durante 72 horas.
- A análise por técnica espectrofotométrica na região do UV-vis, permitiu identificar a cafeína, entretanto não foi possível quantificar sua degradação.
- A cultivar desenvolvida para combater a ferrugem da folha do cafeeiro mostrou-se menos suscetível ao crescimento de fungos filamentosos, bactérias e leveduras.

1 INTRODUÇÃO

Com o crescer do consumo do café no Brasil, cada vez mais a população exige qualidade nos produtos provenientes da matéria-prima dessa bebida que se tornou tão popular no território nacional. Segundo a ABIC (Associação Brasileira da Indústria de Café), o Brasil é o maior produtor, sendo responsável por 30% do mercado internacional e o segundo mercado consumidor de café. Os principais centros produtores de café no Brasil são Minas Gerais, São Paulo, Espírito Santo e Paraná. A produção da cultivar mais consumida, o *Coffea arabica*, se concentra em São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia e parte do Espírito Santo, enquanto a cultivar *C. robusta* é plantada principalmente no Espírito Santo e Rondônia.

A espécie *C. arabica* foi descrita por Linnaeus em 1753, da qual existem atualmente duas mais conhecidas variedades, a Typica e a Bourbon. A espécie *arabica* média é um arbusto grande com folhas ovais verde-escuras e é cultivado em toda a América Latina, na África Central e Oriental, na Índia e na Indonésia¹. Considerada uma espécie muito suscetível a ataques de pragas, doenças e a presença de um alto teor de umidade, a resistência do *C. arabica* é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento de plantas, uma vez que, controlando esses parâmetros pode-se mitigar o desenvolvimento de microrganismos e a mudança de cor, ou seja, pode-se manter a qualidade do produto^{1,2}.

A variedade Bourbon é considerada uma das melhores para se produzir bebidas *gourmet*, pois suas características são únicas, tais como seu aroma intenso, suavidade, textura achocolatada e sabor adocicado, no entanto, é de suma

importância que seu ambiente de cultivo e os procedimentos de secagem sejam rigorosos para que as características sejam preservadas. Dados importantes referentes à estereotipagem das plantas da variedade mostram que são de até 3 metros de altura, produzem frutos menores, sua produtividade é menor e é muito suscetível a pragas e doenças³.

A grande suscetibilidade dos grãos às doenças e pragas faz com que os processos das fases de colheita sejam de extrema importância para manutenção da qualidade do produto final. Parizzi⁴ descreve que diversos autores encontraram problemas de contaminação por fungos presentes naturalmente no solo durante essas fases desde pré-colheita ao armazenamento do café. Outro grande desafio do cultivo de café no Brasil são as oscilações e as periódicas frustrações do rendimento de grãos, uma vez que existem relações entre os parâmetros climáticos e da produção agrícola complexas. Os fatores ambientais também interferem no crescimento e desenvolvimento das plantas durante as fases fenológicas da cultura de café⁵⁻⁷.

Com a finalidade de emitir seu selo de qualidade e mitigar as adversidades na fabricação do produto comercializado, a ABIC estipula valores para os parâmetros de qualidade e de acordo com a “Norma de Qualidade Recomendável e Boas Práticas de Fabricação de Cafés Torrados em Grão e Cafés Torrados e Moídos”^{8,9}, um dos parâmetros que conferem características aos diversos tipos de bebidas à base de café é a cafeína, um alcaloide purínico que ocorre naturalmente em mais de 60 espécies de plantas¹⁰. Utilizada comumente para produção de bebidas energéticas¹¹, e utiliza de mecanismo bioquímico semelhante aos das drogas que estimulam o cérebro, como anfetaminas, cocaína e heroína¹².

A cafeína presente nos diversos tipos de café (*C. arabica*, *robusta*, etc.) varia também de acordo com as variedades da planta de café, dentre as quais estão Bourbon, Catuaí, Acaiá e Mundo Novo. Como se sabe a cafeína pertence à classe das xantinas^{11,13} e a *commodity* pura é obtida a partir do processo de descafeinação como um subproduto do café e também extraída da folha de chá-preto (*Camellia* sp.), da erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e do guaraná (*Paullinia cupana*). Ainda existem dois metabólitos muito semelhantes à estrutura da cafeína, entretanto possuem diferentes efeitos fisiológicos, a teofilina (dilatador brônquico e para tratar de apneia) e a teobromina (possui propriedades diuréticas)^{14,15}.

A presença da cafeína em diversas plantas faz com que muitos microrganismos não sejam capazes de crescer e se reproduzir nesse meio, entretanto existem algumas cepas na literatura que são, e além disso, conseguem consumir esse alcaloide como fonte de carbono e de nitrogênio, dando início à via de degradação da cafeína¹⁶⁻²⁴.

Nota-se a relevância de todo procedimento do cultivo do café, uma vez que o processo envolvido afeta a qualidade da bebida se não for seguido com rigor e qualidade, por esses motivos o objetivo dessa segunda parte do trabalho foi isolar a microflora dos grãos de duas cultivares diferentes de *C. arabica*, a cultivar Bourbon tradicional e a cultivar resistente a ferrugem, selecionar por técnica de *screening* em meio de cultivo sólido e líquido os microrganismos capazes de modificar a molécula de cafeína.

2 MICROFLORA DO *C. arabica*

2.1 TÉCNICAS DE ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO

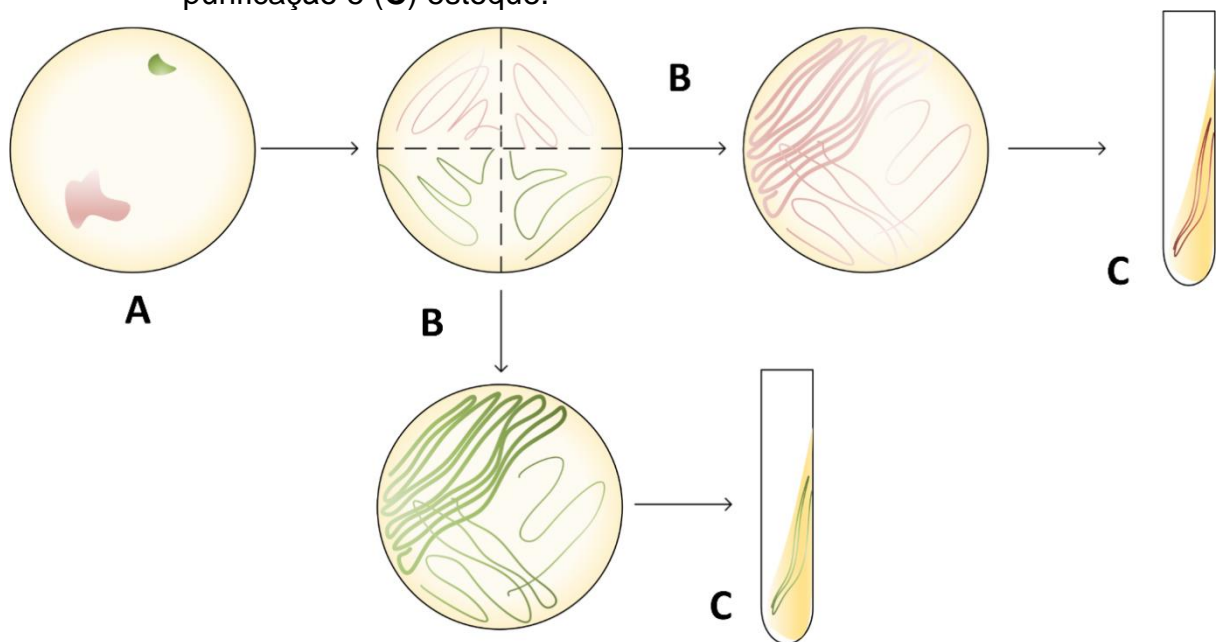
As técnicas de isolamento e purificação de cepas envolvem a adaptação das mesmas em meios de cultivo que contenham os nutrientes necessários para que cresçam e se reproduzam, o conhecimento do que o microrganismo pode consumir e verificar se o microrganismo é capaz de degradar alguma molécula presente no meio^{21,22}.

Os meios de cultivo mais comumente utilizados para isolamento de fungos filamentosos, leveduras e bactérias são, respectivamente, PDA (Batata Dextrose Ágar), YEPD (Extrato de Levedura Peptona-Glucose) e DYG'S, mas outros meios como os que contenham apenas sais também são de grande utilidade para essa finalidade. Alguns meios são específicos para determinados estudos, como por exemplo Roussos et al.¹⁸ utilizou três meios diferentes para isolamento e purificação das cepas de fungos filamentosos e um quarto meio foi usado para a seleção rápida de cepas puras de microrganismos capazes de degradar a cafeína.

Essenciais às técnicas de isolamento e purificação, algumas etapas são necessárias para que se possa realizar o isolamento e a purificação das cepas. A Figura 30 ilustra os procedimentos de isolamento, purificação e estoque das cepas. A técnica de semeadura e estrias múltiplas em placas de Petri consistem em semear e espalhar superficialmente o material com o auxílio de uma alça bacteriológica e em fluxo laminar contínuo, fazendo estrias sucessivas. O procedimento é feito até que ocorra o esgotamento do material biológico para conter

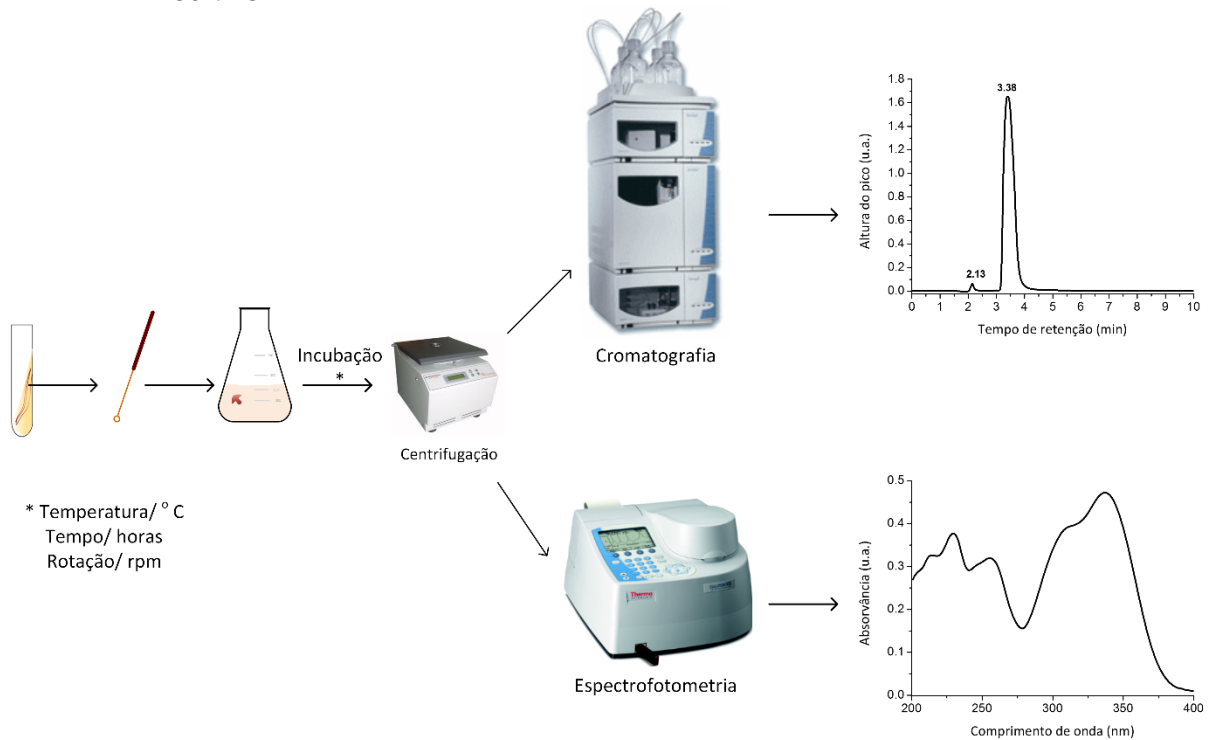
poucos microrganismos, uma vez que cada colônia formada na superfície é originada de um ou alguns poucos microrganismos.

Figura 30 - Ilustração dos procedimentos de (A) isolamento, (B) estrias múltiplas e purificação e (C) estoque.



Após a criação do estoque das cepas isoladas e purificadas, para avaliar alguma característica dos microrganismos faz-se necessário que os mesmos cresçam em um meio líquido para que posteriormente realize-se a centrifugação e, por exemplo, as amostras possam ser analisadas por técnicas espectrofotométricas²⁴ ou cromatográficas²⁰, Figura 31.

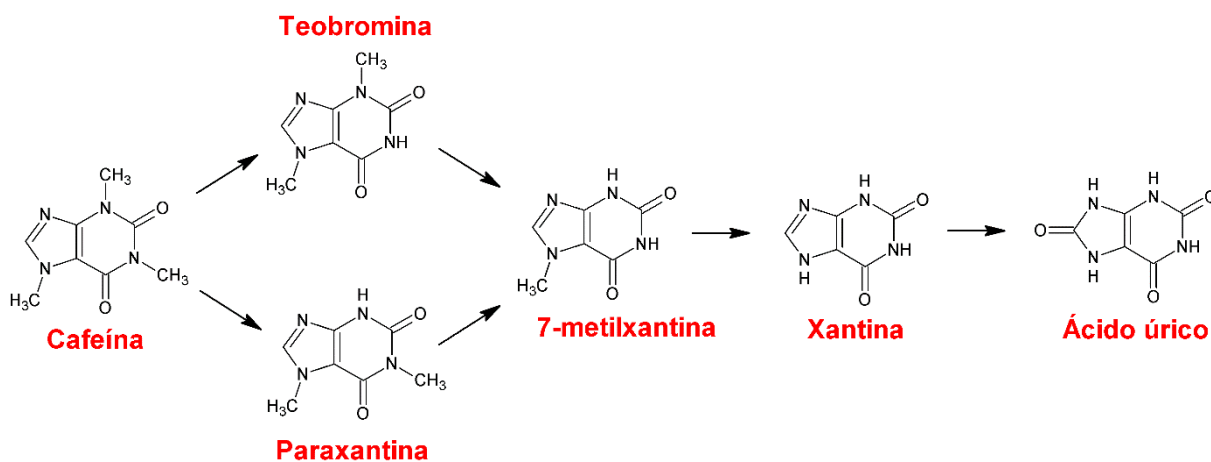
Figura 31 - Ilustração dos procedimentos de pré análise de amostras biológicas para detecção, separação e quantificação de metabólitos contendo meio de cultivo.



2.2 SELEÇÃO DE CEPAS CAPAZES DE DEGRADAR A CAFEÍNA

Embora a busca de um microrganismo capaz de degradar a cafeína tenha começado há quase 35 anos, estudos realizados ainda não são concretos. No entanto existem propostas para mecanismos de degradação por bactérias (*Pseudomonas*)^{14,21} e fungos (*Aspergillus*^{16,22} e *Penicillium*¹⁸) por duas vias, a de demetilação por fungos, Figura 32, e a oxidativa.

Figura 32 - Proposta de via de N-demetilação para a degradação da cafeína por *P. putida* CBB5¹⁴.



A confirmação da capacidade de degradação da cafeína pode inferir que existe a possibilidade de ocorrer um desequilíbrio da microflora natural do café, seja pela má estocagem ou negligência com os locais de armazenamento, e conseqüentemente afetar a qualidade do grão. Segundo Ashihara¹³ o *Coffea eugenioides* possui alto nível da enzima cafeína demetilase, podendo assim converter a cafeína endógena eficientemente a teofilina, o que faz com que a cafeína comece a ser degradada. Além da enzima ser inerente ao fruto do café, também pode ser produzida por microrganismos capazes de degradar a cafeína, e além de alterar a qualidade dos grãos, o *flavour* da bebida também é afetado.

Por outro lado, a degradação da cafeína por vias microbianas e enzimáticas tem sido uma opção vantajosa na substituição de técnicas genéticas no desenvolvimento de plantas sem cafeína. Apesar das enzimas envolvidas na degradação da cafeína serem conhecidas, as mesmas não apresentam relatos concretos à respeito de seu mecanismo de atuação. A principal enzima envolvida nesse processo é denominada especificamente pela sua função, cafeína demetilase, a qual não é considerada estável e por isso a demanda por uma investigação tem se tornado atrativa e viável¹⁹.

3 EXPERIMENTAL

Foram analisados grãos crus de diferentes cultivares de *C. arabica* cedidas pelo Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), a cultivar Bourbon vermelho e uma cultivar desenvolvida pelo próprio IAPAR, denominada IPR101. Na cultivar Bourbon não há cruzamento com outras cultivares e foi usada como referência. A cultivar IPR101 originou-se do cruzamento da cultivar Catuaí x Sarchimor, com genes SH2 e SH3 que são resistentes a ferrugem.

Para isolar a microflora natural das cultivares de *C. arabica* utilizou-se a metodologia adaptada de Roussos et al.¹⁸. Em placas de Petri descartáveis foram adicionados 0,2 g do grão da cultivar e adicionando o meio seletivo (Tabela 3) para fungos filamentosos, leveduras e bactérias (PDA, YEPD e DYG'S), totalizando 12 placas. O tempo de incubação foi de 120 horas à 28 ° C para que os microrganismos se adaptassem ao meio e pudessem crescer, tanto no isolamento quanto nos repiques e purificação por estriamento, semeadura e esgotamento.

Tabela 3 - Composição dos meios de cultivo utilizados para isolamentos da microflora.

Meio de cultivo	PDA	YEPD	DYG'S
	g L ⁻¹		
Extrato de levedura	-	10,0	2,0
KH ₂ PO ₄	-	-	0,5
Glicose	-	20,0	2,0
Peptona	-	20,0	1,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	-	0,5
Batata Dextrose Ágar	39,0	-	-

A Figura 33 mostra o esquema referente à metodologia utilizada para realização do isolamento dos microrganismos e após a purificação as cepas replicadas foram armazenadas em tubos de ensaio com a finalidade de criar um estoque para os próximos testes.

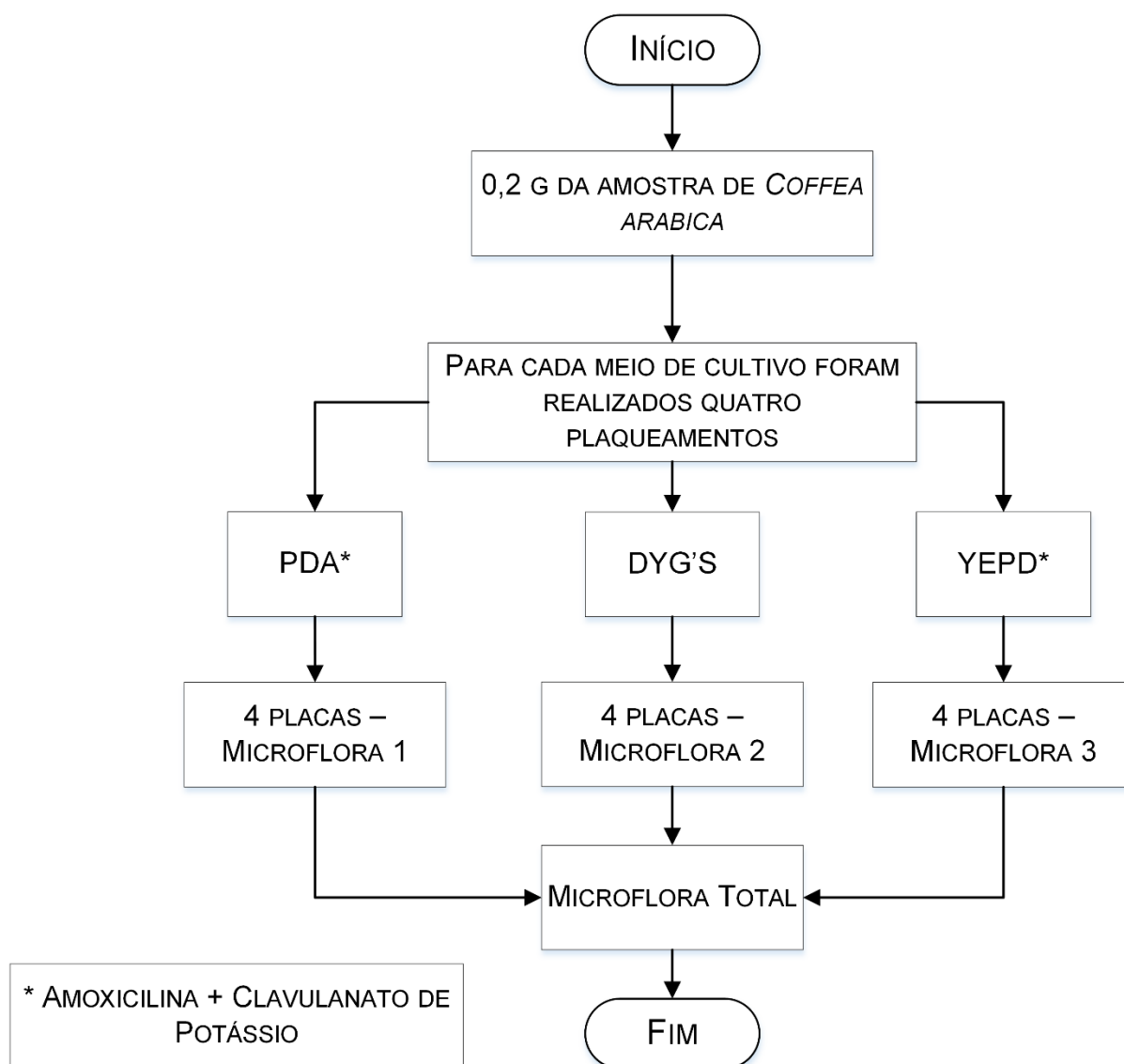


Figura 33 - Esquema de plaqueamento para isolamento de microflora natural dos grãos de café.

Com a finalidade de buscar microrganismos que cresçam em meio contendo cafeína, realizou-se a seleção em duas etapas. Na primeira, as culturas puras isoladas foram inoculadas em meio contendo cafeína de composição

mostrada na Tabela 4, e as culturas que se desenvolveram nesse meio sólido foram submetidas a um teste de *screening* em meio líquido. O tempo de incubação foi de 72 horas à 28 ° C para o meio sólido e as mesmas condições sob aeração a 180 rpm para o meio líquido.

Tabela 4 - Composição do meio utilizado para isolamento e seleção das cepas.

Componentes	Meio (g L⁻¹)
KH ₂ PO ₄	1,30
Na ₂ HPO ₄	0,12
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,30
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,30
Glicose	5,00
Cafeína	1,20
Ágar	15,00

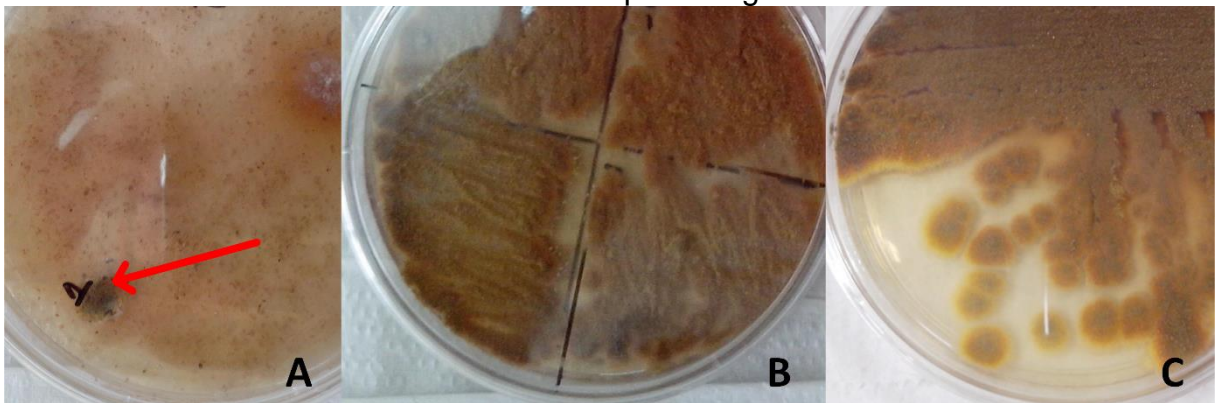
Na segunda etapa, as culturas foram inoculadas com 200 µL de suspensão de esporos da parte dois da primeira etapa em 10 mL de meio contendo cafeína (sem ágar) em balões cônicos (250 mL) e incubou-se sob condições de aeração a 180 rpm, a uma temperatura de 28 ° C durante 72 horas.

No final do período de incubação, apenas um dos frascos inoculados foi selecionado e juntamente ao frasco controle (ausência de inóculo), foram submetidos à centrifugação à 15000 rpm. Do sobrenadante do meio foram retirados 3 mL e realizou-se uma extração líquido-líquido da cafeína seguida de diluição do meio em 125 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) para que não houvesse interferentes na análise espectrofotométrica na região do UV-vis.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

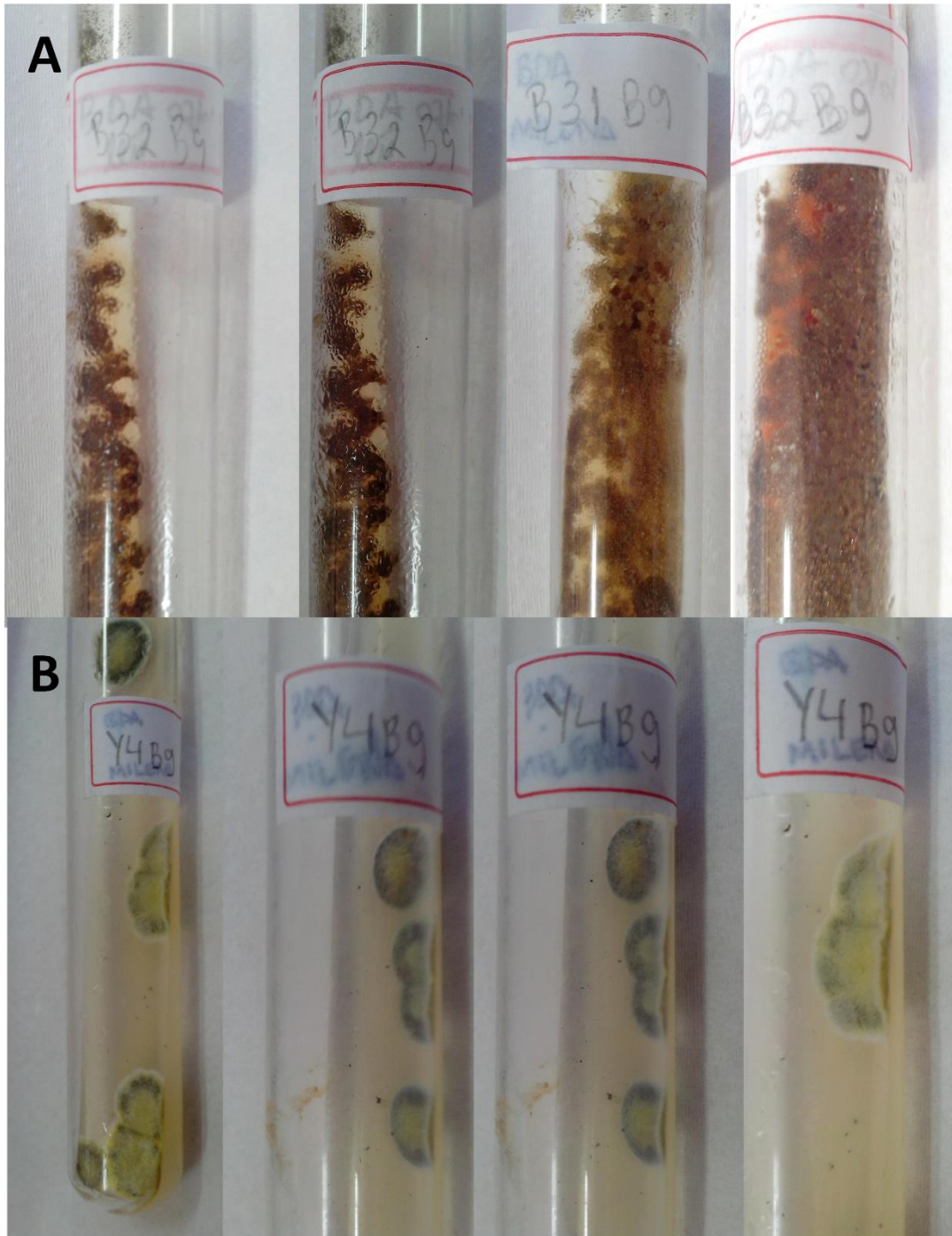
A Figura 34A mostra a colônia isolada em meio de cultivo PDA da cultivar Bourbon, já a Figura 34B mostra o repique realizado por estriamento da colônia isolada e na Figura 34C a purificação da colônia por semeadura e esgotamento.

Figura 34 - Processo de (A) isolamento, (B) repique e (C) purificação das cepas da cultivar Bourbon em meio PDA para fungos filamentosos.



A Figura 35 mostra o estoque criado para armazenar as cepas purificadas, com a finalidade de poder estudá-las em testes futuros. Na linha superior (A) estão apresentadas as cepas de fungos filamentosos purificadas e na inferior (B) as de leveduras.

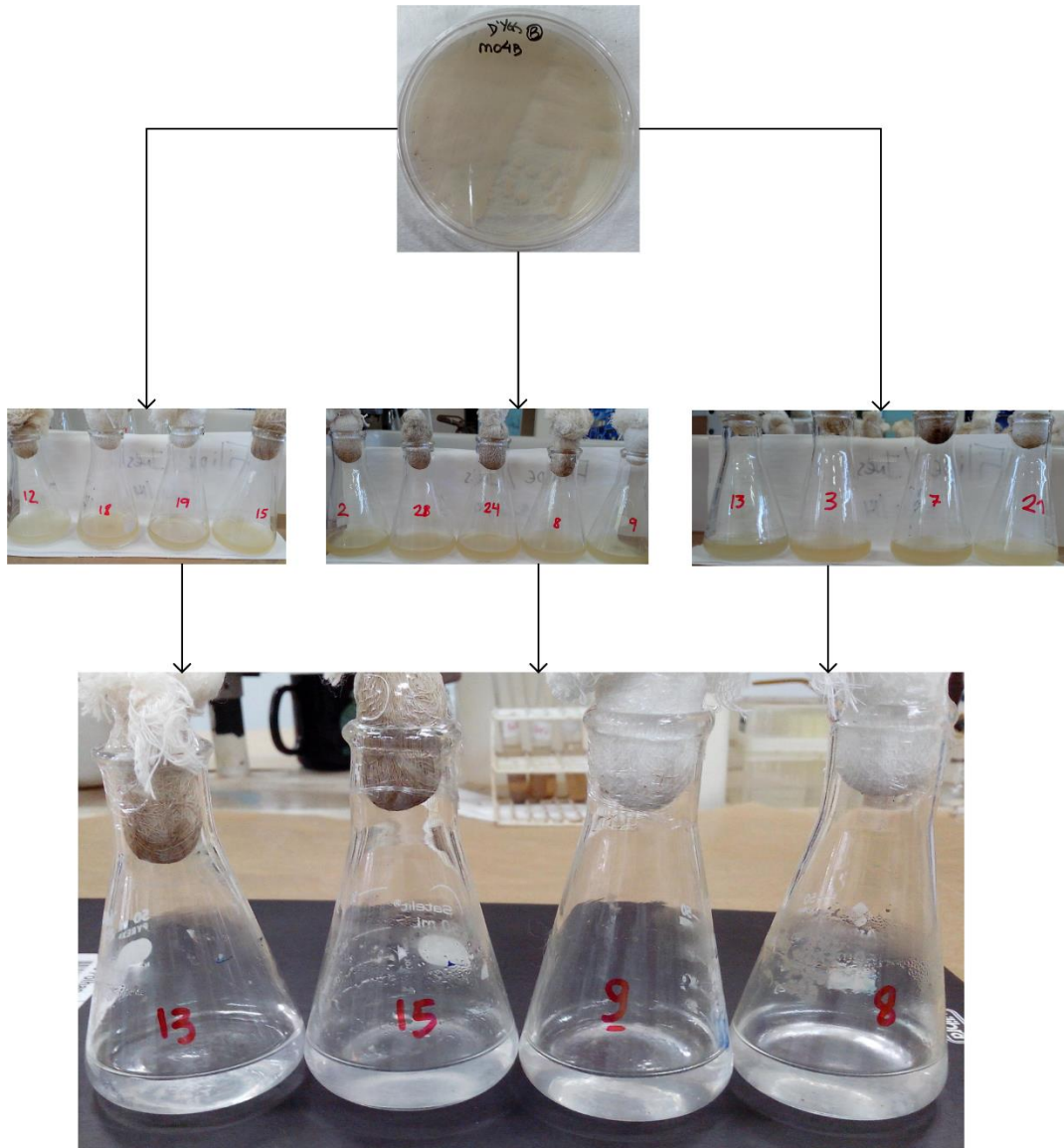
Figura 35 - Estoque das cepas purificadas em meios PDA (A) e YEPD (B).



Como mostra a Figura 36, algumas das bactérias isoladas no meio DYG'S cresceram mais em meio contendo cafeína e os inóculos foram dispostos em ordem crescente $13 > 15 > 9 > 8$, e por esse motivo o de número 8 foi selecionado e

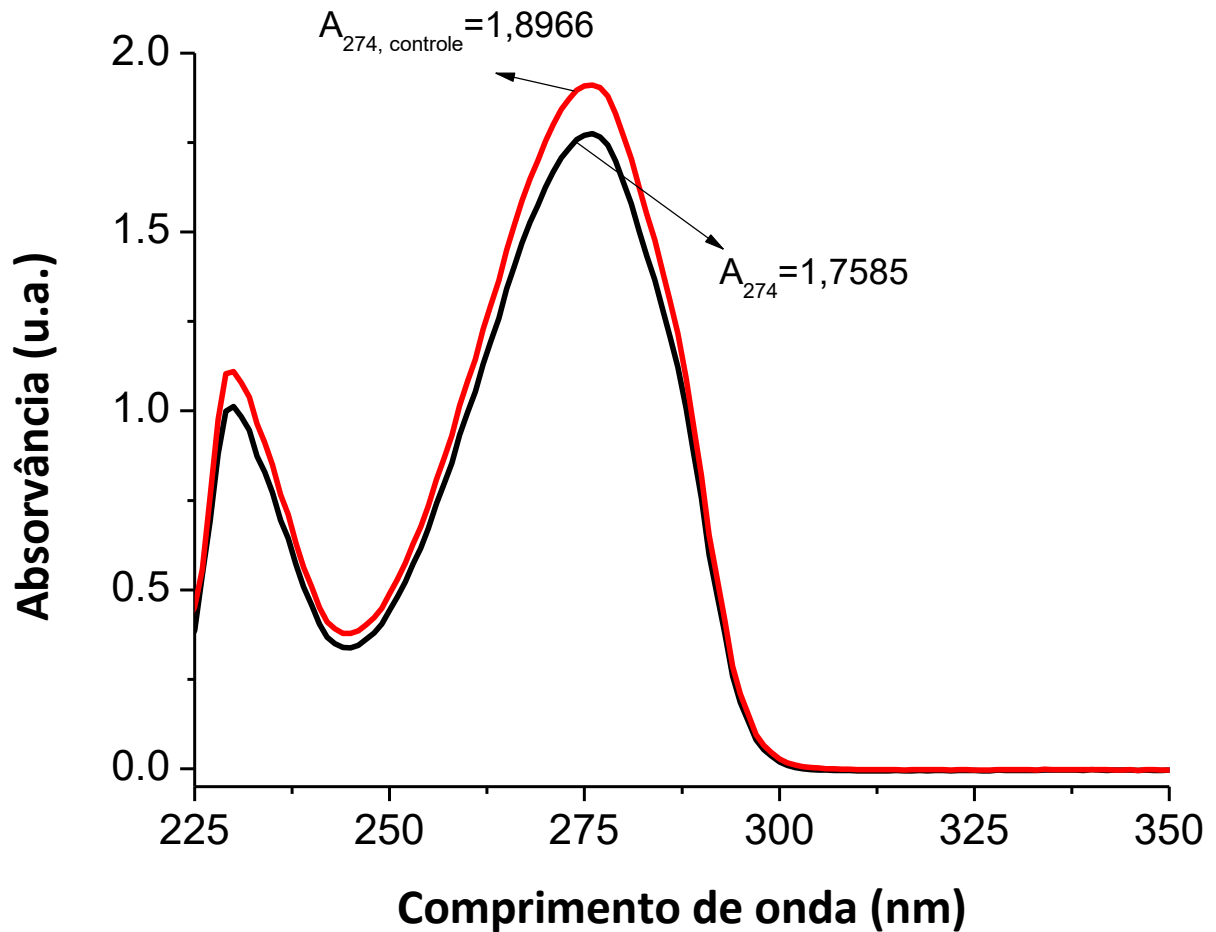
submetido aos próximos passos para quantificar a degradação da cafeína por técnicas espectrofotométricas na região do UV-vis.

Figura 36 - Procedimentos de seleção de microrganismo capaz de degradar a cafeína



Dentre os espectros obtidos, o que mostrou maior diferença entre o controle (vermelho) e após o inóculo (preto) no comprimento de onda característico da cafeína é apresentado na Figura 37.

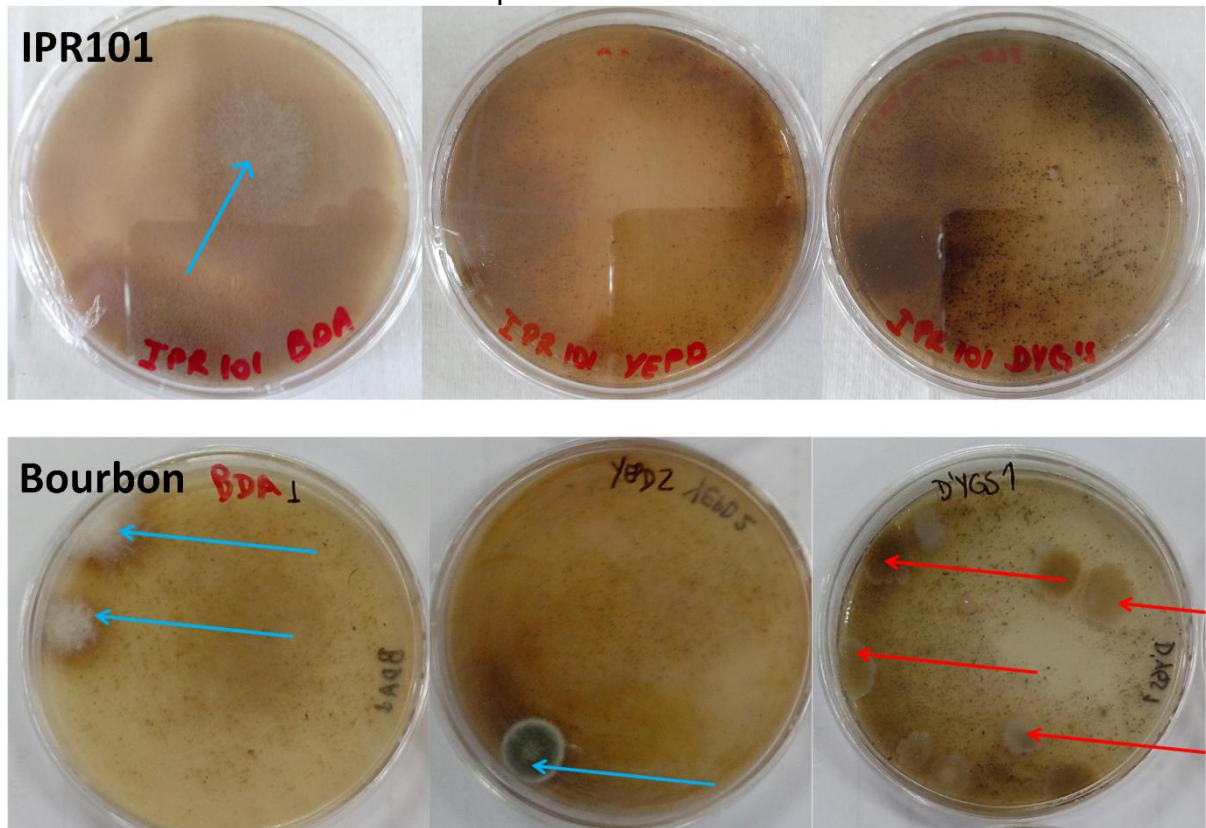
Figura 37 - Espectro da cafeína comparando o controle e o inoculado.



Nota-se que a absorvância do inoculado é mais baixa que o controle, a qual poderia indicar uma possível degradação da cafeína, entretanto não é possível afirmar devido a sobreposição espectral das metilxantinas.

Para fins de comparação entre as duas cultivares, foi realizado o *screening* nos meios de cultivo PDA, YEPD e DYG'S e, como mostra a Figura 38, na cultivar Bourbon os microrganismos se desenvolveram e na IPR101 os microrganismos não foram capazes de crescer. Isso indica qualitativamente que as técnicas de melhoramento vegetal aplicadas no desenvolvimento da cultivar IPR101 podem inibir o crescimento da microflora natural de cultivares de *C. arabica*.

Figura 38 - *Screening* em meios de cultivo específicos para fungos filamentosos, leveduras e bactérias para as cultivares Bourbon e IPR101.



CONCLUSÃO

Baseado em estudos¹⁷⁻²⁴, a microflora natural do *C. arabica* foi isolada e purificada e esperava-se que algum dos microrganismos isolados fosse capaz de degradar a molécula de cafeína. Entretanto, o que se observou foram condições que não favoreceram a degradação pelo consumo microbiano nem pela enzima cafeína demetilase.

Quando as cultivares Bourbon e IPR101 foram comparadas observou-se que, de fato, a cultivar melhorada foi mais resistente ao desenvolvimento de microrganismos de sua microflora natural, uma vez que, os genes SH2 e SH3 para resistência à ferrugem estão presentes.

REFERÊNCIAS

1. CLIFFORD, Michael N. et al. **Coffee: botany, biochemistry, and production of beans and beverage.** Croom Helms, 1985. 457 p.
2. MAMANI, Mery Yovana Rendón. **Acidez do café e a qualidade da bebida.** 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Londrina. 2007.
3. MAZZAFERA, Paulo; CROZIER, Alan; MAGALHÃES, Antonio C. Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3913-3916, 1991.
4. PARIZZI, Fátima Chieppe **Incidência de fungos da pré-colheita ao armazenamento de café.** 2005. 70 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Agrícola, Viçosa. 2005.
5. LEME, Paulo Henrique Montagnana Vicente. **Os pilares da qualidade: o processo de implementação do programa de qualidade do café (PQC) no mercado de café torrado e moído do Brasil.** 2007. 110 f. Dissertação (Mestrado em Administração, área de concentração em Dinâmica, Estrutura e Gestão de Cadeias Produtivas) – Universidade Federal de Lavras. Departamento de Administração, Lavras. 2007.
6. CAMARGO, Ângelo Paes de; CAMARGO, Marcel Bento Paes de. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, v. 60, n. 1, p. 65-68, 2001.
7. CAMARGO, Marcelo Bento Paes de. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 1, 2010.
8. EQUIPE TÉCNICA DA ABIC. **Norma de Qualidade Recomendável e Boas Práticas de Fabricação de Cafés Torrados em Grãos e Cafés Torrados e Moídos.** Associação Brasileira da Indústria de Café. [S.l.], 8 p. 2006.
9. RODRIGUES, Roberto. **Instrução Normativa Nº 8.** Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. [S.l.], 11 p. 11 jun. 2003.
10. NAYAK, Sneha et al. Isolation and characterization of caffeine degrading bacteria from coffee pulp. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 86-91, 2012.
11. BRENELLI, Eugênia Cristina Souza. A extração de cafeína em bebidas estimulantes-uma nova abordagem para um experimento clássico em química orgânica. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 136-138, 2003.

12. ALTIMARI, Leandro Ricardo et al. Cafeína e performance em exercícios anaeróbios. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, 2006.
13. ASHIHARA, Hiroshi. Metabolism of alkaloids in coffee plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2006.
14. YU, Chi Li et al. Two distinct pathways for metabolism of theophylline and caffeine are coexpressed in *Pseudomonas putida* CBB5. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 14, p. 4624-4632, 2009.
15. CAZARIM, Maurílio de Souza; UETA, Julieta Mieko. Café: uma bebida rica em substâncias com efeitos clínicos importantes, em especial a cafeína. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 3, 2015.
16. GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, Gerardo et al. Initial proteome analysis of caffeine-induced proteins in *Aspergillus tamarii* using two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 166, p. 2064-2077, 2012.
17. MAZZAFERA, Paulo. Degradation of caffeine by microorganisms and potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 4, p. 815-821, 2002.
18. ROUSSOS, Sevastianos et al. Biotechnological management of coffee pulp— isolation, screening, characterization, selection of caffeine-degrading fungi and natural microflora present in coffee pulp and husk. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 42, n. 5, p. 756-762, 1995.
19. GOKULAKRISHNAN, S.; CHANDRARAJ, K.; GUMMADI, Sathyanarayana N. Microbial and enzymatic methods for the removal of caffeine. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 225-232, 2005.
20. MAZZAFERA, P.; OLSSON, O.; SANDBERG, G. Degradation of caffeine and related methylxanthines by *Serratia marcescens* isolated from soil under coffee cultivation. **Microbial ecology**, v. 31, n. 2, p. 199-207, 1996.
21. YAMAOKA-YANO, Dirce Mithico; MAZZAFERA, Paulo. Catabolism of caffeine and purification of a xanthine oxidase responsible for methyluric acids production in *Pseudomonas putida* L. **Revista de microbiologia**, v. 30, n. 1, p. 62-70, 1999.
22. HAKIL, M. et al. Caffeine degradation in solid state fermentation by *Aspergillus tamarii*: effects of additional nitrogen sources. **Process biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 103-109, 1999.
23. MOHAPATRA, B. R. et al. Purification and characterization of a novel caffeine oxidase from *Alcaligenes* species. **Journal of biotechnology**, v. 125, n. 3, p. 319-327, 2006.
24. KURTZMAN JR., R. H.; SCHWIMMER, S. Caffeine removal from growth media by microorganisms. **Experientia**, v. 27, n. 4, p. 481-482, 1971.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na primeira parte do estudo observou-se que o melhor modelo foi obtido com três fatores, apesar do modelo com quatro fatores mostrar-se muito atrativo quando se objetiva a separação química. O modelo com quatro fatores explica informações extras quando comparado com PCA e HA^{40,41}, o que torna o PARAFAC um método de fácil aplicação e interpretação para matrizes de ordem superior.

Quando se discute a parte microbiológica do trabalho, observa-se que a grande dificuldade de lidar com esses tipos sistemas são as condições a serem pré-estabelecidas e o comportamento diário do microrganismo. Observou-se que as cultivares comparadas apresentaram comportamentos diferentes quando submetidas às mesmas condições para crescimento microbiano, comprovando que o melhoramento vegetal é uma variável importante no estudo microbiológico.