



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FERNANDA DELAROZA

**ESTUDO DOS METABÓLITOS NAS DIFERENTES
CONDIÇÕES DE LUZ E PLANTIOS DE FOLHAS E GRÃOS
DO *Coffea arabica* L.**



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA



FERNANDA DELAROZA

**ESTUDO DOS METABÓLITOS NAS DIFERENTES
CONDIÇÕES DE LUZ E PLANTIOS DE FOLHAS E GRÃOS
DO *Coffea arabica* L.**

Tese apresentada à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química–Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor - Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2015

FERNANDA DELAROZA

**ESTUDO DOS METABÓLITOS NAS DIFERENTES
CONDIÇÕES DE LUZ E PLANTIOS DE FOLHAS E GRÃOS
DO *Coffea arabica* L.**

Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química–Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor - Área de concentração Química Analítica.

Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2015

**Catálogo Elaborado Pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual De Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

D339e Delaroza, Fernanda.

Estudo dos metabólitos nas diferentes condições de luz e plantios de folhas e grãos do *Coffea arabica* L. / Fernanda Delaroza. – Londrina, 2015.
107 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Química analítica – Teses. 2. Coffea arabica – Teses. 3. Café – Plantio – Teses. 4. Análise de componentes principais – Teses. 5. Metabolômica – Teses. 6. Cafeeiro – Efeito da luz – Teses. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. IV. Universidade Estadual do Centro-Oeste. V. Título.

CDU 543


FERNANDA DELAROZA

**ESTUDO DOS METABÓLITOS NAS DIFERENTES
CONDIÇÕES DE LUZ E PLANTIOS DE FOLHAS E
GRÃOS DO *Coffea arabica* L.**

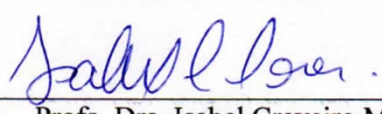
Tese apresentada junto à Universidade Estadual de Londrina, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química–Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, para a obtenção do título de Doutor- Área de concentração Química Analítica.

BANCA EXAMINADORA

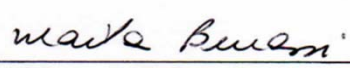
Orientadora: Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina - UEL




Profa. Dra. Angela Regina Araujo
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” - UNESP



Profa. Dra. Isabel Craveiro Moreira
Universidade Tecnológica Federal do Paraná-UTFPR



Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina - UEL



Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de Março de 2015.

Dedico este trabalho a Deus, por iluminar a
minha vida e fortalecer os meus dias...

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Profa. Dra. Ieda Spacino Scarminio pela sua excelente orientação, apoio, paciência, amizade e conhecimento transmitido para realização deste trabalho.

Aos professores da banca: Profa. Dra. Angela Regina Araujo, Profa. Dra. Isabel Craveiro Moreira, Profa. Dra. Marta de Toledo Benasse, Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa, Prof. Dr. Paulo Henrique Março e Prof. Dr. Carlos Alberto Paulinetti da Camara que prontamente aceitarem o convite para avaliação deste trabalho.

A pesquisadora Dra. Miroslava Rakocevic, por toda a sua contribuição e disposição no decorrer destes anos.

Ao Prof. Dr. Roy Edward Bruns por todo conhecimento compartilhado e ajuda no trabalho.

Aos meus queridos pais, Claudemir e Geni, meus primeiros professores de vida, por toda dedicação e amor.

Ao meu esposo Wagner E. Risso, por toda sua paciência, apoio, amor, companheirismo, enfim...sempre ao meu lado!!

Ao Júlio, Flávio, Edna, Amanda, ponto de apoio em todos os momentos.

As crianças, Gabriel e Giovana, que sempre me contagiam com alegria.

A amiga Elis D. Pauli, por toda a sua ajuda e sobretudo pelas boas e descontraídas horas de conversas no decorrer deste trabalho.

A amiga Amélia E. Terrille, parceira no trabalho e na amizade.

Aos queridos estagiários Galileu B. Malta, Patrícia M. Sanches e Guilherme L. Scheel pela ajuda, dedicação, empenho e amizade.

O apoio e ajuda das amigas Mari e Cris.

Ao grupo LQCN (e a quem um dia foi do grupo): Ivanira, Sabrina, Guilherme S., Pedro, Gustavo, Fabiano, Filipe e Carlos.

Aos técnicos, funcionário de almoxarifado e secretaria da Química.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, à Fundação Araucária e ao Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento de Café, pelo suporte financeiro dando condições de desenvolver e concluir este projeto.

Ao programa Doutorado Associado.

O meu muito obrigada!!!!

*"Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!"*

Mário Quintana

Delaroza, Fernanda. **Estudo dos metabólitos nas diferentes condições de luz e plantios de folhas e grãos do *Coffea arabica* L.** 2015. 107 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Grãos e folhas do *Coffea arabica* L. foram avaliados quanto às diferentes formas de plantio envolvendo conceitos de densidades e arranjos. Duas alturas (exposição à luz solar e autossombreamento) no estrato da planta também foram avaliadas. As extrações dos materiais vegetais foram realizadas seguindo planejamento do tipo centroide-simplex envolvendo quatro solventes: etanol, acetona, diclorometano e hexano. As impressões digitais foram obtidas por técnicas espectrofotométricas (FT-IR, UV-Vis) e cromatográficas (CLAE-DAD). Métodos quimiométricos, ACP e modelagem de misturas foram utilizados para análise exploratória dos extratos. Para interpretação dos dados também foram usados teste de Tukey e LSD Fisher. Com a aplicação desses métodos nos dados obtidos foi possível verificar que a condição de extração determinará o grupo de metabólitos extraídos, tais como ligninas, carboidratos, polissacarídeos e cafeína. Foram encontrados para folhas expostas ao sol cerca do dobro do teor de cafeína, teobromina e ácido clorogênico dos encontrados nas folhas autossombreadas, indicando que as condições expostas ao sol são mais estressantes do que autossombreadas. As concentrações lipídicas em *Coffea arabica* de folhas autossombreadas são cerca do dobro aqueles expostos à luz solar direta, o que indica o papel protetor lipídico eficiente dos produtos do metabolismo secundário na sombra. Este estudo mostrou também que existe correlação entre cafeína e ácido clorogênico para as formas de plantio (10.000 *versus* 6.000 plantas.ha⁻¹) estudadas. Os teores de cinzas não foram significativos em relação à densidade de plantas, porém foram significativos aos arranjos de plantios. Arranjos retangulares apresentaram maiores teores de cinzas que os arranjos quadrados em folhas e grãos.

Palavras-chave: Planejamento centroide-simplex. Densidade de plantio. Arranjo de plantio. Análise de componentes principais. Metaboloma.

Delaroza, Fernanda. **Study of metabolites in different conditions of light and plant patterns of leaves and grains of *Coffea arabica* L.** 2015. 107 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Grains and leaves of *Coffea arabica* L. were evaluated for the different ways plant patterns, involving concepts plant densities and arrangements. Two heights (exposure to sunny and self-shadowed) in the plant stratum were also assessed. The extraction of plant materials were done according simplex centroid design of the type involving four solvents: ethanol, acetone, dichloromethane and hexane. Fingerprints were obtained by spectrophotometric techniques (FT-IR, UV-Vis) and chromatographic (HPLC-DAD). Chemometric methods, ACP and modeling mixtures were used for exploratory analysis of the extracts. For data interpretation were also used Tukey and Fisher's LSD test. With the application of these methods on the data obtained it was possible to verify that the extraction condition will determine the group of extracted metabolites such as lignins, carbohydrates, polysaccharides and cafeína. Were found to exposure to sunny leaves about twice the caffeine, theobromine and chlorogenic acid content found in the self-shadowed leaves, indicating that the sun-exposed conditions are more stressful than self-shadowed. Lipid concentrations in *Coffea arabica* self-shadowed leaves are about twice those exposed to direct sunlight, which indicates the efficient lipid protective role of secondary metabolic products in the shade. This study also showed a correlation between caffeine and chlorogenic acid to the plant patterns (10,000 versus 6,000 plants.ha⁻¹) studied. The ash content was not significant in relation to plant density, but were significant to plant patterns. Rectangular plant patterns had higher ash content than the square plant patterns in leaves and grains.

Keywords: Simplex-centroid design. Plant density. Plant patterns. Chemometric methods. Metabolome.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II - REVIÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - Principais alcaloides do *Coffea*: a) cafeína, paraxantina, teofina e teobromina b) trigonelina21
- Figura 2** - ACQ- ácidos cafeoilquínicos.....23

CAPÍTULO III - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO METABOLÔMICA DE FOLHAS DE *Coffea arabica* POR PLANEJAMENTO DE MISTURA E FATORIAL 2^3

- Figura 1** - Planejamento centroide-simplex para extrações com solventes orgânicos etanol, acetona, diclorometano e hexano nas folhas *Coffea arabica* L40
- Figura 2** - Planejamentos centroide-simplex e planejamento 2^3 para extração das folhas *Coffea arabica* L.....41
- Figura 3** - Curvas de níveis para extrações conforme planejamento de extração simplex centroide controlando as variáveis dos ensaios 1 a 8. a) ensaio (- - -); b) ensaio (+ - -); c) ensaio (- + -), d) ensaio (+ + -), e) ensaio (- - +), f) ensaio (+ - +), g) ensaio (- + +) e h) ensaio (+ + +).47
- Figura 4** - Gráfico dos escores do fator 1×fator 2 para os rendimentos obtidos em diferentes solventes extratores, bem como condição de extração.49
- Figura 5** - Gráfico dos loadings do fator 1×fator 2 para os rendimentos obtidos em diferentes solventes extratores, bem como condição de extração50
- Figura 6** - Espectro infravermelho em diferentes solventes extratores, bem como condição de extração.51

CAPÍTULO IV - ANÁLISE DE IMPRESSÕES DIGITAIS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS DA VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE FOLHAS DO *Coffea arabica* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUZ E FENOFASES DA PLANTA

Figura 1	-	Rendimento do extrato bruto para diferentes proporções de solventes, etanol, acetona, diclorometano e hexano para amostras a) autossombreadas e b) expostas ao sol da colheita maturação de frutos e amostras c) autossombreadas e d) expostas ao sol da colheita da época de florescimento, onde (Q) arranjos quadrado e (R) arranjos retangulares.....	67
Figura 2	-	Superfícies de resposta para as amostras autossombreado e expostas ao sol de maturação de frutos colheita, para arranjos quadrado (S) e retangulares (R) de ambas as colheitas.....	71
Figura 3	-	a) Escores de CP1 <i>versus</i> CP3, b) Loading de CP1 <i>versus</i> CP dos espectros de FT-IR obtidos das misturas conforme planejamento simplex-centroide de arranjos quadrados e retangulares de ambas colheitas.....	73
Figura 4	-	Escores da CP1 <i>versus</i> CP2 <i>versus</i> . CP3 com 94,7 % da variância dos dados espectrais de FT-IR obtidos a partir das misturas simplex-centroide dos arranjos quadrado (Q) e retangulares (R) da colheita de maturação dos frutos e de floração de amostras expostas ao sol (es) autossombreada (as).	74
Figura 5	-	Espectros dos picos cromatográficos por HPLC- UV-DAD para o extrato, preparado em mistura (eh) etanol: hexano obtidos para as amostras expostas ao sol e autossombreada dos arranjos quadrados (S) e retangulares (R).....	75
Figura 6	-	Abundância da cafeína estimada da altura dos picos por espectros DAD para extratos com diferentes proporções de solventes etanol, acetona, diclorometano e hexano para amostras a) autossombreadas e b) expostas ao sol de colheita de maturação do fruto e amostras c) autossombreadas e d) expostas ao sol de colheita de floração, para os arranjos quadrado (Q) e retangular (R).....	77

CAPÍTULO V - EFEITOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA DENSIDADE DE PLANTAS, ARRANJOS E DISPONIBILIDADE DE LUZ SOBRE OS PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE FOLHAS E GRÃOS DO *Coffea arabica*

Figura 1	- Gráfico de concentração de porcentagem de lipídios vs. cinzas. Os símbolos □ referem-se à baixa densidade do plantio; ◆ alta densidade do plantio - amostras de grão; □ baixa densidade e ■ alta densidade-folhas.	96
Figura 2	- Gráfico de concentração de lipídios vs. porcentagem de cinzas. Os símbolos ◆ referem-se a amostras de arranjo de plantio retangular e ■ amostras de arranjo de plantio quadrado.	97
Figura 3	- Gráfico de concentrações de cafeína vs. de ácido clorogênico. Os símbolos o referem-se ao ambiente com baixa densidade - amostras de grãos ● alta densidade - grãos □ baixa densidade – e folhas ■ alta densidade.	98
Figura 4	- Gráfico de concentrações de cafeína vs. ácido clorogênico. Os símbolos o referem-se ao arranjo retangular - amostras de luz solar direta ● arranjo retangular autossombreado - □ arranjo quadrado- luz solar direta e ■ arranjo quadrado autossombreada.....	100

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II- REVIÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1	- Composição química do grão verde <i>C. arabica</i> em base seca (g/100g)	9
-----------------	--	---

CAPÍTULO III - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO METABOLÔMICA DE FOLHAS DE *Coffea arabica* POR PLANEJAMENTO DE MISTURA E FATORIAL 2³

Tabela 1	- Resultados dos rendimentos da extração conforme planejamento experimental de solvente, centroide-simplex combinados as variáveis: número de remaceração, temperatura e tipo de agitação e parâmetros de seletividade (α/Σ ; β/Σ e π/Σ)* para as misturas correspondentes a cada ponto do planejamento fatorial.....	42
Tabela 2	- Análise de variância para os modelos matemáticos dos ensaios do planejamento 2 ³	43
Tabela 3	- Matriz de correlação dos rendimentos dos extratos e parâmetros solvatocrômicos.....	46
Tabela 4	- Valores dos loadings varimax nos quatro fatores somando 91,63 %.....	48

CAPÍTULO IV- ANÁLISE DE IMPRESSÕES DIGITAIS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS DA VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE FOLHAS DO *Coffea arabica* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUZ E FENOFASES DA PLANTA

Tabela 1	- Planejamento de extração para misturas simplex.....	64
Tabela 2	- Análise de variância (ANOVA) e falta de ajuste das regressões significativas no nível de probabilidade	69
Tabela 3	- Quantidades percentuais de umidade, cinzas totais, cafeína e de lipídios em triplicatas para folhas colhidas na fase de amadurecimento dos frutos e floração.....	78

CAPÍTULO V- EFEITOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA DENSIDADE DE PLANTAS, ARRANJOS E DISPONIBILIDADE DE LUZ SOBRE OS PRINCIPAIS CONSTITUENTES QUÍMICOS DE FOLHAS E GRÃOS DO *Coffea arabica*

- Tabela 1** - Planejamento fatorial para os órgãos da planta, disponibilidade de luz, densidade de plantio e arranjos de plantio nas concentrações de cafeína, ácidos clorogênicos, açúcares redutores de lipídios ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e porcentagens de cinzas. Os valores são as médias das determinações das triplicatas95
- Tabela 2** - Média, desvio padrão e valores teste *t* emparelhados calculados para cafeína, ácidos clorogênicos, açúcares redator, cinzas e lipídios para os fatores órgão, disponibilidade de luz, densidade e arranjo de plantio96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a	Acetona
ACN	Acetonitrila
ACP	Análise de componentes principais
ACG	Ácido clorogênico
ACQ	Ácidos cafeoilquínicos,
AdiCQ	Dicafeoilquínicos
AFQ	Feruloilquínicos e
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CP	Componente principal
CP1	Primeira componente principal
CP2	Segunda componente principal
CP3	Terceira componente principal
d	Diclorometano
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
e	Etanol
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
H ₂ O	Água
h	Hexano
IV	Espectroscopia no Infravermelho
P	Polaridade
pH	Potencial de hidrogênio
UV-Vis	Espectrofotometria no ultravioleta-visível
v	Volume
vs	<i>Versus</i>
β	Parâmetro de Snyder para basicidade
α	Parâmetro de Snyder para acidez
π^*	Parâmetro de Snyder para dipolaridade

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E OBJETIVO

INTRODUÇÃO.....	2
REFERÊNCIAS	5

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
2.1.1	<i>Coffea arabica</i> L.....	8
2.1.2	Formas de Plantios	11
2.1.2.1	Sistemas agroflorestais (SAF)	11
2.1.2.2	Adensamento de plantio	13
2.1.3	Metabólitos Primários e Secundários	17
2.1.3.1	Principais metabólitos primários e secundários de grãos e folhas do <i>Coffea</i>	18
2.1.3.1.1	Carboidratos	18
2.1.3.1.2	Lipídios.....	19
2.1.3.1.2.1	Isoprenoides.....	19
2.1.3.1.3	Aminoácidos.....	20
2.1.3.1.3.1	Derivados de aminoácidos.....	20
2.1.3.1.4	Compostos fenólicos	22
2.1.3.1.5	Ácidos.....	22
2.1.3.1.6	Clorofila.....	23
2.2	OBJETIVO GERAL.....	24
REFERÊNCIAS	24	

CAPÍTULO III - OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO METABOLÔMICA DE FOLHAS DE *Coffea arabica* POR PLANEJAMENTO DE MISTURA E FATORIAL 2³

RESUMO.....	35	
ABSTRAT.....	35	
3.1	INTRODUÇÃO	36
3.2	PARTE EXPERIMENTAL	39
3.2.1	Planta, Coleta e Extração.....	39

3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
3.4	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS.....	52

**CAPÍTULO IV - ANÁLISE DE IMPRESSÕES DIGITAIS CROMATOGRÁFICAS
E ESPECTROSCÓPICAS DA VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE
FOLHAS DO *Coffea arabica* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE
LUZ E FENOFASES DA PLANTA**

	RESUMO	58
	ABSTRACT.....	59
4.1	INTRODUÇÃO	60
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	62
4.2.1	Amostras das Folhas do <i>Coffea arabica</i>	62
4.2.2	Reagentes.....	63
4.2.3	Preparo das Extrações.....	63
4.2.4	Análise por Espectroscopia no Infravermelho.....	64
4.2.5	Preparo das Amostras para Análise em CLAE.....	65
4.2.6	Análise de Cafeína e Lipídios.....	65
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.4	CONCLUSÕES	78
	AGRADECIMENTOS.....	79
	REFERÊNCIAS.....	79

**CAPÍTULO V - EFEITOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA DENSIDADE
DE PLANTAS, ARRANJOS E DISPONIBILIDADE DE LUZ
SOBRE OS PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS DE
FOLHAS E GRÃOS DO *Coffea arabica***

	RESUMO	84
	ABSTRACT.....	84
5.1	INTRODUÇÃO	85
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	89
5.2.1	Amostragem	89
5.2.2	Preparo da Amostra	90
5.2.3	Cinzas	90

5.2.4	Total de Lipídios.....	91
5.2.5	Clarificação.....	91
5.2.6	Açúcares Redutores	92
5.2.7	Cafeína.....	92
5.2.8	Ácidos Clorogênicos	93
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	93
	AGRADECIMENTOS.....	100
	REFERÊNCIAS.....	100
	CONCLUSÃO GERAL.....	106

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E OBJETIVO



INTRODUÇÃO

No ano de 2014, o Brasil foi o maior produtor e exportador mundial de café, correspondendo a 32,16 % da produção mundial, onde cerca 70 % dessa produção foi de *Coffea arabica* (*C. arabica*). Os estados brasileiros que se destacam no plantio de café são Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia e Paraná (MORGANO; PAULUCI; MANTOVANI; MORY, 2002; ABIC, 2015).

A qualidade do café produzido no Paraná é considerada baixa quando comparada com outras regiões do Brasil, (ANDROCIOLI FILHO, 2002) do mesmo modo que no mercado internacional o produto brasileiro não é o mais conceituado (MARTINS; ANDROCIOLI FILHO, 2002). Por isso, institutos de pesquisa e produtores vêm investindo em pesquisas para melhorar a qualidade e aumentar a valorização do produto no mercado externo.

O Brasil é um país de grande diversidade climática e topográfica devido ao seu território extenso (8,5 milhões de km²), possui seis tipos de climas, classificados como subtropical, semiárido, equatorial úmido, equatorial semiúmido, tropical de altitude e tropical. As diferenças climáticas se destacam até mesmo num único estado, como exemplo o Paraná, que possui diversos microclimas associados com variações de latitude e altitude. Segundo o sistema de classificação climática de Köppen, o Paraná se divide em dois tipos climáticos; subtropical (norte, centro, oeste e sudoeste) com verões quentes, geadas pouco frequentes e tendência de concentração das chuvas nos meses de verão e em clima temperado (sul) com verões frescos, temperatura média no mês mais quente abaixo de 22°C e ambos sem estação de seca definida. Diante destes fatores, muitas pesquisas buscam a melhor adaptação da espécie de café a região de cultivo, para que a forma de plantio seja adequada às condições climáticas e topográficas. Geneticistas vêm estudando o emprego de novas arquiteturas de planta, como por

exemplo, desenvolvimento de plantas de menores portes que favorecem plantios adensados (RITTA NETTO, 2010; ROSS, 2005). O sabor e o aroma da bebida café são resultantes de vários constituintes químicos, entre eles os ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos e compostos fenólicos (SARRAZIN; LE QUÉRÉ; GRETSCHR; LIARDON, 2000; AVELINO et al., 2005). As condições de plantio (clima, posição geográfica, disposição de plantio) estão associadas aos metabolitos primários e secundários no café, conseqüentemente estão correlacionadas à qualidade do produto (AVELINO et al. 2005; LARA-ESTRADA; VAAST, 2007; GEROMEL et al., 2008).

As respostas endofoclimáticas do plantio associado aos seus metabolomas necessitam de uma extração de material vegetal eficiente, senão muitos metabólitos permanecerão nas matrizes das plantas. Para este tipo de perfil complexo, combinar técnicas analíticas com métodos quimiométricos é uma forma de extrair informações significativas da composição multicomponente de metabólitos, (SCARMINIO; BRUNS, 1989) com a vantagem de que eles são capazes de apontar pequenas diferenças entre os sinais analíticos (LONNI, 2002).

Na literatura há diversos trabalhos que estudam o café arábica quanto ao seu metaboloma e formas de plantios; porém com objetivos diferentes deste trabalho. Os estudos mais frequentes nesta área são em avaliar as alterações morfológicas do cafeeiro ou então alguns parâmetros físico-químicos. Outra linha de pesquisa muito ampla é estudar apenas um conjunto de metabólitos na associação da qualidade da bebida, sem relacionar as condições plantio.

Este trabalho tem como objetivo avaliar por métodos quimiométricos as diferenças existentes nas composições de folhas e de grãos do *C. arabica* L., buscando rastrear o maior número de metabólitos e associá-los nas diferentes condições de plantios.

Para este estudo metabolômico foram realizadas duas colheitas de folhas em dois anos consecutivos associadas a determinadas condições de plantios e também foram comparados metabolomas de grãos e folhas de mesmo ano em densidades de plantios diferenciados.

Os objetivos específicos serão melhores abordados nos Capítulos III, IV e V apresentados na formas de artigos.

O Capítulo III apresenta um manuscrito de título: “*Otimização da extração metabolômica de folhas de Coffea arabica por planejamento de mistura e fatorial 2³*”. O objetivo deste trabalho foi otimizar o processo de extração controlando parâmetros de remaceração, temperatura e agitação usando um planejamento fatorial 2³, em quinze diferentes misturas, obtidas por um planejamento estatístico de misturas de quatro componentes.

No Capítulo IV é apresentado a versão em português do artigo publicado em 2014 no Journal of the Brazilian Chemical Society, vol. 25, nº 11, com título original “*Spectroscopic and Chromatographic Fingerprint Analysis of Composition Variations in Coffea arabica Leaves Subject to Different Light Conditions and Plant Phenophases*”. Neste trabalho o objetivo foi avaliar as diferenças metabolômicas em folhas do *C. arabica* sob diferentes formas de plantio e com estes resultados inferir as condições de melhor plantio.

No Capítulo V o artigo em discussão é intitulado como “*Factorial design effects of plant density, pattern and light availability on the main chemical constituents of Coffea arabica beans and leaves*”. Este trabalho tem como objetivo avaliar metabólitos de folhas e grãos coletados em mesmo ano, avaliando parâmetros físicos-químicos e metabolômicos em diferentes formas de plantios.

REFERÊNCIAS

ABIC- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. Disponível em: <<http://www.abic.com.br>> Acesso em: 28 de março de 2015.

ANDROCIOLI FILHO, A. **Café adensado**: Espaçamentos e cuidados no manejo da lavoura Londrina. Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR, Londrina, circular n. 121, p. 32, 2002.

AVELINO, J.; BARBOZA, B.; ARAYA, J. C.; FONSECA, C.; DAVRIEUX, F.; GUYOT, B.; CILAS, C. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa Maria de Dota. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 11, p. 1869-1875, 2005.

GEROMEL, C.; FERREIRA, L. P.; DAVRIEUX, F.; GUYOT, B.; RIBEYRE, F.; SCHOLZ, M. B. DOS S.; PEREIRA, L. F. P.; VAAST, P.; POT, D.; LEROY, T.; ANDROCIOLI FILHO, A.; VIEIRA, L. G. E.; MAZZAFERA, P.; MARRACCINI, P. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica*) fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 569-579, 2008.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. London, UK: Academic Press, 1995.

LARA-ESTRADA, L.; VAAST, P. Effects of altitude, shade, yield and fertilization on coffee quality (*Coffea arabica* L. var Caturra) produced in agroforestry systems of the Northern Central Zones of Nicaragua. In: 2nd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON MULTI-STRATA AGROFORESTRY SYSTEMS WITH PERENNIAL CROPS: Making ecosystem services count for farmers, consumers and the environment, 2007, Turrialba. **Proceedings...** Turrialba, 2007.

LONNI, A. S. **Caracterização e identificação química de carquejas do gênero Baccharis por métodos quimiométricos**. 2002, Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais)- Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

MAPA- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br> > Acesso em: 22 de fevereiro de 2015.

MORGANO, M. A.; PAULUCI, L. F.; MANTOVANI, D. M., MORY, E. E. Determinação de minerais em café cru. **Food Science and Technology**, v. 22 , n. 1, p. 19-23, 2002.

RITTA NETTO, A. S. Secretaria da agricultura e abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br>> Acesso em 20 de fevereiro de 2015.
ROSS, J. L. **Geografia do Brasil**, 5^a ed., São Paulo: Edusp-Editora da Universidade da Cidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

SARRAZIN, C.; LE QUÉRÉ, J. L.; GRETSCHR, C.; LIARDON, R.
Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods. **Food Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 99-106, 2000.

SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. An Adaptation of ARTHUR for Microcomputers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 326-327, 1989.



CAPÍTULO II

Revisão Bibliográfica

2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.1 *Coffea arabica* L.

O gênero *Coffea* abrange 41 espécies pertencentes ao continente africano e 62 encontradas em Madagascar, ilhas Mascarenhas e Grande Comore (ANTHONY; DINIZ; COMBES; LASHERMES, 2010). As espécies mais utilizadas comercialmente são *C. liberica* H., *C. congensis* F., *C. canefora* P. e *C. arabica* L., (GRANER; JÚNIOR, 1967). O *C. arabica* L. pertence à família *Rubiaceae*, subfamília *Ixoroideae*, tribo *Coffeae* e gênero *Coffea*, nativa de florestas da Etiópia, Kenya e Sudan (CAMARGO, 2010). Todas as variedades de arábicas podem produzir cafés especiais (tipo *gourmet*), desde que, colhidas, processadas e armazenadas adequadamente (FAZUOLI et al., 2007). A composição química dos frutos de café procedente de mesma espécie será diferente em consequência das condições ambientais, manejos de pré e pós-colheita não controladas e mutações gênicas.

O sabor e o aroma da bebida são atribuídos aos ácidos, aldeídos, cetonas, açúcares, proteínas, aminoácidos, ácidos graxos, compostos fenólicos entre outros (FERNANDES; PINTO; THÉ; PEREIRA; CARVALHO, 2001).

A Tabela 1 apresenta os principais compostos presentes do *C. arabica* L e seus teores máximos, conforme literaturas.

O cafeeiro (*C. arabica* L.) demora de 3 a 4 anos para dar frutos, podendo uma planta viver até 100 anos. Seu ciclo fenológico se completa a cada dois anos. O amadurecimento da fruta se dá de 6,5 a 7 meses (JOLY, 2002; CAMARGO; CAMARGO, 2001).

Tabela 1 – Composição química do grão verde *C. arabica* em base seca (g/100g)

Componentes	<i>Coffea arabica</i>	Referência
Cafeína	0,9-1,3	(FARAH, A 2012)
Trigonelina	0,6-2,0	(FARAH, A 2012)
Aminoácidos livres	0,27-0,5	(PREEDY, 2015)
Ácidos clorogênicos totais	4,1-7,9	(FARAH, A 2012)
Açúcares redutores	0,1	(FARAH, A 2012)
Sacarose	6,0-9,0	(FARAH, A 2012)
Total de carboidratos	56	(PREEDY, 2015)
Proteínas	10,0-11,00	(FARAH, A 2012)
Lipídios totais	13-17,0	(ILLY; VIANI, 1995)
Diterpenos: cafestol	05-09	(ILLY; VIANI, 1995)
Kaweol	0.3	(ILLY; VIANI, 1995)

O *C. arabica* tem um ano de alta produção seguido no próximo ano de menor produção; este fenômeno é chamado de bienabilidade. Em anos de alta produção de frutos, há grande intensificação da atividade metabólica devido ao crescimento dos frutos e com isso o cafeeiro não sintetiza fotoassimilados suficientes para suprir as demandas de frutificação (RENA; MAESTRI, 1985; CARVALHO; RENA; PEREIRA; CORDEIRO, 1993), no que reduz o seu desenvolvimento. No ano seguinte o fruto se desenvolve nos ramos novos, com isso, a produção é proporcional ao número de nós e gemas florais formadas.

O plantio para *C. arabica* necessita de altitudes em torno de 1.000- 2.100 m, o clima deve ser ameno entre 15 a 22°C e medidas pluviométricas de 1.500 a 2.000 mm (ILLY; VIANI, 1995).

O cafeeiro apresenta boa plasticidade fenotípica, isso é a capacidade de expressar fenótipos distintos quando exposto a diferentes ambientes (GOTTHARD; NYLIN, 1995), podendo sofrer alterações morfológicas conforme o nível de radiação como forma de adaptação (MORAIS; MEDRI; MARURO; CARAMORI; RIBEIRO; GOMES, 2004; RICCI; COSTA; PINTO; SANTOS, 2006; CÉSAR; MATSUMOTO; VIANA; SANTOS; BONFIM, 2010). Como o Brasil é um país que tem grandes diferenças de médias pluviométricas, temperaturas e altitudes entre os estados, estes

fatores merecem atenção diante dos estudos realizados em termos de produtividade e qualidade de café. Muitos trabalhos citam o efeito da temperatura sobre o café arábica, destacando o limite de temperatura para garantir uma colheita de qualidade. Considerando que os fotossintatos (compostos fenólicos, aldeídos e carboidratos) acumulados pela planta durante o crescimento de frutos são importantes para a qualidade da bebida, qualquer estresse que encurte esta fase de enchimento dos grãos pode prejudicar o acúmulo destas substâncias. Os fatores mais comuns que podem ocasionar menores acúmulos desses fotossintatos são: ataques de parasitas, elevadas temperaturas e déficit hídrico (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As plantas de *C. arabica* se desenvolveram em regiões de sub-bosques, portanto são adaptadas à sombra. No Brasil, é comum se cultivar café a pleno sol, (VALENTINI; CAMARGO; ROLIM; SOUZA; GALLO, 2010) devido às latitudes mais elevadas e altitudes inferiores quando comparados à sua região de origem, porém nesta adaptação ao ambiente, a planta é esgotada expressando todo seu potencial produtivo resultando em produções bienais (FAHL; CARELLI, 2007). Devido o plantio do *C. arabica* ser muito sensível à temperatura, existe muitos trabalhos em campo que aplicam artefatos para amenizar o efeito da temperatura na qualidade dos grãos, dentre elas os plantios em sistemas agroflorestais (SAF) e por adensamento de plantio. Estes sistemas têm em comuns plantas em vários níveis de sombreamento, portanto, compreender os dois sistemas fará compreender a adaptação do plantio em um sistema diferente do pleno sol.

2.1.2 Formas de Plantios

2.1.2.1 Sistemas agroflorestais (SAF)

A arborização inserida à cafeicultura é uma técnica muito utilizada para a proteção de cafezais, contra as adversidades climáticas (CAMARGO, 1998). O SAF é um tipo de cultivo classificado como “sistemas sustentáveis”; é uma técnica antiga, muito difundida na América Latina (MORAIS; MARUR; CARAMORI; RIBEIRO; GOMES, 2003) e muito utilizada na Colômbia, Venezuela, Costa Rica, Panamá e México (MUSCHLER, 2001). Em uma mesma unidade de terra é combinada de maneira simultânea plantas lenhosas perenes associadas com plantas herbáceas, culturas agrícolas e/ou forrageiras e/ou em integração com animais, aplicando técnicas de manejo que são compatíveis com as práticas culturais da população local (KING; CHANDLER, 1978). As plantas lenhosas normalmente usadas nos SAF intercaladas com cafeeiros são de uso florestal ou de exploração comercial tais como: macadâmia, seringueira, bananeira, (RICCI; COSTA; PINTO; SANTOS, 2006) abacateiro, (PINARD; BOFFA; RWAKAGARA, 2014) coco anão, eritrina (RICCI; COSTA; PINTO; SANTOS, 2006; MUSCHLER, 2001), figueira, ervilha-de-pombo (MORAIS; MARUR; CARAMORI; RIBEIRO; GOMES, 2003) grevillea robusta (*Grevillea robusta* A. Cunn. ex R. Br.) (BAGGIO; CARAMORI; ANDROCIOLI FILHO; MONTOYA, 1997) entre outras.

A técnica da arborização tem um sombreamento mais ralo, com 60 a 70 plantas de por hectare (FAZUOLI; THOMAZIELLO; CAMARGO, 2007) promovendo diminuição da temperatura média em até 2°C e grande proteção contra vento, podendo favorecer o plantio de cafeeiro nas condições edafoclimáticas do meio ambiente (BEER, 1987; FAZUOLI; THOMAZIELLO; CAMARGO, 2007). Os motivos do insucesso da arborização dos cafezais foram objetos de muitos estudos, concluindo que as árvores de

sombra competiam fortemente com os cafeeiros na absorção de água durante a época seca (FAHL; CARELLI, 2007). Porém, no Brasil, a preferência do cultivo de cafeeiros é em pleno sol, com cerca de 90 % das lavouras. Esta forma de plantio está relacionada à maior facilidade de passagem de máquinas no plantio e por estar associado ao conceito de maior produção de grãos a pleno sol (RICCI; COSTA; PINTO; SANTOS, 2006).

O conhecimento dos efeitos do sombreamento de árvores ou arbustos sobre crescimento de cafeeiros dá suporte na implantação da arquitetura ideal do cafeeiro que maximiza a captura da radiação solar disponível em ambientes sombreados (MORAIS; MARUR; CARAMORI; RIBEIRO; GOMES, 2003). Quando o sombreamento é excessivo nos cafeeiros pode haver diminuição dos ramos plagiotrópicos, número de nós por ramo e botões florais o que resulta na redução da produção de café (MORAIS; CARAMORI; RIBEIRO; GOMES; KOGUISHI, 2006). Fahl et al. (1994) e Carelli et al. (1999) observaram que o sombreamento excessivo reduziu o crescimento de *C. arabica*. Por outro lado, o excesso de intensidade de radiação pode levar a danos na planta, (WILLEY, 1975) prejudicando o desenvolvimento floral, morte das flores (MES, 1957) levando a perdas da produtividade e desenvolvimento de plantas daninhas (LUNZ, 2007). Por isso, existe a necessidade de definir uma densidade de sombreamento que proteja a planta de temperaturas extremas. Para cafeeiros, o sombreamento moderado (entre 20 e 30 %) pode ser adequado, não prejudicando o crescimento das plantas, qualidade dos frutos e produtividade (NETO; ALVARENGA; OLIVEIRA, 2014). Estudos mostram benefícios para este tipo de cultura para os cafeeiros, como maior desenvolvimento dos frutos, (MUSCHLER, 2001) maior nota de corpo e acidez no teste sensorial, ausência de defeitos (MUSCHLER, 2001) e aumento da produção (PINARD; BOFFA; RWAKAGARA, 2014). A presença de árvores aumenta o aporte de matéria orgânica em virtude da queda de folhas, reduzindo as

perdas de N, aumentando a capacidade de absorção e infiltração de água no solo aumentando a umidade (MORAIS; CARAMORI; RIBEIRO; GOMES; KOGUISHI, 2006) e reduzindo o risco de erosão.

Caramori et al. (1999), observou que durante a geada, a temperatura média diária aumentou em 5,5 °C no plantio de café devido ao consorciamento com arbusto. Morais et al. (2006) observou a maturação mais lenta em cultivos sombreados do que em pleno sol. Este resultado pode influenciar na qualidade do grão, já que a maturação mais lenta pode favorecer a produção de frutos de maior qualidade.

2.1.2.2 Adensamento de plantio

O adensamento é uma técnica de cultivo que diminui a incidência direta da luz solar sobre o plantio, pois aumenta o número de plantas entre linhas e entre ruas (plantio em renque) apresentando maior número de cafeeiros por hectare do que nas culturas convencionais. Uma lavoura é adensada quando o espaço livre entre as linhas de cafeeiros é de 20 cm e a distância nos corredores pode variar de 1 m até 1,5 m para duas plantas, ou de 0,5 m a 1 m para uma planta. Super adensada é quando as distâncias entre as linhas e entre as plantas na linha são menores que zero, isto é, inferiores ao diâmetro da copa do cafeeiro adulto (ANDROCIOLI FILHO, 2002).

Os cafeeiros têm grande capacidade de adaptação a altas densidades de plantios podendo ser conduzidos em ambientes de baixa luminosidade para realizar o processo fotossintético, isto porque apresentam baixa irradiância de saturação, variando de 300 a 600 $\mu\text{mol}^{-2}\text{s}^{-1}$ (KUMAR; TIESZEN, 1980; FAHL; CARELLI; VEJA; MAGALHÃES, 1994; FAHL; CARELLI, 2007). Outro fator que conta com a adaptação do cafeeiro a plantios densos são as variações morfológicas e bioquímicas que ocorrem nas folhas, as quais aumentam a eficiência do aparelho fotossintético do cafeeiro. (AKUNDA;

IMBAMBA; KUMAR, 1979). No plantio adensado ocorre à competição entre as plantas, principalmente com relação à radiação solar, fator que influenciará na morfologia das folhas aumentando o índice de área foliar (IAF) (relação entre a superfície de folha e a área explorada pelos cafeeiros) e nos metabolomas. Tradicionalmente as dimensões utilizadas em culturas de café no Brasil eram compostas de 700 a 800 plantas.ha⁻¹. Após a introdução do Plano de Renovação e Revigoração de Cafezais em 1970, o espaçamento entre as plantas diminuiu, passando a compor de 5,000 a 10,000 plantas.ha⁻¹ (ROCHA; CEOTTO; PREZOTTI, 2000).

Trabalhos mostram espaçamentos reduzidos com até 17 mil plantas ha⁻¹, resultando em melhores produtividades com maior número de safras (GUIMARÃES; MENDES, 1998) gerando um número maior de frutos, porém não se pode dizer se há um aumento na qualidade destes (CARVALHO, 1986; SARRAZIN; LE QUÉRÉ; GRETSCHR; LIARDON, 2000).

Um critério importante para o adensamento das culturas de café é a escolha de plantas de menores portes. Plantas mais baixa facilitam a colheita e tratos culturais, além de apresentarem maior produtividade por área cultivada quando comparada com cultivares de porte alto (SAKIYAMA; PEREIRA; ZAMBOLIM, 1999) A cultivar IAPAR 59, lançada no Estado do Paraná em 1993, foi apresentada para plantios de altas densidades devido às características de porte baixo e diâmetro de copa pequeno, além da resistência à ferrugem (*Hemileia vastatrix* BERK ET BR.). Estas plantas adultas cultivadas em latossolo roxo distrófico, Londrina, PR apresentam diâmetro de copa de 1,80 m, bem menor que outras da mesma espécie, como por exemplo, Catuai com 2,20 m.

Com a intensificação do sistema de cultivo adensado e a retomada da possibilidade de sombreamento do café no Brasil, tornou-se imprescindível conhecer as respostas dos cultivares atuais às variadas condições edafoclimáticas e o efeito na

fisiologia na produtividade do cafeeiro, visando adequar o manejo e otimizar a produtividade nesses novos modelos tecnológicos.

Vários autores (GUYOT; GUEULE; MANEZ; PERRIOT; GIRON; VILLAIN, 1996; MUSCHLER, 2001; VAAST et al., 2005), verificaram um aumento significativo no tamanho dos grãos em cafeeiros sob sombreamento.

No campo, autores destacam que técnica de adensar cafeeiros faz a planta desenvolver maior eficiência na utilização da radiação solar, da água e dos minerais, e possivelmente há melhor controle das plantas invasoras e algumas pragas (PEREIRA; GUIMARÃES; BARTHOLO; GUIMARÃES; ALVES, 2007). Outra vantagem é que o adensamento mantém os cafeeiros mais enfolhados com menores níveis de estresse proporcionando menores temperaturas no interior da planta, (FAZUOLI; THOMAZIELLO; CAMARGO, 2007) estando em torno de 2-4 °C abaixo do ambiente externo (PEZZOPANE; PEDRO JÚNIOR; CAMARGO; FAZUOLI, 2008; VAAST et al., 2005).

O aumento da densidade de plantio oferece maior proteção ao solo devido à maior cobertura proporcionada pelos próprios cafeeiros e pelo maior número de folhas que caem no chão, diminuindo a erosão, a temperatura do solo, a lixiviação, a volatilização, a evaporação da água e intensificando a reciclagem de nutrientes. Estudos conduzidos no IAPAR mostram que o adensamento de plantio melhoram as propriedades físicas e químicas do solo, aumentando a estabilidade de agregados, pH, teores de Ca, Mg e K, diminuindo o Al-trocável (PAVAN; CHAVES, 1994).

Cafeeiros sombreados terão maiores períodos de maturação dos frutos (SCALCO; COLOMBO; QUINTELA; PAIVA; MORAIS, 2005; JARAMILLO-BOTERO; SANTOS; MARTINEZ; CECON; FARDIN, 2009; RICCI; COSTA; PINTO; SANTOS, 2006) produzindo frutos de melhor qualidade, já que há maior acúmulo de açúcares e sólidos (MORAIS; CARAMORI; RIBEIRO; GOMES;

KOGUISHI, 2006; SOMPORN; KAMTUO; THEERAKULPISUT; SIRIAMORNPUN, 2012).

Martinez et al. (2008) relata pequena redução no teor das clorofilas totais nas folhas de cafeeiros adensados e aumento no teor de clorofila b, a principal coletora de luz do fotossistema II cujo teor pode ser considerado um parâmetro de eficiência do aparelho fotossintetizante, indicando adaptação favorável nos plantios adensados (MARTINEZ; AUGUSTO; CRUZ; PEDROSA; SAMPAIO, 2008).

A produtividade dos cafeeiros pode estar relacionada com as taxas fotossintéticas de plantas no estágio inicial de desenvolvimento, (MAZZAFERA; GUERREIRO FILHO, 1991) porém, nem sempre o aumento na taxa fotossintética da planta é sinônimo de aumento de qualidade de bebida, geralmente o que favorece qualidade não favorece produtividade e vice-versa. Assim como, resultados têm mostrado que plantas de sol produzem mais que de sombra, porém, a qualidade da bebida pode ser menor devido à maturação mais acelerada influenciando o metabolismo de certos ácidos (FAGAN; SOUZA; PEREIRA; MACHADO, 2011).

Uma forte influência do clima e da fenologia do cafeeiro foi observada nas características sensoriais da bebida, fator que pode estar correlacionado com o tempo de formação do grão. No final da maturação dos grãos os ácidos clorogênicos (ACG) são translocados da semente para a periferia do fruto, para proteção contra ataque de microorganismos, porém, fatores como temperaturas elevadas interferem no período de maturação do fruto (FAGAN; SOUZA; PEREIRA; MACHADO, 2011), já que essa condição afeta a translocação de compostos fenólicos do interior do endosperma para as camadas superficiais, impedindo uma migração total desses compostos no que confere um caráter adstringente e metálico à bebida (ORTOLANI et al., 2000).

A relação entre densidade e produtividade não segue uma função linear. A máxima produtividade nestes sistemas depende fundamentalmente do ponto de

equilíbrio entre o número de plantas, existindo um ponto ótimo nessa relação, do contrário, o aumento de densidade passa a reduzir a produtividade.

2.1.3 Metabólitos Primários e Secundários

As enzimas são responsáveis por todas as reações químicas sintetizadas e degradadas no metabolismo dos seres vivos.

Todos os organismos, incluindo as plantas, possuem vias metabólicas semelhantes que lhes permitam utilizar ou sintetizar substâncias que são essenciais para a sua sobrevivência. Estes compostos de funções fisiológicas básicas são denominados metabólitos primários, compostos de carboidratos, aminoácidos, lipídios, ácidos nucleicos e clorofila (SKALICKA-WOŹNIAK; HANOS; KAZIMIERZ, 2011).

Existem outras vias metabólicas que produzem compostos que não têm uma utilidade específica, conhecidos como produtos naturais ou metabólitos secundários. Sua ocorrência é limitada a grupos sistemáticos menores e são encontrados em baixas concentrações, com funções que permitem que o organismo se adapte ao ambiente, a fim de sobreviver e se reproduzir (SKALICKA-WOŹNIAK; HANOS; KAZIMIERZ, 2011). Na planta, a adaptação ao meio ambiente consiste na adaptação as condições externas, e então esses metabólitos são produzidos em resposta a um mecanismo de defesa contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores e animais dispersores de sementes (SIMÕES; SCHENKEL; GOSMANN ; MELLO; MENTZ; PETROVICK, 2007).

Os principais componentes do fruto de café cru são a água, carboidratos, lipídios, compostos nitrogenados, minerais e ácidos. Comumente associa-se a qualidade do café aos constituintes físico-químicos, tais como os compostos nitrogenados (proteínas, cafeína, trigonelina), carboidratos, lipídios e compostos fenólicos presentes

no endosperma do grão. O resultado destes compostos principalmente nos produtos pós torra são responsáveis pelos sabores e aromas característicos da bebida (FRANCA; MENDONÇA; OLIVEIRA, 2005).

2.1.3.1 Principais metabólitos primários e secundários de grãos e folhas do *Coffea*

2.1.3.1.1 Carboidratos

Os carboidratos são sintetizados pela fotossíntese; primeiro formam-se os monossacarídeos e posteriormente por transformações de polimerização e condensação formam-se, di, tri e polissacarídeos. Os carboidratos estão presentes no grão na forma de polissacarídeos (40-50 % em base seca) e açúcares de baixo peso molecular (8,2- 8,3 % em base seca) que incluem tri, di e monossacarídeos redutores e não redutores.

Os principais carboidratos acumulados em folhas e frutos de cafeeiro são o amido e os açúcares solúveis redutores e não-redutores. Os principais açúcares redutores são a glicose e frutose, enquanto o principal açúcar não-redutor é a sacarose (TAIZ; ZEIGER, 2004). Entre os açúcares de baixo peso molecular, a sacarose é de maior concentração nos grãos, está na faixa de 5 a 8,5 % (base seca) (BRADBURY, 2001). Nas folhas a glicose varia de 1,1 a 1,9 % (CAVATTE; RODRIGUEZ-LÓPEZ; MARTINS; MATTOS; DA MATTA, 2012). Os açúcares estão associados com a qualidade, por estarem junto com os aminoácidos e proteínas. (SHANKARANARAYANA; RAGHAVAN; ABRAHAM; NATARAJAN, 1974). Um dos atributos que leva o *C. arabica* a ser considerado um café de melhor qualidade em comparação com outras espécies é por conter maior teor de carboidratos (ILLY; VIANI, 1995).

2.1.3.1.2 Lipídios

Os lipídios ocorrem naturalmente na planta com as funções de armazenar energia e estruturar a membrana celular. Podem aparecer na forma de gorduras, ceras, esteróis, vitaminas solúveis em gordura tais como vitaminas (A, D, E, e K), monoglicérides, diglicérides, triacilglicerois e fosfolípidos (SKALICKA-WOŹNIAK; HANOS; KAZIMIERZ, 2011). Todos os lipídios derivam da acetil coenzima A (acetil-CoA) (KOOLMAN; RÖHM, 2005). A fração lipídica no café está presente em maior quantidade no endosperma, tais como, triacilgliceróis, fosfolípidos, esteróis, tocoferóis, diterpenos e ésteres de ácidos graxos e em menor quantidade, na camada externa do grão, na forma de cera, composta, sobretudo de 5-hidroxitriptamidas (OESTREICH-JANZEN, 2010).

O teor de lipídios no grão está em torno de 7 a 17 % com uma média de 15 % no *C. arabica* L. (CHU, 2012; OESTREICH-JANZEN, 2010). Possuem um efeito positivo na qualidade da bebida do café; durante a torração concentram-se nas áreas externas, formando uma camada protetora no grão contra eventuais perdas ocasionadas pelo processamento (PIMENTA, 2003; AGUIAR, SALVA; FAZUOLI; FAVARIN, 2005). Nas folhas, a cutina, polímero insolúvel de ácidos graxos, tem como funções aumentar a resistência às doenças e perda de água (LICHSTON; GODOY, 2006).

2.1.3.1.2.1 Isoprenoides

Os isoprenoides ou terpenoides são uma classe de ocorrência natural, derivados de um precursor comum, o isopreno (2 metil-1,3-butadieno), com cinco átomos de carbono e um metil ramificado, oriunda da acetil-CoA (KOOLMAN; RÖHM, 2005). Na maioria são estruturas multicíclicas que diferem um do outro não só nos grupos funcionais, mas também em seus esqueletos básicos de carbono, que são eles,

monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40), politerpenos (C5n). No grupo de isoprenoides pode haver outras moléculas nas quais o número de átomos de carbono não são divisíveis por 5, como esteroides e iridoides, que resultam de reações secundárias, tais como oxidação, ciclização, ou desprendimento de alguns substituintes (SKALICKA-WOŹNIAK; HANOS; KAZIMIERZ, 2011).

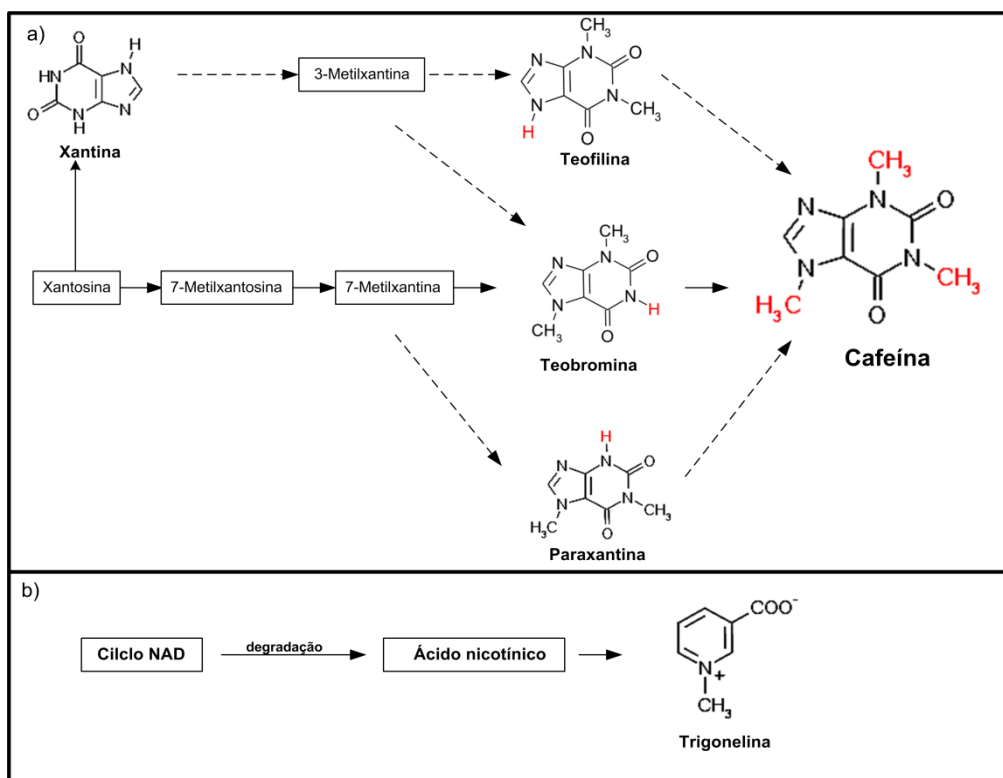
2.1.3.1.3 Aminoácidos

Aminoácidos são unidades estruturais básicas de construção de proteínas, composto de molécula contendo amina e grupos funcionais carboxila. Os aminoácidos são considerados os produtos de base que resultam assimilação de nitrogênio pelas plantas (SKALICKA-WOŹNIAK; HANOS; KAZIMIERZ, 2011). No grãos crus, são significantes precursores de aromas da bebida (ARNOLD; LUDWIG, 1996).

2.1.3.1.3.1 Derivados de aminoácidos

Os alcaloides surgem biogeneticamente a partir de aminoácidos ou dos seus derivados diretos, são produzidas por uma grande variedade de organismos, incluindo plantas, bactérias, fungos e animais.

No café é preciso destacar os alcaloides purínicos e piridínicos conhecidos como pseudo-alcaloide, derivam da xantina e não diretamente de um aminoácido. Os alcaloides purínicos constituem a cafeína (1,3,7-trimetilxantina), teobromina (3,7-N-dimetilxantina) e a paraxantina; o alcaloide piridinico constitui a trigonelina (ácido 1-N, metilnicotínico), Figura 1 (ASHIHARA, 2006).



(Fonte: NOGUEIRA, TRUGO, 2003; ASHIHARA, 2006)

Figura 1- Principais alcaloides do *Coffea*: a) cafeína, paraxantina, teofilina e teobromina
b) trigonelina,

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é o alcaloide mais abundante e importante no café (CLIFFORD, 1985), é encontrada em todas as partes do cafeeiro, porém com mais abundância nas flores, nas sementes e nas folhas mais novas (RAJU; GOPAL, 1979). Apesar do sabor característico, este alcaloide não contribui mais do que 10 % do amargor do café (FARAH, 2009; NOGUEIRA; TRUGO, 2003). Muitos alcaloides são tóxicos para outros organismos, desta forma, estudos mostram que a cafeína pode ser alelopática, atuando como agentes deferrentes contra a predação por herbívoros. Na bebida, a cafeína é bastante estável a altas temperaturas, com isto, permanece quase estável com a torração (ILLY; VIANI, 1995).

A trigonelina é uma N-metil betaína (CROZIER; CLIFFORD; ASHIHARA, 2008) que contribui para o aroma por meio da formação de produtos de degradação como as piridinas e o N-metilpirrol durante a torra (MONTEIRO; TRUGO, 2005; ABRAHÃO; PEREIRA; LIMA; FERREIRA; MALTA, 2008). A porcentagem de

trigonelina no grão verde reduz de 1,0-1,2 % para 0,5-1 % após a torra, originando em maior quantidade a N-metilperidina e em menor porcentagem o ácido nicotínico (niacina) (PREEDY, 2015). Embora a niacina seja atribuída ao aumento do teor nutricional no café, Souza et al. encontrou uma variação de apenas 0,024 a 0,032 g/100 g de ácido nicotínico para o café *Gourmet* (100 % grãos arábica).

2.1.3.1.4 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem a uma grande classe de compostos, formados por pelo menos um anel aromático, no qual, ao menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (SIMÕES; SCHENKEL; GOSMANN; MELLO; MENTZ; PETROVICK, 2007). Os fenólicos são biossintetizados por dois caminhos: a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. Os derivados da via do ácido chiquímico são fenóis, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas e ligninas e da via do ácido malônico, de menor importância em plantas superiores, resultante de produtos de fungos e bactérias (SKALICKA-WOŹNIAK; HANOS; KAZIMIERZ, 2011).

Os compostos fenólicos são conhecidos por suas características antioxidantes. *in vitro* (MONTEIRO; TRUGO, 2005). Atuam na proteção das plantas, induzidos por fatores bióticos (patogênicos e herbívoros) e estresses abióticos (UV, temperatura, nutriente, luz, competição entre plantas). (FARAH, 2009; ILLY; VIANI, 1995), Na bebida, contribuem com sabor e aroma característicos, aumentando o amargor (KY; LOUARN; DUSSERT; GUYOT; HAMON; NOIROT, 2001). Nos grãos de café, o principal composto fenólico são os ácidos clorogênicos, ACG (ROSTAGNO; CELEGHINI; DEBIEN; NOGUEIRA; MEIRELES, 2014).

2.1.3.1.5 Ácidos

Os ácidos encontrados no café verde são ácido cítrico (8,5mg/g-base seca), ácido málico (4,14 mg/g-base seca); ascórbico (3,37 mg/g de base seca), acético (0,58 mg/g de base seca) (ALCÁZAR; FERNÁNDEZ-CÁCERES; MATÍN; PABLOS; GONZÁLEZ, 2003) e ácido clorogênico (6,5 mg/g em base seca) (COSTA; TRUGO, 2005) principal fenólico do café. (ABRAHÃO; PEREIRA; LIMA; FERREIRA; MALTA, 2008).

O ACG é formado principalmente pela esterificação do ácido quínico e derivados trans-cinâmicos (ácidos cafeicos, p-cumaricos e ferúlico) (ROSTAGNO; CELEGHINI, DEBIEN; NOGUEIRA; MEIRELES, 2014).

Os principais grupos de ACG encontrados no *Coffea* são os ácidos cafeoilquínicos (ACQ), estes em maior concentração, Figura 2, feruloilquínicos (AFQ) e dicafeoilquínicos (AdiCQ), com pelo menos três isômeros por grupo (FARAH; DONANGELO, 2006).

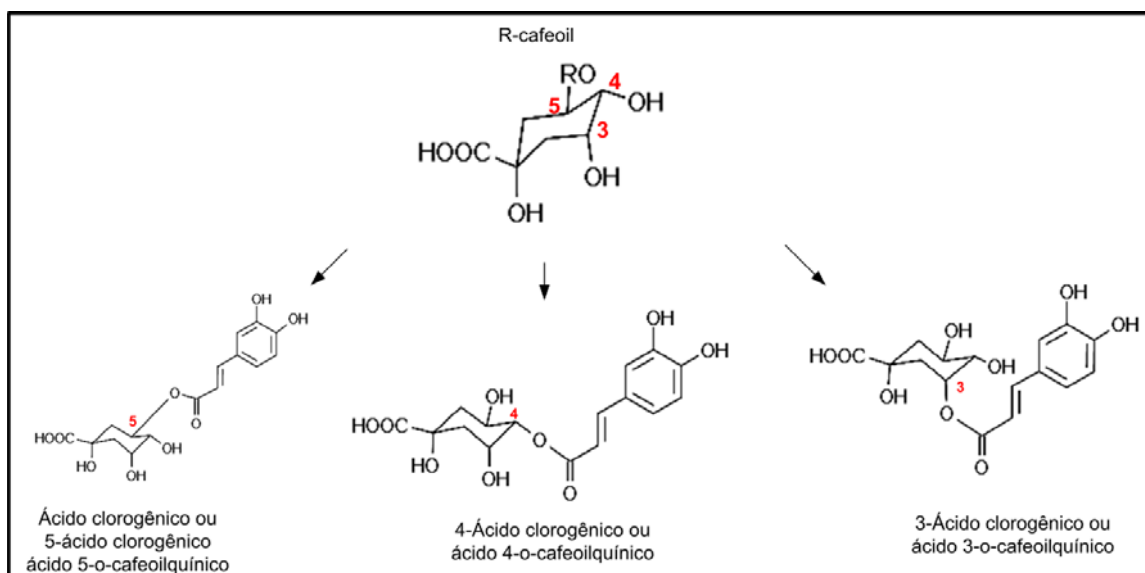


Figura 2-A CQ- ácidos cafeoilquínicos

(Fonte: MOLDOVEAN, 2009; DEBRY, 1994)

2.1.3.1.6 Clorofila

As clorofilas são os pigmentos naturais mais abundantes presentes nas plantas, ocorrem nos cloroplastos das folhas e em outros tecidos vegetais. Os principais pigmentos encontrados no *Coffea* são as clorofilas *a* (Chl *a*) e *b* (Chl *b*). A Chl *a*, é o pigmento utilizado para realizar a fotoquímica (o primeiro estágio do processo fotossintético), enquanto que o Chl *b* auxilia na absorção de luz e na transferência da energia radiante para os centros de reação, sendo assim chamados de pigmentos acessórios (STREIT; CANTERLE; CANTO; HECKTHEUER, 2005). Coelho et al. (2007) relata que em seus estudos de comparação entre cafeeiros em pleno sol e sombreados não houve diferença significativa entre os teores de clorofila.

2.2 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver metodologia e aplicá-la no estudo dos metabólitos por impressão digital utilizando análise espectrocópicas FTIR, HPLC-UV-DAD associada com análise química clássica nas diferentes condições de luz e plantios de folhas e grãos do *C. arabica* L.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A.; PEREIRA, R. G.; LIMA, A. R.; FERREIRA, E. B.; MALTA, M. R. Compostos bioativos em café integral e descafeinado e qualidade sensorial de bebida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n.12, p.1799-1804, 2008.
- AGUIAR, A. T.; SALVA, T. D.; FAZUOLI, L. C.; FAVARIN, J. L. Variação no teor de lipídios em grãos de variedades de *Coffea canephora*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 12, p. 1251-1254, 2005.

AKUNDA, E. M.; IMBAMBA, S. K.; KUMAR, D. High density plantings of coffee: I. microclimatic and related changes. **East African Agricultural and Forestry Journal** v. 45, n. 2, p. 130-132, 1979.

ALCÁZAR, A.; FERNÁNDEZ-CÁCERES, P.; MATÍN, M.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. Ion chromatographic determination of some organic acids, chloride and phosphate in coffee and tea. **Talanta**, v. 61, n. 2 p. 95-101, 2003.

ANDROCIOLI FILHO, A. **Café adensado**: Espaçamentos e cuidados no manejo da lavoura de Londrina. Instituto Agrônomo do Paraná-IAPAR, Circular 121, p. 32, 2002.

ANTHONY, F.; DINIZ, L. E.; COMBES, M.-C.; LASHERMES, P. Adaptive radiation in *Coffea* subgenus *Coffea* L. (Rubiaceae) in Africa and Madagascar. **Plant Systematics and Evolution**, v. 285, n. 1-2, p. 51-64, 2010.

ARNOLD, U., LUDWIG, E. Analysis of free amino acids in green coffee beans. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 203, n. 4, p. 379-384 1996.

ASHIHARA, H. Metabolism of alkaloids in coffee plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 1-8, 2006.

BAGGIO, A. J.; CARAMORI, P. H.; ANDROCIOLI-FILHO, A.; MONTOYA, L. Productivity of southern Brazilian coffee plantations shaded by different stockings of *Grevillea robusta*. **Agroforestry systems**, v. 37, n. 2, p. 111-120, 1997.

BEER, J. Advantages, disadvantages and desirable characteristics of shade trees for coffee, cacao and tea. **Agroforestry systems**, v. 5, n. 1, p. 3-13, 1987.

BRADBURY, A. G. Chemistry I: Non-volatile compounds, 1A: Carbohydrates. In: CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. (Eds.). **Coffee: Recent Developments**, Oxford:Blackweel Science Ltda, 2001, p. 1-3.

CAMARGO, A. P. A arborização de cafezal como meio de reduzir as adversidades climáticas e promover a sustentação da cafeicultura. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DO CAFÉ, 16, 1998, Espírito Santo do Pinhal, **Anais...** Campinas: IAC, 1990. p. 6-7.

CAMARGO, A. P.; CAMARGO, M. B. Agrometeorologia definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, v.60, n. 1, p. 65-68, 2001.

CAMARGO, M. B. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffe crop in Brazil. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 239-2010, 2010.

CARELLI, M. L.; FAHL, J. I.; TRIVELIN, P. C.; QUEIROZ-VOLTAN, R. B. Carbon isotope discrimination and gas exchange in *Coffea* species grown under different irradiance regimes. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.11, n. 2, p. 63-68, 1999.

CARVALHO, A. A. Pesquisas Sobre o Melhoramento do Café. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 43, n. 2, p. 793-809, 1986.

CAVATTE, P.; RODRIGUEZ-LÓPEZ, N. F.; MARTINS, S. C.; MATTOS, M. S.; DA MATTA, F. M. Functional analysis of the relative growth rate, chemical composition, construction and maintenance costs, and the payback time of *Coffea arabica* L. leaves in response to light and water availability. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-12, 2012.

CÉSAR, F. R.; MATSUMOTO, S. N.; VIANA, A. E.; SANTOS, M. A.; BONFIM, J. A. Morfofisiologia foliar de cafeeiro sob diferentes níveis de restrição luminosa. **Coffee Science**, v.5, n .3, p. 262-271, 2010.

CHU, Y.-F. **Coffee**: emerging health effects and disease prevention. Ames: John Wiley & Sons, 2012. 652 p.

CLIFFORD, M. N. **Coffee**: botany, biochemistry and production of beans and beverage. London: Croom Helm, 1985. 457 p.

COELHO, R. A.; MATSUMOTO, S. N.; BONFIM, J. A.; LEMOS, C. L.; CÉSAR, F. R.; SANTOS, M. A.; LIMA, J. M.; ARAUJO, G. S.; GUIMARÃES, M. M. C.; FARIAS, D. H. Teor de clorofila nas folhas do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) em monocultivo e dois sistemas agroflorestais em barra do Choça, BA, Águas de Lindoia **Anais...** Brasília, D. F.: Embrapa Café, 2007.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. **Plant secondary metabolites**: occurrence, structure and role in the human diet. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2008. 384 p.

DEBRY, G. **Coffee and Health**. Montrouge :John Libbey Eurotext, 1994, 537 p.

DE CARVALHO, C. H. S.; RENA, A. B.; PEREIRA, A. A.; CORDEIRO, A. T. Relação entre produção, teores de N, P, K, Ca, Mg, amido e a seca de ramos do Catimor (*Coffea arabica* L.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 665-673, 1993.

FAGAN, E. B.; SOUZA, C. H.; PEREIRA, N. M.; MACHADO, V. J. Efeito do tempo de formação do grão de café (*Coffea* sp) na qualidade da bebida, 27. **Bioscience Journal**, v. 27, n. 5, p. 729-738, 2011.

FAHL, J. I.; CARELLI, M. L. Os estudos sobre a fisiologia do cafeeiro no Instituto Agrônômico. **O Agrônômico**, v. 59, p. 41-43, 2007.

FAHL, J.; CARELLI, M.; VEGA, J.; MAGALHAES, A. Nitrogen and irradiance levels affecting net photosynthesis and growth of young coffee plants *Coffea arabica* L. **Journal of Horticultural Science**, v. 69, n. 1, p. 161-169, 1994.

FARAH, A. Coffee as a speciality and functional beverage. In: PAQUIN, P. (Ed), **Functional and speciality beverage technology**. 1. ed., Abington: Woodhead Publishing limited, 2009, p. 370-392.

FARAH, A. Coffee constituents. In: CHU, Y.-F. (Ed.). **Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention**. 1. ed., Iowa: John Wiley & Sons, 2012, p. 28

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FAZUOLI, L. C.; THOMAZIELLO, R. A.; CAMARGO, M. B. Aquecimento global, mudanças climáticas e a cafeicultura paulista. **O Agrônômico**, v. 59, p.19-20, 2007.

FAZUOLI, L.C.; SILVAROLLA, M. B.; SALVA, T. D.; GUERREIRO FILHO, O.; MEDINA FILHO, H. P., GONÇALVES, W. Cultivares de café arábica do IAC- um patrimônio da cafeicultura brasileira. **O Agrônômico**, v. 59, n. 1, p. 12-15, 2007.

FERNANDES, S. M.; PINTO, N. V.; THÉ, P. M., PEREIRA, R. G.; CARVALHO, V. D. Teores de polifenóis, ácido clorogênico, cafeína e proteína em café torrado. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 7 n. 3, p. 197-199, 2001.

FRANCA, A. S.; MENDONÇA, J. C.; OLIVEIRA, S. D. Composition of green and roasted coffees of different cup qualities. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 7, p. 709–715, 2005.

GOTTHARD, K.; NYLIN, S. Adaptive plasticity and plasticity as an adaptation: a selective review of plasticity in animal morphology and life history. **Oikos**, v. 74, n. 1, p. 3-17, 1995.

GRANER, E. A.; JÚNIOR, C. G. **Manual do Cafeicultor**. São Paulo: Editora da Universidade Estadual de São Paulo, 1967. 320 p.

GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. Produção de mudas de cafeeiro. In: MENDES, A. N. G.; GUIMARÃES, R. G. (Eds.). **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1998, p. 1-60.

GUYOT, B.; GUEULE, D.; MANEZ, J.; PERRIOT, J.; GIRON, J.; VILLAIN, L. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés arabica. **Plantations, Recherche, Développement**, v. 3, n. 4, p. 272-283, 1996.

ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso coffee: the chemistry of quality**. 2. ed. London, UK: Academic Press, 2005. 398 p.

JARAMILLO-BOTERO, C.; SANTOS, R. H.; MARTINEZ, H. E.; CECON, P. R.; FARDIN, M. P. Production and vegetative development of coffee trees grown under solar radiation and fertilization levels, during years of high and low yield. American-Eurasian. **Journal of Agricultural and Environmental Science**, v. 67, n. 6, p. 639-645, 2009.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal**. 13. ed., Companhia Editora Nacional: São Paulo, 2002. 778 p.

KING, K. F.; CHANDLER, T. M. **The wasted lands: The program of work of the International Council for Research in Agroforestry (ICRAF)**. International Council for Research in Agroforestry-ICRAF. Nairobi, Kenya, 1978.

KOOLMAN, J., RÖHM, K.-H. **Bioquímica: texto y atlas**. 4. ed. Ed. Médica Panamericana: Madrid, 2005, 488 p.

KUMAR, D.; TIESZEN, L. L. Photosynthesis in *Coffea arabica*. II. Effects of water stress. *Experimental Agriculture*, v. 16, n. 1, p. 21-27, 1980.

KY, C.-L.; LOUARN, J. D.; GUYOT, B. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. accessions. *Food Chemistry*, v. 75, n. 2, p. 223-230, 2001.

LICHSTON, J. E.; GODOY, S. A. P. de. Morfologia e teor de cera de folhas de café após aplicação de fungicida Pesquisa agropecuária brasileira, Brasília, v.41, n.6, p.919-926, 2006.

LUNZ, A. M.; BERNARDES, M. S.; RIGHI, C. A.; FAVARIN, J. L. Acúmulo de biomassa acima do solo em cafeeiro sob diferentes regimes de radiação solar. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 5, 2007 Águas de Lindóia. **Anais...** Brasília, D. F.: Embrapa Café, 2007.

MARTINEZ, H. E.; AUGUSTO, H. S.; CRUZ, C. D.; PEDROSA, A. W.; SAMPAIO, N. Crescimento vegetativo de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) e sua correlação com a produção em espaçamentos adensados. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 29, n. 4, p. 481-489, 2008.

MAZZAFERA, P.; GUERREIRO FILHO, O. **A produtividade do cafeeiro**. Documentos IAC, 24, p. 21, Campinas, 1991.

MES, M. G. Studies on the flowering of *Coffea arabica* L. III. Various phenomena associated with the dormancy of coffee flower buds. **Portugaliae Acta Biologica**, v. 5, n. 1, p. 25-44, 1957.

MOLDOVEAN, S. C. **Pyrolysis of Organic Molecules: Applications to Health and Environmental Issues**. Oxford:Elsevier Science; , 2009, 744 p.

MONTEIRO, M. C.; TRUGO, L. C. Determinação de compostos bioativos em amostras comerciais de café torrado. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 637-641, 2005.

MORAIS, H.; CARAMORI, P. H.; RIBEIRO, A. M.; GOMES, J. C.; KOGUISHI, M. S. Microclimatic characterization and productivity of coffee plants grown under shade of pigeon pea in Southern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 763-770, 2006.

MORAIS, H.; MARUR, C. J.; CARAMORI, P. H.; RIBEIRO, A. M.; GOMES, J. C. Características fisiológicas e de crescimento de cafeeiro sombreado com guandu e cultivado a pleno sol. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1131-1137, 2003.

MORAIS, H.; MEDRI, M. E.; MARURO, C. J.; CARAMORI, P. H.; RIBEIRO, A. M.; GOMES, J. C. Modifications on Leaf Anatomy of *Coffea arabica* caused by Shade of Pigeonpea (*Cajanus cajan*). **Brazilian Archives of Biology and Technol**, v. 47, n. 6, p. 863-871, 2004.

MUSCHLER, R. G. Shade improves coffee quality in a sub-optimal coffee-zone of Costa Rica. **Agroforestry Systems**, v. 51, n.2, p. 131-139, 2001.

NETO, J. N.; ALVARENGA, M. I.; OLIVEIRA, C. C. Efeito das variáveis ambientais na produção de café em um sistema agroflorestal. **Coffee Science**, Lavras, v. 9, n. 2, p. 187-195, 2014.

NOGUEIRA, M.; TRUGO, L. C. Distribuição de isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros. **Food Science and Technology**, v. 23, n. 2, p. 296-299, 2003.

OESTREICH-JANZEN, S. Chemistry of Coffee. In: *Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology*. Mander, LEW; L., HUNG-WEN (Eds), Oxford: Elsevier Science; 1 ed., 2010, p.1085–1117 .

ORTOLANI, A. A.; CORTEZ, J. G.; PEDRO, M. J.; CAMARGO, M. B.; THOMAZIELLO, R. A.; ALFONSI, R. R., DOS SARRAIPA, L. A. S. Clima e qualidade natural de bebida do café arábica no Estado de São Paulo. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1, 2000. Poços de Caldas. **Resumos expandidos...** Brasília: Embrapa, 2000, p. 662-664.

PAVAN, M.; CHAVES, J. Influência da densidade de plantio de cafeeiros sobre a fertilidade do solo. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAFÉ ADENSADO, 1994. **Anais...** Londrina: IAPAR, 1994, p.76-89.

PEREIRA, S. P.; GUIMARÃES, R. J.; BARTHOLO, G. F.; GUIMARÃES, P. T.; ALVES, J. D. Crescimento vegetativo e produção de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) recepados em duas épocas, conduzido em espaçamentos crescentes. **Ciência e agrotecnologia**, v. 31, n. 3, p. 643-649, 2007.

PEZZOPANE, J. R.; PEDRO JÚNIOR, M. J.; CAMARGO, M. B.; FAZUOLI, L. C. Exigência térmica do café arábica cv. mundo novo no subperíodo florescimento-colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n.6, p. 1781-1786, 2008.

PIMENTA, C. **Qualidade do café (*Coffea arabica* L.) originado de frutos colhidos em quatro estágios de maturação**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Lavras, 1995.

PINARD, F.; BOFFA, J. M.; RWAKAGARA, E. Scattered shade trees improve low-input smallholder arabica coffee productivity in the northern lake Kivu region of Rwanda. **Agroforestry Systems**, v. 88, n. 4, p. 707-718, 2014.

RAJU, K.; GOPAL, N. Distribution of caffeine in Arabica and Robusta coffee plants. *Journal of Coffee Research*, v. 9, n. 4, p. 83-90, 1979.

RENA, A.B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: *CULTURA DO CAFEEIRO, FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEEIRO*, Piracicaba, 1986. Anais... Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato, 1986, p.13-85.

RICCI, M. D.; COSTA, J. R.; PINTO, A. N.; SANTOS, V. L. Cultivo orgânico de cultivares de café a pleno sol e sombreado. *Pesquisa agropecuária brasileira*, v. 41, n. 4, p. 569-575, 2006.

ROCHA, A. C.; CEOTTO, O. L.; PREZOTTI, L. C. Diversos espaçamentos para o plantio de café Catuai na região serrana do Espírito Santo. In: *SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL*, Poços de Caldas, 2000. Resumos expandidos... Brasília: Embrapa café, 2000 p. 1001-1003.

ROSTAGNO, M. A.; CELEGHINI, R. M. S; DEBIEN, I. C. N.; NOGUEIRA, G. C.; MEIRELES, M. A. A., Phenolic compounds in coffee compared to other beverages. In: *PREEDY, V. R. (Ed). Coffee in health and disease prevention*, Academic Press, UK, 2014, p. 137-138

SAKIYAMA, N. S.; PEREIRA, A. A.; ZAMBOLIM, L. Melhoria do café arábica. In: *BORÉM, A. (Ed), Melhoria de espécies cultivadas*. Viçosa. Editora UFV, 1999, p. 189-204.

SALAZAR, E. M. Calidad de Coffea arabica bajo sombra de Erythrina poeppigiana a diferentes elevaciones en Costa Rica. *Agroforestería en las Américas*, v. 7, n. 26, p. 40-42, 2000.

SARRAZIN, C.; LE QUÉRÉ, J. L.; GRETSCHR, C.; LIARDON, R. Representativeness of coffee aroma extracts: a comparison of different extraction methods. *Food Chemistry*, v. 70, n. 1, p. 99-106, 2000.

SCALCO, M. S.; COLOMBO, A.; QUINTELA, A. C.; PAIVA, L. C.; MORAIS, A. R. Rendimento e maturação de frutos do cafeeiro sob diferentes critérios de irrigação e densidades de plantio-safra 2003/2004. In: *ANAIS DO IV SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS*, Londrina, 2005, Anais... Londrina: Embrapa - Café, CD-ROM, 2005.

SHANKARANARAYANA, M. L.; RAGHAVAN, B.; ABRAHAM, O.; NATARAJAN, C. Complex nature of coffee aroma. *Indian Coffe*, v. 38, n. 4, p. 84-92, 1974.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.) *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2002.

SKALICKA-WOŹNIAK, K.; HANOS, M. Ł.; KAZIMIERZ, G. P. Phytopharmacology, and the biological role of plant metabolites. In: WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. (Eds.) *High performance liquid chromatography in phytochemical analysis*, Boca Raton: CRC Press, p. 90-93, 2011.

SOMPORN, C.; KAMTUO, A.; THEERAKULPISUT, P.; SIRIAMORNPUN, S. Effect of shading on yield, sugar content, phenolic acids and antioxidant property of coffee beans (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) harvested from north - eastern Thailand, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 92, n. 9, p. 1956-1963, 2012.

SOUZA, R. M. N. de; CANUTO, G. A. B., DIAS, R. C. E.; BENASSI, M. de T. Teores de compostos bioativos em cafés torrados e moídos comerciais. *Química Nova*, v. 33, n. 4, p. 885-890, 2010

STREIT, N. M.; CANTERLE, L. P.; CANTO, M. W.; HECKTHEUER, L. H. As Clorofilas. *Ciência Rural*, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Castelló de La Plana: Publicacions de La Universitat Jaume I, 2006. 618 p.

VAAST, P., KANTEN, R. V., SILES, P., DZIB, B., FRANCK, N., HARMAND, J. M.; GENARD, M. Shade: a key factor for coffee sustainability and quality. In: ASIC 2004. 20th INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, Bangalore, 2004. **Anais...** Bangalore: Association Scientifique Internationale du Café (ASIC), 2005, p. 887-896.

VALENTINI, L. S.; CAMARGO, M. B.; DE ROLIM, G.; SOUZA, P. S.; GALLO, P. B. Temperatura do ar em sistemas de produção de café arábica em monocultivo e arborizados com seringueira e coqueiro-anão na região de Mococa, SP. **Bragantia**, v. 69, p. 1005-1010, 2010.

WILLEY, R. W. The use of shade in coffee, cocoa and tea. **Horticultural Abstract**, v. 45, p. 791-798, 1975.



CAPÍTULO III

Artigo 1

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO METABOLÔMICA DE FOLHAS DE *Coffea arabica* POR PLANEJAMENTO DE MISTURA E FATORIAL 2³

Fernanda Delaroza^a, Miroslava Rakocevic^b; Galileu Bernardes Malta^a, Roy Edward Bruns^c, Ieda Spacino Scarminio*^a

^a Laboratório de Quimiometria em Ciências Naturais, Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brasil

^b Embrapa Informática Agropecuária, Campus da UNICAMP, Barão Geraldo, CP6041, 13083-886, Campinas, SP, Brasil

^c Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

* Corresponding author. Tel.:+55 43 33714811; fax +55 43 33714286

e-mail: ieda@uel.br

RESUMO

Planejamento de mistura centroide simplex de quatro componentes, etanol, acetona, diclorometano e hexano associados a um planejamento fatorial 2^3 controlando o número de remacerações, temperaturas e tipo de agitação foi usado para otimizar os rendimentos dos extratos de folhas de *Coffea arabica*. Os extratos foram analisados por espectroscopia FT-IR. O uso do planejamento de mistura associado ao planejamento fatorial mostrou que variações nas condições de extração para os mesmos solventes variam a composição do extrato. Fortes correlações foram encontradas entre os espectros obtidos nas diferentes condições com os parâmetros solvatocrômicos. As condições de extração afetam metabólitos como ligninas, carboidratos e polissacarídeos e cafeína.

Palavras-chave: ultrassom, solventes, espectroscopia FT-IR, planejamento fatorial.

ABSTRAT

Mixture design simplex-centroid four components, ethanol, acetone, dichloromethane and hexane associated with a 2^3 factorial design controlling the number of re-remaceration , temperature and type of agitation was used to optimize the yields of the extracts of leaves of *Coffea arabica*. The extracts were analyzed by FTIR spectroscopy. The use of the associated planning mixture of the factorial design showed that variations in extraction conditions to vary the same solvent extract composition. Strong correlations were found between the spectra obtained in different conditions with solvatochromic parameters. Lignins, carbohydrates and polysaccharides , as well as caffeine seem to depend on the extraction condition.

Keyword : ultrasound , solvents, factorial design , FTIR spectroscopy.

3.1 INTRODUÇÃO

Experimentos com materiais vegetais são realizados para analisar um ou mais metabólitos da planta, o que necessita de um cuidadoso processo de extração. As técnicas para a extração de amostras vegetais podem ser realizadas por processos de extrações a frio (maceração ou percolação) (SEIDEL, 2006), a quente em sistemas abertos (infusão, decocção), (AL-ACHI, 2008) e a quente em sistemas fechados (arraste por vapor d água) (SEIDEL, 2006). Para reduzir o tempo e aumentar o rendimento nas extrações em sistemas fechados são utilizados: ultrassom (WANG; WELLER 2006); micro-ondas; fluído supercrítico; microextração de fase sólida (SEIDEL, 2006) e extração acelerada por solvente e pressurizada por líquido (ENG SHI, 2004). Os processos de extração de material vegetal são complexos e para serem executados é essencial que sejam bem definidos a natureza química do solvente que será usado, a temperatura, a frequência dos compostos a serem extraídos (YAQIN; XINGQIAN; YUNBIN; GUONENG; GUIHUA; DONGHONG, 2008).

Em uma extração seletiva, a técnica é conduzida para que haja compatibilidade na solubilidade do solvente/tampão com o analito de interesse, porém, não é aplicado o mesmo conceito quando o objetivo é extrair o metaboloma (DUNN; ELLIS, 2005). No processo de extração do metaboloma, o (s) solvente (s) extrator tem que ter afinidade com vários compostos de propriedades químicas diferentes, abrangendo grupos neutros (gorduras), orgânicos (fenólicos e terpenoides), básicos (alcaloides) e polares (n-óxidos e alcaloides quaternários) (GARCIA; DE OLIVEIRA; SOARES; BRUNS; SCARMINIO, 2010), garantindo com isto o esgotamento total do material vegetal. Desta forma, ao extrair um material vegetal, a escolha do solvente é parte essencial para que a extração seja completa, porém, se feita com um só solvente nem sempre representará o esgotamento total e, desta forma, constituintes permanecem na matriz da

planta. Outros solventes como hidrocarbonetos clorados ou alifáticos, ésteres e demais tipos de alcoóis com baixo peso molecular (SEIDEL, 2006) também são encontrados na literatura para esse fim. Muitos trabalhos fazem a escolha do solvente avaliando uma polaridade (δ) próxima ao soluto, ou se baseiam em protocolos para o metabólito de interesse. Comumente, a extração de mesma classe de metabólitos, como exemplo, as xantinas em amostras de café normalmente se utiliza água (a 80 °C/ acidificada/com diclorometano) (De MARIA; TRUGO; MOREIRA, 1995; PETERMANN; BAUMANN, 1984; TRUGO, MACRAE, DICK, & 1934), ácidos clorogênicos faz-se com metanol: água (MONTEIRO; FARAH, 2012; KY; NOIROT; HAMON, 1997), lipídios com hexano (ARAÚJO; SANDI, 2006) e açúcares com hexano ou em água: metanol (20:80 v/v) (RODRÍGUEZ-DURAN et al., 2014). No entanto, se a extração for para multicomponentes, dificilmente serão encontradas metodologias para este fim.

Para a escolha do solvente extrator, a teoria mais usual é baseada na polaridade semelhante solvente/soluto; porém existem outros parâmetros que podem auxiliar na escolha de um solvente extrator, como o triângulo de seletividade de Snyder, e a teoria de solvência de Hildebrand/Hansen (TSIVINTZELIS; ECONOMOU; KONTOGEORGIS, 2009; CURCIO; ALLIX; PICKAERT; JAMART-GRÉGOIRE, 2011; SRINIVAS; KING; MONRAD; HOWARD; HANSEN, 2009; NANGREJO; EDIRISINGHE, 2010).

O triângulo de seletividade classifica solventes orgânicos baseados nas suas propriedades termodinâmicas por parâmetros: ácido (x_d), básico (x_e) e dipolar (x_n). A partir destes parâmetros surgiram os termos solvatocrômicos, que são médias de medidas espectroscópicas que classificam os solventes quanto a sua capacidade de serem receptores de pontes de hidrogênio (basicidade, β), doadores de pontes de hidrogênio (acididade, α) ou por fazer interação dipolo-dipolo (dipolaridade, Π),

compondo o triângulo de Snyder. Sua vantagem é que vários tipos de solventes são classificados de acordo com o tipo de interação conforme o composto de interesse.

O solvente é considerado um dos parâmetros mais importantes na extração em ultrassom, já que está ligado diretamente com a solubilidade dos constituintes de interesse (CHEN; XIE; GONG, 2007). Um volume grande de solvente pode causar inchaço no material vegetal comprometendo o processo de extração (SEIDEL, 2005). Auxiliar o processo de extração por uso de ultrassom faz aumentar o seu rendimento e reduzir o tempo (YAQIN; XINGQIAN; YUNBIN; GUONENG; GUIHUA; DONGHONG, 2008). O uso do ultrassom age por efeito mecânico aumentado a permeação do solvente na parede celular liberando os constituintes e facilitando a dissolução dos compostos solúveis na transferência dos metabolitos do material vegetal para o meio líquido por osmose e difusão (LI; SUN; XU; SUN, 2012).

A frequência mínima usada em extrações por ultrassom é de 16 kHz (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA, 2010); a faixa de 16-100kHz é usada nas extração de substâncias como flavonoides hidrofílicas (antocianinas, taninos), carotenoides hidrofóbicas (licopeno, betacaroteno, capsaicina e luteína. (FENG; BARBOSA-CÁNOVAS; WEISS, 2011).

A temperatura é grande aliada na extração, quando bem controlada faz aumentar o rendimento dos metabólitos, já que aumenta a dissolubilidade e difusividade, (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA, 2010). Porém quando muito elevada pode levar a perda do rendimento ocasionada pela evaporação do solvente (YAQIN; XINGQIAN; YUNBIN; GUONENG; GUIHUA; DONGHONG, 2008) degradação ou volatilização de constituintes de interesse. Na decomposição térmica os fenóis podem reagir com outros componentes diminuindo sua extração (ANDREO; JORGE, 2006).

Para realizar extração exaustiva, e abranger os mais diversificados grupos de metabólitos, é fundamental realizar otimização com parâmetros que auxiliam no

processo extrativo. O objetivo deste trabalho foi otimizar o solvente extrator bem como parâmetros de extração como, número de remaceração, temperatura e tipo de agitação no rendimento de extratos obtidos das folhas de *Coffea arabica* L.

3.2 PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1 Planta, coleta e extração.

Os experimentos foram conduzidos no Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina (23°18'S, 51°17'W), Paraná, Brasil. As folhas dos cultivares IAPAR 59 foram coletadas em 04/11/2010 dos ramos plagiotrópicos do terceiro par de folhas após antese (florada principal) a 40 cm do solo. As folhas foram provenientes dos sistemas de plantio com 8.000 plantas.ha⁻¹, dimensão de 3.00 m x 0.41 m e espaço por planta de 1.25 m² em arranjo retangular.

Após coleta, as folhas foram passadas em água destilada, cortadas com tesoura, colocadas para secar em temperatura ambiente, trituradas em liquidificador, embaladas e condicionadas em freezer -20 °C.

Os extratos foram preparados utilizando os solventes orgânicos: etanol, acetona, diclorometano e hexano, (F Maia) nas proporções mostradas no planejamento experimental simplex-centroide, apresentado na Figura 1.

Foram pesadas 0,50 g de folhas secas, trituradas e submetidas à extração exaustiva. Foi utilizado um planejamento 2³ totalizando 8 ensaios com três variáveis número de remaceração, temperatura e tipo de agitação solvente/folha. Em cada ponto do planejamento fatorial, foi feito um planejamento de mistura, Figura 2. No planejamento fatorial, o nível inferior foi definido por 24 remacerações de 30 minutos cada, temperatura de -5 ° C (± 3 ° C) e agitação em ultrassom (ultra cleaner- unique USC 1400, 40 kHz, cap. 2,8 L, dim. 240 x 137 x 100 mm). O nível superior foi

definido por 6 remacerações de 120 minutos cada, com temperatura de 30 °C (± 2 °C) sem nenhum tipo de agitação (0kHz). Para cada ensaio foram utilizados 72 mL de solvente com duração de 720 min.

Os extratos foram submetidos à ventilação mecânica até a obtenção de massas constantes. As análises em FT-IR foram realizadas no espectrofotômetro Thermo Scientific Nicoletti S10, usando um acessório ATR com janela de Ge com modo de medição em transmitância, número de scans de 60, resolução 4 cm^{-1} na registrados na faixa de 675 a 4000 cm^{-1} . Foram realizadas leituras durante as extrações em espectrofotômetro UV-Visível Thermo Scientific modelo Evolution 60S, acoplado ao *software* Vision lite na região 200-800 nm.

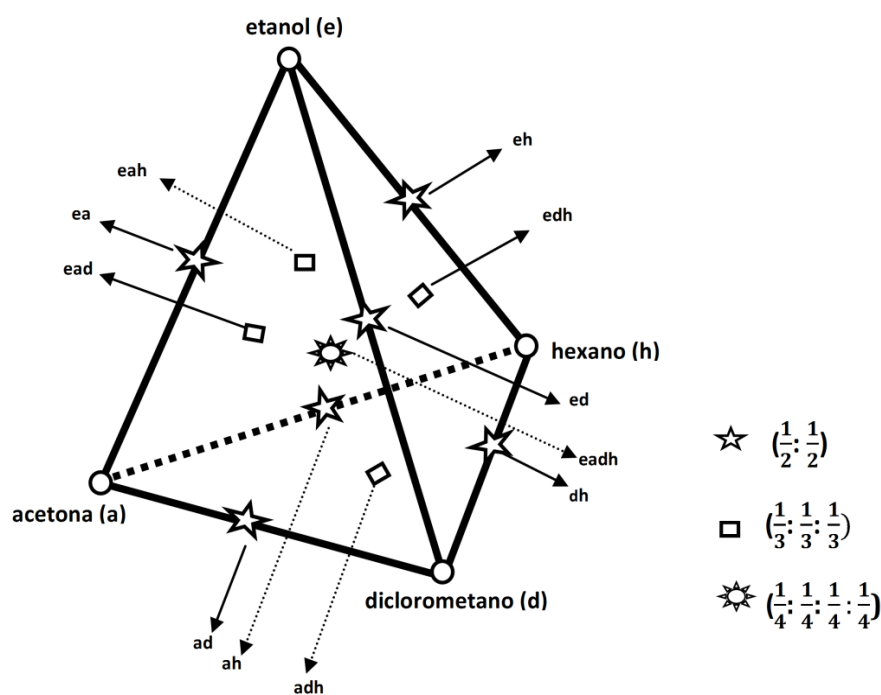


Figura 1- Planejamento centroide-simplex para extrações com solventes orgânicos etanol, acetona, diclorometano e hexano nas folhas *Coffea arabica* L.

Níveis	(-)	(+)	
Fatores			
Nº de remaceração	24 de 30 min.	6 de 120 min.	
Temperatura	-5 ($\pm 4^{\circ}\text{C}$)	30 ($\pm 2^{\circ}\text{C}$)	
Modo de extração	Ultrassom (40 Hz)	Repouso (0 Hz)	
Classificação dos níveis	Nº de remaceração	Temperatura	Modo de extração
nível (- - -)	-	-	-
nível (+ - -)	+	-	-
nível (- + -)	-	+	-
nível (+ + -)	+	+	-
nível (- - +)	-	-	+
nível (+ - +)	+	-	+
nível (- + +)	-	+	+
nível (+ + +)	+	+	+

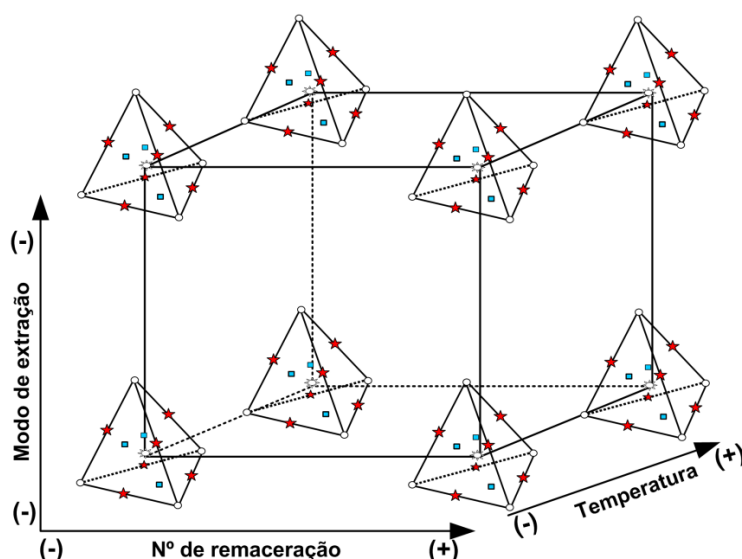


Figura 2- Planejamentos centroide-simplex e planejamento 2^3 para extração das folhas *Coffea arabica* L.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos rendimentos dos extratos em base seca bem como os parâmetros de seletividade (α/Σ ; β/Σ e π/Σ) para as misturas correspondentes a cada ponto do planejamento fatorial estão apresentados na Tabela 1. As respostas das massas do extrato vegetal para o planejamento de misturas foram investigadas por modelos matemáticos polinomiais de primeira, segunda e terceira ordem que permitem explorar os efeitos de várias variáveis simultaneamente e extrair o máximo de informação do sistema que está sendo investigado. Foram obtidas curvas de nível dos modelos matemáticos ajustados de cada uma das extrações. Os modelos matemáticos foram

avaliados pela análise de variância das regressões, ANOVA, Tabela 2, no nível de 95 % de confiança. Analisando as regressões obtidas para os rendimentos nas diferentes condições, verificou-se que a média quadrada da regressão pela média residual foi maior que o valor tabelado (BARROS NETO; SCARMINIO,;BRUNS, 2007) e as médias quadradas da falta de ajuste pelo erro puro foram menores que as referentes médias tabeladas comprovando as significâncias nas regressões e inexistência de faltas de ajuste. Os valores da variância explicada pela variância total ficaram na faixa de 0,83 a 0,99.

Tabela 1- Resultados dos rendimentos da extração (%) conforme planejamento experimental de solvente, centroide-simplex combinados as variáveis: número de remaceração, temperatura e tipo de agitação e parâmetros de seletividade (α/Σ ; β/Σ e π/Σ) * para as misturas correspondentes a cada ponto do planejamento fatorial

	Níveis								π/Σ	α/Σ	β/Σ
	(--)	(+-)	(-+)	(++)	(-+)	(+-)	(++)	(+++)			
Solventes											
e	2,38	3,02	2,91	3,84	3,88	3,37	3,88	6,76	0,25	0,39	0,36
a	1,43	1,87	2,11	2,17	1,59	1,44	5,86	9,1	0,56	0,06	0,38
d	1,38	1,59	3,38	2,31	1,69	1,97	3,38	1,43	0,73	0,27	0,00
h	1,42	0,98	1	0,97	1,58	1,07	0,47	1,21	0,00	0,00	0,00
ea	3,55	3,37	3,2	4,48	3,09	3,31	2,29	4,76	0,41	0,23	0,37
ed	2	2,35	2,94	3,63	3,65	2,49	2,2	2,57	0,49	0,33	0,18
eh	1,66	2,02	1,9	3,22	2,11	2,29	1,66	3,01	0,13	0,20	0,18
ad	1,12	1,75	2,35	2,17	1,67	2,08	0,99	1,86	0,65	0,16	0,19
ah	1,76	1,54	1,48	2,15	3,3	1,73	0,69	2,43	0,28	0,03	0,19
dh	1,45	1,4	1,88	2,39	1,6	1,72	1,84	2,03	0,37	0,14	0,00
ead	1,56	2,24	2,59	3,6	2,98	2,12	1,92	2,1	0,51	0,24	0,24
eah	1,99	2,23	2,03	2,9	3,05	2,64	2,23	3,53	0,27	0,15	0,24
edh	1,75	3,17	3,31	3,22	2,17	2,37	2,01	2,5	0,32	0,21	0,12
adh	1,2	2,28	1,98	2,33	1,39	1,82	2,14	2,09	0,43	0,11	0,13
eadh	1,44	2,89	1,97	3,17	1,54	2,33	1,83	3,51	0,39	0,18	0,19
eadh	1,39	2,36	2,04	3,21	2,26	2,04	1,52	2,63	0,39	0,18	0,19
eadh	2,21	2,33	1,83	3,33	1,87	2,29	3,62	2,63	0,39	0,18	0,19

*Classificação de SYNDER, 1997

e=tanol, a=acetona, d=diclorometano, h=hexano

Tabela 2-Análise de variância para os modelos matemáticos dos ensaios do planejamento 2³.

Ensaio (- - -)	G.L	F _{cal}	F _{tab}	Regressão
Regressão	9	4,11	3,29	0,96
Resíduos	7			
Falta de ajuste	5	1,68	19,30	
Erro Puro	2			
Ensaio (+ - -)				
Regressão	12	9,02	5,91	0,96
Resíduos	4			
Falta de ajuste	2	0,22	19,00	
Erro Puro	2			
Ensaio (- + -)				
Regressão	11	7,03	4,71	0,94
Resíduos	5			
Falta de ajuste	3	11,23	19,16	
Erro Puro	2			
Ensaio (+ + -)				
Regressão	9	26,43	3,68	0,97
Resíduos	7			
Falta de ajuste	5	8,87	19,30	
Erro Puro	2			
Ensaio (- - +)				
Regressão	8	4,92	3,44	0,83
Resíduos	8			
Falta de ajuste	6	2,03	19,33	
Erro Puro	2			
Ensaio (+ - +)				
Regressão	13	25,13	4,66	0,99
Resíduos	3			
Falta de ajuste	1	0,02	18,81	
Erro Puro	2			
Ensaio (- + +)				
Regressão	13	10,00	8,73	0,98
Resíduos	3			
Falta de ajuste	1	7,72	18,81	
Erro Puro	2			
Ensaio (+ + +)				
Regressão	9	19,98	3,68	0,96
Resíduos	7			
Falta de ajuste	5	1,49	19,30	
Erro Puro	2			

Os modelos ajustados aos dados da Tabela 1 para os oito pontos do planejamento fatorial estão apresentados nas equações simplificadas Eq1 a 8, assim todos os coeficientes das equações são significativos no nível de 95 % de confiança.

Os rendimentos de extração em massa seca para ensaios (- - -), (+ - -), (+ + -), (- - +) e (+ + +) foram ajustados com o modelo quadrático e para os ensaios (- + -), (+ - +) e (- + +) os resultados foram ajustados com modelo cúbico especial.

$$\hat{y}_{ensaio(- - -)} = 2,48e + 1,55a + 1,46d + 1,47h + 4,63ea \quad [Eq1]$$

(±0,34) (±0,34) (±0,34) (±0,34) (±1,44)

$$\hat{y}_{ensaio(+ - -)} = 3,03e + 1,87a + 1,59d + 0,99h + 3,77ea + 30,43edh \quad [Eq2]$$

(±0,22) (±0,25) (±0,25) (±0,25) (±1,19) (±7,18)

$$\hat{y}_{ensaio(- + -)} = 2,90e + 2,10a + 3,37d + 1,00h + 21,51edh \quad [Eq3]$$

(±0,26) (±0,26) (±0,29) (±0,24) (±8,30)

$$\hat{y}_{ensaio(+ + -)} = 3,88e + 2,21a + 2,30d + 1,02h + 5,04ea + 2,22ed + 2,32eh + 3,00dh \quad [Eq4]$$

(±0,21) (±0,21) (±0,21) (±0,21) (±0,90) (±0,90) (±0,90) (±0,90)

$$\hat{y}_{ensaio(- - +)} = 4,04e + 1,80a + 1,84d + 1,73h + 4,82ah \quad [Eq5]$$

(±0,43) (±0,43) (±0,47) (±0,47) (±2,01)

$$\hat{y}_{ensaio(+ - +)} = 3,37e + 1,44a + 1,97d + 1,07h + 3,61ea - 16,64ead \quad [Eq6]$$

(±0,13) (±0,13) (±0,13) (±0,13) (±0,63) (±4,00)

$$\hat{y}_{ensaio(- + +)} = 3,87e + 5,85a + 3,37d - 9,96ea - 14,16ad - 9,54ah \quad [Eq7]$$

(±0,44) (±0,44) (±0,44) (±2,13) (±2,13) (±2,13)

$$\hat{y}_{ensaio(+ + +)} = 6,61e + 8,92a - 10,70ed - 12,07ad - 7,99ah \quad [Eq8]$$

(±0,58) (±0,58) (±2,48) (±2,48) (±2,48)

onde e, a, d e h representam as proporções de etanol, acetona, diclorometano e hexano, respectivamente. Os erros padrão estimados estão apresentados entre parenteses abaixo dos seus respectivos coeficientes.

Analisando os modelos, podemos observar que na equação 1, o coeficiente linear do etanol é maior que da acetona, diclorometano e hexano. Das quatro misturas binárias, somente etanol:acetona (1:1, v/v) apresentou efeito sinérgico. Este efeito também foi significativo nas equações 4 e 6. Nas equações 2 e 3, o coeficiente linear do hexano foi menos efetivo na extração, enquanto que o etanol foi maior que a acetona e diclorometano na equação 2 e diclorometano foi maior na equação 3. O maior efeito de

interação nos dois modelos (Eq. 2 e 3) ocorreu no coeficiente da mistura etanol:diclorometano:hexano (1:1:1, v/v/v). A equação 4 apresentou outros efeitos de interação binária não significativos nos outros modelos, são eles etanol:diclorometano (1:1 v/v), etanol:hexano (1:1, v/v), diclorometano:hexano (1:1 v/v). Na equação 5, apenas a interação acetona:hexano foi significativa. Na equação 6, aparece o efeito antagônico da mistura ternária etanol:acetona:diclorometano (1;1;1, v/v/v). Interessante notar que nas equações 7 e 8, quando aumenta a temperatura e o processo de extração está em repouso, aparecem três efeitos antagônicos que não são significativos nas outras condições de extração. Na equação 7, o efeito da mistura etanol:acetona apresentam efeito antagônico, enquanto que nos demais modelos este efeito é sinérgico. Acetona:dicloronetano e acetona:hexano também apresentam efeito antagônico nos modelos apresentados nas equações 7 e 8.

As curvas de níveis construídas a partir dos modelos matemáticos ajustados estão apresentadas na Figura 3a-h. Para todas estas figuras, a proporção do hexano foi zero, por apresentar o menor coeficiente linear. Observa-se que as Figuras 3 a, b, d, f são muito semelhantes, enquanto que a Figura 3c (- + -), difere das outras. As Figuras 3 g, h parecem bem semelhantes entre si. Para entender melhor a variação entre as condições experimentais, os dados da Tabela 1 foram sujeitos ao cálculo de correlação, Tabela 3.

Interessante notar que o ensaio (- - -) mostra correlação com os ensaios (+-+; 0,76), (+ + -; 0,70), (- - +; 0,61) e (+ - -, 0,61) e correlação com o parâmetro solvatocrômico $\beta = 0,55$. O ensaio (+ - -) mostra maior correlação com os ensaios (+ + -; 0,85) e (+ - +; 0,82) e menor correlação com o ensaio (- + -; 0,60) e com parâmetros solvatocrômicos $\alpha=0,59$ e $\beta=0,59$. O ensaio (+ + -) é altamente correlacionado com o ensaio (+-+; 0,88) e com os parâmetros solvatocrômicos $\alpha=0,76$ e $\beta=0,58$. Embora a

correlação do ensaio (- + -) com (+ - +; 0,62) e (+ + -; 0,61) seja menor que 0,70, elas são estatisticamente significativa no nível de 95% de confiança. Esta condição de extração foi a única correlacionada com π , num valor de 0,54 e como as outras $\alpha=0,78$. Estes resultados mostram a concordância com as superfícies de respostas, e o outro exemplo é a correlação entre os ensaios (- + +) e (+ + +). Embora muitas superfícies apresentem-se similares, acabamos de ver que a correlação com os parâmetros solvatocrômicos de algumas delas são diferentes, daí infere-se que as classes de metabólitos extraídos são diferentes. Por exemplo, os ensaios (+ - -), (+ + -), (- - +) e (+ - +) provavelmente extraem mesma classe de metabólitos, uma vez que apresentam correlações de α é mais ou menos igual a correlação com β . Nos ensaios (- - -), (- + -), (- + +) e (+ + +), as classes de metabólitos são diferentes, porque apresentam diferentes parâmetros solvatocrômicos.

Tabela 3- Matriz de correlação dos rendimentos dos extratos e parâmetros solvatocrômicos.

	(---)	(+--)	(-+-)	(++-)	(--+)	(+-+)	(-++)	(+++)	π	α	β
(---)	1,00										
(+--)	0,61	1,00									
(-+-)	0,39	0,60	1,00								
(++-)	0,70	0,85	0,61	1,00							
(--+)	0,61	0,39	0,35	0,59	1,00						
(+-+)	0,76	0,82	0,62	0,88	0,65	1,00					
(-++)	0,18	0,24	0,35	0,22	-0,01	0,18	1,00				
(+++)	0,34	0,36	0,16	0,27	0,22	0,29	0,77	1,00			
π	-0,17	0,05	0,54	0,11	-0,15	0,02	0,39	0,05	1,00		
α	0,40	0,59	0,78	0,76	0,53	0,78	0,27	0,12	0,28	1,00	
β	0,55	0,59	0,24	0,58	0,51	0,57	0,48	0,80	0,09	0,26	1,00

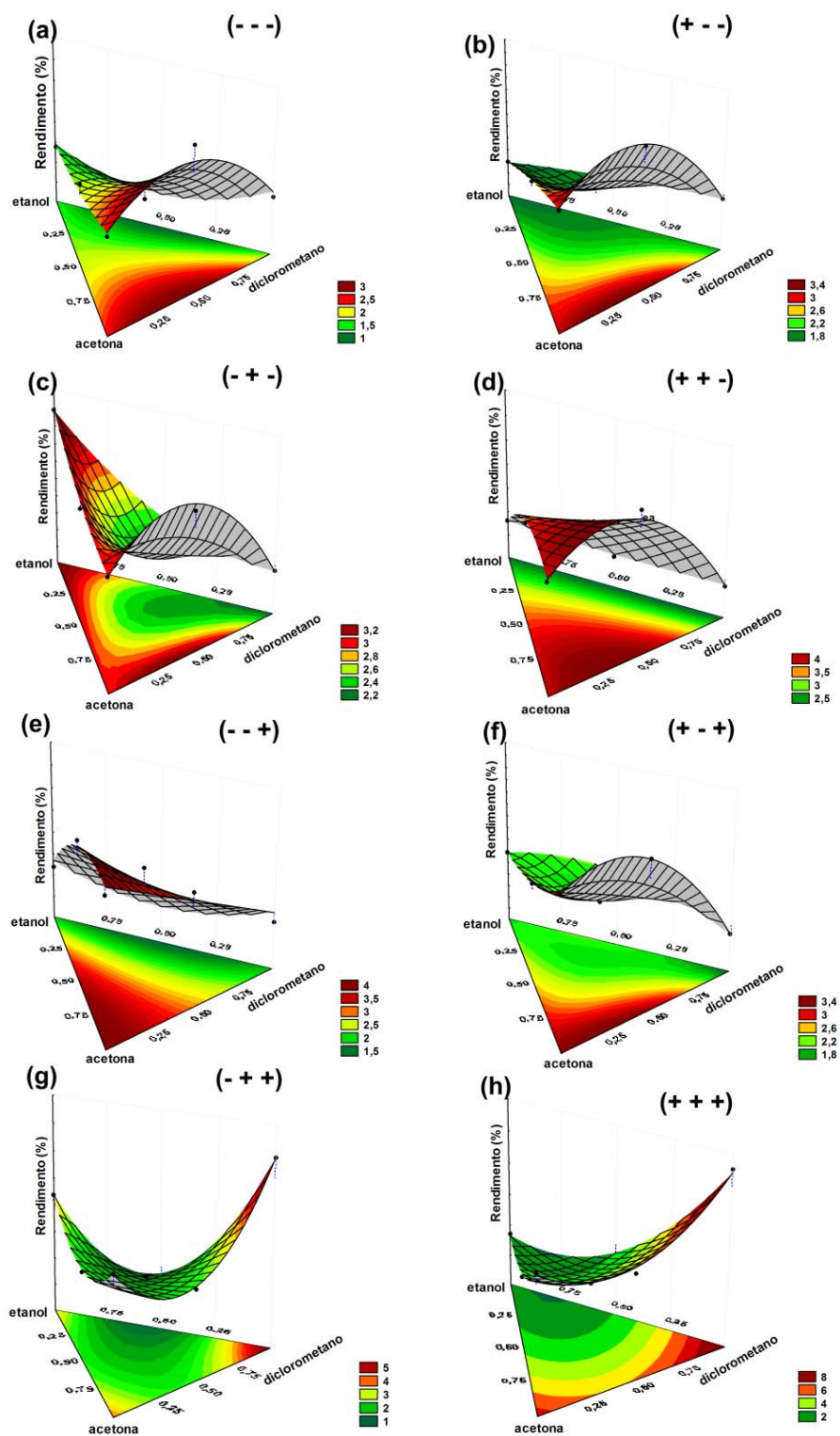


Figura 3- Curvas de níveis para extrações conforme planejamento de extração simplex centroide controlando as variáveis dos ensaios 1 a 8. a) ensaio (- - -); b) ensaio (+ - -); c) ensaio (- + -), d) ensaio (+ + -), e) ensaio (- - +), f) ensaio (+ - +), g) ensaio (- + +) e h) ensaio (+ + +).

Outra forma de observar a correlação entre as diferentes condições de extração podem ser visualizadas por outro método quimiométrico de análise multivariada. Os dados da Tabela 1 foram colocados na forma de matriz 17×8 (17 diferentes misturas e os 8 ensaios do planejamento experimental) e sujeitos a análise de componentes principais com rotação varimax, sendo assim vamos nominá-los de fatores. Quatro fatores explicam 91,63 % da variância total dos dados. A Tabela 4 mostra os loadings varimax dos 4 primeiros fatores.

Tabela 4- Valores dos loadings varimax nos quatro fatores somando 91,63 %.

Fatorial 2^3	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4
(- - -)	-0,024	0,180	0,559	0,668
(+ - -)	0,253	0,167	0,072	0,9111
(- + -)	0,886	0,130	0,150	0,379
(+ + -)	0,298	0,101	0,334	0,830
(- - +)	0,145	0,018	0,930	0,264
(+ - +)	0,290	0,097	0,435	0,794
(- + +)	0,277	0,924	-0,0745	0,047
(+ + +)	-0,091	0,927	0,158	0,202

Observa-se na Tabela 4 que o fator 1 apresenta maior loading para o ensaio (- + -), no segundo fator 2 os ensaios (- + +) e (+ + +) são altamente correlacionados, o fator 3 apresenta maior loading para o ensaio (- - +) e o fator 4 mostra correlações entre os ensaios, (- - -), (+ - -), (+ + -) e (+ - +) como na correlação.

A Figura 4 mostra o gráfico dos escores dos dois primeiros fatores que correspondem a 75,07 % da variância total. O fator 1 discrimina os extratos que contêm diclorometano na extração, localizados na região positiva do fator 1, enquanto que os extratos preparados em hexano e suas misturas, encontram-se na região negativa do fator 1. O fator 2 positivo discrimina principalmente o extrato preparado em acetona.

Com o auxílio do gráfico dos loadings, Figura 5, podemos observar que no fator 1 positivo está localizado o extrato preparado nas condições de extração (- + -) ou seja, 24 remacerações de 30 min., temperatura 30 °C e modo de extração em ultrassom. Já no lado negativo, as condições de extração para o ensaio (- - -) foram 24 remacerações de 30 min., temperatura -15 °C e modo de extração em ultrassom. Interessante que o fator 1 é caracterizado pelo parâmetro solvatocômico π , ou seja saindo do extrato preparado em hexano na direção do extrato de diclorometano, os extratos ad, ead, ed e edh apresentam maiores valores deste parâmetro. No fator 2, os ensaios (+ + +) e (- + +), diferenciam o extrato preparado em acetona nas condições: 6 remacerações de 120 min., temperatura 30 °C e modo de extração em repouso e 24 remacerações de 30 min., temperatura 30 °C e modo de extração em repouso. Para este extrato o número de remacerações parece não influenciar no procedimento de extração.

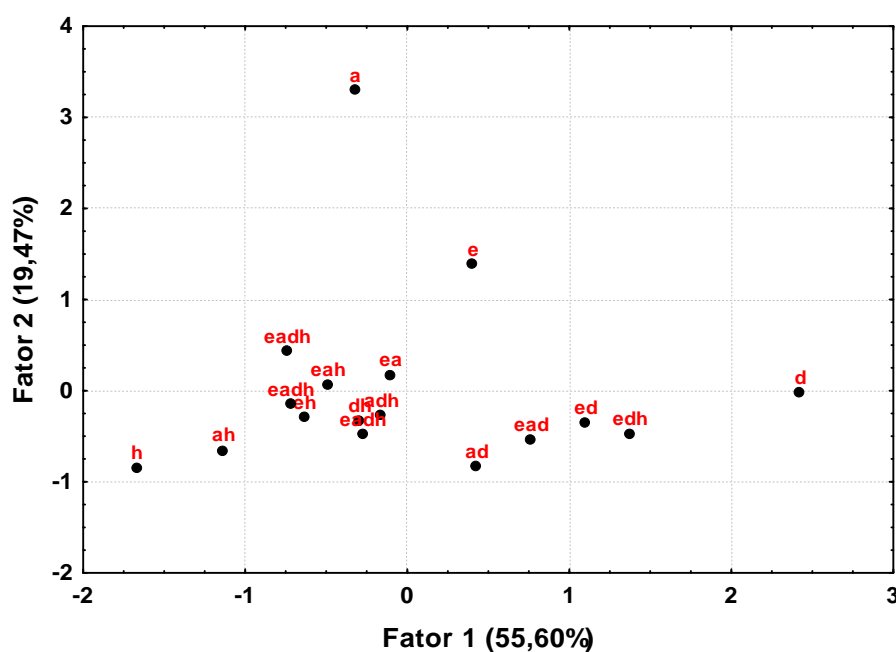


Figura 4– Gráfico dos escores do fator1×fator2 para os rendimentos obtidos em diferentes solventes extratores, bem como condição de extração.

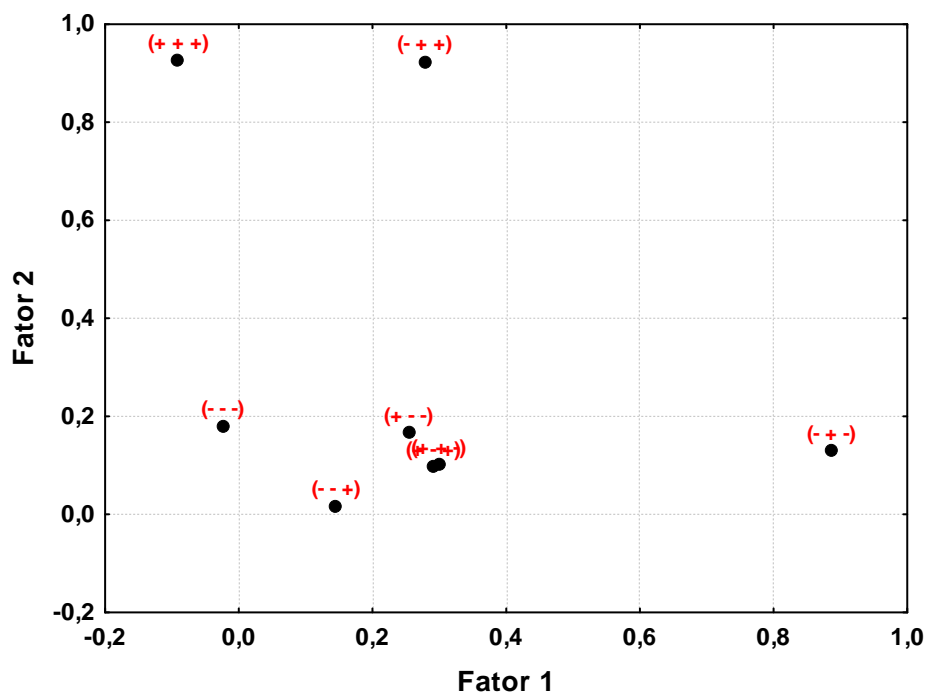


Figura 5- Gráfico dos loadings do fator1×fator2 para os rendimentos obtidos em diferentes solventes extratores, bem como condição de extração

A espectroscopia no infravermelho permite determinar os tipos de ligações e grupos funcionais e assim caracterizar qualitativamente substâncias por comparação com dados tabelados.

Os espectros originais na região do infravermelho estão apresentados na Figura 6. Observando os espectros (- + -), (- - -) e (- + +) parecem muito similares, Figura 6a. Na Figura 6b, observamos dois picos fortes no espectro (- - -) localizados em 1380 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} e outros dois em 1035 cm^{-1} e 1085 cm^{-1} quando comparados com o espectro (- + -). Picos mais fortes são obtidos no espectro (+ + +). De acordo com a literatura, o pico em 1250 cm^{-1} é característico da lignina (DOKKEN; DAVIS; ERICKSON; CASTRO-DOAZ; MARINKOVIC, 2005), mas outros picos são importantes para a caracterização das mesmas (SALIBA; RODRIGUEZ; MORAIS; PILÓ-VELOSO, 2001). O conteúdo de lignina nas folhas têm sido relacionadas ao estresse devido a irradiação, onde folhas expostas ao sol apresentam conteúdo mais elevado de lignina (JOUANIN; LAPIERR, 2012). O espectro (- + -) apresenta características da cafeína. O

espectro (- - -) apresenta dois picos intensos em 1376 cm^{-1} e 1450 cm^{-1} e 1040 cm^{-1} e 1060 cm^{-1} , sendo estes últimos atribuídos a arabinose ou polissacarídeos hemicelulose (COIMBRA; NUNES; BARROS; DELGADILLO, 2010). Ambos os espectros (- + +) e (+ + +) também apresentam sinais característicos de carboidratos e polissacarídeos (COIMBRA; NUNES; BARROS; DELGADILLO, 2010).

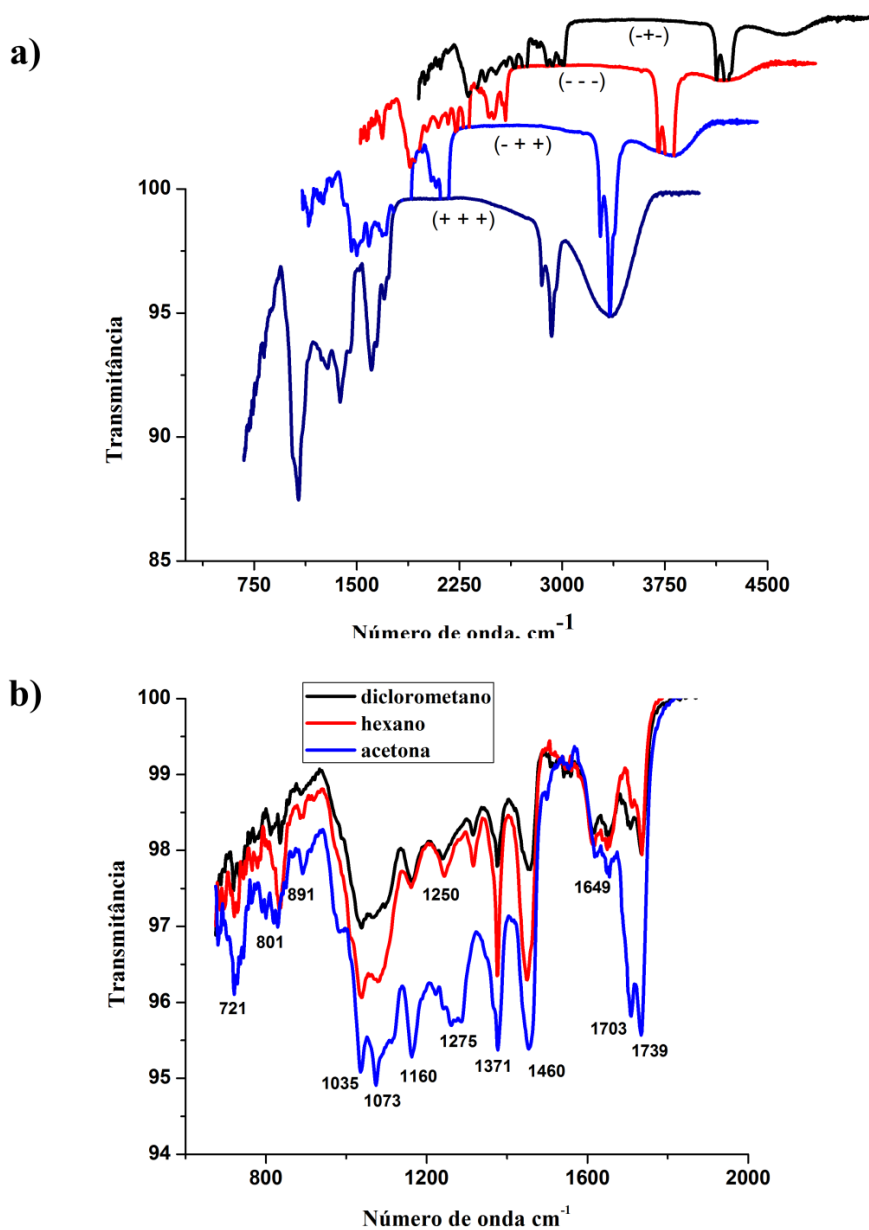


Figura 6- Espectro infravermelho em diferentes solventes extratores, bem como condição de extração.

3.4 CONCLUSÕES

Nós temos mostrado que o uso do planejamento de mistura associado ao planejamento fatorial é uma ferramenta útil para monitorar extrações de material vegetal. Variação nas condições de extração para os mesmos solventes podem variar a composição do extrato. Além disso, fortes correlações foram encontradas entre os espectros obtidos nas diferentes condições com os parâmetros solvatocrômicos. Os espectros de infravermelho comparados aos loadings das componentes principais para mostrou que ligninas, carboidratos e polissacarídeos e cafeína parecem depender da condição de extração.

referências

ARAÚJO, J. M. A.; SANDI, D. Extraction of coffee diterpenes and coffee oil using supercritical carbon dioxide. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p. 1087–1094, 2006.

AL-ACHI, A. **An introduction to botanical medicines: history, science, uses, and dangers**. 1. ed. Westport: Praeger Publishers, 2008. 208 p.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Ceppa**, v. 24, n. 2, p. 319-336, 2006.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3. ed., Campinas: Editora UNICAMP, 2007. 480 p.

BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S.; NETO, B. B. **Statistical Design – Chemometrics**. 1. Ed. Amsterdam: Elsevier, 2006. 422 p.

CHEN, Y.; XIE, M.Y.; GONG, X. F. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n. 1, p. 162- 170, 2007.

COIMBRA, M. A.; NUNES, A.; BARROS, A. S.; DELGADILLO, I. The potential of mid-infrared spectroscopy for monitoring changes in polysaccharides and other carbohydrates during processing. In: LI-CHAN, E.; P. R.; CHALMERS, J. M.;

GRIFFITHS, P. R. **Applications of Vibrational Spectroscopy in Food Science**. Chichester: John Wiley & Sons; v. 1, p. 261-273, 2010.

CORNELL, J. **Experiments with mixtures**: Designs, models, and the analysis of mixture data. 3. ed. New York: John Wiley & Sons, 2002. 680 p.

CURCIO, P.; ALLIX, F.; PICKAERT, G.; JAMART-GRÉGOIRE, B. A favorable, narrow, δ h Hansen-Parameter domain for gelation of low-molecular-weight amino acid derivatives. 3e.d, **Chemistry - A European Journal**, v.17, n. 48, pp. 1360–1361, 2011.

DE MARIA, C. A. B.; TRUGO, L. C.; MOREIRA, R. F. A. Simultaneous determination of total chlorogenic acid, trigonelline and caffeine in green coffee samples by high performance gel filtration chromatography. **Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 447-449, 1995.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.

FENG, H.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.; WEISS, J. **Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing**. 1. ed. New York: Springer-Verlag, 2011.668 p.

GARCIA, L. M. Z.; DE OLIVEIRA, T. F.; SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design-Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 103, n.1, p. 1-7, 2010.

HANSEN, C. M. Polymer additives and solubility parameters. **Progress in organic coatings**, v. 51, n. 2, p. 109–112, 2004.

JONES, W. P.; KINGHORN, D. Extraction of plant secondary metabolites. In: SARKER, S. D., LATIF, Z., GRAY, A. I. (Eds). **Natural Products Isolation**, 2. ed., Totowa: Humana Press, p. 323-327, 2006.

JOUANIN, L.; LAPIERRE, C. Lignins and abiotic stresses. In: CABANE, M.; AFIF, D.; HAWKINS, S. **Advances in Botanical Research Lignins**: Biosynthesis,

Biodegradation and Bioengineering. 5. ed., **Waltham:Academic Press**. v. 61, p. 241, 2012.

KY, C.-L.; NOIROT, M.; HAMON, S. Comparison of Five Purification Methods for Chlorogenic Acids in Green Coffee Beans (*Coffea* sp.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 786–790, 1997.

LI, M.-F.; SUN, S.-N.; XU, F.; SUN, R.-C. Ultrasound-enhanced extraction of lignin from bamboo (*Neosinocalamus affinis*): Characterization of the ethanol-soluble fractions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 2, p. 243–249, 2012.

LUO C. J.; NANGREJO, M.; EDIRISINGHE, M. A novel method selecting solvents for polymer electrospinning. **Polymer**, v. 51, n. 7, p.1654–1662, 2010.

MONTEIRO, M. C.; FARAH, A. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 611–614, 2012.

ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 23–33, 2004.

PARADKAR, M. M.; IRUDAYARAJ, J. Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 78, n. 2, p. 261–266, 2002.

PETERMANN, J. B.; BAUMANN, T. W. Metabolic relations between methylxanthines and methyluric acids in *Coffea* L. **Plant Physiology**, v. 73, n. 4, p.961-964, 1983.

RODRÍGUEZ-DURAN, L. V.; RAMÍREZ-CORONEL, M. A.; ARANDA-DELGADO, E.; NAMPOOTHIRI, K. M.; FAVELA-TORRES, E.; AGUILAR, C. N. SAUCEDO-CASTAÑEDA, G. Soluble and bound hydroxycinnamates in coffee pulp (*Coffea arabica*) from seven cultivars at three ripening stages. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 31, p. 7869–7876, 2014.

SALIBA, E. O.; RODRIGUEZ, N. M.; MORAIS, S. A.; PILÓ-VELOSO, D. Ligninas: Métodos de obtenção e caracterização química, **Ciência Rural**, v. 31, n.5, p. 917-928, 2001.

SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. An adaptation of ARTHUR for microcomputers. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 8, n. 9, p. 326–327, 1989.

SEIDEL V. Initial and bulk extraction. SARKER, S. D., LATIF, Z., GRAY, A. I. (Eds). **Natural Products Isolation**, 2 ed., Humana Press Inc, Totowa, p. 29-35, 2006.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2. ed., New York: John Wiley, 1997. 800 p.

SRINIVAS, K.; KING, J. W.; MONRAD, J. K.; HOWARD, L. R.; HANSEN, C. M. Optimization of subcritical fluid extraction of bioactive compounds using Hansen solubility parameters. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 6, 2009.

TSIVINTZELIS, I.; ECONOMOU, I. G.; KONTOGEORGIS, G. M. Modeling the phase behavior in mixtures of pharmaceuticals with liquid or supercritical solvents. **Journal of Chemical Physics B**, v. 113, n. 18, p. 6446–6458, 2009.

TRUGO, L. C.; MACRAE, R.; DICK, J. Determination of purine alkaloids and trigonelline in instant coffee and other beverages using high performance liquid chromatography. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 34, n. 3, p. 300–306, 1983.

YAQIN, M., XINGQIAN, Y., YUNBIN, H., GUONENG, X., GUIHUA, X.; DONGHONG, L. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, n. 3, p. 227-232, 2008.

WANG, L.; WELLER, C. L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300–312, 2006.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. H. **Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis**. 1. ed. New York: CRC Press, 2010. 996 p.



CAPÍTULO IV

Artigo 2

Article	<p>http://dx.doi.org/10.5935/0103-5053.20140172 J. Braz. Chem. Soc., Vol. 25, No. 11, 1929-1938, 2014. Printed in Brazil - ©2014 Sociedade Brasileira de Química 0103 - 5053 56.00-0100</p>
<p>Spectroscopic and Chromatographic Fingerprint Analysis of Composition Variations in <i>Coffea arabica</i> Leaves Subject to Different Light Conditions and Plant Phenophases</p>	
<p><i>Fernanda Delarozza,^a Miroslava Rakocevic,^b Galileu Bernardes Malta,^c Roy Edward Bruns^c and Ieda Spacino Scarmínio^{b,c}</i></p>	
<p>^aLaboratório de Quimiometria em Ciências Naturais, Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990 Londrina-PR, Brazil</p>	
<p>^bInstituto Agronômico do Paraná (IAPAR), CP 481, 86047-902 Londrina-PR, Brazil</p>	
<p>^cInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970 Campinas-SP, Brazil</p>	

ANÁLISE DE IMPRESSÕES DIGITAIS CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROSCÓPICAS DA VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE FOLHAS DO *Coffea arabica* SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE LUZ E FENOFASES DA PLANTA

Fernanda Delaroza^a, Miroslava Rakocevic^b, Galileu Bernardes Malta^a, Roy Edward Bruns^c, Ieda Spacino Scarminio^{*.a}

^aLaboratório de Quimiometria em Ciências Naturais, Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brasil

^bInstituto Agrônomo do Paraná - IAPAR, CP 481, 86047-902, Londrina, PR, Brasil

^cInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970, Campinas, SP, Brasil

* Corresponding author. Tel.:+55 43 33714811; fax +55 43 33714286

e-mail: ieda@uel.br

RESUMO

Impressões digitais de folhas de *Coffea arabica* expostas a luz solar e autossombreadas colhidas na mesma planta foram usadas para determinar as variações das concentrações dos metabólitos devido à diferentes ambientes de luz e fases fenológicas. Os rendimentos dos extratos nos solventes etanol, acetona, hexano e diclorometano, bem como as suas misturas são apresentados. Os maiores rendimentos para todas as folhas autossombreadas e expostas ao sol são obtidos com misturas binárias etanol-acetona. Análise de Componentes Principais (ACP) dos espectros de FTIR dos extratos indicam diferenças espectrais entre 2962-2828 cm^{-1} , 1759-1543 cm^{-1} e inferiores a 1543 cm^{-1} que podem ser atribuídos à maiores concentrações de ésteres de ácidos graxos ou grupo éster em triglicerídeos, cafeína, ácidos clorogênicos e carboidratos, que são mais predominantes em folhas na fase de floração. Os espectros dos picos cromatográficos (CLAE-UV-DAD) dos extratos mostraram que folhas expostas ao sol apresentam absorções mais fortes para a cafeína, ácido clorogênico e teobromina. Experimentos confirmatórios para determinar a concentração de cafeína realizados com curvas de calibração UV, mostram que a cafeína de folhas expostas ao sol são cerca de duas vezes maior que as folhas autossombreadas da fase de floração. O conhecimento da quantidade de cafeína em folhas de *Coffea arabica* é de importância ecológica, já que plantas expostas ao sol parecem mais estressadas do que as autossombreadas para esta espécie. As concentrações lipídicas em folhas autossombreadas são quase o dobro daquelas expostas ao sol.

Palavavras –chave: Impressão digital, *Coffea arabica* leaves; planejamento de mistura, análise de componente principal, CLAE-UV-DAD, exposição a luz

ABSTRACT

Fingerprints of self-shaded and sunlight-exposed leaves of the same *Coffea arabica* plant were obtained to determine metabolic concentration changes owing to different light environments and phenological stages. Leaf extract yields of the ethanol, acetone, dichloromethane and hexane solvents, as well as their statistical design mixtures, are reported. Highest yields are obtained with binary 1:1 ethanol-acetone mixtures for all sun-exposed and self-shaded leaves. Principal Component Analysis (PCA) of FTIR spectra of leaf extracts indicate spectral differences between 2962-2828 cm^{-1} , 1759-1543 cm^{-1} and below 1543 cm^{-1} that can be attributed to higher concentrations of fatty acid esters or the ester group in triglycerides, caffeine, chlorogenic acids and carbohydrates that are more prevalent in leaves of flowering plants. HPLC-UV-DAD spectra of the chromatographic peaks for the extracts showed that sun-exposed samples contain stronger absorptions for caffeine, chlorogenic acid and theobromine. Confirmatory experiments carried out with reference UV calibration curves determined caffeine contents for sun-exposed leaves that are about double those for self-shaded leaves of flowering plants. Knowledge of leaf caffeine content in coffee Arabica is of ecological importance since sun-exposed conditions seem more stressful than self-shading ones for this species. Lipid concentrations in self-shaded leaves are almost double those that were sun-exposed.

Keywords: Fingerprint; *Coffea arabica* leaves; mixture design, principal component analysis, HPLC-UV-DAD, light exposure

4.1 INTRODUÇÃO

Dentro do âmbito do sistema biológico, a análise funcional de metabolomas teve um nível de atividade intensa na última década. Impressão digital espectroscópica e cromatográfica têm sido cada vez mais usada para fornecer informações para o estudo do material vegetal. Entre estas aplicações, impressão digital química mostrou-se especialmente útil para diversas aplicações, tais como controle de qualidade,¹ classificações taxonômicas² e diagnósticos de doenças.³ Técnicas de impressão digital^{4,5} também tornaram-se muito eficientes para analisar simultaneamente vários metabolitos e identificar diferenças entre eles. Eles são descritos por uma variedade de métodos de análise que pode identificar e quantificar aproximadamente um grupo de metabolitos associados com vias específicas. A vantagem da utilização destes perfis é que as variações do metabolito são observados principalmente por variações do padrão cromatográfico ou espectroscópicos, sem conhecimento prévio das identidades dos compostos investigados. Recentemente, nosso grupo tem mostrado que os planejamentos estatístico de mistura permite o desenvolvimento de procedimentos rigorosos mas econômico para o desenvolvimento de perfis de impressão digital dos metabolitos extraídos de material de plantas.⁴⁻⁷

Café arábica (*Coffea arabica* L.) tem o seu centro primário de diversidade no sudoeste da Etiópia, Boma Plateau do Sudão e Monte Marsabit de Quênia.⁸ Nos seus ambiente naturais, o café arábica é um arbusto lenhoso, perene à sombra de árvores mais altas. Sua forma externa é caracterizada por um crescimento dimórfico, que consiste em tronco vertical (ortotrópico e plagiortrópico) e ramos horizontais (modelo arquitetônico de Roux).⁹ A arquitetura da planta está direta ou indiretamente relacionada com as múltiplas funções da planta, como a interceptação de luz, fotossíntese e transpiração.¹⁰

Culturas de café podem ser produzidas sobre sombra ou sob forma de monocultura.¹¹⁻¹⁴ Plantação autossombreada de cafeeiros são cultivadas entre árvores mais altas ou sob um dossel de sombreamento de floresta natural. Em sistemas de plantios modernos e intensivos, o café arábica é mais cultivado em monocultura, como normalmente ocorre no Brasil,¹⁵ porque esses sistemas produzem maior rendimento do fruto.

Nas plantas, em especial medicinais e alimentícias, as condições ambientais que induzem as reações fisiológicas e de adaptações estão estreitamente relacionadas com as alterações bioquímicas observadas em seu metabolismo. Em plantas de café, essas mudanças podem ser importantes para o produto final - qualidade de grãos de café. Muitos processos biossintéticos de metabólitos secundários e produção de alcaloides purina por células de *C. arabica* ocorrem sob irradiância solar.¹⁶ As condições de estresse estão relacionadas com a acumulação de substâncias defensivas qualitativas, tais como alcaloides, glicosídeos, e outros. Em sistemas agroflorestais (SAF)^{12,17-21} a diminuição da radiação incidente nas plantas de café, altera seu desenvolvimento fenológico, refletindo com isso positivamente na qualidade da bebida.¹¹ Como o café é um dos mais importantes produtos comerciais em todo o mundo, é essencial saber como a intensidade de luz e a densidade das plantas podem afetar a bioquímica e o metaboloma da folha, e, posteriormente, a qualidade e metaboloma de grãos.

O alcaloide cafeína é o metabólito mais estudado em café, principalmente devido à sua atividade farmacológica.²² É produzido em folhas jovens e acumula-se nas maduras.²³ É considerado tóxico para os fungos e insetos. A "teoria da defesa química" propõe que a cafeína em folhas jovens, frutos e botões florais servem para proteger os tecidos moles de predadores, como larvas de insetos e besouros.²⁴ No café arábica, o teor de cafeína nas folhas varia com a nutrição mineral e omissão de K induziu o maior aumento do conteúdo de cafeína em folhas, enquanto a omissão de P e K apresentaram

menores teores.²⁵ Mazzafera et al.²⁶ inferiu o papel alelopático ou anti-herbívoro de cafeína em folhas de café, discutindo o papel da cafeína como um composto de armazenamento de nitrogênio e seu envolvimento na resistência contra doenças.

A abordagem de impressão digital metabolômica permite separar a dinâmica de qualquer perturbação biótica, abiótica ou genética na planta. Neste sentido, considera-se que o impacto de qualquer elemento genético, fisiológico ou do ambiente poderia ser diagnosticado através da caracterização química do material vegetal. Nossa hipótese é que as folhas de café arábica crescem sob condições estressantes quando expostas à luz intensa nas camadas superiores de monoculturas, já que a espécie é originária de áreas florestais naturalmente sombreadas. Para demonstrar esta hipótese, foram obtidas impressões digitais metabolômicas de folhas autossombreadas e expostas a luz solar de mesma planta. Um planejamento estatístico de mistura foi realizado para desenvolver impressões digitais cromatográficas e espectroscópicas para comparar as composições dos metabólitos de folhas de *C. arabica* cultivadas sob diferentes arranjos e condições de luz solar (folhas autossombreadas e expostas ao sol). Análise de componentes principais (ACP) foram usadas para analisar as impressões digitais bem como para comparar o desempenho das impressões digitais na discriminação de folhas de *C. arabica* de autossombreamento das expostas à luz solar.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Amostras das Folhas do *Coffea arabica*

As plantas de café arábica, IAPAR 59, foram cultivadas na área experimental do Instituto Agrônomo do Paraná, Londrina (23 ° 18 ' S, 51 ° 17'W), Paraná , Brasil, plantadas no ano de 1995 e aparadas duas vezes (2000 e 2008) junto ao solo. As plantas

foram cultivadas em duas distribuições espaciais distintas: um arranjo retangular (3,0 mx 0,41 m) permitindo um espaço de 1,25 m² para o desenvolvimento de cada planta (8,000 plantas ha⁻¹) e um quadrado (0,84 x 0,84 m), com 0,71 m² para cada planta (14,000 plantas ha⁻¹). As folhas foram colhidas a partir de duas camadas do dossel: superior (folhas diretamente expostas ao sol) e inferior (folhas autossombreadas). As folhas foram coletadas a partir de ramos plagiotrópicos garantindo dessa forma mesma idade. As plantas foram observadas em duas fenofases: frutos amadurecendo em abril de 2010 e final de floração em outubro de 2011.

4.2.2 Reagentes

Os solventes acetonitrila e metanol (grau HPLC) foram adquiridos da VETEC Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil). A preparação da mistura da fase móvel foi realizada com água purificada pelo sistema de Milli - Q da Millipore. Hexano, diclorometano, acetona e etanol, também foram adquiridos da VETEC, grau analítico.

4.2.3 Preparo das Extrações

Para a extração do material vegetal foram pesadas 2,50 g de folhas secas de *Coffea arabica* L., trituradas e submetidas à extração exaustiva com 60 ml de solvente orgânico seguindo o planejamento experimental do tipo simplex-centroide de 4 componentes, composto por solventes puros etanol (e), acetona (a), diclorometano (d) e hexano (h), seis misturas binárias 1:1, quatro misturas ternárias 1:1:1 e uma mistura quaternária 1:1:1:1, em iguais proporções, Tabela 1. Cada mistura foi colocada em banho ultrassônico (Unique, modelo USC 1400) por duas horas. O banho foi mantido gelado adicionando cubos de gelo. O extrato foi filtrado separando as soluções das

folhas de café. Este procedimento foi repetido mais onze vezes, de modo que o volume total da mistura de solvente adicionado às folhas foi de 720 mL. Este solvente foi evaporado num evaporador rotativo e, em seguida, mantida sob ventilação forçada até peso constante.

Tabela 1- Planejamento de extração para misturas simplex

Extratos	Proporções			
	etanol	acetona	diclorometano	hexano
1	1	0	0	0
2	0	1	0	0
3	0	0	1	0
4	0	0	0	1
5	0,5	0,5	0	0
6	0,5	0	0,5	0
7	0,5	0	0	0,5
8	0	0,5	0,5	0
9	0	0,5	0	0,5
10	0	0	0,5	0,5
11	0,333	0,333	0,333	0
12	0,333	0,333	0	0,333
13	0,333	0	0,333	0,333
14	0	0,333	0,333	0,333
15	0,25	0,25	0,25	0,25

4.2.4 Análise por Espectroscopia no Infravermelho

As análises em FT-IR foram realizadas no espectrofotômetro Thermo Scientific Nicoletti S10, usando um acessório ATR com janela de Ge com modo de medição em transmitância, número de scans de 60, resolução 4 cm^{-1} e 32 scans registrados na faixa de 675 a 4000 cm^{-1} . A ACP foi realizada nos espectros de infravermelhos completos usando o software Statistica 6.0 (Statistica for Windows 6.0, Statsoft, Tulsa, OK, EUA, 1999).

4.2.5 Preparo das Amostras para Análise em CLAE

Cada amostra foi preparada pesando 0,10 mg de extrato concentrado e redissolvido em 1,00 ml de metanol. Esta solução foi colocada num banho ultrassônico (Ultracleaner 1400) durante 15 min, e posteriormente filtrado em filtro de membrana de 0,20 μm CHROMAFIL[®] XTRA PTFE-20/25 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Germany).

Quinhentos microlitros da fase móvel foram adicionados a 100 μl de extrato bruto. Uma alíquota de 20 μl desta solução diluída foi injetada na CLAE. As condições cromatográficas foram: coluna Kinetex HILIC C18; 2,6 mm; 100 A°, com dimensões de 150 mm x 4,6 mm (Phenomenex), coluna de guarda Kinetex HILIC, 4,6 milímetros (Phenomenex) e taxa de vazão de fluxo da fase móvel de 0,5 mL min⁻¹. As análises foram realizadas em cromatógrafo líquido SPD - M10AV Finnigan Surveyour 61607 equipado com um detector de arranjo de diodos Finnigan Surveyour PDA Plus e quatro canais de bombas, Thermo Electron. O programa de gradiente usado foi de ACN:H₂O (15:85 v/v), 0-0,44 min ; ACN:H₂O (35:65 v/v), 0,45-2,67 min ; ACN:H₂O (90:10 v/v), 2,68-3,33 ; ACN:H₂O (15:85 v/v), 3,34-15 min. A eluição foi monitorada em 263, 274 e 325 nm. A separação satisfatória foi em 274 nm. Os dados foram processados usando software Chrom Quest 4.2.

4.2.6 Análise de Cafeína e Lipídios

Para a extração de cafeína,²⁸ foram utilizados 2,00 g de folhas de *C. arabica* L. secas e trituradas, aquecidas num banho com 50 mL de água a 80°C (± 2) com 4 ml de ácido sulfúrico e mantidas em fervura durante 15 minutos. Após este procedimento, a amostra foi filtrada ainda quente e o funil e recipiente utilizados no processo passaram

por um processo de lavagem que foi repetido por três vezes com 10 mL de água quente acidulada com ácido sulfúrico. Este filtrado foi transferido para um funil de separação com 30 ml de clorofórmio e extraído por três vezes. A porção decantada foi filtrada com papel de filtro pré-umedecido com clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado num evaporador rotativo a 50°C (± 2). O extrato foi mantido no forno até a completa evaporação do clorofórmio. A cafeína extraída foi diluída em 10 mL de água Milli-Q e uma alíquota de 30 μ L desta solução foi adicionada a 2970 mL de água Milli-Q. Para quantificação de cafeína, uma solução estoque padrão foi preparada adicionando 0,10 g de cafeína (Sigma Hidrus, PA) com 100 mL de água (Milli-Q) e em seguida diluídas para concentrações de 0,0060; 0,0080; 0,0100; 0,0200; 0,0300 e 0,0400 mg/mL. As extrações de cafeína foram realizadas em triplicatas e a curva de calibração analítica foi obtida a 274 nm no espectrofotômetro de UV-VIS. Para a extração de lipídios,²⁸ 5,00 g de folhas secas e trituradas de *C. arabica* L. foram pesadas e colocadas num forno durante quatro horas a 105° C ± 2 . As amostras foram submetidas à extração Soxlet com uma mistura de éter e éter de petróleo (1:1) durante 6 horas a 55 °C (± 2). A solução foi concentrada num evaporador rotativo e submetida à ventilação forçada até alcançar uma massa constante. A massa de lipídios foi determinada em duplicata.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos da composição do solvente sobre os rendimentos de extratos de folhas de *Coffea arabica* estão apresentadas na Figura 1. Para colheitas de maturação e de floração dos frutos, independentemente do arranjo de plantio, os rendimentos são maiores para os extratos das folhas autossombreada. As diferenças foram mais pronunciadas na segunda colheita com as folhas das plantas mais maduras. As folhas

sombreadas da colheita de floração tiveram maiores rendimentos do que da colheita do de maturação dos frutos.

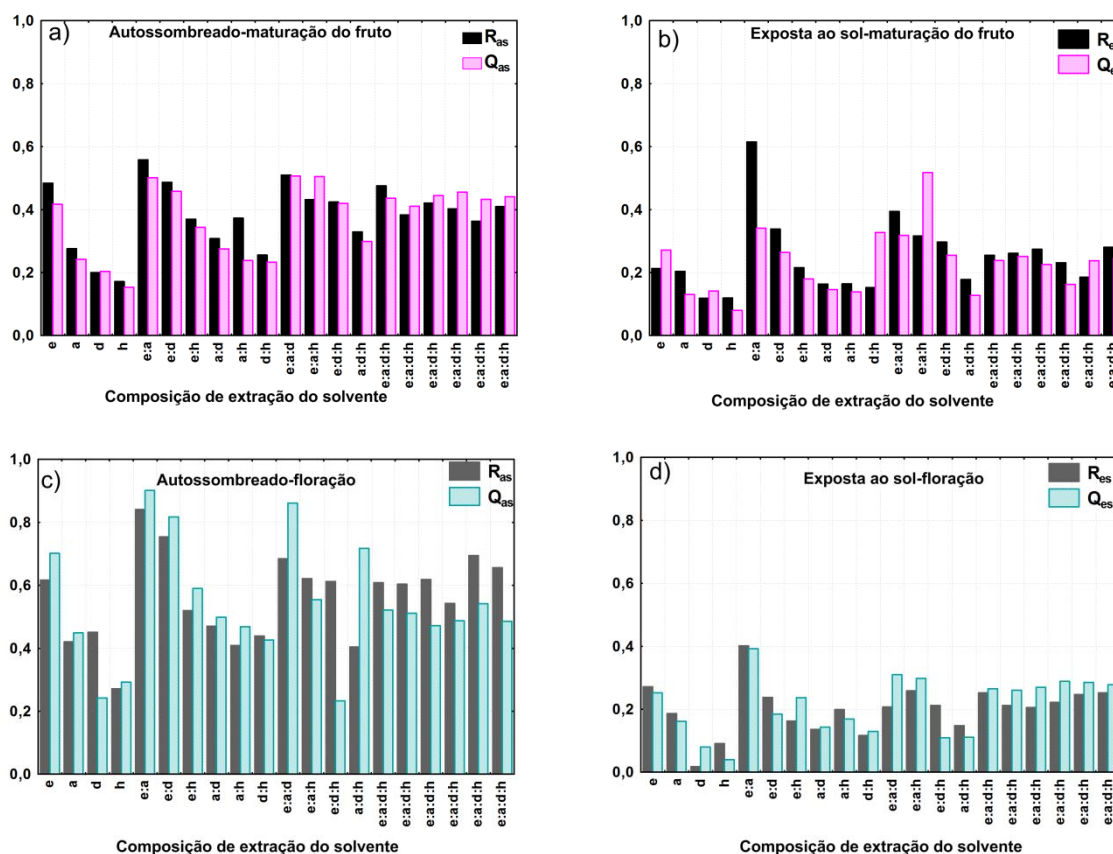


Figura 1- Rendimento do extrato bruto para diferentes proporções de solventes, etanol, acetona, diclorometano e hexano para amostras a) autossombreadas e b) expostas ao sol da colheita maturação de frutos e amostras c) autossombreados e d) expostas ao sol da colheita da época de florescimento, onde (Q) arranjos quadrado e (R) arranjos retangulares.

As variações de rendimento com as composições dos solventes são semelhantes para ambas às densidades de plantas e ambas as condições de luz de cada fenofase. Os rendimentos máximos relativos em todos os gráficos de barras da Figura 1 são etanol puro, misturas binárias etanol-acetona; etanol-diclorometano; mistura ternária etanol-acetona-diclorometano e a mistura quaternária envolvendo todos os solventes.

Os perfis semelhantes dos valores de rendimento (Figura 1) podem ser melhores compreendidos através das determinações de superfícies de resposta para o rendimento

do extrato bruto como uma função da composição de extração do solvente. Os modelos destas superfícies foram validados pela realização de análise de variância (ANOVA) e teste de falta de ajuste. Os modelos quadráticos para os rendimentos da fase de maturação do fruto (fm) e de floração (ff) e para o arranjo retangular das folhas de exposição ao sol (es) e autossombreadas (as), foram significativos não apresentando falta de ajuste no nível de 95 % de confiança (Tabela 2). As equações simplificadas, contendo apenas coeficientes binários estatisticamente significativos para os rendimentos previstos são:

$$\hat{Y}_{Ras(fm)} = 0,49e + 0,29a + 0,20d + 0,18h + 0,61ea + 0,57ed + 0,45ah \quad (1)$$

(±0,04) (±0,04) (±0,04) (±0,15) (±0,15) (±0,15) (±0,15)

$$\hat{Y}_{Ras(ff)} = 0,62e + 0,43a + 0,46d + 0,27h + 1,19ea + 0,82ed \quad (2)$$

(±0,04) (±0,04) (±0,04) (±0,04) (±0,17) (±0,17)

$$\hat{Y}_{Res(fm)} = 0,21e + 0,20a + 0,12d + 0,12h + 1,66ea + 0,72ed \quad (3)$$

(±0,04) (±0,04) (±0,04) (±0,04) (±0,19) (±0,19)

$$\hat{Y}_{Res(ff)} = 0,28e + 0,20a + 0,02d + 0,09h + 0,56ea + 0,31ed + 0,27dh \quad (4)$$

(±0,03) (±0,03) (±0,03) (±0,03) (±0,11) (±0,11) (±0,11)

onde e, a, d e h representam as proporções de etanol, acetona, diclorometano e hexano, respectivamente. As estimativas dos erros padrões estão entre parênteses, abaixo dos coeficientes correspondentes do modelo. Em todas as equações lineares os coeficientes de etanol são maiores do que os outros solventes puros. Como mostrado na Figura 1, de todos os solventes puros, o máximo rendimento é com etanol. Todos os modelos contêm coeficientes binários significativos para os solventes etanol:acetona e etanol:diclorometano. Estes coeficientes positivos indicam a existência de interações sinérgicas nas misturas destes solventes resultando em rendimentos mais elevados. O

efeito sinérgico entre acetona: hexano é significativa apenas na equação 1 e o diclorometano:hexano, equação 4.

Tabela 2-Análise de variância (ANOVA) e falta de ajuste das regressões significativas no nível de probabilidade.

Colheita	Arranjo	Exposição	Nível de significância	
			Regressão	Falta de ajuste
1	R	AS	0,000	0,633
1	R	ES	0,003	0,163
1	Q	AS	0,000	0,089
1	Q	ES	0,011	0,054
2	R	AS	0,000	0,878
2	R	ES	0,000	0,122
2	Q	AS	0,000	0,072
2	Q	ES	0,000	0,010

O modelo cúbico especial para os rendimentos da primeira e segunda colheitas dos arranjos quadrados de folhas expostas ao sol e autossombreadas, não mostrou falta de ajuste significativa no nível de 95 % de confiança. As equações de previsão simplificadas para os rendimentos são:

$$\begin{aligned} \hat{y}_{Qas(fm)} = & 0,41e + 0,24a + 0,20d + 0,15h + 0,75ea + 0,68ed + 0,29eh \\ & (\pm 0,02) (\pm 0,02) (\pm 0,02) (\pm 0,02) (\pm 0,10) (\pm 0,09) (\pm 0,10) \\ & + 0,28ad + 0,28dh + 2,34eah \\ & (\pm 0,09) (\pm 0,09) (\pm 0,67) \end{aligned} \quad (5)$$

$$\begin{aligned} \hat{y}_{Qas(ff)} = & 0,70e + 0,45a + 0,24d + 0,29h + 1,34ea + 1,42ed + 0,65ad \\ & (\pm 0,03) (\pm 0,03) (\pm 0,03) (\pm 0,03) (\pm 0,17) (\pm 0,17) (\pm 0,17) \\ & + 0,42ah + 0,67dh - 5,17eah - 12,96edh + 4,63adh \\ & (\pm 0,17) (\pm 0,17) (\pm 1,03) (\pm 1,03) (\pm 1,03) \end{aligned} \quad (6)$$

$$\begin{aligned} \hat{y}_{Qes(fm)} = & 0,28e + 0,13a + 0,14d + 0,57ea + 0,93dh + 5,59eah - 4,96adh \\ & (\pm 0,05) (\pm 0,05) (\pm 0,05) (\pm 0,23) (\pm 0,25) (\pm 1,48) (\pm 1,58) \end{aligned} \quad (7)$$

$$\hat{y}_{Qes(ff)} = 0,26e + 0,17a + 0,09d + 0,05h + 0,74ea + 0,33eh \quad (8)$$

$$\begin{array}{cccccc} (\pm 0,03) & (\pm 0,03) & (\pm 0,03) & (\pm 0,03) & (\pm 0,09) & (\pm 0,08) \\ & + 0,23ah + 2,18ead & & & & \\ & (\pm 0,08) & (\pm 0,50) & & & \end{array}$$

Como encontrado nos modelos do arranjo retangular, os coeficientes de mistura de etanol são os mais elevados de todos os coeficientes lineares nestas equações. Neste arranjo (equações 5-8), todos os modelos contêm coeficientes binários e ternários significativos.

Todos os modelos possuem coeficientes binários positivos significativos para o etanol e acetona. Para as folhas autossombreadas os dois modelos têm coeficientes binários significativos de etanol e diclorometano embora a interação destes solventes não seja significativa para as folhas expostas a luz solar. Os modelos de arranjos quadrados têm maiores números de coeficientes significativos binários e ternários. A maioria deles são positivos, indicando efeitos sinérgicos da mistura dos solventes sobre a extração.

As curvas de níveis que contêm os rendimentos máximos previstos das equações (1-8) estão apresentadas na Figura 2. Os modelos para os rendimentos de extração das folhas nas colheitas de maturação dos frutos e de floração, para ambos os arranjos de plantas expostos ao sol e autossombreados preveem que rendimentos mais elevados podem ser conseguidos com misturas binárias acetona:etanol com volumes iguais ou ricas em etanol.

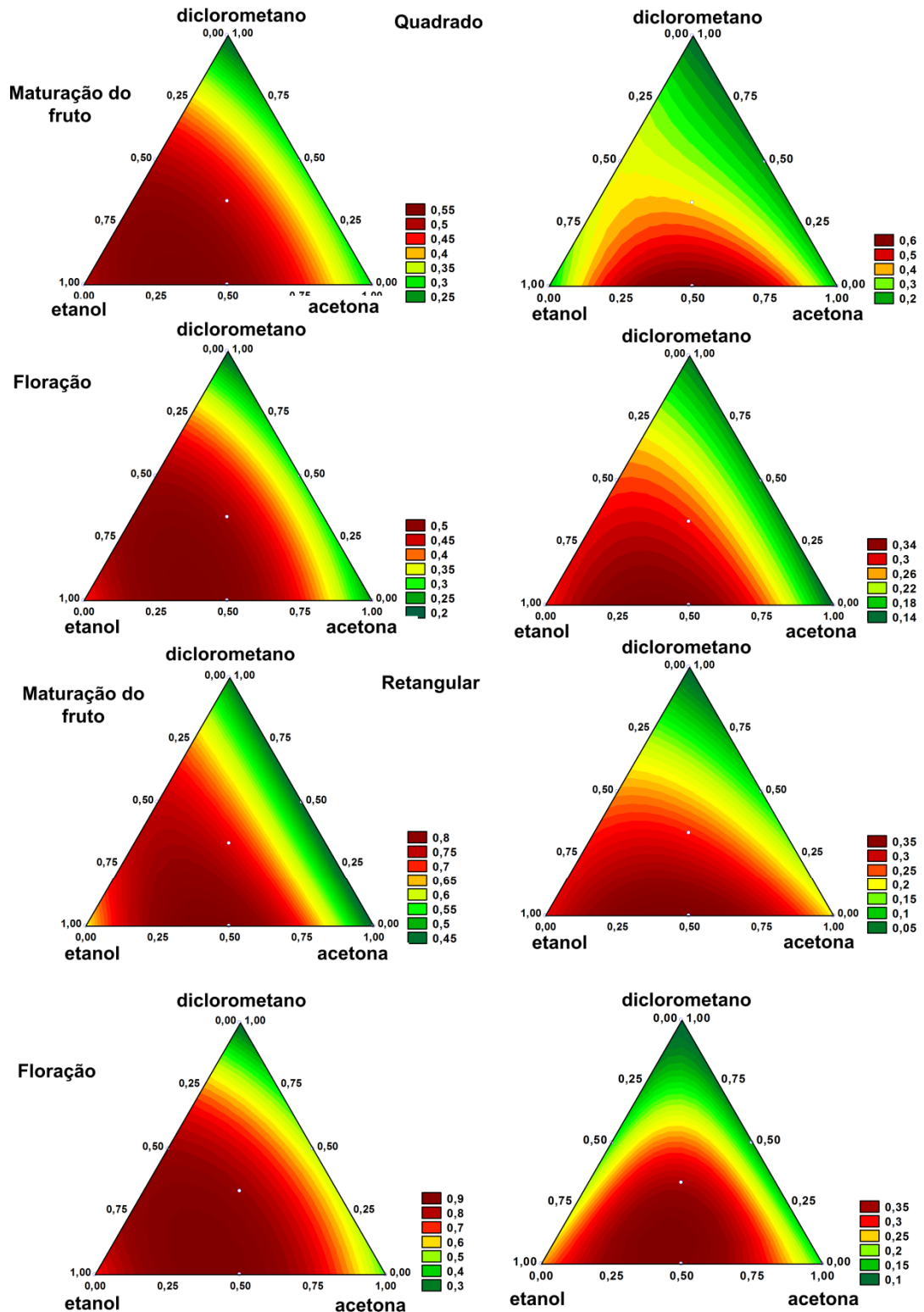


Figura 2 - Superfícies de resposta para as amostras autossombreado e expostas ao sol de maturação de frutos colheita, para arranjos quadrado (Q) e retangulares (R) de ambas as colheitas.

A ACP foi aplicada a espectros FT-IR para encontrar a impressão digital, bem como explorar as diferenças espectroscópicas de composições químicas nas diferentes

condições de luz e fenofases das folhas das plantas de café arábica. Os dados espectrais foram dispostos em uma matriz 152 x 1725, correspondendo a espectros de 15 diferentes proporções de solvente com uma quintuplicata no ponto central, para folhas colhidas nos arranjos retangulares e quadradas em condições expostas ao sol e autossombreadas.

A Figura 3a mostra os escores para CP1 *versus* CP3, que responde por 93,2 % da variância total. Embora CP3 explique uma pequena porcentagem de variância, estes pontos mostram uma clara separação entre as folhas nas fases de maturação dos frutos e floração. Uma porção maior das amostras de folhas na fase de maturação do fruto encontra-se no escore CP3 positivo, enquanto que as do período de floração estão localizados em seus valores negativos. A Figura 3b mostra loadings para CP1 e CP3 na faixa espectral estudada. Três principais regiões contribuem para a separação de folhas a partir das duas fenofases do café, 2962-2828, 1759-1543 e abaixo 1543 cm^{-1} , incluindo a região de impressão digital. A banda 1744 cm^{-1} pode ser atribuída à vibração C=O associadas com ésteres de ácidos graxos ou a grupo éster de triglicerídeos, enquanto que as bandas a 1658 e 1704 cm^{-1} estão associados com a absorção de cafeína. Uma vez que essas bandas têm loadings negativos (Figura 3b) pode-se concluir que as folhas na fase de floração são mais ricas nestes compostos do que as da fase de maturação do fruto. Nas regiões espectrais próximas a 2920-2850 cm^{-1} são atribuídos estiramento CH_2 assimétrico e CH simétrico de grupos metila. As bandas de 1739 e 1660 cm^{-1} consistem em estiramento C=O de polissacarídeos e C=C de lipídios e ácidos graxos, respectivamente.²⁹ A região abaixo de 1543 cm^{-1} , incluindo a região de impressão digital clássica, tem loadings negativos e pode ser associado com ácidos clorogênicos e carboidratos que parecem ser mais predominante em folhas de plantas com flores. Portanto, estes resultados sugerem que esta separação espectral das folhas nas duas fenofases é devida principalmente a polissacarídeos, ácidos graxos, proteínas e cafeína.

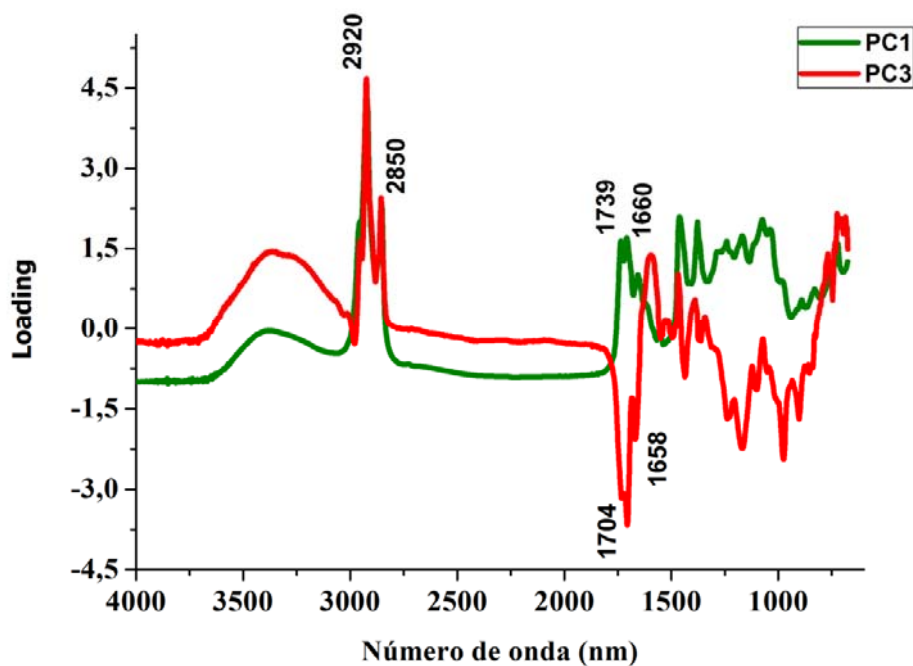
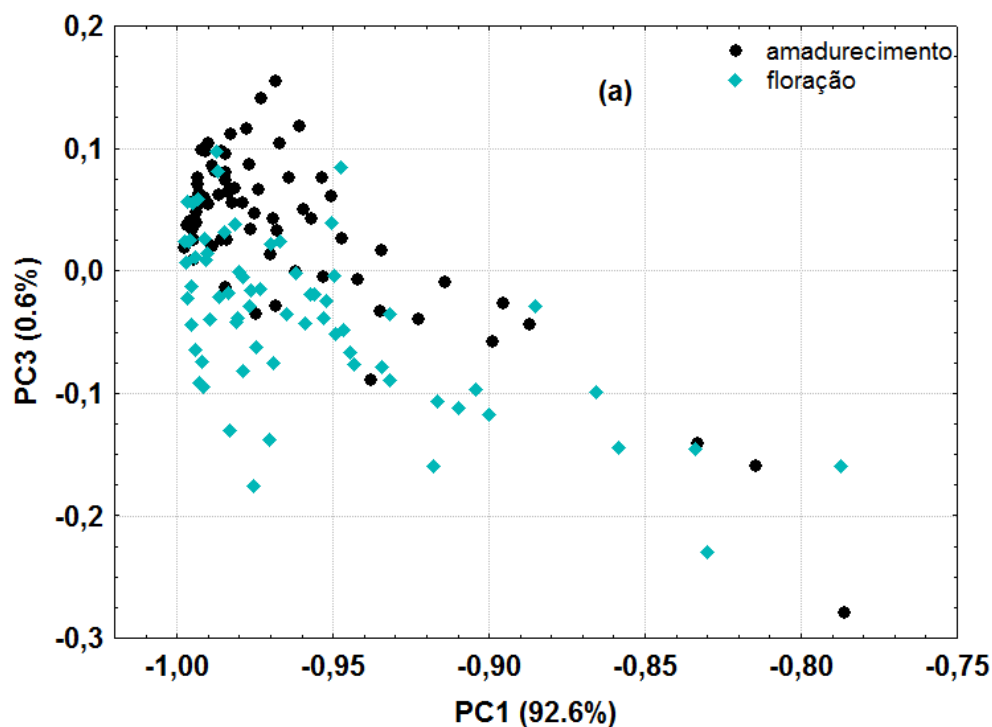


Figure 3 – (a) Escores de CP1 *versus* CP3 b) Loading de CP1 *versus* CP dos espectros de FT-IR obtidos das misturas conforme planejamento simplex-centroide de arranjos quadrados e retangulares de ambas as colheitas.

Uma melhor separação foi obtida pela projeção CP2 *versus* CP3, não mostrada aqui. Para a fase de maturação de frutos, a mistura etanol: hexano (1: 1 v/v) discriminou

as folhas de autossombreamento daquelas diretamente expostas ao sol, enquanto que com este extrator a discriminação não ficou clara para as folhas na fase de floração. Para as outras misturas do planejamento estatístico, não foram encontradas separação de folhas autossombreadas e expostas ao sol.

A Figura 4 contém um gráfico tridimensional com três CP dos espectros de UV-visível dos extratos de folha entre 200 e 611 nm com 94,7 % da variância total dos dados. A matriz de dados continha 140 linhas e 601 colunas. Quatro grupos principais podem ser vistos aqui, onde o grupo no centro, bem separado dos outros três, está indicado com um círculo. Este grupo contém os pontos que representam apenas os espectros de folhas autossombreadas, obtidos dos extratos com soluções de diclorometano, 1:1 de etanol-hexano, 1:1 hexano-diclorometano e 1:1:1 etanol-diclorometano-hexano.

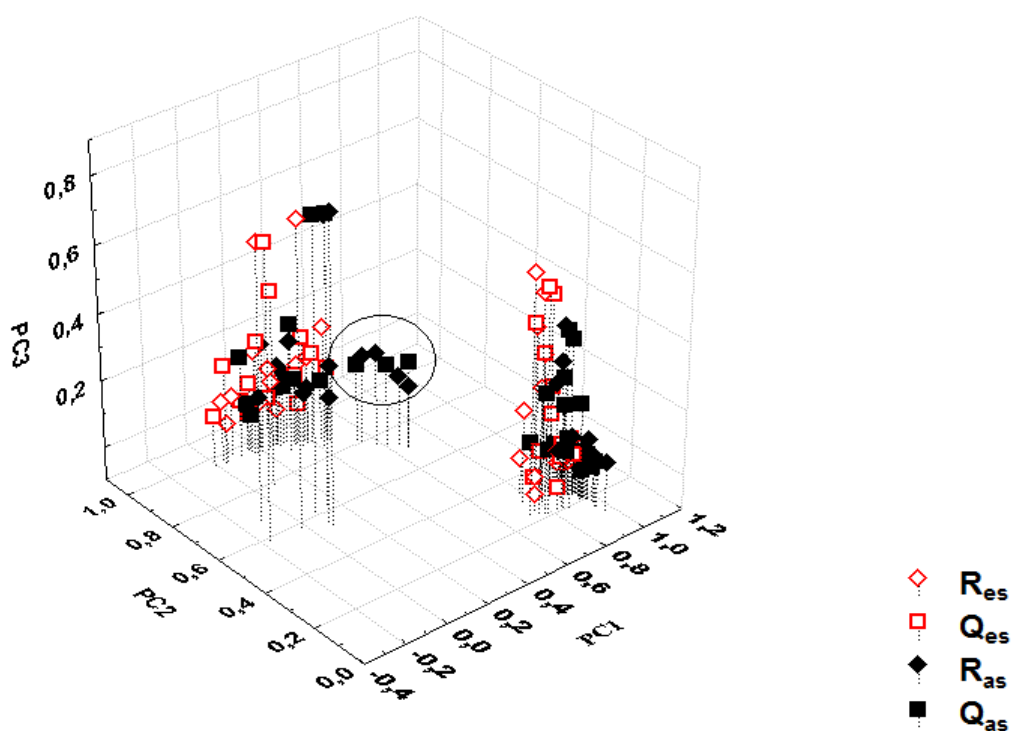


Figura 4 – Escores da CP1 versus CP2 versus CP3 com 94,7 % da variância dos dados espectrais de UV-vis obtidos a partir das misturas simplex-centroide dos arranjos quadrado (Q) e retangulares (R) da colheita de maturação dos frutos e de floração de amostras expostas ao sol (es) autossombreada (as).

A Figura 5 mostra os espectros UV obtido do detector arranjo de diodo DAD dos picos cromatográficos para o extrato preparado com a mistura de etanol:hexano 1:1, obtidos para as amostras de autossombreamento, expostas ao sol, arranjos retangulares e quadrados. Amostras expostas ao sol contêm absorções mais forte para a cafeína, ácido clorogênico e teobromina, que indicam concentrações mais elevadas destes metabólitos nestas folhas do que nas autossombreadas. O teor de cafeína da folha em café arábica leva a uma interpretação ecológica para os quais as condições expostas ao sol parecem mais estressantes do que as autossombreada provenientes de camadas mais baixas da floresta para esta espécie. Isto contrasta com os teores mais altos de cafeína nas folhas de erva-mate *Ilex paraguarienses* que são cultivadas na sombra em comparação com as expostas à luz solar, onde as condições de sombra são mais estressantes.³⁰ A erva-mate é originária de florestas onde predomina Araucárias angustifolia, em habitat natural, ela existe na primeira camada acima da espécie dominante.

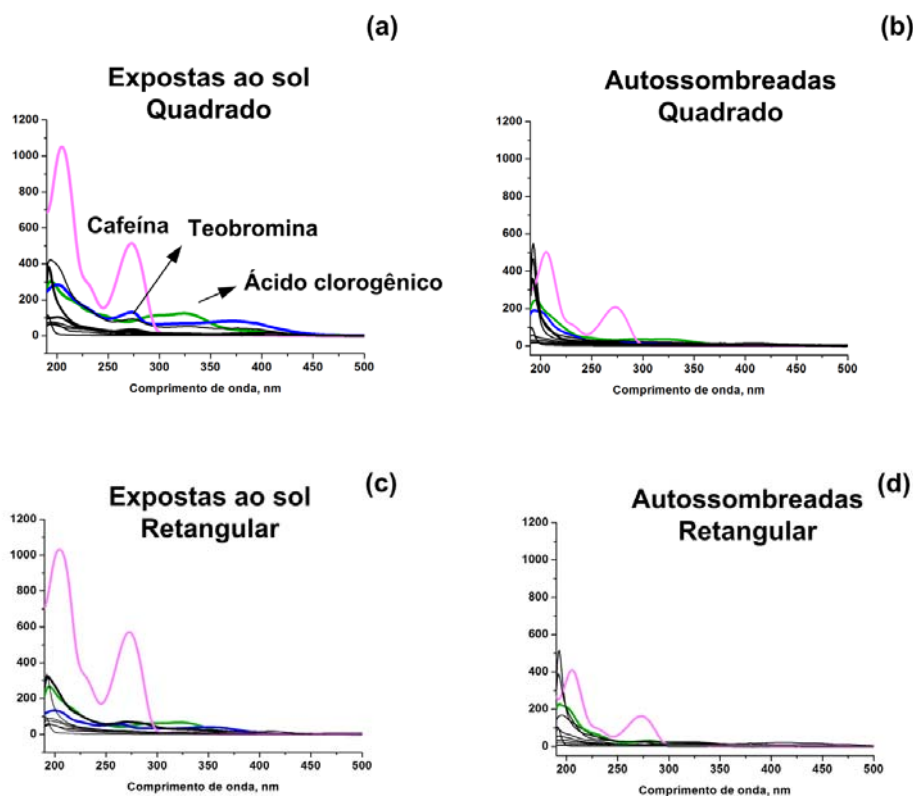


Figure 5. Espectros dos picos cromatográficos por HPLC- UV-DAD para o extrato, preparado em mistura (eh) etanol: hexano obtidos para as amostras expostas ao sol e autossombreada dos arranjos quadrados (Q) e retangulares (R).

A diferença entre os arranjos é muito menos pronunciada do que o efeito da exposição à luz solar direta ou não. Espectros de absorvância entre 190-210 nm³¹ são atribuídos aos açúcares e lipídios, tal que estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos dos espectros IV.

A Figura 6 contém gráficos de barras com abundâncias estimadas de cafeína a partir das alturas de pico em 274 nm do espectro UV obtido por DAD dos picos de cafeína. Abundâncias de cafeína são normalmente maiores para todos os extratos de folhas expostas ao sol, em comparação com as folhas de autossombreamento. Isto é verdade para ambos os arranjos de plantio e colheitas. Um teste t-pareado foi realizado em todas as 68 diferenças de alturas dos picos de cafeína, DAD dos extratos de folhas expostas ao sol e autossombreadas. As maiores abundâncias de cafeína nas folhas expostas ao sol são altamente significativas, acima do nível de 99 % confiança. Testes t das diferenças também foram realizados separados em extratos de folhas de cada colheita. Essas diferenças em relação à colheita de floração foram significativas, acima do nível de 99 % de confiança, enquanto que os do estágio de maturação dos frutos foram significativos abaixo desse nível, mas acima do nível de 95 %.

Experimentos confirmatórios em triplicatas foram realizados diretamente sobre os materiais de folhas autossombreadas e expostas ao sol determinando as percentagens das abundâncias de cafeína a partir das curvas de calibração UV e lipídios dos gravimétricos dos arranjos quadrados e retangulares de plantas de maturação dos frutos e florescimento. Estes resultados são apresentados na Tabela 3 juntamente com teores de umidade e de cinzas. Como pode ser visto, teores cafeína para as folhas expostas ao sol de ambos os arranjos para as plantas com flores são cerca de duas vezes os valores das folhas autossombreadas. As diferenças são muito menores para as folhas das plantas em fase de maturação dos frutos, indicando um efeito de interação entre a exposição à luz e período de colheita como encontrado anteriormente nas estimativas de abundância

DAD para cafeína. Em uma interpretação ecológica, a cafeína é considerada um metabólito secundário de proteção,²⁴ e plantas em floração também emitem muitas folhas novas, muito mais do que as plantas de amadurecimento de frutas. A área foliar recém-formada é responsável pela assimilação de carbono necessário tanto para o desenvolvimento do fruto e estrutura de crescimento da planta acumulando metabólitos mais protetores, enquanto que durante a maturação de frutos a área da folha é responsável apenas pela formação final de sementes. O teste *t* pareado confirma as diferenças entre cafeína de folhas expostas ao sol e autossombreadas no nível de 90 % de confiança.

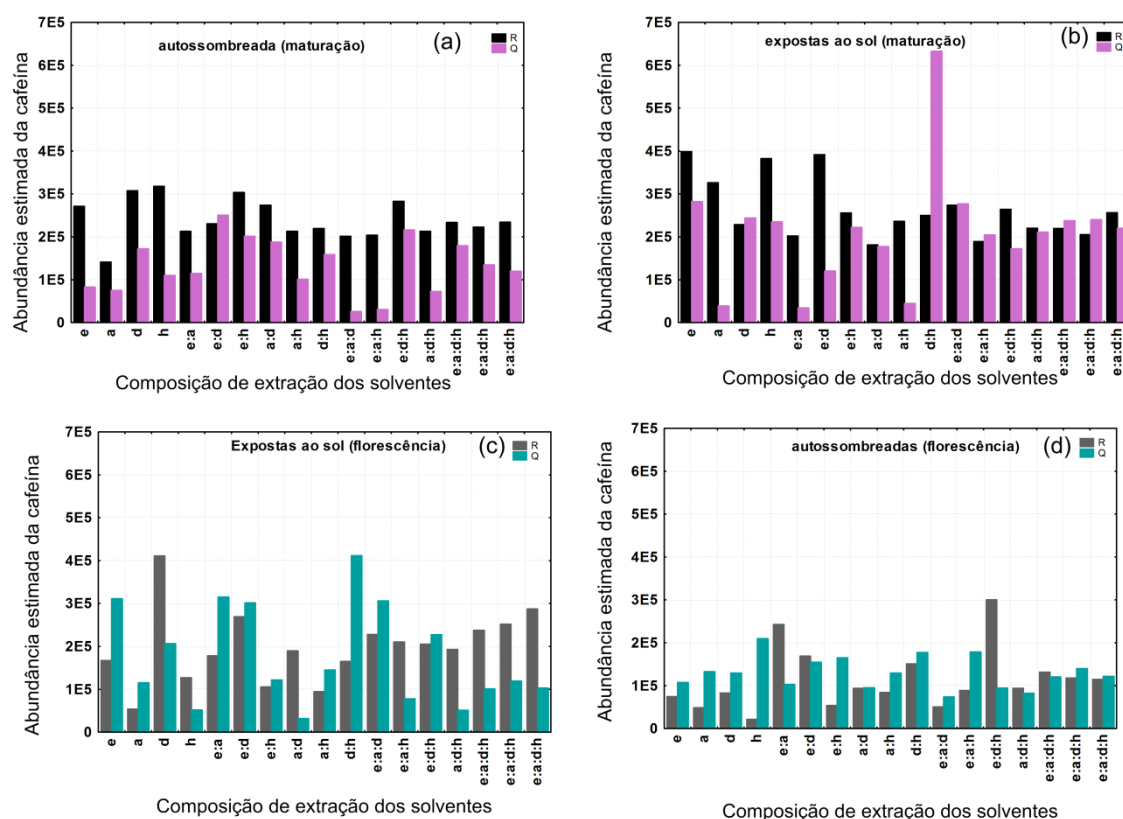


Figura 6- Abundância da cafeína estimada da altura dos picos por espectros DAD para extratos com diferentes proporções de solventes etanol, acetona, diclorometano e hexano para amostras a) autossombreadas e b) expostas ao sol de colheita de maturação do fruto e amostras c) autossombreadas e d) expostas ao sol de colheita de floração, para os arranjos quadrado (Q) e retangular (R).

Teores de lipídios são muito maiores nas folhas autossombreadas de ambos os arranjos de plantas e fenofases que indicam o papel protetor lipídico eficiente dos produtos do metabolismo secundário na sombra. Não existem diferenças significativas de lipídios para o tipo de arranjo ou fenofase da planta.

Tabela 3: Quantidades percentuais de umidade, cinzas totais, cafeína e de lipídios em triplicatas para folhas colhidas na fase de amadurecimento dos frutos e floração.

Arranjo	Umidade	Total cinza	Cafeína	Lipídios
Coleta de amadurecimento				
Ras	8,25	8,43	0,50	3,18
Res	9,26	7,78	0,52	1,92
Qas	9,74	8,25	0,65	3,49
Qes	11,64	7,56	0,71	1,91
Coleta de florescimento				
Ras	8,34	8,51	0,35	3,19
Res	8,80	7,99	0,83	1,96
Qas	7,75	7,96	0,43	3,51
Qes	8,80	7,07	0,74	2,02

4.4 CONCLUSÕES

A abordagem de impressão digital metabólica permitiu a caracterização química de material vegetal. FTIR, CLAE-UV-DAD e análise química clássica mostram que o teor de cafeína, teobromina e ácido clorogênico em *Coffea arabica* de folhas expostas ao sol são cerca do dobro das encontrados nas folhas autossombreadas, indicando que as condições expostas ao sol são mais estressantes do que as autossombreadas como as de origem das camadas mais baixas da floresta para esta espécie. Isto contrasta com os teores mais altos de cafeína em folhas de erva-mate *Ilex paraguarienses* cultivadas à sombra em comparação com aqueles expostos à luz do sol.²⁹ Folhas na fase de floração são mais sensíveis à exposição à luz do que na fase de maturação. As concentrações

lipídicas em folhas *Coffea arabica* autossombreadas são cerca do dobro das expostas à luz solar direta, o que indica o papel protetor lipídico eficiente dos produtos do metabolismo secundário na sombra.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio do CNPq, Fundação Araucária e Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento de Cafés, agências de financiamento brasileiras.

REFERÊNCIAS

1. Xu, X.; Jiang, J.; Liang, Y.; Yi, L.; Cheng, J. *Anal. Methods* **2010**, *2*, 2002.
2. Choi, Y. H.; Sertic, S.; Kim, H. K.; Wilson, E. G., Michopoulos, F.; Lefeber, A. W. M.; Erkelens, C.; Prat Kricun, S. D.; Verpoorte R. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 1237.
3. Ellis, D. I.; Dunn, W. B.; Griffin, J. L.; Allwood, J. W.; Goodacre, R. *Pharmacogenomics* **2007**, *8*, 1243.
4. Moreira, I.; Scarminio, I. S.; *Talanta* **2013**, *107*, 416.
5. Soares D. X.; Scarminio I.S.; *Anal. Chim. Acta* **2011**, *702*, 288.
6. Soares, P. K.; Scarminio, I. S.; *Phytochem. Anal.* **2008**, *19*, 78.
7. Soares, P. K.; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S.; *Anal. Chim. Acta* **2012**, *736*, 36.
8. Anthony, F.; Combes, M. C.; Astorga, C.; Bertrand, B.; Graziosi, G.; Lashermes, P. *Theor.; Appl. Genet.* **2002**, *104*, 94.
9. Hallé F.; Oldeman R. A.A.; Tomlinson P.B.; *Tropical trees and forests: an architectural analysis*, 1th, Springer-Verlag: Berlin, Germany , **1978**; pp. 441.
10. Sinoquet, H.; Stephan, J.; Sonohat, G.; Lauri, P. E.; Monney, P.; *Plant, Cell and Environment.* **2001**, *24*, 395.

11. Beer, J.; Muschler, R.; Kass, D.; Somarriba, E. *Agrofor. Syst.*; **1998**, *38*, 139.
12. López-Gómez, A. M.; Willians-Linera, G.; Manson, R. H. *Agric. Ecosyst. Environ.*; **2008**, *124*, 160.
13. Muschler R.G; *Agrofor. Syst.*; **2001**, *51*, 131.
14. Perfecto, I.; Vandermeer, J.; Mas, A.; Pinto, L.S.; *Ecol. Econ.* **2005**, *54*, 435.
15. Clay J.C.; *World agriculture and environmental: a commodity-by-commodity guide to impacts and practices*, 1th, Island Press: Washington, USA, 2004; ch.3.
16. Kurata, H.; Matsumura, S.; Furusaki, S.; *Plant Sci.* **1997**, *123*, 197.
17. Bosselmann, A. S.; Dons, K.; Oberthur, T.; Smith Olsen, C.; Ræbild, A.; Usma, H.; *Agric. Ecosyst. Environ.* **2009**, *129*, 253.
18. Souza, H. N. de.; Goede, R. G. M. de; Brussaard, L.; Cardoso, I. M.; Duarte, E. M. G.; Fernandes, R. B. A.; Gomes, L. C.; Pulleman, M. M.; *Agric. Ecosyst. Environ.* **2012**, *146*, 179.
19. Rice, R. A.; *Agric. Ecosyst. Environ.* **2008**, *128*, 212.
20. Babbar, L. I.; Zak, D. R.; *Agric. Ecosyst. Environ.* **1994**, *48*, 107.
21. Lin, B. B.; *Agric. Forest Meteorol.* **2007**, *144*, 85.
22. Viani, R. In *Physiologically Active Substances in Coffee*. Clarke, R.J; Macrae, R., eds; New York; Elsevier, **1988**, ch. 1.
23. Ashihara, H.; Sano, H.; Crozier, A.; *Phytochem.* **2008**, *69*, 841.
24. Ashihara, H.; Crozien, A.; *Trends in Plant Sci.* **2001**, *6*, 407.
25. Mazzafera, P.; *Bragantia* **1999**, *58*, 387.
26. Mazzafera, P.; Yamaoka-Yano, D. M.; Vitória, A. P.; *R. Bras. Fisiol. Veg.* **1996**, *8*, 67.
27. Barros, B. B; Bruns, R. E.; Scarminio, I. S. *Statistical design – Chemometrics*; Elsevier: Amsterdam; **2006**, ch.7.

28. Zenebon, O.; Pascuet, N. S.; Tiglea, P.; *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*; 1th.; Instituto Adolfo Lutz:São Paulo; **2008**, ch. 4.
29. Wang, N.; Fu, Y.; Lim, L-T. *J. of Agric. Food Chem.*; **2011**, 59, 3220.
30. Mazzafera, P. *Braz. J. Plant. Physiol.*; **1994**, 6, 149.
31. Veloso, A.C.A; Rodrigues L.R.; Dias, L. G.; Peres, A. M.; In *UV Spectrophotometry Method for Dietary Sugars*, Preedy, V.R., ed.; RSC Publishing: Cambridge, UK, **2012**, ch. 14.



CAPÍTULO V

Artigo 3

**EFEITOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL DA DENSIDADE DE PLANTAS,
ARRANJOS E DISPONIBILIDADE DE LUZ SOBRE OS PRINCIPAIS
CONSTITUINTES QUÍMICOS DE FOLHAS E GRÃOS DO *Coffea arabica***

Fernanda Delaroza^a, Miroslava Rakocevic^b; Galileu Bernardes Malta^a, Roy Edward
Bruns^c, Ieda Spacino Scarminio^{a,1}

^aLaboratório de Quimiometria em Ciências Naturais, Departamento de Química,
Universidade Estadual de Londrina, CP 6001, 86051-990, Londrina, PR, Brasil

^bInstituto Agrônômico do Paraná - IAPAR, CP 481, 86047-902, Londrina, PR, Brasil

^cInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13083-970,
Campinas, SP, Brasil

¹ Corresponding author. Tel.:+55 43 33714811; fax +55 43 33714286
e-mail: ieda@uel.br

RESUMO

Experimentos do planejamento fatoriais foram executados para determinar os efeitos dos arranjos e densidade de plantio, bem como o grau de disponibilidade de luz sobre a cafeína, ácidos clorogênicos, lipídios, açúcares redutores e cinzas de grãos e folhas de amostras de *Coffea arabica*. O teor de cafeína mostrou diferença significativa no nível de 99 % de confiança entre as amostras de grãos e folhas, em amostras expostas a luz solar direta e indireta, de altas e baixas densidades de plantas e arranjos de plantios quadrados e retangulares. As amostras expostas à luz solar direta tem conteúdo de cafeína menores ($0,68 \mu\text{g mL}^{-1}$) do que aqueles parcialmente protegida da exposição ao sol ($0,99 \mu\text{g mL}^{-1}$). Amostras de densidades altas de plantas que são provavelmente mais protegidas da exposição ao sol apresentam maior teor de cafeína ($0,98 \mu\text{g mL}^{-1}$) do que os de parcelas de baixas densidades ($0,69 \mu\text{g mL}^{-1}$). Amostras de padrão quadrado de plantas, provavelmente, menos expostas ao sol, apresentam maior teor de cafeína ($0,97 \mu\text{g mL}^{-1}$) do que aqueles a partir de padrão de arranjos retangular ($0,70 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Palavras-chave: planejamento fatorial, *Coffea arabica*, cafeína, ácidos clorogênico, açúcares redutores, lipídios, densidade de plantio, disponibilidade de luz.

ABSTRACT

Factorial design experiments were executed to determine the effects of plant pattern and density as well as the degree of light availability on the caffeine, chlorogenic acids, lipids, reducing sugars and ash contents of beans and leaves of *Coffea arabica* samples. Caffeine content showed 99 % confidence level significant

differences between bean and leaf samples, samples exposed to direct and indirect sunlight, from high and low plant densities and from square and rectangular plant patterns. Samples exposed to direct sunlight have smaller caffeine contents ($0.68 \mu\text{g mL}^{-1}$) than those partially protected from sun exposure ($0.99 \mu\text{g mL}^{-1}$). High plant density samples that are probably more protected from sun exposure have higher caffeine contents ($0.98 \mu\text{g mL}^{-1}$) than those from low density plots ($0.69 \mu\text{g mL}^{-1}$). Square plant pattern samples, probably less exposed to the sun, have higher caffeine contents ($0.97 \mu\text{g mL}^{-1}$) than those from rectangular plant patterns ($0.70 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Keywords: factorial design, *Coffea arabica*, caffeine, chlorogenic acids, reducting sugars, lipid, plant density, light availability

5.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Coffea arabica* é originária da Etiópia e cresce em florestas naturais e em sistemas agroflorestais (MULETA; ASSEFA; NEMOMISSA; GRANHALL, 2007). Grande parte das plantações de café de áreas florestais do sudoeste da Etiópia crescem naturalmente à sombra das árvores. O cultivo de café no Brasil ocorre geralmente em pleno sol. Os ciclos de produção do café são cerca de 4-5 anos na monocultura e 6-7 no sistema tradicional e são regulados pela poda. A poda de árvores de café tem duas funções essenciais: manter um rendimento suficiente durante toda a vida da árvore e permitir que os frutos permaneçam acessíveis (TERESSA; CROUZILLAT; PÉTIARD; BROUHAN, 2010). As árvores plantadas em áreas de luz solar direta tem alta produção de café nos anos de cultivo inicial, mas o esgotamento da planta ocorre como consequência, a não ser que as condições de autossombreamento são impostas para diminuir este efeito (VOLTAN; FAHAL; CARELLI, 1992). O efeito de sombra na

qualidade do grão de café é mostrado como um fator positivo (VAAST; BERTRAND; PERRIOT; GUYOT; GENARD, 2006).

Do ponto de vista agrônômico, um dos aspectos mais importantes que caracteriza os diferentes sistemas é o número de plantas por hectare ou densidade de cultivo, normalmente pesquisado em níveis baixos e altos. Estudos realizados em vários países têm demonstrado que o cultivo de café adensado é uma alternativa viável para o aumento da produtividade e também pode reduzir os custos. No Brasil, os estudos sobre a densidade de plantas têm sido realizados por muitos anos por vários institutos de pesquisa, incluindo o Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e Empresa Capixaba de Pesquisa Agropecuária (EMCAPA) (ANDROCIOLI FILHO, 2002). Sob cultivo denso, a maioria das folhas recebem luz solar moderada, que é importante para as plantas adaptadas à sombra.

A qualidade do café é o resultado de alguns atributos dados aos grãos crus, tais como, tamanho, cor, homogeneidade e normalmente está relacionado com a espécie. Do ponto de vista químico, a qualidade do grão de café cru está relacionada com os componentes químicos que dependem de genética de plantas, condições ambientais e estágio de maturação (LEROY et al., 2006; BERTRAND et al., 2012; MENEZES, 1994). Os principais constituintes do café são os ácidos clorogênicos, cafeína, trigonelina, fibra solúvel, diterpenos da fração lipídica, açúcares, ácidos e proteínas (FARAH, 2012). O *Coffea arabica* é classificado como café de boa qualidade, pois tem altas concentrações de carboidratos, lipídios e trigonelina (ILLY, 2005). Embora o alcaloide mais popular do café seja a cafeína, a sua contribuição para a qualidade da bebida ocorre principalmente como fator estimulante, contribuindo ao mesmo tempo com menos de um décimo de sua amargura. Ácidos clorogênicos contribuem com a adstringência, amargor e acidez da bebida. Estudos destacam propriedades antioxidantes

dos ácidos clorogênicos e suas principais subclasses encontrados na natureza, como por exemplo as atividades antivirais dos ácidos dicafeoilquínicos e cafeoilquínicos contra o adenovírus e herpes (FARAH, 2012). Os principais carboidratos, não estruturais acumulados nas folhas e frutos de plantas de café, são amido e açúcares solúveis redutores (glicose e frutose) e açúcares não-redutores.

A qualidade da bebida é também atribuída às diferentes espécies, mas este conceito é muito superficial, uma vez que as mesmas espécies podem ter diferentes composições metabólicas. Essas variações podem ser pelas condições de solo e clima, tais como as diferenças de altitude, formas de cultivo e os cuidados pós-colheita, bem como diferentes procedimentos utilizados para secar grãos ou processá-los para comercialização (SAKAI; BARBOSA; SILVEIRA; PIRES, 2015).

É bem conhecido que as diferenças de radiação captadas pelas plantas nas suas estruturas podem causar alterações na função de folha, bem como nas concentrações do metabolito. Alguns resultados tem mostrado que plantas adaptadas ao sol produzem mais cafeína que as crescidas na sombra, embora a qualidade da bebida esteja relacionada com o tempo de maturação influenciando o metabolismo de certos ácidos. Muitos estudos nas áreas de ecologia e agronomia enfatizaram os efeitos do sol e sombreamento em cultivares de café; entre os quais as características fisiológicas (FREITAS; OLIVEIRA; DELU FILHO; SOARES, 2003; MORAIS; CARAMORI; RIBEIRO; GOMES; KOGUISHI, 2006; BARRADAS; FANJUL, 1986; FRIEND, 1984) características morfológicas e estruturais (CÉSAR; MATSUMOTO; VIANA; SANTOS; BONFIM, 2010; CUSTÓDIO; LEMOS; MINGOTTE; BARBOSA; POLLO; SANTOS, 2014; ARAUJO et al., 2008; MATOS; WOLFGRAMM; GONÇALVES; CAVATTE; VENTRELLA; DAMATTA, 2009; OKUBO; TOMATSU; MUHAMAD; HARASHINA; TAKEUCHI, 2012), os níveis de clorofila (RICCI; COSTA; PINTO; SANTOS, 2006; CHAVES; TEN-CATEN; PINHEIRO; RIBEIRO; DAMATTA, 2008)

diferenças microclimáticas (BARRADAS et al., 1986; CHARBONNIER et al., 2013) e produtividade (CUSTÓDIO; POZZA; CUSTÓDIO; SOUZA; LIMA; LIMA, 2010; RICCI et al. 2006; RICCI; COSTA; OLIVEIRA, 2011; LUNZ; BERNARDES; RIGHI; FAVARIN; COSTA; CAMARGO, 2007; STEIMAN; BITTENBENDER; GAUTZ, 2011; LÄDERACH et al., 2011) foram estudadas. Alguns estudos mostram que a redução da luz solar na planta mudará a qualidade do grão em sistemas agroflorestais (SAF) ou sob condições de alta densidade (MARTINEZ; AUGUSTO; CRUZ; PEDROSA; SAMPAIO, 2007; PREZOTTI; ROCHA, 2004).

Para empregar sistemas de alta densidade de plantas e maior produtividade, plantas menores de café são desenvolvidas para esse meio de cultura. Um menor espaçamento entre plantas vizinhas aumenta a densidade de plantas por hectare (ha planta⁻¹) e gera um maior número de grãos (CARVALHO, 1986), mas não se pode afirmar que haverá melhora na qualidade. Quando as culturas são submetidas a diferentes sistemas de plantio, por mudanças nos espaçamentos das linhas e interlinhas, a permeação do sol será diferente para cada arranjo de plantio, modificando a temperatura interna, a circulação de ar e umidade entre as plantas (MAESTRI; BARROS; RENA, 2001). Com um espaçamento menor poderá haver uma maior competição entre plantas e, portanto, um aumento de ataques de pragas desencadeando um conjunto de processos associados à defesa da planta (GREENBERG; BICHER; ANGON; MACVEAN; PEREZ; CANO, 2000).

A hipótese deste trabalho foi que a densidade de cultivo o arranjo de plantio irá modificar as respostas fisiológicas dos grãos crus e das folhas encontradas em diferentes camadas vegetais de perfil vertical. Portanto, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito de dois níveis de exposição de luz, baixo sol (autossombreamento) e pleno sol, dois arranjos de plantio (retangulares e quadrados) e diferentes densidades de plantas (altas densidades: 10.000 plantas ha⁻¹ e 6.000 plantas ha⁻¹) sobre as concentrações de

lipídios, cafeína, açúcares redutores e ácidos clorogênicos em grãos cru e folhas da cultivar IAPAR 59 (cruzamento entre *Coffea arabica* 'Villa Sarchi "e" Híbrido de Timor "- Sarchimor) (GEROMEL et al., 2008). As diferenças encontradas nestes constituintes para os grãos e folhas combinadas com as de outros metabolitos podem servir como prognóstico da qualidade da bebida.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.1 Amostragem

Os experimentos foram conduzidos no Instituto Agronômico do Paraná, Londrina (23°18'S, 51°17'W), Paraná, Brasil. A coleta dos frutos de cafeeiros *Coffea arabica* L. de cultivares IAPAR 59, foram realizadas em diferentes ângulos ao redor da planta em 11/05/2011. As folhas dos ramos plagiotrópicos foram coletadas em 07/10/2011 após principal período de florada. Os frutos e as folhas foram provenientes de dois sistemas de plantios: 6.000 e 10.000 plantas.ha⁻¹, com espaço por planta de 1,67 m² e 1,00 m², respectivamente em dois arranjos de plantio, quadrado (Q) e retangular (R). Na densidade de 6.000 plantas.ha⁻¹ o arranjo retangular é 3,00 m x 0,55 m e o arranjo quadrado com 1,29 m x 1,29 m. Para a densidade de 10.000 plantas.ha⁻¹ o arranjo retangular tem dimensões de 3,00 m x 0,33 m o arranjo quadrado de 1,00 m x 1,00 m plantas.ha⁻¹. Também foram coletadas dois diferentes estratos do perfil vertical da planta; uma coleta no dossel e outra 40 cm acima do solo. A radiação calculada atenuada na parte inferior da planta varia de 2-10 % de radiação solar na escala diária. Os experimentos foram executados seguindo um planejamento fatorial de dois níveis com quatro fatores, arranjo de plantio (retangular e quadrado), densidade de plantas (6.000 e 10.000 plantas.ha⁻¹), disponibilidade de luz (sol e autossombreado) e órgãos

vegetais (grãos e folhas) . Além de economizar experimentos e proporcionar resultados mais confiáveis do que um fator de cada vez, a abordagem do planejamento 2^4 permite a determinação dos efeitos de interação, bem como os efeitos principais que poderiam ser determinados por métodos univariados.

5.2.2 Preparo da Amostra

Os frutos cereja coletados foram secados no sol em terreiro de concreto até atingir cerca de 12,5 % de teor de água. Após a secagem, foram removidos a casca e pergaminho e grãos defeituosos. Os grãos verdes foram triturados em moinho Laboratory Mill 3600 com nitrogênio líquido, peneirados em peneira de 0,71 mm (ABNT nº 25), embalados em seladora Selovac 2B e armazenados em freezer a -20 °C. As folhas foram passadas em água destilada, cortadas com tesoura, colocadas para secar em temperatura ambiente, trituradas em liquidificador, embaladas e condicionadas em freezer -20 °C. As amostras foram submetidas às análises físico-químicas para teores de umidade, cinzas, lipídios, cafeína, ácido clorogênico, açúcares redutores.

5.2.3 Cinzas

Para ambos os materiais, folhas e grãos, pesou-se 3,0 g onde foram colocadas em cadinhos previamente calcinados a 550 °C e levados ao bico de Bunsen para carbonização. Em seguida, o material vegetal foi incinerado a 550 °C em forno de mufla (Marconi MA385) durante 12 horas, colocado num dessecador até temperatura ambiente e pesado. A amostra foi então retornada ao forno de mufla a 550 °C durante mais 12 horas e pesado. O procedimento foi repetido até que foi obtida uma massa constante (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008).

5.2.4 Total de Lipídios

Na extração dos lipídios totais dos grãos verdes e folhas secas empregou-se o método de Soxhlet (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA, 2008). As extrações foram realizadas em triplicata com éter de petróleo (30-60 °C, Alphatec) e n-hexano (Fmaia) na proporção 1:1 (v/v). Foi fixada a velocidade/quantidade de 6 a 8 ciclos por hora à temperatura constante e com fluxo de gotejamento entre 2 e 3 gotas por segundo. Foram pesados 5,0 g de amostra, embalados em papel filtro (Qualy, 80 g/m²) e colocados no aparelho de Soxhlet em 250 mL da mistura de solvente, na temperatura constante de 100 °C. O tempo de extração foi de oito horas. Para o cálculo do rendimento, a fração lipídica foi recolhida e seca em ventilação forçada (ventilador) até massa constante.

5.2.5 Clarificação

Para quantificação dos açúcares redutores, cafeína e ácido clorogênico, as amostras, folhas ou grãos, passaram por um processo de clarificação. Pesou-se 0,50 g do material vegetal, adicionou-se 5 mL de água destilada e foi levado por cinco minutos na chapa de aquecimento sobre agitação. A solução foi filtrada com o funil de Buchner e em seguida adicionou-se uma solução saturada de acetato de chumbo básico ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 2\text{Pb}(\text{OH})_2$) (Cinética) precipitando as substâncias interferentes como aminoácidos, proteínas e lipídios (CECCHI, 2003). A solução foi novamente filtrada em funil de Buchner com papel de filtro e ao sobrenadante foi acrescentado bicarbonato de sódio (NaHCO_3) (Synth) para neutralizar o excesso de chumbo que precipitou na forma de carbonato de chumbo (PbCO_3). A solução foi filtrada em funil com papel filtro (Qualy- 80 g/m²) e seu volume completado para 10 mL em balão volumétrico.

5.2.6 Açúcares Redutores

Os açúcares redutores (AR) foram quantificados por curvas de calibração seguindo uma adaptação fotométrica do método de Somogy (1952) - Nelson (1944). Uma solução de 3 mg / mL de glucose padrão (Merck -cas 14431-43-7) foi preparada e diluída 0,009-0,45 mg / mL. Todos os pontos de calibração foram realizados em triplicatas para teste de linearidade das curvas de calibração, como recomendado por Pimentel e Barros (PIMENTEL; BARROS NETO, 1996), bem como Danzer e Currie (DANZER; CURRIE, 1998). O valor F calculado de 2,28 no nível de confiança de 95 % de confiança é maior que $F_{5,12, 3,11}$, indicando que não há falta significativa de ajuste.

5.2.7 Cafeína

Foi utilizado material de cafeína certificado (Cerilliant, o CAS- 58-08-2) para preparar soluções de referência 0,1 μg / mL em três réplicas. Para construção da curva analítica foram feitas diluições nas concentrações de 0,005 a 0,025 μg / mL. As quantificações foram feitas em triplicatas em cromatógrafo líquido de alta eficiência SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjo de fotodiodo (PDA) e bomba quaternária Termo-Electron Corporation. Na análise foi utilizada uma coluna C_{18} KINETEX, 2,6 μm HILIC 100 Å e um volume de injeção de 20 μL e vazão da fase móvel 0,5 mL min^{-1} com o solvente acetonitrila, ACN, (Lichrosolv EUR MERCK- grau HPLC). A fase móvel foi realizada em gradiente, com os tempos de 0-0,44 minutos ACN: H_2O (15:85 v/v); 0,45-2,67 minutos ACN: H_2O (35:65 v/v); 2,68-3,33 ACN: H_2O (90:10 v/v) 3,34-12 ACN: H_2O (15:85 v/v), com detecção monitorada no comprimento de onda de 274 nm. (DELAROZA et al., 2014)

5.2.8 Ácidos Clorogênicos

Foi utilizado material de referência certificado de ácido clorogênico (Aldrich- 327-97-9) para preparar soluções de referência 0,1 µg/mL em três réplicas. Estas foram diluídas para concentrações entre 0,005-0,018 µg/mL. As quantificações foram realizadas em triplicata, por cromatografia líquida de alto desempenho como descrito no procedimento para a cafeína. A curva de calibração foi linear, sem falta de ajuste no nível de confiança de 95 % (valor F calculado de 1,40 em comparação com um valor crítico 3,11).

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos foram conduzidos seguindo um planejamento fatorial 2^4 , Tabela 1, onde estão apresentados os valores médios das determinações em triplicata de cafeína, ácido clorogênico, açúcares redutores, cinzas e lipídios totais.

Os resultados experimentais para a cafeína, açúcares redutores, cinzas e lipídios de todas as combinações dos dois níveis dos quatro fatores estão indicados na tabela. Os ácidos clorogênicos foram medidos apenas para os grãos de café, já que suas concentrações nas folhas estavam abaixo do limite de detecção. Este planejamento permite a determinação de todos os efeitos principais e de interação dos quatro fatores. Os efeitos são definidos por

$$Ef = \bar{R}_+ - \bar{R}_-,$$

Onde \bar{R}_+ e \bar{R}_- são médias dos resultados nos níveis altos e baixos de cada fator ou de suas interações, respectivamente. Note-se a definição do efeito é o mesmo que o valor da diferença usado nos testes t pareado para médias. Um teste t pareado para o planejamento fatorial elimina todas as contribuições de variância de outros fatores no

planejamento exceto o de interesse para sistemas de resposta linear. Como resultado, este teste tem mais precisão do que outros métodos de comparação de médias, como os testes LSD Fisher e Tukey, que são aplicadas usando valores de desvio padrão (Tabela 2) que são afetadas por múltiplas variações do nível do fator obtido a partir de dados sem considerações de planejamentos estatísticos.

A Tabela 2 apresenta os desvios médios e padrões de cafeína, ácidos clorogênicos, açúcares redutores, cinzas e lipídios totais para as amostras de grãos e folhas, amostras com maior ou menor exposição de luz, plantas de duas densidades e amostras de arranjos de plantios retangular e quadrado. As amostras referentes aos órgãos da planta, grãos e folhas, mostram as diferenças mais significativas na Tabela 2.

Para os resultados dos teores de cinzas e de lipídios, os valores de t calculados são mais de dez vezes o valor de t crítico de 2,81 em 99 % de confiança.

A Figura 1 contém um gráfico dos dados lipídios vs cinzas dos experimentos do planejamento fatorial. Os pontos de amostragem dos grãos no canto superior esquerdo têm concentrações de lipídios muito maiores do que as amostras de folhas na parte inferior direito. Em contrapartida, as amostras de folhas têm teores de cinzas muito maiores. As amostras de alta densidade tendem a ter concentrações de lipídios mais elevadas do que aquelas plantadas em densidade menor. Esta tendência é indicada na Tabela 2 com o teste- t de lipídios para densidade, significativo ao nível de confiança de 95 %. Os testes de LSD Fisher e Tukey não detectam diferenças significativas nas médias de altas e baixas densidades, porque as estimativas de variância contêm contribuições nos níveis de fatores relacionadas às mudanças nos órgãos da planta e disponibilidade de luz e arranjos de plantios. Os teores lipídicos para os grãos de café têm médias de $14,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ em alta densidade e $12,96 \mu\text{g mL}^{-1}$ em baixa densidade. Isto também é verdade para as amostras de folhas de alta densidade apresentando média de $2,07 \mu\text{g mL}^{-1}$ enquanto que uma menor média foi para as folhas de baixa densidade,

1,53 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado os teores de cinzas não parecem depender da densidade de plantas apresentado resultados do teste *t* não significativos.

Tabela 1- Planejamento fatorial para os órgãos da planta, disponibilidade de luz, densidade de plantio e arranjos de plantio nas concentrações de cafeína, ácidos clorogênicos, açúcares redutores, cinzas e lipídios ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e porcentagens de cinzas. Os valores são as médias das determinações das triplicatas

Fatores					-					+
1. Arranjo de plantio					Quadrado					Retangular
2. Densidade de plantio					6000					10000
3. Disponibilidade de luz					Pleno sol					Autossombreada
4. Órgão da planta					Grão					Folha
Fatorial	Nível do Fator				Cafeína	Ácidos	Áçúcares	Cinzas	Lipídios	
Experimentos	1	2	3	4		clorogênicos	redutores			
1	-	-	-	-	0,7076	0,1430	0,2359	3,6209	15,4977	
2	+	-	-	-	0,7744	0,1145	0,2830	3,9136	13,9307	
3	-	+	-	-	1,3647	0,2571	0,4012	3,7277	15,3516	
4	+	+	-	-	0,8462	0,1697	0,2748	4,5344	12,5741	
5	-	-	+	-	1,2934	0,3302	0,2443	3,8701	11,3823	
6	+	-	+	-	0,8815	0,1609	0,3844	4,1961	11,0206	
7	-	+	+	-	1,9971	0,3221	0,1927	3,5024	14,9878	
8	+	+	+	-	1,2098	0,0932	0,1220	4,8217	14,9216	
9	-	-	-	+	0,3626	nd	0,1986	7,7986	1,1523	
10	+	-	-	+	0,3682	nd	0,2248	8,0091	1,3236	
11	-	+	-	+	0,3428	nd	0,5586	7,4659	1,5721	
12	+	+	-	+	0,6200	nd	0,4926	8,0338	1,2359	
13	-	-	+	+	0,6629	nd	0,1566	7,6018	1,2319	
14	+	-	+	+	0,5112	nd	0,3297	8,2847	1,8979	
15	-	+	+	+	1,0235	nd	0,5657	8,0121	2,8202	
16	+	+	+	+	0,4337	nd	0,3746	8,3366	2,6608	

Tabela 2- Média, desvio padrão e valores teste *t* emparelhados calculados para cafeína, ácidos clorogênicos, açúcares redutores, cinzas e lipídios para os fatores órgão, disponibilidade de luz, densidade e arranjo de plantio.

Fatores	Cafeína	Ácidos clorogênicos	Açúcares Redutores	Cinzas	Lipídios
Grãos	1,13±0.44	0,199±0.096	0,27±0.09 ^b	4,02±0.59	13,70±1.75
Folhas	0,54±0.23	0,000	0,38±0.16 ^b	8,00±0.37	1,79±0.67
<i>t</i> _{cal}	9,75	10,10	2,25	35,97	33,16
Sol	0,68±0.33	0,086±0.098	0,34±0.13	5,90±2.03 ^d	7,85±6.69
Sombra	0,99±0.52	0,113±0.141	0,30±0.15	6,12±2.14 ^d	7,66±5.73
<i>t</i> _{cal}	4,68	1,62	1,46	2,11	0,45
6000	0,69±0.33	0,094±0.117	0,27±0.08 ^c	5,97±2.14	7,24±6.00 ^e
10000	0,98±0.53	0,105±0.127	0,37±0.16 ^c	6,05±2.04	8,27±6.40 ^e
<i>t</i> _{cal}	4,44	0,94	2,30	0,74	2,74
Quadrado	0,97±0.55	0,132±0.149	0,32±0.16	5,70±2.08	8,00±6.58 ^f
Retangular	0,70±0.30	0,067±0.076	0,32±0.11	6,32±2.04	7,50±5.84 ^f
<i>t</i> _{cal}	3,50	3,39	0,14	4,95	2,09

a) Pares em negrito têm diferenças significativas ao nível de confiança de 99 %. *t*_{cal} (v=23, 99%) = 2,81.

b - f) Pares com as mesmas letras são diferentes no nível de confiança de 95 % *t*_{cal} (v=23, 95%) = 2,07.

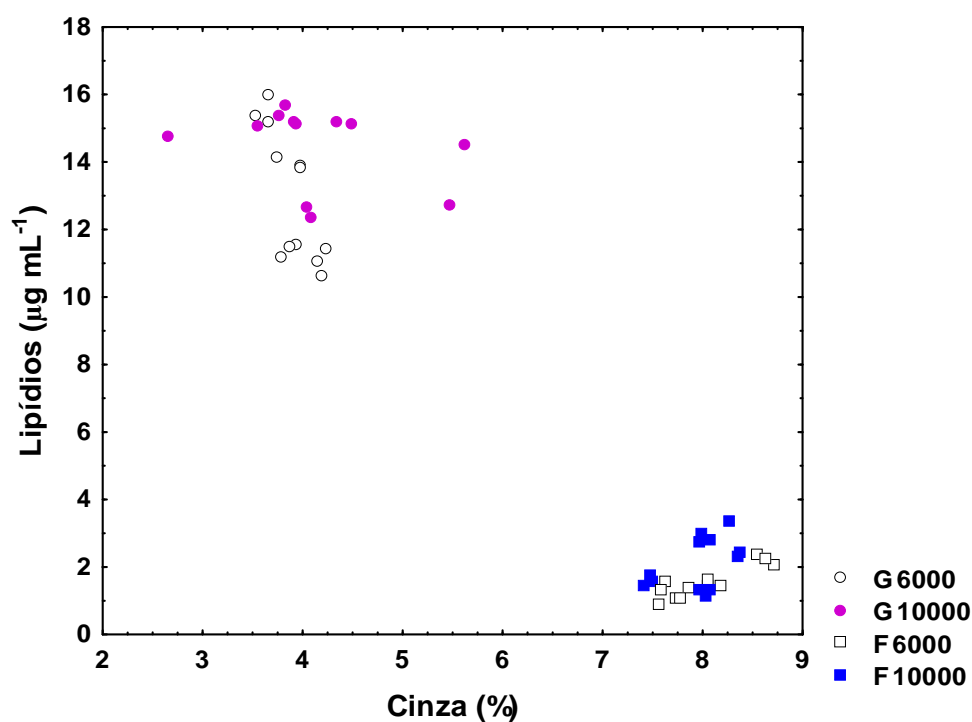


Figura 1. Gráfico de concentração de porcentagem de lipídios vs. cinzas. Os símbolos □ referem-se à baixa densidade do plantio; ◆ alta densidade do plantio - amostras de grão, □ baixa densidade e ■ alta densidade-amostras de folhas.

O teor de cinzas parece depender da condição de plantio da planta. O teste t para teores de cinzas nos arranjos quadrados e retangulares são significativos no nível de 99 % de confiança. O arranjo retangular resulta em 4,37 % e 8,28 % de cinzas para amostras de grãos e folhas em comparação com 3,68 % e 7,72 % para o arranjo quadrado. Isto pode ser visto na Figura 2 onde os pontos que representam arranjos retangulares estão localizados à direita e em valores mais altos de cinzas do que os arranjos quadrados. As médias para os arranjos quadrados e retangulares também mostram uma diferença significativa no nível de 95 % de confiança de acordo com os resultados do teste emparelhados.

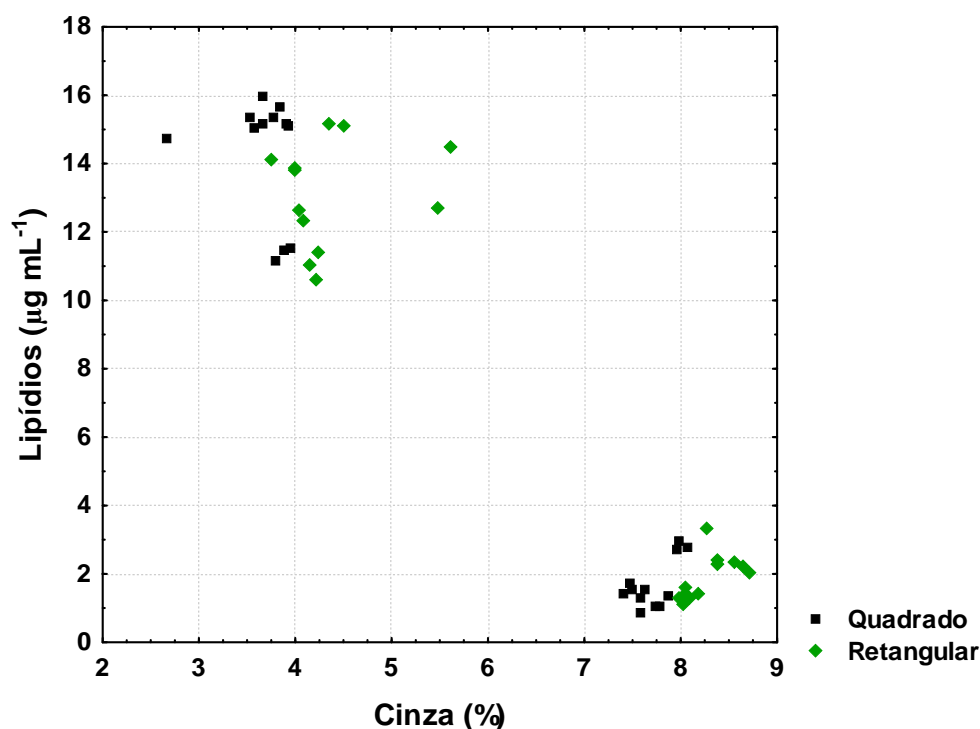


Figura 2. Gráfico de concentração de lipídios vs. porcentagem de cinzas. Os símbolos ◆ referem-se a amostras de arranjo de plantio retangular e ■ amostras de arranjo de plantio quadrado.

Os efeitos mais significativos sobre os ácidos clorogênicos e cafeína estão listados na Tabela 2, ocorrem nos fatores grãos e folhas. Como mencionado

Um padrão similar é encontrado para as amostras dos grãos, exceto que as dispersões em valores de cafeína e ácido clorogênico são maiores do que para as amostras de folhas. As concentrações de cafeína são $0,914 \mu\text{g mL}^{-1}$ para amostras de baixa densidade e $1,354 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as de alta densidade. A média de alta densidade é 48 % maior do que a de baixa densidade. As concentrações de ácidos clorogênicos são $0,211 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,187 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para as amostras de grãos de baixa e alta densidade. A Tabela 2 contém resultados significativos ao nível de 99 % pelo teste-*t* para concentrações de cafeína nos fatores de disponibilidade de luz e arranjos de plantios. A Figura 4 mostra o gráfico das concentrações de cafeína e ácido clorogênico, com símbolos que identificam as amostras em sol/sombra, disponibilidade de luz e arranjos de plantios quadrado / retangular. Para o arranjo de plantio quadrado - amostras autossombreada estão à direita das amostras em condições de luz solar direta. Esta mesma discriminação ocorre para amostras autossombreadas e em pleno sol no arranjo retangular em concentrações de cafeína mais baixas do que as amostras de arranjo quadrado. As Figuras 3 e 4 sugerem uma correlação significativa entre as concentrações de cafeína e ácido clorogênico das amostras de grãos. Os cálculos confirmam esta observação com $r = 0,78$.

Os açúcares redutores não têm nenhum efeito de valor significativo no nível de 99 % de confiança, mas os fatores órgão da planta e densidade mostram diferenças significativas em seus valores médios ao nível de 95 %. O planejamento fatorial mostrou que esses dois fatores têm um efeito de interação ($+0,142 \mu\text{g mL}^{-1}$), que é maior do que os dois principais efeitos ($0,108$ e $0,103 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esta grande interação é causada principalmente por grandes concentrações de açúcares redutores em amostras de folhas de plantas de alta densidade, que possuem uma média de $0,498 \mu\text{g mL}^{-1}$, que é cerca de duas vezes a média do restante das amostras, $0,262 \mu\text{g mL}^{-1}$.

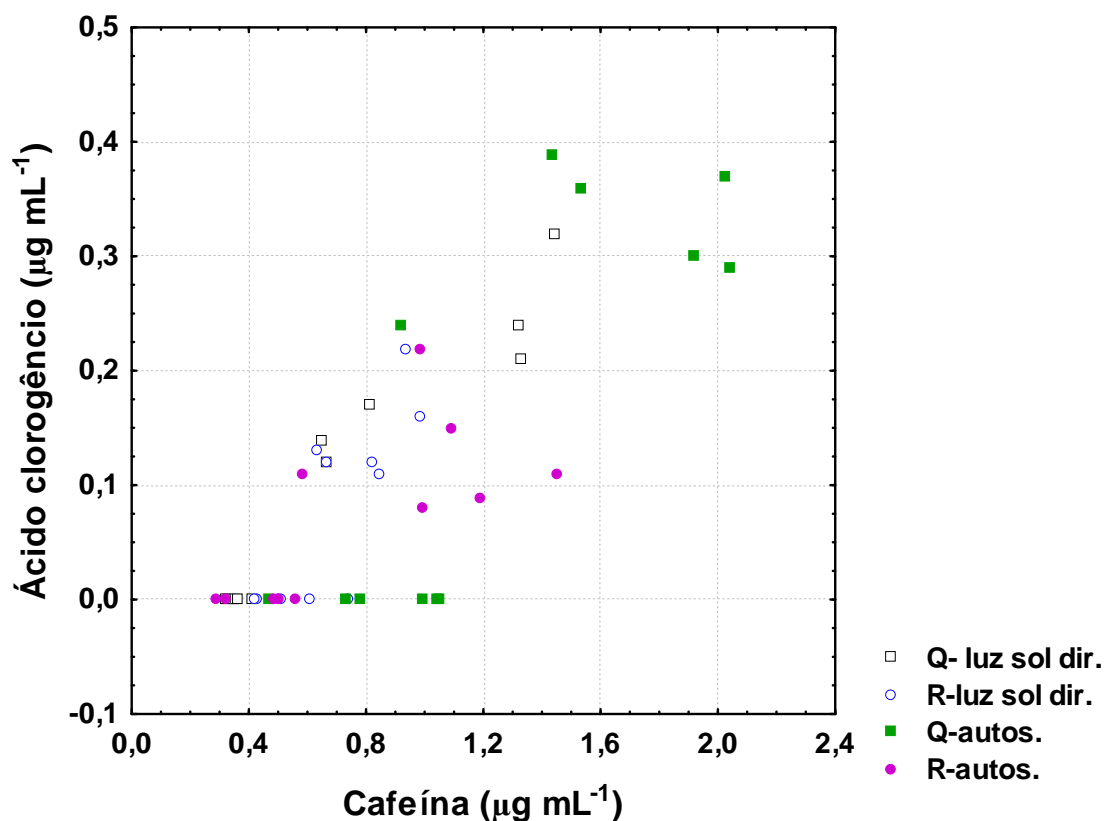


Figura 4. Gráfico de concentrações de cafeína vs. ácido clorogênico. Os símbolos ○ referem-se ao arranjo retangular - amostras de luz solar direta e ● arranjo retangular autossombreado - □ arranjo quadrado- luz solar direta e ■ arranjo quadrado - autossombreada.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho teve apoio do CNPq, Fundação Araucária e Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento de Cafés, agências de financiamento brasileiras.

REFERÊNCIAS

ANDROCIO FILHO, A. A. **Café adensado**: Espaçamentos e cuidados no manejo da lavoura. Circular 121, Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), p. 32, 2002.

ARAUJO, W. L.; DIAS, P. C.; MORAES, G. A.; CELIN, E. F.; CUNHA, R. L.; BARROS, R. S.; DAMATTA, F. M. Limitations to photosynthesis in coffee leaves from different canopy positions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 884- 890, 2008.

BARRADAS, V. L.; FANJUL, L. Microclimatic characterization of shaded and open-grown coffee (*Coffea arabica* L.) plantations in Mexico. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 38, n. 1, p. 101-112, 1986.

BERTRAND, B.; BOULANGER, R.; DUSSERT, S.; RIBEYRE, F.; BERTHIOT, L.; DESCROIX, F.; JOËT, T. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. **Food chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2575-2583, 2012.

CARVALHO, A. Pesquisas sobre o melhoramento do Café. **Anais da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz**, v. 43, n. 2, 793-809, 1986.

CÉSAR, F. R. C. F.; MATSUMOTO, S. N.; VIANA, A. S. E.; SANTOS, M. A. F.; BONFIM, J. A. Morfofisiologia foliar de cafeeiro sob diferentes níveis de restrição luminosa. **Coffee Science**, v. 5, n. 6, p. 262-271, 2010.

CECCHI, H. M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. 4. ed., Campinas: Unicamp, 2010. 208 p.

CHARBONNIER, F.; LE MAIRE, G.; DREYER, E. CASANOVES, F.; CHRISTINA, M.; DAUZAT, J.; EITEL, J. U. H.; VAAST, P.; VIÉRLING, L. A.; ROUPSARD, O. Competition for light in heterogeneous canopies: Application of MAESTRA to a Coffee (*Coffea arabica* L.) agroforestry system. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 181, p. 152–169, 2013.

CHAVES, A. R.; TEN-CATEN, A.; PINHEIRO, H. A.; RIBEIRO, A.; DAMATTA, F. M. Seasonal changes in photoprotective mechanisms of leaves from shaded and unshaded field-grown coffee (*Coffea arabica* L.) trees. **Trees**, v. 22, p. 351-361, 2008.

CUSTÓDIO, A. A. DE P.; POZZA, E. A.; CUSTÓDIO, A. A. DE P.; SOUZA, P. E. DE, LIMA, L. A.; LIMA, L. M. Intensidade da ferrugem e da cercosporiose em cafeeiro quanto à face de exposição das plantas. **Coffee Science**, v. 5, n. 3, p. 214-228, 2010.

CUSTÓDIO, A. A. D. P.; LEMOS, L. B.; MINGOTTE, F. L. C.; BARBOSA, J. C.; POLLO, G. Z.; SANTOS, H. M. D. Florescimento de cafeeiros sob manejos de irrigação, faces de exposição solar e posições na planta. **Coffee Science**, v. 9, n. 2, p. 245-257, 2014.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for calibration in analytical chemistry Pure. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, 1998.

DELAROZA, F.; RAKOCEVIC, M.; MALTA, G. B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Análise de impressões digitais cromatográficas e espectroscópicas da variação da composição de folhas do *Coffea arabica* sob diferentes condições de luz e fenofases da planta. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 1929-1938, 2014.

DE MENEZES, H. C. The relationship between the state of maturity of raw coffee beans and the isomers of caffeoylquinic acid. **Food chemistry**, v. 50, n. 3, p. 293-296, 1994.

FARAH, A. Coffee constituents. In: CHU, Y.-F., (Ed), **Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention**. 1, ed., Oxford: Wiley-Blackwell, p. 21-50, 2012.

FREITAS, R. B. DE; OLIVEIRA, L. E. M. D.; DELÚ FILHO, N.; SOARES, A. M. Influência de diferentes níveis de sombreamento no comportamento fisiológico de cultivares de café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, n. 4, 804-810, 2003.

FRIEND, D. J. C. Shade adaptation of photosynthesis in *Coffea arabica*. **Photosynthesis Research**, v. 5, p. 325- 334, 1984.

GEROMEL, C.; FERREIRA, L. P.; DAVRIEUX, F.; GUYOT, B.; RIBEYRE, F.; SCHOLZ, M. B. DOS S.; PEREIRA, L. F. P.; VAAST, P.; POT, D.; LEROY, T.; ANDROCIOLI FILHO, A.; VIEIRA, L. G. E.; MAZZAFERA, P.; MARRACCINI, P. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 5-6, p. 569-579, 2008.

GREENBERG, R.; BICHER, P.; ANGON, A. C.; MACVEAN, C.; PEREZ, R.; CANO, E. The impact of avian insectivory on arthropods and leaf damage in some Guatemalan coffee plantations. **Ecology**, v. 81, n. 6, p. 1750-1755, 2000.

ILLY, A. Quality. In: ILLY, A.; VIANI, R. (Eds), **Espresso coffee: the chemistry of quality**, 2. ed., San Diego: Elsevier Academic Press, p. 1-20, 2005.

LÄDERACH, P.; OBERTHÜR, T.; COOK, S.; IZA, M. E.; POHLAN, J. A.; FISHER, M.; LECHUG, R. R. les. Systematic agronomic farm management for improved coffee quality. **Field Crops Research**, v. 120, n. 3, p. 321-329, 2011.

LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P.; DUFOUR, M.; MONTAGNON, C.; POT, D. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 229-242, 2006.

LUNZ, A. M. P.; BERNARDES, M. S.; RIGHI, C. A.; FAVARIN, J. L.; COSTA, J. D.; CAMARGO, F. T. Uniformidade de maturação de frutos e classificação de grãos por peneira de café arábica sombreado e a pleno sol. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, Água de Lindoia, 2007. **Anais...**Brasília, Embrapa Café, 2007.

MAESTRI, M.; BARROS, R. S.; RENA, A. B. Coffee. In: LAST, F. T. (Ed.). **Tree Crop Ecosystems**, Amsterdam: Elsevier Publishers, p. 339-360, 2001.

MARTINEZ, H. E. P.; AUGUSTO, H. S.; CRUZ, C. D.; PEDROSA, A. W.; SAMPAIO, N. F. Vegetative growth of the coffee plant (*Coffea arabica* L.) and its correlation with the production in narrower spacing. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 29, n. 4, p. 481-489, 2007.

MATOS, F. S.; WOLFGRAMM, R.; GONÇALVES, F.V.; CAVATTE, P. C.; VENTRELLA, M. C.; DAMATTA, F. M. Phenotypic plasticity in response to light in the coffee tree. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 2, p. 421-427, 2009.

MORAIS H.; CARAMORI, P. H.; RIBEIRO, A. M. D. A.; GOMES, J. C.; KOGUISHI, M. S. Microclimatic characterization and productivity of coffee plants grown under shade of pigeon pea in Southern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, 763-770, 2006.

MULETA, D.; ASSEFA, F.; NEMOMISSA, S.; GRANHALL, U. Composition of coffee shade tree species and density of indigenous arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) spores in Bonga natural coffee forest, southwestern Ethiopia. **Forest Ecology and Management**, v. 241, n. 1, p. 145-154, 2007.

NELSON, N. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, v. 153, n. 2, p. 370-380, 1944.

OKUBO, S.; TOMATSU, A.; MUHAMAD, D.; HARASHINA, K.; TAKEUCHI, K. Leaf functional traits and functional diversity of multistoried agroforests in West Java, Indonesia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 149, p. 91-99, 2012.

PINTO NETO, J. N.; ALVARENGA, M. I. N.; CORRÊA, M. de P.; OLIVEIRA, C. C. Efeito das variáveis ambientais na produção de café em um sistema agroflorestal. **Coffee Science**, v. 9, n. 2, p. 187-195, 2014.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, 268-277, 1996.

PREZOTTI, L. C.; DA ROCHA, A. C. Nutrição do cafeeiro arábica em função da densidade de plantas e da fertilização com NPK; **Bragantia**, v. 63, n. 2, p. 239-251, 2004.

RICCI, M. D. S. F.; COSTA, J. R.; PINTO, A. N.; SANTOS, V. L. D S. Cultivo orgânico de cultivares de café a pleno sol e sombreado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 41, n. 4, p. 569-575, 2006.

RICCI, M. DOS S. F.; COSTA, J. R.; DE OLIVEIRA, N. G. Utilização de componentes principais para analisar o comportamento do cafeeiro a pleno sol e sombreado. **Coffee Science**, v. 6, n. 1, p. 44-54, 2011.

SAKAI, E.; BARBOSA, E. A. A.; SILVEIRA, J. M. DE C.; PIRES, R. C. DE M. A. *Coffee* productivity and root systems in cultivation schemes with different population arrangements and with and without drip irrigation. **Agricultural Water Management**, v. 148, n. 31, p. 16-23, 2015.

STEIMAN, S.; IDOL, T.; BITTENBENDER, H. C.; GAUTZ, L. Shade coffee in Hawai'i—Exploring some aspects of quality, growth, yield. **Scientia Horticultura and Nutrition**, v.128, n. 2, p. 152-158, 2011.

TERESSA, A.; CROUZILLAT, D.; PETIARD, V.; BROUHAN, P. Genetic diversity of arabica coffee (*Coffea arabica* L.) collections. **EJAST**, v. 1, n. 1, p. 63-79, 2010.

VAAST, P.; BERTRAND, B.; PERRIOT, J-J.; GUYOT, B.; GÉNARD, M. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica* L.) under optimal conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 2, 197-204, 2006.

VOLTAN, R. B. Q.; FAHAL, J. I.; CARELLI, M. L. C. Variação na anatomia foliar de cafeeiros submetidos a diferentes intensidades luminosas, **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 4, n. 2, p. 99-105, 1992.

ZENEBO, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos. 4. ed./1. ed. digital, Instituto Adolfo Lutz: São Paulo, 2008. 1020 p.



CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

A utilização de planejamentos fatoriais, bem como planejamento de misturas simplex-centroide nas extrações de folhas e grãos de *Coffea arabica* foram fundamentais para obter a impressão digital cromatográfica e espectroscópica e respostas concisas nos sistemas estudados. Com o uso deste recurso foi possível obter novas informações e também confirmar as já existentes na literatura.

Fortes correlações foram encontradas entre os espectros obtidos nas diferentes condições de temperatura, modo de extração e número de remacerações com os parâmetros solvatocrômicos. Os espectros de infravermelho comparados aos loadings das componentes principais mostrou que ligninas, carboidratos, polissacarídeos e cafeína parecem depender da condição de extração.

A abordagem de impressão digital por FTIR, HPLC-UV-DAD e análise química clássica mostrou que o conteúdo de cafeína, teobromina e ácido clorogênico em *Coffea arabica* folhas expostas ao sol são cerca do dobro dos encontrados nas folhas autoprotetida, indicando que as condições expostas ao sol são mais estressantes do que autossombreada. As concentrações lipídicas em folhas de *Coffea arabica* autossombreadas são cerca do dobro daquelas expostas à luz solar direta, o que indica o papel protetor lipídico eficiente dos produtos do metabolismo secundário na sombra.

Nas densidades 10.000 *versus* 6.000 plantas.ha⁻¹ as concentrações mais elevadas de cafeína estão relacionadas a maior densidade de plantio, em grãos e folhas, porém esta tendência é maior nos grãos.

A comparação entre os arranjos mostrou que arranjos retangulares possuem menores teores de cafeína, nos dois sistemas de luminosidade. O teor de cafeína, neste estudo parece estar muito relacionado ao tipo de arranjo.

Os teores de ácidos clorogênicos foram maiores em baixa densidade, assim com a cafeína.

Este estudo mostrou também que existe correlação entre cafeína e ácido clorogênico para as formas de plantio (10.000 *versus* 6.000 plantas.ha⁻¹) estudadas.

Os teores de cinzas não foram significativos em relação à densidade de plantas, porém foram significativos aos arranjos de plantios. Arranjos retangulares apresentaram maiores teores de cinzas que os arranjos quadrados em folhas e grãos.