



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CLÁUDIA DOMICIANO TORMENA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
ASSOCIADOS AOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM
METABOLÔMICA:
EFEITO DO INCREMENTO DE CO₂ ATMOSFÉRICO EM
FOLHAS E GEMAS DE *Coffea arabica***

CLÁUDIA DOMICIANO TORMENA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS
ASSOCIADOS AOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM
METABOLÔMICA:
EFEITO DO INCREMENTO DE CO₂ ATMOSFÉRICO EM
FOLHAS E GEMAS DE *Coffea arabica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ieda Spacino Scarminio

Londrina
2018

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

Tormena, Cláudia Domiciano.

Desenvolvimento de métodos analíticos associados aos métodos quimiométricos em metabolômica: efeito do incremento de CO₂ atmosférico em folhas e gemas de *Coffea arabica* / Cláudia Domiciano Tormena. - Londrina, 2018.
80 f. : il.

Orientador: Ieda Spacino Scarminio.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, , 2018.
Inclui bibliografia.

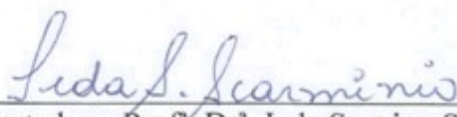
1. *Coffea arabica* - Tese. 2. Dioxido de carbono - Tese. 3. Quimiometria - Tese. 4. UV-Vis - Tese. I. Scarminio, Ieda Spacino. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. . III. Título.

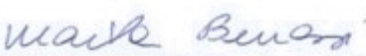
CLÁUDIA DOMICIANO TORMENA

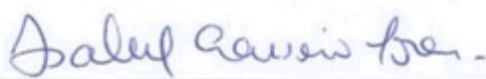
**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS ASSOCIADOS
AOS MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS EM METABOLÔMICA:
EFEITO DO INCREMENTO DE CO₂ ATMOSFÉRICO EM FOLHAS E
GEMAS DE *Coffea arabica***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

BANCA EXAMINADORA


Orientadora: Prof.^a. Dr.^a. Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina - UEL


Prof. Dr.^a. Marta de Toledo Benassi
Universidade Estadual de Londrina - UEL


Prof. Dr.^a. Isabel Craveiro Moreira
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Londrina, 14 de novembro de 2018.

Dedico este trabalho à minha família. Aos meus pais, minha avó e minha tia por todo o amor, paciência e carinho dedicado a mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me abençoar todos os dias durante esta caminhada.

A minha família, por todo apoio, incentivo e amor transmitido mesmo a alguns quilômetros de distância.

A minha orientadora Dr^a Ieda Spacino Scarminio, pela amizade, apoio e orientação durante esses anos. Tenho uma grande admiração não só pela profissional, mas sobretudo pela pessoa que é.

Ao amigo e parceiro de laboratório Me. Gustavo Galo Marcheafave, não só pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho, mas principalmente pela amizade construída, o apoio nos dias difíceis e pelas risadas compartilhadas.

Ao professor Dr. Roy Edward Bruns pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos e pela amizade.

Aos colegas do laboratório de quimiometria em ciências naturais (LQCN), em especial a Elis Daiane Pauli por toda ajuda e ensinamentos compartilhados.

A todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para a finalização desta etapa da minha vida.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, pelos ensinamentos.

Aos membros da banca pela disposição e participação. E a todos que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho, meu muito obrigada!

**Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota.**

Madre Teresa de Calcutá

TORMENA, Cláudia Domiciano. **Desenvolvimento de métodos analíticos associados aos métodos quimiométricos em metabolômica:** efeito do incremento de CO₂ atmosférico em folhas e gemas de *Coffea arabica*. 2018. 78 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Embora o CO₂ seja um dos maiores gases do efeito estufa, existem muitas incertezas a respeito dos efeitos do aumento da sua concentração na composição química das plantas, especialmente as de grande interesse comercial. Este trabalho reporta o primeiro estudo metabólico do impacto do dióxido de carbono (CO₂) nas gemas e folhas de plantas de *Coffea arabica* L. cultivadas em atmosfera ambiente de CO₂ (390 µL CO₂ L⁻¹) e atmosfera com incremento desse gás (590 µL CO₂ L⁻¹). Planejamento estatístico de mistura, extração em fase sólida, espectrofotometria, espectroscopia no infravermelho próximo e análise multivariada foram utilizados para a obtenção e análise dos dados. O método de discriminação multivariada mostrou que gemas e folhas alteraram a composição química devido ao aumento da concentração de CO₂. Folhas cultivadas em alta concentração de CO₂ mostraram um aumento significativo na banda de cafeína em 272 nm do UV-Vis, em comparação com as amostras cultivadas em nível ambiente de CO₂, indicando um aumento substancial na abundância de cafeína, que pode ser atribuído ao equilíbrio químico de sua biossíntese. Para as folhas da planta, são encontrados maiores níveis de ácidos fenólicos em folhas cultivadas em alta concentração de CO₂ ao passo que não nenhum aumento foi encontrado para as bandas de caveol, canferol e quercetina. Através da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) aliada ao método mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA) foi possível confirmar que um dos metabólitos discriminador para as amostras de folhas são do tipo metilxantinas por apresentar bandas em 1572, 1610, 1664, 1684 e 1698 nm, características dessas substâncias e indicadas pelos valores dos VIPs. Após a suspensão da injeção de CO₂ as amostras de folhas apresentaram similaridade na composição química àquelas cultivadas em CO₂ ambiente tanto na análise de fator (AF) quanto no método de mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA).

Palavras-chave: Dióxido de carbono. UV-Vis. CLAE. NIR. Quimiometria.

TORMENA, Cláudia Domiciano. **Development of analytical methods associated with chemometric methods in metabolomics: effect of atmospheric CO₂ increase on leaves and buds of *Coffea arabica***. 2018. 78 p. Dissertation (Master's Degree Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Although CO₂ is one of the largest greenhouse gases there are innumerable uncertainties regarding the effects of increasing concentration on the chemical composition of plants, especially those of great commercial interest. The first metabolic study of the impact of elevated CO₂ on the buds and leaves of *Coffea arabica* L. plants grown in current atmosphere of CO₂ (390 µL CO₂ L⁻¹) and an atmosphere with an increase of this gas (590 µL CO₂ L⁻¹) is being reported. Statistical mixture design, solid phase extraction, spectrophotometry, near infrared spectroscopy and multivariate analysis were used to obtain and analyze the data. Multivariate discrimination techniques showed that buds and leaves altered their chemical composition due to the increase in CO₂ concentration. Leaves grown at high CO₂ concentration showed a 32% area increase in the caffeine band at 272 nm of UV-Vis compared to samples grown at current CO₂ level, indicating a substantial increase in caffeine abundance, which may be attributed to the chemical balance of its biosynthesis. For the leaves of the plant, higher levels of phenolic acids are found in leaves cultivated in elevated CO₂ concentration whereas no increase was found for the bands of kahweol, kaempferol and quercetin. Through the Near Infrared spectroscopy (NIR) and the Partial Least Squares with Discriminant Analysis PLS-DA method it was possible to confirm that one of the discriminant metabolites for leaf samples is of the methylxanthines type because it has bands in 1572, 1610, 1664, 1684 and 1698 nm, characteristics of these substances and indicated by the values of VIPs. After the CO₂ injection suspension, the leaf samples showed similarity in the chemical composition to those grown in current CO₂ in both factor analysis (AF) and Partial Least Squares with Discriminant Analysis PLS-DA.

Key words: Carbon dioxide. UV-Vis. HPLC. NIR. Chemometrics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Esquema de posições da coleta de folhas e gemas de plantas de *Coffea arabica* cultivadas sob níveis ambiente e enriquecido com CO₂ nas instalações FACE. O ramo ortotrópico é o caule principal, enquanto as orientações cardinais são relacionadas aos ramos plagiotrópicos de 2ª e 3ª ordem sobre o perfil vertical da planta..... 32
- Figura 2.** Planejamento estatístico de mistura de três componentes (éter etílico, diclorometano e metanol) utilizando como extratores componentes puros, misturas binárias e mistura ternária. 33
- Figura 3.** Figura 3. Gráfico dos escores da análise de fator para a composição química de gemas coletadas de plantas cultivadas em níveis de CO₂ ambiente (●) e CO₂ elevado (▲) no experimento FACE, destacando-se as eluições realizadas com diclorometano puro (d)..... 37
- Figura 4.** a) Gráfico dos escores dos espectros de UV-Vis de gemas coletadas de plantas de *Coffea arabica* cultivadas em níveis de CO₂ ambiente (●) e CO₂ elevado (▲) no experimento FACE. b) Gráfico do loading para os dois primeiros fatores. 39
- Figura 5.** Gráfico do escore da análise de fator para as frações extraídas com os solventes do planejamento estatístico de misturas para as folhas de café cultivadas em CO₂ ambiente (●) e CO₂ elevado (▲) no experimento FACE. 41
- Figura 6.** Espectros médios de absorção UV-Visível para as frações eluídas correspondente ao planejamento de misturas para folhas de *Coffea arabica* obtida de dois grupos pela análise fatorial, a) Grupo 1 (d, dm, ed, edm) b) Grupo 2 (e, em, m)..... 43
- Figura 7.** Ampliação de parte do quadrante positivo do gráfico dos dois primeiros fatores para as folhas coletadas de plantas cultivadas em CO₂ ambiente e elevado no experimento FACE..... 43

Figura 8.	a) Gráfico dos escores da análise de fator dos espectros de UV-Vis de amostras de folhas de <i>Coffea arabica</i> cultivadas em níveis de CO ₂ ambiente (●) e CO ₂ elevado (▲) no experimento FACE e tratada com a mistura ternária. b) Gráfico dos loading para os dois primeiros fatores.....	45
Figura 9 –	Estratégia para determinar um gradiente cromatográfico otimizado para o extrato edm de amostras de folhas de <i>Coffea arabica</i> L.	47
Figura 10.	a) Espectros de cafeína obtidos a partir dos extratos edm de folhas de <i>Coffea arabica</i> coletadas de plantas cultivadas em níveis de CO ₂ ambiente e elevado no experimento FACE. b) Espectros característicos para caveol, canferol e quercetina presentes nas folhas de <i>Coffea arabica</i>	49
Figura 11.	Gráfico dos escores do espectros de UV-Vis para amostras de folhas de <i>Coffea arabica</i> coletadas sete meses (Fevereiro, 2017) após a suspensão da injeção de CO ₂ nos campos para os extratos de edm . CO ₂ ambiente (●) e sete meses após a injeção de CO ₂ ser interrompida (▲).....	51

CAPÍTULO III

Figura 1.	Posições esquemáticas das folhas de <i>Coffea arabica</i> L. coletadas de plantas cultivadas em atmosferas elevada e ambiente de CO ₂ sob o experimento FACE.	63
Figura 2.	Esquema das medidas de reflectância realizada nas folhas de <i>Coffea arabica</i> L. cultivadas nos dois ambientes de CO ₂	64
Figura 3.	Espectro do infravermelho próximo das amostras de folhas de <i>Coffea arabica</i> L. cultivadas em CO ₂ ambiente e CO ₂ elevado após a aplicação de MSC e segunda derivada conjuntamente.	66
Figura 4.	a) Escores entre LV1 vs. LV3 do modelo PLS-DA para as folhas de <i>Coffea arabica</i> L. cultivadas em atmosfera de CO ₂ elevada e ambiente. b) Gráfico dos loadings das LV1 e LV3. Folhas em: CO ₂ elevado de calibração (▼), CO ₂ elevado de validação (■), CO ₂ ambiente de calibração (★) e CO ₂ ambiente de validação (◆).....	68
Figura 5.	Gráfico dos VIP escores para o modelo PLS-DA para as amostras cultivadas em CO ₂ ambiente e CO ₂ elevado.....	69

Figura 6. Distribuição das amostras de calibração e validação nas classes para folhas de *Coffea arabica* L. cultivadas em a) CO₂ elevado e b) CO₂ ambiente. Folhas em: CO₂ elevado de calibração (▼), CO₂ elevado de validação (■), CO₂ ambiente de calibração (★) e CO₂ ambiente de validação (◆). 71

Figura 7. Distribuição das amostras de folhas de *Coffea arabica* coletadas após sete meses de interrupção de CO₂ cultivadas em condições anteriormente a) CO₂ elevado e b) CO₂ ambiente, utilizando o modelo PLS-DA desenvolvido a partir do conjunto de espectros (NIR) de calibração das folhas enriquecidas de CO₂ e ambiente. Folhas em: CO₂ elevado de calibração (▼), CO₂ sete meses depois (■), CO₂ ambiente de calibração (★) e ambiente sete meses depois (◆) 72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1.	Planejamento estatístico de mistura para o fracionamento e seus respectivos parâmetros de força da fase móvel em ordem crescente de eluição	34
Tabela 2.	Composição da fase móvel inicial para o gradiente de eluição das corridas cromatográficas.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Análise de Componente Principal
AF	Análise de Fator
CDIAC	<i>Carbon Dioxide Information Analysis Center</i>
CLAE-PDA	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Arranjo Diodos
CO ₂	Dióxido de carbono
CV	Validação Cruzada
d	Diclorometano
dm	Diclorometano/Metanol
e	Éter etílico
ed	Éter etílico/Diclorometano
edm	Éter etílico/Diclorometano/Metanol
em	Éter etílico/Metanol
FACE	<i>Free Air Carbon Enrichment</i>
GEE	Gases de efeito estufa
IES-MS	Espectrometria de Massa por Ionização Eletrospray
IPCC	<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>
m	Metanol
MSC	<i>Multiplicative Scatter Correction</i>
N ₂	Nitrogênio
NIR	Infravermelho próximo
PLS	<i>Partial Least Squares</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Squares for Discriminant Analysis</i>
RMSECV	<i>Root Mean Square Error of Cross Validation</i>
RMSEP	<i>Root Mean Square Error of Prediction</i>
UV-Vis	Ultravioleta visível
VIP	Importância da Variável na Projeção
VL	Variável Latente
β	Basicidade
ε°	Parâmetro de Força da Fase Móvel

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	11
1.1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1.1. Objetivos Específicos	13
1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.2.1. <i>Coffea arabica</i> L.	14
1.2.2. <i>Dióxido de carbono</i>	16
1.2.3. <i>Métodos Quimiométricos</i>	17
1.2.3.1. <i>Planejamento estatístico de misturas</i>	18
1.2.3.2. <i>Análise de fator</i>	18
1.2.3.3. <i>Regressão dos quadrados mínimos parciais com análise discriminante</i>	19
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO II	27
2.1. INTRODUÇÃO	28
2.2. MATERIAIS E MÉTODOS	30
2.2.1. <i>Material Vegetal</i>	30
2.2.2. <i>Preparo das frações</i>	32
2.2.3. <i>Extração em fase sólida (SPE)</i>	33
2.2.4. <i>Aquisição espectroscópica UV-Vis</i>	34
2.2.5. <i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	34
2.2.6. <i>Espectrometria de massa direta (IES-MS)</i>	35
2.2.7. <i>Análise estatística</i>	36
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
2.3.1. <i>Perfil metabólico de gemas de café após o cultivo em CO₂ elevado</i>	36
2.2.2. <i>Discriminação do diclorometano para as gemas</i>	38
2.2.3. <i>Perfil metabólico de folhas de café após o cultivo em CO₂ elevado</i>	40
2.2.1. <i>Discriminação da mistura ternária para as folhas</i>	44
2.2.1. <i>Identificação dos metabólitos predominantes em folhas de café cultivadas em CO₂ elevado</i>	46
2.2.1. <i>Efeito epigenético no perfil metabólico em folhas de café para plantas cultivadas em concentrações de CO₂ elevado e posteriormente em CO₂ ambiente</i>	50

2.4.	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO III		60
3.1.	INTRODUÇÃO	61
3.2.	MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.2.1.	<i>Cultivo do café</i>	63
3.2.2.	<i>Medida espectroscópica no infravermelho próximo</i>	64
3.2.3.	<i>Tratamento dos dados</i>	64
3.3.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
3.4.	CONCLUSÃO	73
	REFERÊNCIAS	74
CAPÍTULO IV		79
4.1.	CONCLUSÃO GERAL	80

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por 4 capítulos. No Capítulo 1 é apresentada uma introdução geral e uma pequena revisão bibliográfica sobre o café, o dióxido de carbono e os métodos quimiométricos como análise de fator (AF) e reconhecimento de padrão supervisionado baseado em mínimos quadrados parciais com análise discriminante (PLS-DA).

O Capítulo 2 tem como objetivo a otimização de um método para identificar as mudanças metabólicas em folhas e gemas de *Coffea arabica* L. cultivadas em atmosfera elevada de CO₂ e avaliar o eventual efeito epigenético após essas plantas retornarem a atmosfera ambiente de CO₂ através de técnicas analíticas integradas. Os resultados desse trabalho encontram-se publicados no periódico científico Talanta (Tormena, C. D., Marcheafave, G. G., Rakocovic, M., Bruns, R. E., & Scarminio, I. S. Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds. Talanta, 2019, 191, 382-389. doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.002).

O Capítulo 3 tem como objetivo a construção de um modelo PLS-DA para discriminar as amostras de folhas de *Coffea arabica* L. cultivadas em atmosfera elevada de CO₂ e aplicar este modelo às folhas após retornarem a atmosfera ambiente de CO₂. Os resultados referente a esse trabalho serão publicados em um periódico científico e encontra-se na fase de redação.

No Capítulo 4 apresenta-se uma conclusão geral acerca do trabalho desenvolvido.



CAPÍTULO I

1.1. INTRODUÇÃO GERAL

Desde a criação do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC, do inglês *Intergovernmental Panel on Climate Change*) houve o aumento constante no interesse sobre as mudanças climáticas e possíveis causas para essa mudança. A partir do quarto relatório, publicado em 2007, admitiu-se com 95% de certeza científica que a maior causa das alterações climáticas são as atividades antrópicas.¹

As atividades antrópicas provocam o aumento da concentração de diferentes gases do efeito estufa (GEE), particularmente do dióxido de carbono (CO₂). O aumento dessa concentração de CO₂ pode alterar de forma significativa processos fundamentais em diversas espécies agronômicas com grande importância financeira.² Por ser uma bebida de grande valor econômico e uma das mais consumidas no mundo, o café é uma das *commodities* agrícolas com produção e comercialização apontadas como fatores de risco diante das mudanças climáticas.³⁻⁶

Devido a sua importância econômica, alguns estudos estão sendo realizados para verificar como a exposição a estresses, tanto bióticos como abióticos, alteram a resposta e composição metabólica da planta podendo deixá-la mais resistente a exposições futuras.⁷ A mudança da composição metabólica das folhas de café expostas a diversos estresses já vêm sendo estudada⁸⁻¹⁰, assim como a reação das gemas ao alterar as condições originais do cultivo da planta¹¹, contudo nada relacionado a exposição a altas concentrações de CO₂. Como as folhas possuem uma grande quantidade de informações, a utilização de técnicas analíticas associadas a métodos quimiométricos possibilitam a identificação das fontes de variação metabólica nestas plantas.

Diversas técnicas analíticas vêm sendo utilizadas para detectar e identificar os constituintes químicos de amostras complexas, incluindo espectrofotometria no ultravioleta-visível (UV-Vis)¹⁰, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo diodos

(CLAE-DAD)⁸, e mais recentemente a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR).¹² A utilização dessas técnicas gera uma abundância de dados, se fazendo necessário o uso de ferramentas quimiométricas para a análise e interpretação dos dados. Neste contexto, o objetivo geral dessa pesquisa foi determinar, através de técnicas analíticas e métodos quimiométricos, as diferenças metabólicas de folhas e gemas de *Coffea arabica* L. cultivadas em atmosfera ambiente de dióxido de carbono e atmosfera com o aumento da concentração do gás.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Determinar o solvente extrator que discrimina as amostras de folhas e gemas foliares de *Coffea arabica* L. cultivadas nas duas atmosferas de CO₂;
- Avaliar, através de instrumentos analíticos robustos, o possível metabólito presente nos extratos que discrimina as duas condições de cultivo;
- Avaliar a possível utilização da espectroscopia NIR aliada ao PLS-DA para a discriminação das amostras de folhas cultivadas nas duas atmosferas de CO₂;
- Determinar a eventual memória epigenética nas folhas após a interrupção do incremento de CO₂ na atmosfera na qual estavam cultivadas.

1.2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 *Coffea arabica* L.

O cafeeiro é uma planta que pertence a ordem Rubiales, família das *Rubiaceas* e gênero *Coffea*. Dentro do gênero *Coffea* existem diversos subgêneros, um deles e o qual o café pertence é o *Eucoffea*.¹³ De acordo com a região em que o cafeeiro se origina pode ocorrer variação na quantidade de compostos químicos e na sua aparência. É uma planta que advém de regiões tropicais do planeta, entre os trópicos de Câncer e Capricórnio.¹⁴ O café é originário das florestas Etiópia, Quênia, Sudão e Congo e através dos holandeses ele chegou a Europa. Em 1727 os primeiros grãos de café chegaram ao Brasil e aos poucos as plantações de café foram sendo disseminadas até se tornar o maior produtor do grão.¹⁵⁻¹⁷

Existem mais de 100 espécies do gênero *Coffea*, sendo 25 delas as mais estudadas. Dentro dessas 25 espécies de maior estudo, duas possuem maior interesse econômico que são *Coffea canephora* Pierre ex A.Froehner e *Coffea arabica* L. sendo que esta última representa cerca de 60-70% de todo o café mundialmente produzido.^{13,15,18}

A produção econômica de *Coffea arabica* L. é possível em certo âmbito geográfico e climático, como por exemplo, as temperaturas diurnas e sazonais devem se aproximar de um ótimo de 18 – 24°C. Temperaturas acima desse ótimo podem acarretar em efeitos adversos no crescimento, rendimento e qualidade do café.^{19,20} Quanto a pluviosidade, a produtividade do café é satisfatória em áreas com chuvas bem distribuídas e ocasionais de alta intensidade, atingindo uma média de 1800 mm por ano.¹⁹

Além da temperatura e pluviosidade, a altitude é um importante fator para a qualidade do grão de café arábico. As plantações desenvolvidas em regiões montanhosas levam um período maior para a maturação dos grãos, visto que há menor quantidade de oxigênio e por isso os grãos possuem um sabor mais intenso.³ *C. arabica* cresce em altitudes preferencialmente acima de 1000 – 2000 metros ocorrendo em regiões tropicais do planeta.¹⁴

O cafeeiro é uma planta perene, ou seja, leva dois anos para completar seu ciclo fenológico. A durabilidade desta planta é de aproximadamente 10 a 15 anos na natureza, contudo sua produtividade diminui consideravelmente após poucos anos e por isso as árvores comerciais devem ser regularmente renovadas.¹³ Primeiramente formam-se os ramos vegetativos e as gemas foliares que levam cerca de sete meses para completar sua formação. As gemas ortotrópicas (verticais) podem formar os ramos plagiotrópicos (horizontais) e também permanecerem adormecidas para produzirem as inflorescências. As gemas florais ficam adormecidas até estarem prontas para a antese e posteriormente a florada do cafeeiro. Em seguida, ocorre a granação dos frutos e fase de maturação, e, após a colheita, a auto-poda em que ocorre a morte dos ramos plagiotrópicos.^{21,22}

A produção de café no Brasil é uma das atividades agrícolas mais importantes sendo o maior produtor e exportador e o segundo maior consumidor, colhendo aproximadamente 55 milhões de sacas na safra 2016/2017 e consumindo aproximadamente 20 mil sacas em 2016/2017.^{23,24}

Os contrastes climáticos desempenham um papel importante para o desenvolvimento do ciclo fenológico do cafeeiro, pois afetam a floração e a maturação do fruto.²⁵ Portanto, a produção de *C. arabica* é altamente dependente do clima e isso a torna uma das atividades humanas mais sensíveis à variação climática.^{5,26} As alterações climáticas trazem consigo mudanças drásticas na temperatura e na pluviosidade e alguns modelos de predição indicam que até 2100 o Brasil irá perder 95% da sua área de plantio de café arábica e até 2080 haverá uma redução de 90% da produção em regiões africanas.^{20,26} A principal causa das mudanças climáticas é o aumento da concentração dos chamados gases de efeito estufa (GEE) pela atividade antrópica, dentre os gases que provocam esse efeito o principal deles é o dióxido de carbono. Por isso, se torna importante o estudo de órgãos vegetativos para monitorar o efeito das alterações atmosféricas no cafeeiro.

1.2.2. Dióxido de carbono

O dióxido de carbono (CO_2) é um gás incolor e inodoro formado por um átomo de carbono e dois átomos de oxigênios ligados por uma ligação dupla e é um fraco ácido de Lewis.²⁷ O CO_2 ocorre naturalmente na atmosfera em pequenas quantidades, e é uma molécula fundamental na fotossíntese, no ciclo do carbono e na respiração.²⁸

O CO_2 é um dos principais gases do efeito estufa de origem antropogênica.²⁹ O aumento da concentração desse gás na atmosfera iniciou após o começo da revolução industrial, na qual a queima de combustíveis fósseis se intensificou.³⁰

Durante a era pré-industrial o nível de CO_2 na atmosfera era de 278 ppm representando o equilíbrio de fluxos entre a atmosfera, os oceanos e a biosfera terrestre. Em 2016 essa concentração aumentou em 145% devido, principalmente, às emissões da combustão de combustíveis fósseis e produção de cimento, o desmatamento e outras mudanças no uso da terra. A média de concentração de CO_2 em 2016 foi de $403 \pm 0,01$ ppm.²⁹ Estima-se que esse aumento pode continuar durante o século XXI chegando a concentração de 550 ppm.³¹

O CO_2 é a primeira fonte de carbono no desenvolvimento das plantas, proveniente da assimilação do gás da atmosfera^{32,33} e apesar do aumento da sua concentração atmosférica ser um dos principais causadores do efeito estufa, o aumento antropogênico desse gás traz outras consequências para as plantas.³⁴ Segundo alguns trabalhos, o aumento da concentração de CO_2 provoca na planta o aumento da taxa fotossintética, a diminuição na condutância estomática e o aumento da eficiência no uso de água.^{6,34,35}

Instalações artificiais como, câmaras de crescimento e câmaras de topo aberto possibilitam o estudo das respostas a curto prazo de exposição a alta concentração de dióxido de carbono. Por outro lado, o sistema de enriquecimento de CO_2 ao ar livre (FACE, *Free Air Carbon Enrichment*) possibilita o estudo a médio e longo prazo das respostas fisiológicas de

plantas expostas a concentrações elevadas de CO₂.³⁶

O sistema FACE visa estudar o crescimento e desenvolvimento das plantas quando expostas aos níveis de CO₂ previstos para o fim do século. A tecnologia FACE não utiliza ambientes fechados na sua estrutura, em vez disso ela usa uma série de tubos verticais ou horizontais para a liberação dos jatos do gás CO₂ puro. Comparado a outros tipos de experimentos para o cultivo de plantas em enriquecimento de CO₂ (i.e. câmaras de crescimento e câmaras de topo aberto), sua principal vantagem é que não modifica os fatores ambientais tais como a radiação solar incidente, temperatura, umidade e vento, fatores estes que podem influenciar na resposta final do experimento.^{31,36,37}

1.2.3. *Métodos quimiométricos*

A quimiometria é a ciência que utiliza de métodos estatísticos e matemáticos para obter informações úteis e objetiva dos dados.^{38,39} A quimiometria fornece uma ferramenta poderosa na calibração de dados espectroscópicos e cromatográficos, aplicado em abordagens direcionadas ou não direcionadas para discriminação de amostras.^{40,41}

A análise multivariada de dados pode ser supervisionada ou não-supervisionada. Em métodos não supervisionados o objetivo é encontrar agrupamentos ou relação entre as amostras, sem qualquer conhecimento prévio de classes ou grupos. Incluem-se dentro da análise multivariada não supervisionada a análise de componente principal, análise hierárquica e análise de fatores. Já o método supervisionado visa o desenvolvimento de um modelo matemático de classificação, com base em um conjunto de dados contendo observações quando a categoria é conhecida. São empregados para classificar novas observações (validações) e identificar a qual categoria pertence. Incluem-se dentro da análise multivariada supervisionada a regressão dos quadrados mínimos parciais e regressão dos quadrados mínimos parciais com análise discriminante.^{38,40}

1.2.3.1. Planejamento estatístico de misturas

A busca por metabólitos em matrizes complexas depende de diferentes propriedades inerentes às plantas e também dos solventes utilizados. A utilização de diversos solventes na extração das amostras permite a maximização da extração de compostos químicos da matriz da planta. A maneira mais indicada para explorar como essa mistura de solventes se comporta diante de amostras vegetais é utilizando o planejamento estatístico de misturas.⁴²

Um planejamento muito utilizado é o planejamento simplex-centroide de três componentes, representado por um triângulo. Em um planejamento simplex-centroide de q componentes o número de pontos distintos é $2^q - 1$. Portanto, num planejamento de três componentes o número de pontos é igual a sete. As coordenadas são definidas pelas combinações das proporções de componentes: as proporções de cada componente tomam valores igualmente espaçados de 0 a 1, isto é, o planejamento consiste em todas as combinações possíveis (misturas) dos componentes onde as proporções para cada componente é usado.⁴³⁻⁴⁵

1.2.3.2. Análise de fator

A análise de fator (AF) é um termo genérico usado para descrever vários métodos que analisam relações dentro de um conjunto de variáveis. A análise de fator cria um número mínimo de novas variáveis, que são uma combinação linear das originais, de modo que as novas variáveis contenham a maioria ou a totalidade das informações. Essas novas variáveis são chamadas também de fatores. Os fatores são construídos de tal forma que a complexidade geral dos dados é reduzida, aproveitando as interdependências inerentes. Gerando um pequeno número de fatores que representará aproximadamente a mesma quantidade de informação que o conjunto de dados originais. Nesse sentido, a análise de fator é um método multivariado de dados.⁴⁶

As principais diferenças entre análise de componente principal (ACP) e da análise de fator dependem das maneiras pelas quais os fatores são definidos e das suposições sobre a natureza dos resíduos. Na PCA, os fatores são determinados de forma a contabilizar o máximo de variância de todas as variáveis observadas. Enquanto que na FA, os fatores são definidos para contabilizar ao máximo as intercorrelações das variáveis. Sendo assim, a ACP pode ser descrita como orientado para variação, enquanto a FA é orientado por correlação.^{46,47}

1.2.3.3. Regressão dos quadrados mínimos parciais com análise discriminante

O método de PLS-DA, acrônimo para mínimos quadrados parciais com análise discriminante (do inglês *Partial Least Squares for Discriminant Analysis*), é um método de classificação linear que combina as propriedades da regressão de mínimos quadrados parciais com o poder de discriminação de uma técnica de classificação.⁹ Além disso, o PLS-DA é classificado como um método de reconhecimento de padrão supervisionado aplicado a dados de primeira ordem, ou seja, quando existe um vetor de respostas instrumentais para cada amostra.^{48,49} O modelo do PLS-DA é desenvolvido com base em algoritmos de regressão por mínimos quadrados (PLS) e em um limiar de discriminação bayesiano, o qual discrimina amostras após estimar probabilidades.^{49,50}

O PLS-DA é uma calibração multivariada que visa estabelecer uma relação entre os dados da resposta instrumental e propriedades químicas ou físicas. Seu modelo é construído utilizando respostas experimentais de n amostras obtidas a partir de equipamentos analíticos. Os dados obtidos são dispostos em uma matriz $\mathbf{X}$ e as propriedades de interesse são indicadas em um vetor $\mathbf{y}$. A matriz $\mathbf{X}$ é decomposta em escores e *loadings*, com uma rotação dos eixos a fim de se obter uma maior correlação entre $\mathbf{X}$ e $\mathbf{y}$, por perder sua ortogonalidade os eixos são denominados variáveis latentes, que são definidas para descrever a variabilidade dos dados $\mathbf{X}$ associados aos dados $\mathbf{y}$.⁵⁰⁻⁵²

A construção do modelo e a distribuição de valores de previsão obtidos nas amostras de calibração é necessária para encontrar um valor limite que dividirá as classes amostrais com a menor probabilidade de falsas classificações para previsões futuras.^{49,51} Valores acima do valor previsto indicam que a amostra pertence a classe modelada.⁴⁸

A etapa de validação em um modelo de calibração é importante para a escolha do número de variáveis latentes adequadas para a construção do modelo. Essa escolha geralmente se faz por meio da validação cruzada (CV, do inglês *Cross-Validation*) no qual algumas amostras são separadas em um conjunto de validação e os modelos são construídos com outros.^{41,48,53} Assim, o número de variáveis latentes pode ser designado pelo valor da raiz quadrada da soma do quadrado dos erros de validação cruzada (RMSECV, do inglês *Root Mean Square Error of Cross Validation*).

$$\text{RMSECV} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n}} \quad \text{Eq. (1)}$$

Na qual, y_i é o valor de referência para a propriedade de interesse da amostra “i”, $\hat{y}_i$ é o valor da propriedade de interesse da amostra “i” previsto pelo modelo e n é o número de amostras previstas no processo de validação cruzada.⁴⁸

REFERÊNCIAS

1. IPCC. Climate Change 2007: Impacts, adaptation and vulnerability: contribution of Working Group II to the fourth assessment report of the Intergovernmental Panel. *Genebra, Suíça* (2007).
2. Alves, F., Filho, W. L. & Azeiteiro, U. Theory and practice of climate adaptation. (2018).
3. Giridhar, V. S. P. Variations in diterpenes-cafestol and kahweol content in beans of robusta coffee grown at different altitudes. *Proc. Natl. Acad. Sci. India Sect. B Biol. Sci.* **86**, 291–297 (2016).
4. International Coffee Organization. Coffee market ends 2016 /17 coffee year in deficit for the third consecutive year. (2017).
5. Zullo, J. *et al.* Potential for growing Arabica coffee in the extreme south of Brazil in a warmer world. *Clim. Change* **109**, 535–548 (2011).
6. Martins, L. D. & Tomaz, M. A. Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. 365–379 (2014).
7. Bruce, T. J. A., Matthes, M. C., Napier, J. A. & Pickett, J. A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. **173**, 603–608 (2007).
8. Delaroza, F., Rakocevic, M., Malta, G. B., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. *J. Braz. Chem. Soc.* **25**, 1929–1938 (2014).
9. Sanchez, P. M. *et al.* Irrigation and light access effects on *Coffea arabica* L. leaves by FTIR-chemometric analysis. 0–26 (2011).
10. Scheel, G. L., Daiane, E., Rakocevic, M., Edward, R. & Spacino, I. Environmental

- stress evaluation of *Coffea arabica* L. leaves from spectrophotometric fingerprints by PCA and OSC-PLS-DA. *Arab. J. Chem.* 7 (2016).
11. Campanha, M. M. *et al.* Growth and yield of coffee plants in agroforestry and monoculture systems in Minas Gerais, Brazil. *Agrofor. Syst.* **63**, 75–82 (2004).
 12. Steidle Neto, A. J., Lopes, D. C., Pinto, F. A. C. & Zolnier, S. Vis/NIR spectroscopy and chemometrics for non-destructive estimation of water and chlorophyll status in sunflower leaves. *Biosyst. Eng.* **155**, 124–133 (2017).
 13. Letícia, M., Bizzo, G., Farah, A. & Kemp, J. A. Highlights in the history of coffee science related to health. *Coffee in Health and Disease Prevention* (Elsevier Inc., 2015).
 14. de Carvalho, C. H. S. Cultivares de Café: origem, características e recomendações. 15 (2008).
 15. Camargo, M. B. P. De. The impact of climatic variability and climate change on arabic coffee crop in Brazil. **69**, 239–247 (2010).
 16. Rossetti, R. P. Determinação de fenóis totais em frutos do café: Avaliações em diferentes fases de maturação. (Universidade de São Paulo, 2007).
 17. Rodrigues, D. A lenda do café. *Associação Brasileira da Indústria de Café* 1–9 (2016). Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>. (Acessado: 29 de novembro 2016)
 18. Batista, E. R. Respostas fisiológicas e metabólicas de duas cultivares de *Coffea arabica* L. submetidas a atmosferas enriquecidas em CO₂ em Câmaras de Topo Aberto e sistema FACE. (2016).
 19. Chemura, A. & Kutwayo, D. Bioclimatic modelling of current and projected climatic suitability of coffee (*Coffea arabica*) production in Zimbabwe. (2015).
 20. Davis, A. P., Gole, T. W., Baena, S. & Moat, J. The impact of climate change on

- indigenous arabica coffee (*Coffea arabica*): Predicting future trends and identifying priorities. *PLoS One* **7**, 10–14 (2012).
21. Camargo, M. B. P. & Camargo, Â. P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. *Agrometeorologia* **60**, 65–68 (2001).
 22. Cannell, M. G. R. Physiology of the coffee crop. (1985).
 23. Gama, T. C. P. da, Sales, J. C., Castanheira, D. T., Silveira, H. R. de O. & Azevedo, H. P. A. de. Anatomia foliar, fisiologia e produtividade de cafeeiros em diferentes níveis de adubação. *Coffee Sci.* **12**, 42–48 (2017).
 24. International Coffee Organization. Relatório sobre o mercado de Café. 5–9 (2017).
 25. Villers, L., Arizpe, N., Orellana, R., Conde, C. & Hernández, J. Impactos del cambio climático en la floración y desarrollo del fruto del café en veracruz, México. *Interciencia* **34**, 322–329 (2009).
 26. Bunn, C. *et al.* Multiclass classification of agro-ecological zones for arabica coffee: An improved understanding of the impacts of climate change. (2015).
 27. Shriver, D. F. & Atkins, P. W. Química Inorgânica. (Bookman, 2003).
 28. Lee, J. D. Química Inorgânica não tão concisa. (2000).
 29. World Meteorological Organization. WMO greenhouse gas bulletin. (2017).
 30. Cunha, D. A. da & Reis, D. I. dos. Efeitos das mudanças climáticas no setor agrícola do estado de Minas Gerais. *Rev. Econ. e Agronegócio* **10**, 309–334 (2012).
 31. Marè, C. *et al.* Durum wheat grain yield and quality under elevated CO₂: First results of a free air carbon dioxide enrichment (FACE) experiment. *Options Méditerranéennes* **406**, 401–406 (2014).
 32. Ainsworth, E. A. & Rogers, A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: Mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell*

- Environ.* **30**, 258–270 (2007).
33. Schutz, M. & Fangmeier, A. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO₂ and water limitation. *Environ. Pollut.* **114**, 187–194 (2001).
 34. Drake, B. L., Hanson, D. T., Lowrey, T. K. & Sharp, Z. D. The carbon fertilization effect over a century of anthropogenic CO₂ emissions: Higher intracellular CO₂ and more drought resistance among invasive and native grass species contrasts with increased water use efficiency for woody plants in the US Southwest. *Glob. Chang. Biol.* **23**, 782–792 (2017).
 35. Sobuj, N., Virjamo, V., Zhang, Y., Nybakken, L. & Julkunen-tiitto, R. Impacts of elevated temperature and CO₂ concentration on growth and phenolics in the sexually dimorphic *Populus tremula* (L.). *Environ. Exp. Bot.* **146**, 34–44 (2018).
 36. Rakocevic, M. *et al.* Structural and functional changes in coffee trees after 4 years under free air CO₂ enrichment. *Ann. Bot.* 1–14 (2018).
 37. Okada, M. *et al.* Free-air CO₂ enrichment (FACE) using pure CO₂ injection: System description. *New Phytol.* **150**, 251–260 (2001).
 38. Craig, A. P., Franca, A. S., Oliveira, L. S., Irudayaraj, J. & Ileleji, K. Fourier transform infrared spectroscopy and near infrared spectroscopy for the quantification of defects in roasted coffees. *Talanta* **134**, 379–386 (2015).
 39. Ássimos, A. A. Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração. (2014).
 40. Esteki, M. *et al.* A review on the application of chromatographic methods, coupled to chemometrics, for food authentication. *Food Control* **93**, 165–182 (2018).
 41. Costa, R. E. L. Discriminação de madeiras similares por NIRS e PLS-DA considerando variações de temperatura e umidade. (2015).

42. Filipe Corrêa Guizellini. Análise exploratória de *Coffea arabica* por método PARAFAC e estudo microbiológico. (2015).
43. Bruns, R. E., Scarminio, I. S. & Neto, B. de B. Statistical Design - Chemometrics. (2006).
44. John A. Cornell. Experiments With Mixtures. *John Wiley & Sons, Inc.* (2002).
45. Myers, R. H., Montgomery, D. C. & Anderson-Cook, C. M. Response surface methodology. Process and product optimization using designed experiments. *John Wiley & Sons, Inc.* (2009).
46. Reyment, R. A., Joreskog, K. G. & Marcus, L. F. Applied Factor Analysis in the Natural Sciences. (1996).
47. Ferreira, M. M. C. Quimiometria Conceitos, Métodos e Aplicações. (2015).
48. Valderrama, L., Gonçalves, R. P., Março, P. H. & Valderrama, P. Espectroscopia Uv-Vis e método quimiométrico na avaliação de adulterações e fraudes em azeite de oliva extra virgem. *Rev. Bras. Pesqui. em Aliment.* **5**, 32–40 (2014).
49. Pereira, J. M., Leme, L. M., Perdoncini, M. R. F. G., Valderrama, P. & Março, P. H. Fast discrimination of milk contaminated with *Salmonella* sp. via Near-Infrared Spectroscopy. *Food Anal. Methods* **11**, 1878–1885 (2018).
50. de Almeida, M. R., Correa, D. N., Rocha, W. F. C., Scafi, F. J. O. & Poppi, R. J. Discrimination between authentic and counterfeit banknotes using raman spectroscopy and PLS-DA with uncertainty estimation. *Microchem. J.* **109**, 170–177 (2013).
51. Santos, M. B. H. *et al.* Non-destructive NIR spectrometric cultivar discrimination of castor seeds resulting from breeding programs. *J. Braz. Chem. Soc.* **25**, 969–974 (2014).
52. Alves, F. C. G. B. S. Autenticação de óleos comestíveis empregando espectroscopia UV-Vis e quimiometria. (2015).

53. Almeida, M. R., Fidelis, C. H. V, Barata, L. E. S. & Poppi, R. J. Classification of Amazonian rosewood essential oil by Raman spectroscopy and PLS-DA with reliability estimation. *Talanta* **117**, 305–311 (2013).



CAPÍTULO II

EFEITOS DO AUMENTO DO NÍVEL DE DIÓXIDO DE CARBONO EM METABÓLITOS DE FOLHAS E GEMAS DE *Coffea arabica* L.

2.1. INTRODUÇÃO

O aumento das emissões de CO₂ através de práticas industriais e agrícolas alteram a composição atmosférica em relação a biosfera total da Terra. De fato, a concentração de CO₂ vem aumentando até a alarmante taxa de 1 a 1,8 µL CO₂ L⁻¹ ar ano⁻¹ e as respostas dos ecossistemas são as maiores fontes de incertezas nas projeções das mudanças climáticas.¹ As diferentes espécies de plantas respondem às alterações climáticas, como aumento de temperatura e períodos mais frequentes de secas, de diferentes maneiras com mudanças morfológicas, estruturais e fisiológicas.²⁻⁴

A primeira fonte de carbono para o desenvolvimento das plantas é proveniente da assimilação do CO₂ atmosférico e sua concentração provoca mudanças nos processos fundamentais das plantas como crescimento, produtividade agrônômica e qualidade.^{5,6} O aumento de CO₂ atmosférico pode gerar efeitos positivos no desenvolvimento de plantas, especialmente aquelas com via assimilatória C₃, causando um aumento na fotossíntese.⁷ Estudos realizados em trigo reportam um aumento na biomassa e um aumento de 46% no rendimento de grãos.⁶ A maior disponibilidade de CO₂ pode alterar a complexidade química da planta (i.e. metabólitos secundários) e os mecanismos de defesa, provocando uma diferença quantitativa em compostos fenólicos, flavonóides e taninos.⁸⁻¹⁰

O café, uma das maiores *commodities* agrícolas cultivadas em mais de 80 países, tem sua produção e comercialização apontadas como fatores de risco diante das mudanças climáticas¹¹⁻¹⁵, e alguns modelos de predição indicam que haverá uma redução de 90% da produção em regiões africanas até 2080.¹⁶ As incertezas diante das mudanças climáticas afetam a manutenção financeira dos países produtores. A fotossíntese da planta de café

responde positivamente ao aumento dos níveis da concentração de CO₂ sob o experimento *Free Air Carbon Enrichment* – (FACE), especialmente em períodos de baixo crescimento do primeiro até o quarto ano.^{4,17} Após o período de quatro anos sob condições de CO₂ elevado, as estruturas das plantas começam a ter redução da área foliar, diâmetro de ramo e caule, especialmente nas camadas inferiores, investindo em novas estruturas das camadas superiores dos eixos de ordem superior juntamente com a *turnover* de raízes.^{4,18}

A exposição a diferentes tipos de estresses altera a resposta da planta. O processo de fortalecimento ou endurecimento envolve uma exposição prévia a fatores de estresses bióticos ou abióticos, deixando a planta mais resistente para futuras exposições, o que é chamado de efeito epigenético.¹⁹ Por ser considerado um estresse abiótico o CO₂ pode causar esse efeito nas plantas de café, principalmente nas partes mais expostas e órgãos de plantas iniciados e/ou formados devido sua alta concentração.

Em matrizes complexas o desenvolvimento de uma metodologia aplicada é necessário para elucidar o impacto da alteração atmosférica no metaboloma das plantas e obter resultados mais confiáveis. Por essa razão, desde 2003, nosso grupo desenvolve pesquisas na interface analítica e produtos naturais. A busca de metabólitos discriminatórios a partir dessa abordagem depende de diferentes propriedades inerentes à composição da matriz sob análise e dos solventes orgânicos empregados. Planejamento estatístico de misturas se mostrou uma poderosa ferramenta para o estudo de preparo de amostras envolvendo processo extrativo, fracionamento e análise cromatográfica para discriminação quimiométrica^{20–25}, estudo de sistema simultâneo^{26,27}, otimização da fase móvel^{28,29}, extração de compostos específicos^{30–33}, análise de impressão digital^{34,35}, fracionamento de extrato^{31,36}, exploração de diversidade de classes^{37,38}, estudo de atividade biológica^{22,29,39} e investigação do efeito sazonal^{40,41}.

A alta variedade química de matrizes orgânicas em plantas é uma das dificuldades encontradas no estudo metabolômico necessitando de maior desenvolvimento experimental, experimentos e equipamentos de alto custo.⁴²⁻⁴⁴ Além de usar técnicas integradas e avançadas para resolver esses problemas, o desenvolvimento experimental deve usar métodos de pequeno impacto ambiental⁴⁵ e miniaturização de processos (i.e. menor volume de solvente), como extração em fase sólida⁴⁶. Essas estratégias integradas devem considerar todos os aspectos do conjunto de dados e analisar uma ampla gama de classes metabólica ou metabólitos específicos, fornecendo uma ferramenta válida para o avanço do nosso entendimento do complexo mecanismo regulatório das plantas. Abordagens multiparalelas são necessárias para expandir a cobertura da análise metabólica para uma verdadeira escala metabolômica. Isso deve aumentar a habilidade de identificar mecanismos de adaptação frente às mudanças climáticas e às respostas do aquecimento global nos metabólitos.

Fracionamento multicomponente a partir do planejamento estatístico de misturas em extração em fase sólida foi aplicado para elucidar os diversos perfis metabólicos de interesse na análise de triagem *non-target*. O objetivo foi determinar as mudanças metabólicas em folhas e gemas de plantas adultas de *Coffea arabica* cultivadas sob condições de CO₂ elevado e avaliar o eventual efeito epigenético após retornar as concentrações ambiente de CO₂ através de procedimentos experimentais integrados a partir do planejamento estatístico de mistura e análise exploratória usando extração em fase sólida e dados espectroscópicos e cromatográficos.

2.2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1. Material Vegetal

O experimento foi realizado sob a primeira instalação do FACE na América do Sul, localizada na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna SP, Brasil (22°43'S, 47°01'O, 570 m

de altitude). O solo da área experimental é latossolo vermelho distroférico. O clima é tropical, tipo subtropical úmido (Cwa) de acordo com a classificação Köppen, com verão quente e chuvoso e inverno seco. O sistema FACE estava localizado dentro de uma plantação de café (*Coffea arabica* L.). Mudas de Catuaí Vermelho IAC 144', com três ou quatro pares de folhas, foram transferidas para o campo em março de 2011, em uma área de plantio de 3,5 m entre as linhas e 0,6 m entre as plantas e as linhas. As plantas estavam delimitadas por anéis octogonais (com 10 m de diâmetro), com cada anel contendo quatro linhas e 44 plantas. A injeção direta de CO₂ puro foi usada na metade dos anéis octogonais disponíveis, visando aumentar a abundância de CO₂ em 200 µL CO₂ L⁻¹ acima do nível da concentração atmosférica durante o período diurno. O enriquecimento do ar com CO₂ começou em 25 de Agosto de 2011, com cerca de 390 µL CO₂ L⁻¹. O nível de CO₂ foi medido no centro dos anéis com analisadores de gás infravermelhos (Vaisala, CARBOCAP® Carbon Dioxide Probe GMP343, Vantaa, Finland). O CO₂ era emitido fora dos anéis por tubos instalados a 0,9 e 1,4 m acima do nível do solo, seguindo a direção do vento e velocidade máxima de 0,5 m s⁻¹. A injeção do gás foi mantida até o final de junho de 2016, por um período de cinco anos.⁴⁷

As coletas de folhas e gemas terminais e laterais foram realizadas pela primeira vez após quatro anos da planta sendo cultivada sob FACE, no primeiro período de floração, no final de setembro de 2015. A coleta foi realizada em triplicata em diferentes posições da planta (Figura 1), evitando interferência durante a análise. As posições de coletas para as folhas foram 7, 8, 9, 10 e 12 e para as gemas foram 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10.

A segunda coleta foi realizada em fevereiro de 2017, sete meses após a injeção de CO₂ ter sido interrompida nos anéis octogonais do FACE. A coleta foi novamente realizada em triplicata, e somente folhas foram coletadas nas posições indicadas (com distância de 50 cm entre as camadas verticais da planta, Figura 1).

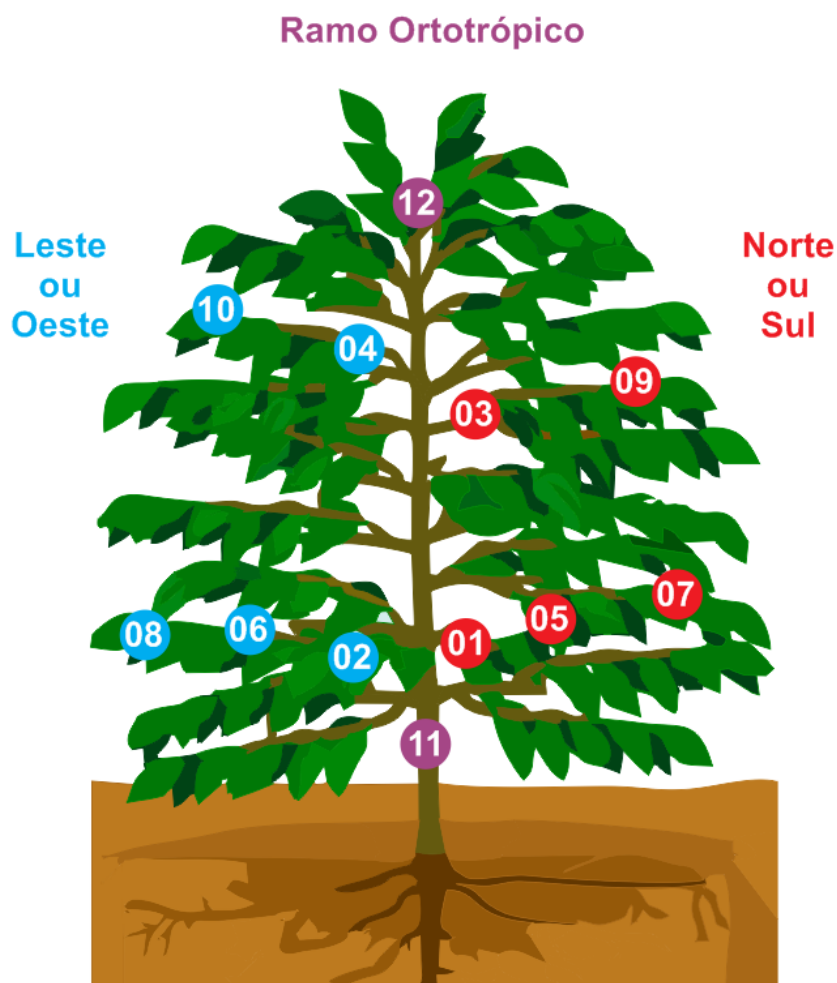


Figura 1. Esquema de posições da coleta de folhas e gemas de plantas de *Coffea arabica* cultivadas sob níveis ambiente e enriquecido com CO₂ nas instalações FACE. O ramo ortotrópico é o caule principal, enquanto as orientações cardinais são relacionadas aos ramos plagiotrópicos de 2^a e 3^a ordem sobre o perfil vertical da planta.

2.2.2. Preparação das frações

Para o preparo das frações foram utilizados os solventes, de grau analítico, éter etílico (**e**) Vetec (São Paulo, Brasil), diclorometano (**d**) e metanol (**m**) Anidrol (São Paulo, Brasil) em diferentes proporções de acordo com o planejamento estatístico de misturas (Figura 2). O processo extrativo consiste em três solventes puros, três misturas binárias e uma mistura ternária.

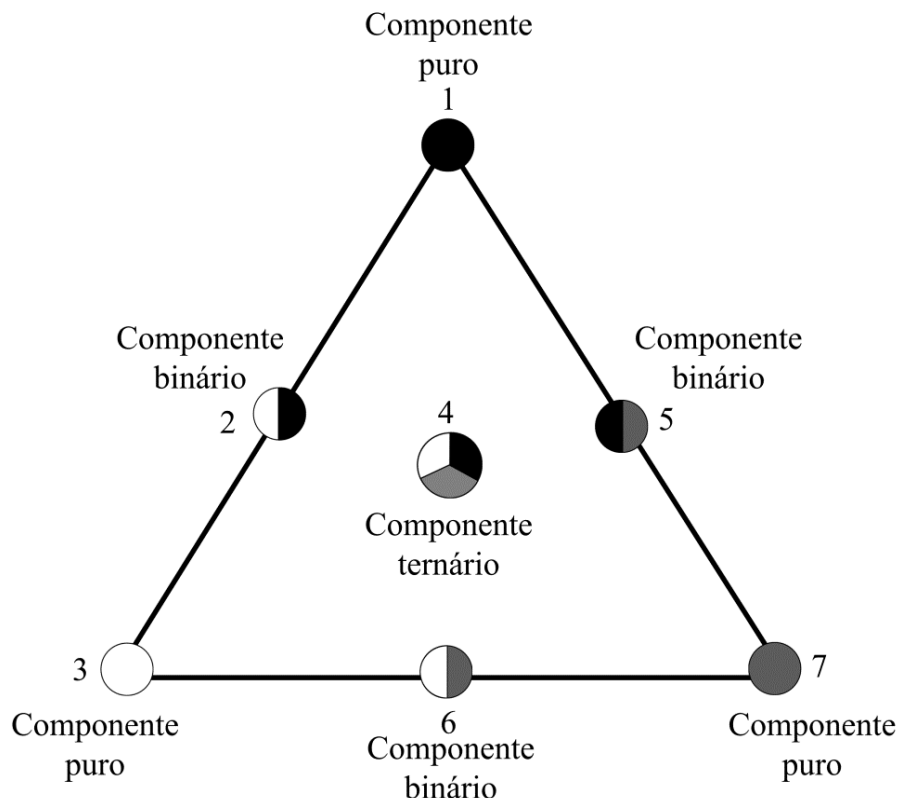


Figura 2. Planejamento estatístico de mistura de três componentes (éter etílico, diclorometano e metanol) utilizando como extratores componentes puros, misturas binárias e mistura ternária.

2.2.3. Extração em fase sólida (SPE)

Para a extração em fase sólida utilizou-se um cartucho de polipropileno com 500 mg de fase sólida fixada entre dois filtros de 20 μm (Silicagel, 0.060-0.200 mm; Acros organics). A sílica foi pré-condicionada aplicando 1,00 mL de metanol para permitir o ajuste da força do solvente de eluição.⁴⁸

100 mg de amostra bruta (folhas ou gemas) foi colocada diretamente no cartucho e eluída com 10 mL de cada solvente ou mistura (Figura 2, Tabela 1). As eluições foram realizadas considerando o parâmetro de força da fase móvel (ϵ°) para a cromatografia líquido-sólido, e a sequência de eluição seguiu o aumento de força⁴⁹, como indicado na Tabela 1. A ordem de eluição foi 100% de éter etílico, 1:1 (v/v) éter etílico e diclorometano, 100% diclorometano, 1:1:1 (v/v/v) éter etílico, diclorometano e metanol, 1:1 (v/v) éter etílico e

metanol, 1:1 (v/v) diclorometano e metanol e finalmente 100% metanol, obtendo sete diferentes frações a partir da ordem de eluição para cada amostra.

Tabela 1. Planejamento estatístico de mistura para o fracionamento e seus respectivos parâmetros de força da fase móvel em ordem crescente de eluição.

Ordem Eluição	Notação Extrato	Solventes			e°
		Éter Etílico(e)	Diclorometano (d)	Metanol (m)	
1	e	1	0	0	0.38
2	ed	0.50	0.50	0	0.40
3	d	0	1	0	0.42
4	edm	0.33	0.33	0.33	0.58
5	em	0.50	0	0.50	0.67
6	dm	0	0.50	0.50	0.68
7	m	0	0	1	0.95

2.2.4. Aquisição espectroscópica UV-Vis

As medidas espectroscópicas foram realizadas imediatamente após a obtenção dos extratos utilizando cubeta de quartzo de 1 cm no espectrofotômetro Thermo Scientific modelo Evolution 60S, acoplado com o *software* Vision Lite e com monitoramento de 200 a 800 nm.

2.2.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada com um cromatógrafo líquido SPD-M10AV Finnigan Surveyor com detector de arranjos de fotodiodos (PAD) Termo-Electro Corporation. A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa Kinetex 2,6 μ C₁₈, tamanho 150 x 4,6 mm com um volume de injeção de 20 μ L e vazão de 1,0 mL min⁻¹. A eluição foi conduzida usando o modo gradiente e como fase móvel A (acetonitrila + 5% água), B (água) e C (metanol + 5% água). As seis corridas cromatográficas tiveram o tempo constante (0 a 30 min) e temperatura constante em 20°C. As

combinações binárias de fase móvel tiveram gradientes variando de 100% a 0% da fase móvel inicial, formando seis combinações de fases móveis (Tabela 2). Os extratos das amostras de folhas obtidas pela mistura ternária **edm** foram submetidos à separação cromatográfica.

Tabela 2. Composição da fase móvel inicial para o gradiente de eluição das corridas cromatográficas.

Corrida cromatográfica	Fase móvel A	Fase móvel B	Fase móvel C
1	100%	0%	-
2	0%	100%	-
3	100%	-	0%
4	0%	-	100%
5	-	100%	0%
6	-	0%	100%

* O gradiente final da corrida cromatográfica é oposto à condição inicial.

2.2.6. Espectrometria de massa direta (IES-MS)

50 mg de extrato de folhas da mistura ternária (**edm**) coletadas de plantas cultivadas em ambiente com e sem enriquecimento de CO₂ foram pesadas e, então, dissolvidas em 1,00 mL de metanol (LC-MS Fluxa Analytical). As soluções foram diluídas com 0,01 % de ácido fórmico (Vetec, São Paulo, Brasil) para obter uma solução com concentração de $1,00 \times 10^{-6}$ mg mL⁻¹ de extrato. Os extratos diluídos foram injetados diretamente na fonte de um espectrômetro de massa Bruker (modelo *Compact*) equipado com um analisador de quadrupolo e ionização por *electrospray* (IES). As análises foram realizadas nos modos positivo e negativo como uma forma de avaliar as diferentes fragmentações dos compostos presentes nos extratos. Os dados foram adquiridos no modo de varredura variando de m/z de 80 a 1000 Da. A fonte de ionização apresentou as seguintes condições: tensão capilar 3 kV, temperatura da fonte de 150 °C, fluxo de gás do cone de 80 L h⁻¹, fluxo de gás de

dessolvatação 800 L h⁻¹ e temperatura de dessolvatação de 350 °C. O gás nitrogênio utilizado para a nebulização continha 99% de pureza. Os dados foram pré-processados utilizando o *software* DataAnalysis 4.2.

2.2.7. *Análise estatística*

O *software* Statistica 6.0 foi usado na análise do conjunto de dados UV-Vis por análise de fator e o *software* Origin Pro 8 foi utilizado para a plotagem dos gráficos dos *loadings*.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Análise de fator (AF) foi aplicada aos dados de UV-Vis a fim de explorar as diferenças na composição química das folhas e gemas de cafeeiro cultivadas sob CO₂ elevado e ambiente e determinar qual solvente do planejamento de misturas é o mais adequado para indicar estas diferenças. Essa análise exploratória foi baseada nos perfis espectrais *non-target* das frações obtidas a partir do planejamento de misturas da Tabela 1.

2.3.1. *Perfil metabólico de gemas de café após o cultivo em CO₂ elevado*

Os dados compostos pelas amostras de gemas coletadas em setembro de 2015 foram dispostos em uma matriz com 601 linhas 140 colunas. As linhas contêm as intensidades de absorbância nos diferentes comprimentos de onda e as colunas correspondem aos extratos do planejamento de misturas de 10 amostras de gemas de plantas cultivadas em CO₂ ambiente e 10 amostras cultivadas em CO₂ elevado, com sete espectros para cada amostra. A análise de fator foi aplicada para esse conjunto de dados obtendo, para os dois primeiros fatores, 79,8% da variância total dos dados.

O gráfico dos escores dos dois primeiros fatores para as gemas na Figura 3 mostra discriminação de três grupos. O grupo 1, localizado na parte superior do gráfico, é formado pelas amostras obtidas pelos solventes diclorometano (**d**), diclorometano/metanol (**dm**), éter etílico/diclorometano (**ed**) e éter etílico/diclorometano/metanol (**edm**). O grupo 2 na parte inferior do gráfico foi obtidos pelas frações em éter etílico (**e**), éter etílico/metanol (**em**) e metanol (**m**). O grupo 3 são os perfis das gemas expostas a nível de CO₂ ambiente obtidas a partir da eluição com diclorometano (**d**). Todas as eluições com diclorometano puro para as gemas com níveis de CO₂ elevado estão contidas no grupo 1. Dessa forma, o perfil químico para as amostras de gemas é discriminado pelo diclorometano puro nos grupos 1 e 3.

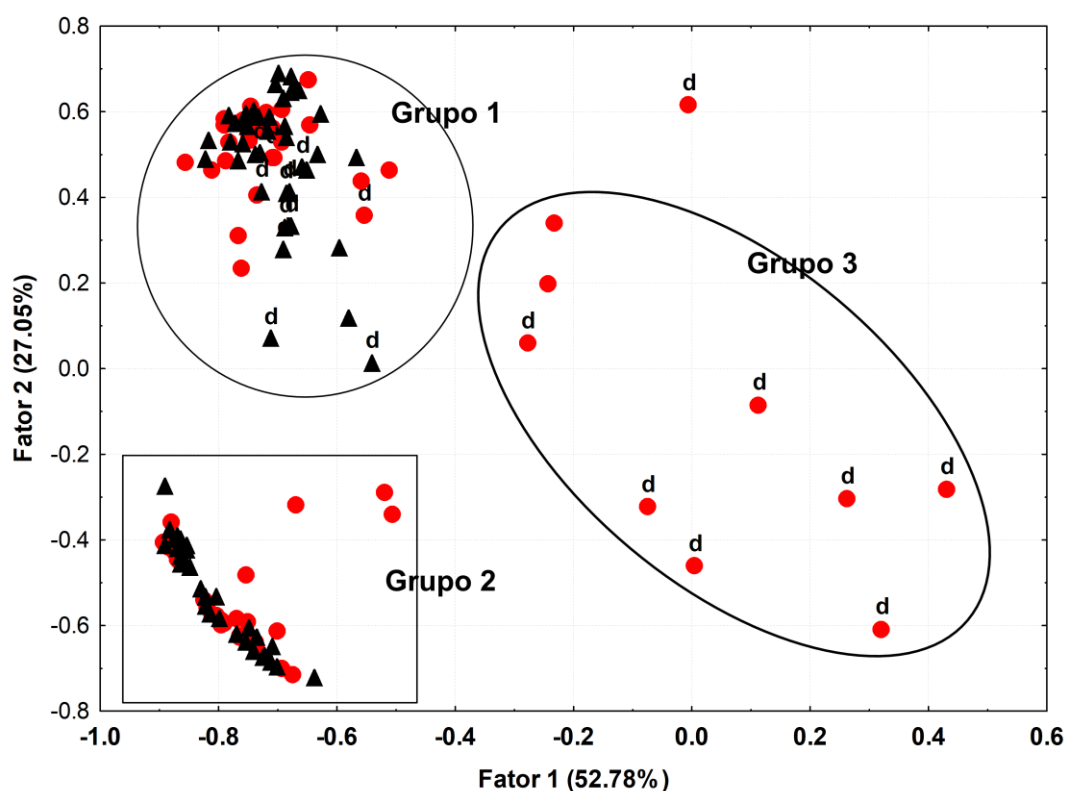


Figura 3. Gráfico dos escores da análise de fator para a composição química de gemas coletadas de plantas cultivadas em níveis de CO₂ ambiente (●) e CO₂ elevado (▲) no experimento FACE, destacando-se as eluições realizadas com diclorometano puro (d).

2.3.2. Discriminação do diclorometano para as gemas

Os espectros das replicatas para as amostras de gemas eluídas com diclorometano foram dispostos em uma matriz de 601 linhas e 60 colunas, com as linhas designando as intensidades de absorção para os diferentes comprimentos de onda e as colunas correspondendo aos 30 extratos de gemas com concentração de CO₂ elevado e 30 correspondentes as gemas com concentração de CO₂ ambiente.

Figura 4a contém o gráfico dos escores para as frações de gemas eluídas com diclorometano puro. Fator 2 discrimina essas amostras. A região positiva do fator 2 contém os pontos das gemas com nível ambiente de CO₂ enquanto a região negativa corresponde as amostras de gemas com CO₂ elevado. O gráfico dos *loadings* na Figura 4b mostra que os metabólitos da banda em 235 nm são predominantemente para amostras de CO₂ ambiente enquanto que os metabólitos da banda em 228 nm estão mais concentrados em amostras de CO₂ elevado.

A dispersão dos pontos das posições 4 e 7 nos ramos plagiotrópicos possuem uma grande divergência (Figura 1). Gemas da posição 7 estão localizadas na parte terminal do ramo plagiotrópico da orientação norte/sul na parte inferior da planta. Gemas da posição 4 dos ramos plagiotrópicos com orientação leste/oeste estão localizados na parte superior da planta. A Figura 4 mostra que as gemas localizadas na posição 4 possuem uma maior abundância de metabólitos associados com a banda de 235 nm que aquelas na posição 7. A forte absorção em 235 nm pode ser atribuída aos grupos cromóforos dos ácidos graxos poliinsaturados oxigenados.⁵⁰ A análise de gemas de café indica que as mudanças metabólicas nesta planta devido a concentração de CO₂ se inicia no estágio inicial das vias foliares do cafeeiro.

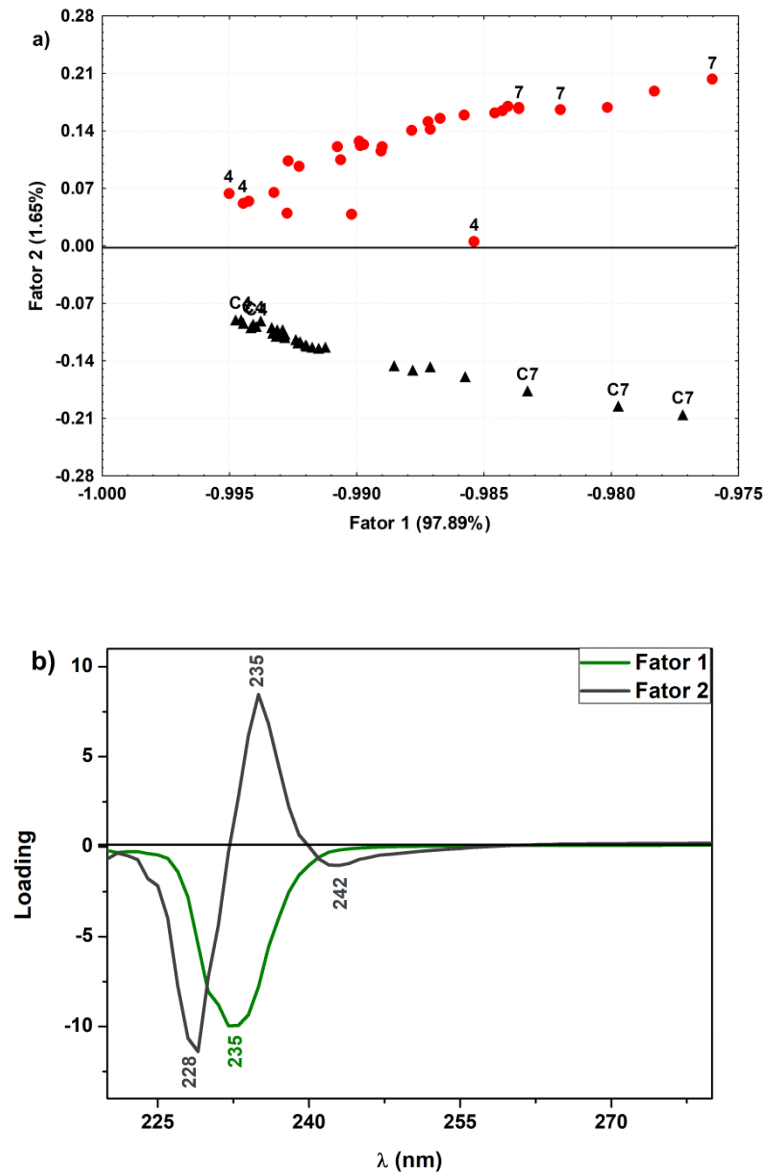


Figura 4. a) Gráfico dos escores dos espectros de UV-Vis de gemas coletadas em diversas posições de plantas de *Coffea arabica* cultivadas em níveis de CO₂ ambiente (●) e CO₂ elevado (▲) no experimento FACE e eluídas com diclorometano. b) Gráfico dos *loadings* para os dois primeiros fatores.

2.3.3. *Perfil metabólico das folhas de café após cultivo em CO₂ elevado*

Os espectros das folhas coletadas em setembro de 2015, após quatro anos de injeção de CO₂, foram registrados em uma matriz com 601 linhas e 70 colunas. As linhas contêm as intensidades de absorbância nos diferentes comprimentos de onda e as colunas correspondem aos extratos do planejamento de misturas de dez amostras, cinco amostras de plantas cultivadas em CO₂ elevado e cinco cultivadas em CO₂ ambiente, sete espectros para cada amostra. A análise de fator foi aplicada para esse conjunto de dados obtendo, para os dois primeiros fatores, 77,4% da variância total dos dados.

Figura 5 mostra a projeção dos dois primeiros fatores no qual dois grupos são discriminados. Grupo 1 está localizado na parte superior do gráfico e é formado pelas amostras obtidas pelos solventes diclorometano (**d**), diclorometano/metanol (**dm**), éter etílico/diclorometano (**ed**) e éter etílico/diclorometano/metanol (**edm**). O grupo 2 na parte inferior do gráfico foi obtidos pelas frações em éter etílico (**e**), éter etílico/metanol (**em**) e metanol (**m**). Assim como na discriminação das gemas, o diclorometano caracteriza um grupo enquanto éter etílico e metanol outro. Esses solventes possuem uma extensa combinação de propriedades químicas e físicas, mas a separação por solvatação depende da sua capacidade de dissolver metabólitos, o que pode ser caracterizado pelos chamados parâmetros solvatocrômicos.⁵¹ A principal diferença entre os parâmetros solvatocrômicos para esses dois grupos (diclorometano e éter etílico/metanol) está presente em suas basicidades, β . Esse parâmetro está relacionado com a capacidade do solvente doar um par de elétrons em uma ligação de hidrogênio entre o soluto e o solvente. Diclorometano possui basicidade zero ($\beta = 0$), enquanto éter etílico, $\beta = 0,47$, e metanol, $\beta = 0,95$ são maiores. A ligação de hidrogênio é a principal fonte de separação para esse grupo.

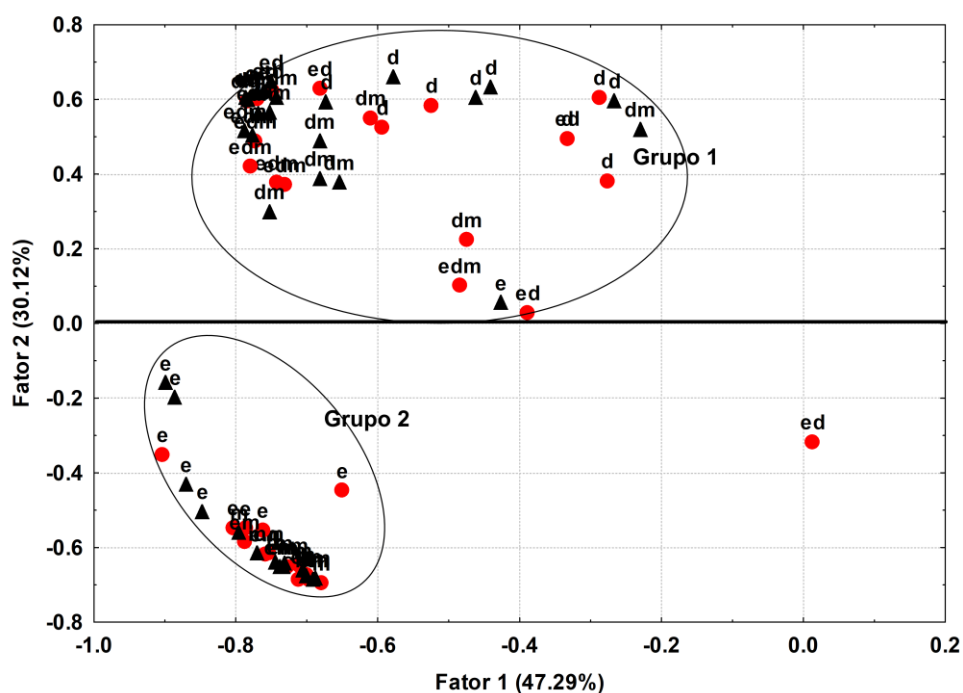


Figura 5. Gráfico dos escores da análise de fator para as frações extraídas com os solventes do planejamento estatístico de misturas para as folhas de cafeeiro cultivadas em CO₂ ambiente (●) e CO₂ elevado (▲) no experimento FACE.

A comparação gráfica dos espectros permite a identificação de sutilezas até então não vistas no processo de separação pelos vários solventes. A Figura 6 mostra os espectros de absorvância média para os dois grupos obtidos pela AF, exibidos na Figura 5. Os principais comprimentos de onda presentes no grupo de amostras eluídas com diclorometano são indicados na Figura 6a. A fração **edm** possui absorvância máxima em 227 e 273 nm, enquanto que as frações **d**, **dm** e **ed** apresentam máxima em 228 e 275 nm. Em folhas de café, a região de 270-300 nm é característica dos metabólitos com bandas devido à promoção de elétrons do oxigênio de um orbital não-ligante para um orbital π antiligante ($C=O$; $n \rightarrow \pi^*$ banda), como, por exemplo, as metilxantinas, possivelmente a cafeína.⁵² Esses metabólitos apresentam uma segunda banda de alta intensidade com menores valores de absorvância, 190-200 nm. Inúmeros compostos possuem absorção típica nessa região espectral. Os extratos **dm** e **edm** possuem os maiores valores de absorvância entre as diferentes frações, porém com bandas distintas. Os espectros da fração **dm** apresenta absorvância em 381, 430 e 455 nm enquanto

que o espectro de **edm** apresenta absorbância em 416 e 450 nm. Os carotenoides absorvem na região de 400-500 nm devido a sua intensa coloração.⁵³ A banda em 666 nm foi atribuída a clorofila ou derivados.⁵⁴ Os extratos **ed** e **d** não separaram pigmentos da matriz, então, diclorometano não é recomendado para extração de pigmentos.

Figura 6b mostra espectro médio para amostras do grupo éter etílico/metanol em que absorção em 213 nm é encontrada para as três frações. O extrato de metanol apresenta banda em 265 nm enquanto o **em** absorve em 275 nm. Na faixa de 400-700 nm a banda em 666 nm é encontrada para as três frações, embora a eluição com éter etílico apresente um máximo de absorção em 407 nm. Existem absorbâncias similares para sistemas de pigmentos que apresentam dupla ligação conjugada, enquanto que as frações **em** e **m** apresentam absorções em 409, 438, 469 nm, características de carotenoides. Embora existam exceções, essas bandas são consideradas como valiosas hipóteses de trabalho e não como leis de caracterização completamente rígidas para a informação metabólica do processo de fracionamento. A energia característica de uma transição é uma propriedade de um grupo de átomos, em geral, a grande variedade de absorções nos perfis químicos indica a diversidade química no processo de separação para diferentes eluentes.

Figura 7 mostra a ampliação de parte da região positiva do fator 2 dos extratos das folhas. Nessa região os perfis eluídos com a mistura ternária (**edm**) fornecem uma discreta separação das amostras de folhas cultivadas em nível de CO₂ ambiente e elevado, então essa mistura de solventes possui a maior variedade de informação metabólica relacionado à modificação ambiental.

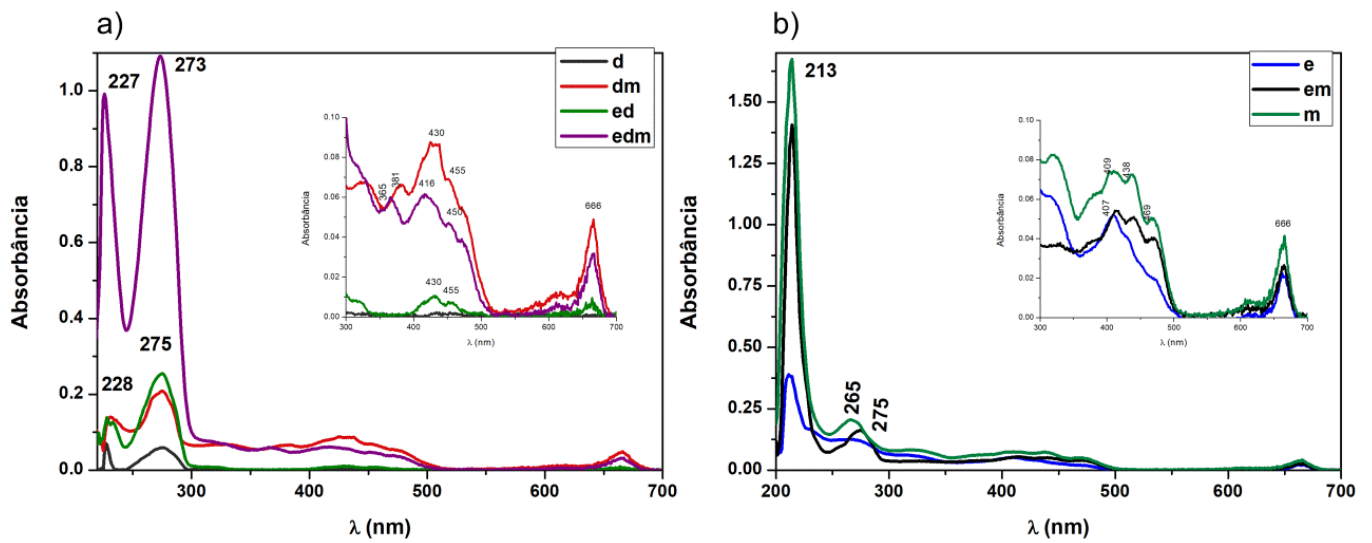


Figura 6. Espectros médios de absorção UV-Visível para as frações eluídas correspondentes ao planejamento de misturas para folhas de *Coffea arabica* obtidos de dois grupos pela análise fatorial, a) Grupo 1 (d, dm, ed, edm) b) Grupo 2 (e, em, m).

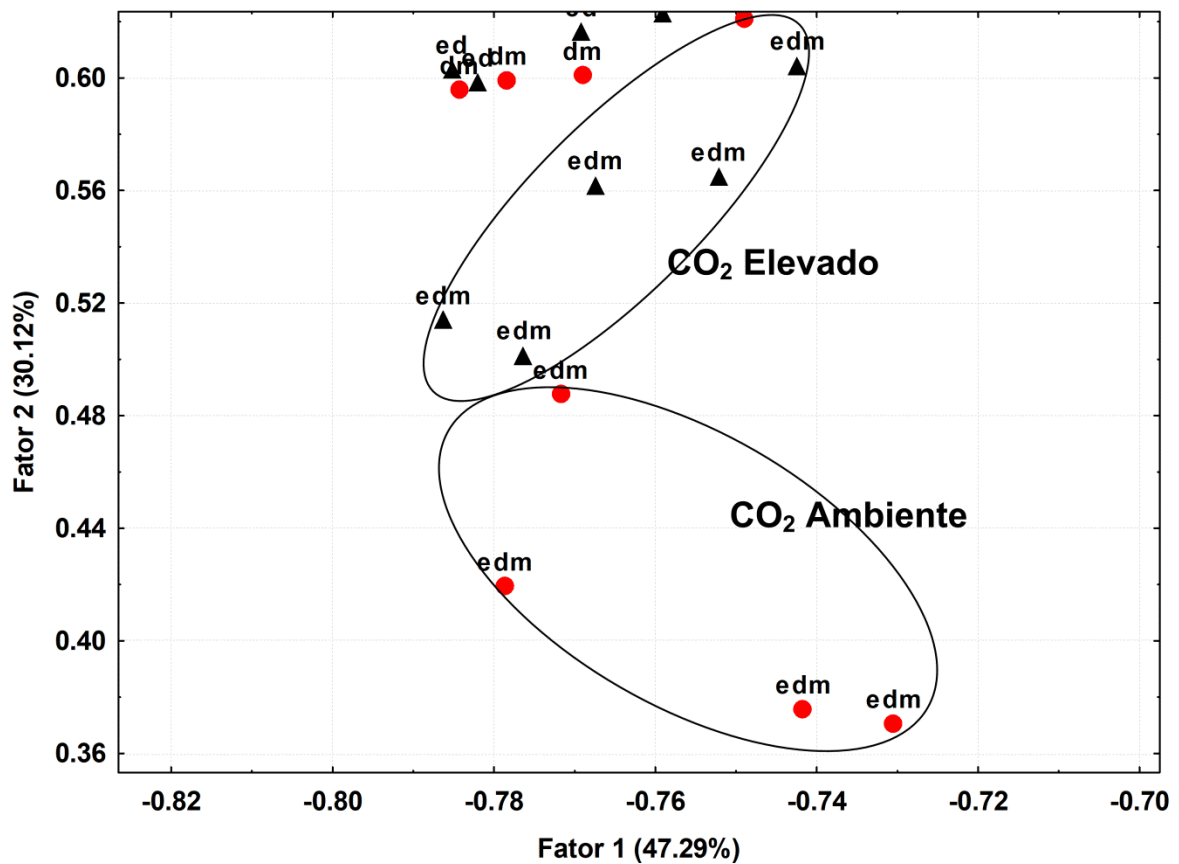


Figura 7. Ampliação de parte do quadrante positivo do gráfico dos escores dos dois primeiros fatores para as folhas coletadas de plantas cultivadas em CO_2 ambiente e elevado no experimento FACE.

2.3.4. Discriminação da mistura ternária para folhas

Os extratos das folhas, obtidos a partir da mistura ternária (éter etílico/diclorometano/metanol), foram as que mais se distinguiram em relação às condições de CO₂ em que estavam cultivadas. Para aumentar a robustez da análise, quinze amostras de folhas de diferentes posições da Figura 1 foram coletadas e tratadas com essa mistura de solventes. Os dados espectrais para as folhas foram arranjados em uma matriz contendo 30 colunas correspondentes as amostras e 601 linhas correspondentes as diferentes intensidades de absorbância. Figura 8a mostra o gráfico dos escores para as frações extraídas com a mistura ternária para as amostras de folhas de CO₂ ambiente e elevado. Fator 2 discrimina dois grupos, um com amostras cultivadas em CO₂ ambiente na parte superior e outro com amostras cultivadas em CO₂ elevado na parte inferior. A partir do gráfico dos *loadings* desse fator, Figura 8b, a banda em 227 nm apresenta maior peso para as amostras ambiente enquanto a banda em 273 nm se correlaciona com amostras de CO₂ elevado.

A dispersão dos escores no fator 1 (Figura 8a) está relacionado as diferentes posições das folhas ao longo do perfil vertical do cafeeiro. As extremidades para amostras ambiente são ocupados pelas posições 8 e 12. Folhas da posição 8 são encontradas no exterior dos ramos plagiotrópicos na orientação leste-oeste na camada inferior, enquanto a posição 12 está no ramo ortotrópico na parte superior da planta. De acordo com os *loadings* do primeiro fator na Figura 8b, os metabólitos associados com as bandas de 227 e 273 nm possuem maiores abundâncias para as folhas na posição 12 para concentração ambiente de CO₂ enquanto aquelas da posição 8 possuem maiores abundâncias para amostras cultivadas em CO₂ elevado. Como pode ser visto na Figura 7b, as bandas em 227 e 273 nm são negativamente correlacionadas no fator 2, com a banda em 227 nm sendo mais forte para amostras com CO₂ ambiente e banda em 273 nm para amostras de CO₂ elevado.

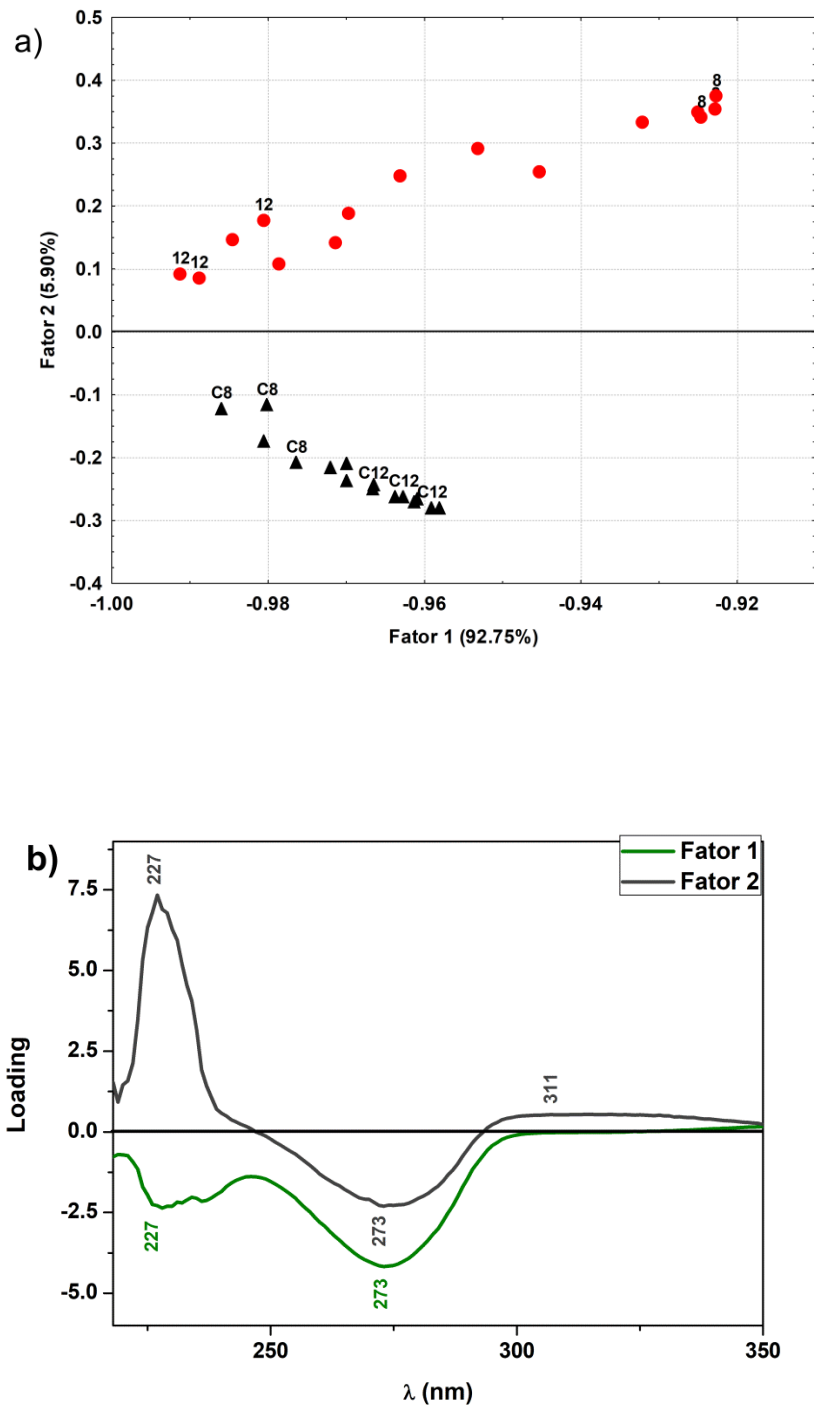


Figura 8. a) Gráfico dos escores da análise de fator dos espectros de UV-Vis de amostras de folhas de *Coffea arabica* cultivadas em níveis de CO_2 ambiente (●) e CO_2 elevado (▲) no experimento FACE e tratada com a mistura ternária. b) Gráfico dos *loadings* para os dois primeiros fatores.

2.3.5. *Identificação dos metabólitos predominantes em folhas de café cultivadas em CO₂ elevado*

A atribuição de metabólitos às bandas individuais de matrizes complexas é intrincado devido às sobreposições de bandas de absorção de espécies químicas similares. Contudo, os espectros proporcionam uma boa ferramenta discriminatória. Para entender os efeitos da biodisponibilidade de carbono na composição, que ocorre durante o processo de adaptação da planta, é necessário identificar os grupos de compostos nos extratos que discriminam as alterações metabólicas nos órgãos vegetativos formados sob concentração elevada de CO₂ em comparação com aqueles sob concentração ambiente de CO₂. Aqui usou-se os extratos de discriminação do planejamento estatístico de misturas, obtidos a partir do solvente extrator **edm** para amostras de folhas (Figura 8a), que foram então submetidas a CLAE-PDA e análise de espectrometria de massa direta.

Uma nova estratégia para eluição gradiente foi aplicada para melhorar a separação metabólica. Figura 9 apresenta o esquema usado na escolha da fase móvel para a separação cromatográfica. Os vértices do triângulo correspondem a níveis de 100% dos solventes acetonitrila, metanol e água. As arestas representam a combinação binária desses solventes que ocorre durante a eluição gradiente. Cada aresta do triângulo representa a eluição em duas direções opostas resultando em seis diferentes eluições gradiente.

Figura 9 mostra que o melhor gradiente cromatográfico encontrado, em menor tempo de corrida, foi o gradiente de água para acetonitrila que apresenta 5 picos em nove minutos.

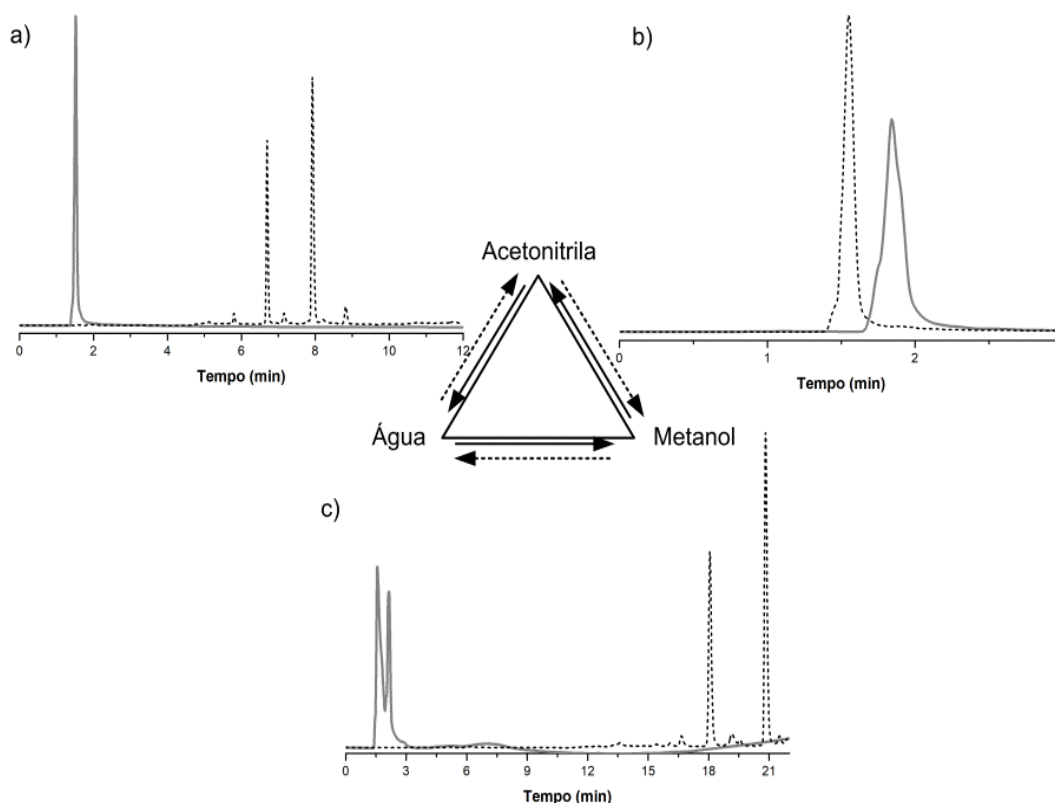


Figura 9. Estratégia para determinar um gradiente cromatográfico otimizado para os extratos **edm** de amostras de folhas de *Coffea arabica* L.

Figura 10a mostra a absorção no UV-Vis de cafeína encontrada na separação cromatográfica das folhas de café. Esse perfil possui bandas com absorções máximas em 195 e 272 nm. A área abaixo da banda para as amostras enriquecidas com CO₂ é 32% maior que as amostras com CO₂ atmosférico. Assumindo que essas bandas são exclusivamente de cafeína, isso corresponderia a um aumento substancial da mesma. A presença de cafeína é confirmada pelos espectros de massas no modo positivo ($[M+H]^+=195$).

Esse metabólito pertence à classe dos alcalóides purínicos, sendo um dos mais abundantes nas plantas da espécie *Coffea*, que desempenha um papel defensivo contra herbívoros e patógenos.^{55,56} Alcalóides purínicos são um grupo de compostos nitrogenados na

maioria derivados de nucleotídeos purínicos e suas classes geralmente tem origens biossintéticas únicas e suas rotas já foram elucidadas. O alcalóide purínico inicial para a síntese é a xantosina. Uma das rotas sintéticas é derivada de nucleotídeos purínicos que se originam da biossíntese purínico denominada *de novo*.⁵⁷⁻⁵⁹ A produção de nucleotídeos purínicos envolve precursor não-purínico, dentre eles, o CO₂, podendo ser uma rota influenciada pelo o aumento de carbono atmosférico e indicado pelo aumento da abundância de cafeína nessas condições.

Além da cafeína, espectros característicos de caveol, canferol e quercetina (Figura 10b), foram encontrados nos extratos de folhas para os dois níveis de concentração de CO₂. O espectro de massa indicou a presença de caveol, m/z 315 [M+H]⁺⁶⁰, canferol-7-O-neohesperidosídeo, m/z 285 [M-H]⁻ e canferol-3-O-rutinosídeo, m/z 284 [M-H]⁻⁶¹. Além disso o sinal m/z 465 [M+H]⁺ sugere a presença de quercetina glucosídeo/galactosídeo.⁶²

Os espectros de massas no modo negativo do extrato de folhas **edm** apresentou sinal para íons moleculares de outros metabólitos, fragmentação do íon m/z 191 que é característico de ácido quínico [M-H]⁻⁶³, m/z 325 [M-H]⁻ de derivados de ácido cumárico⁶⁴, m/z 367 [M-H]⁻ de derivados de ácido ferrúlico⁶⁵ e m/z 421 [M-H]⁻ de derivados de ácido hidroxicinâmico.⁶⁶

A fração discriminante das folhas cultivadas nas duas atmosferas de CO₂ continha alcalóides, diterpenos, flavonóis, ácidos aromáticos e fenólicos (Figura 10). Diterpenos (caveol) e flavonóis (canferol e quercetina), como visto nos dados cromatográficos, não mostraram diferenças em suas abundâncias relativas produzidas em folhas de plantas cultivadas sob os dois ambientes de CO₂. Os terpenos costumam ter um odor forte, sabor amargo e podem proteger as plantas contra herbívoros⁶⁷ e doenças. Além disso, a proximidade de dois ambientes de CO₂ pode ter causado a presença de herbívoros similares e não induziram diferenças no foliar do caveol. O canferol e a quercetina têm funções protetoras nas

plantas induzidos pela geada, seca e calor⁶⁸, e não mostraram diferenças entre as duas amostras cultivadas em dois ambiente de CO₂ nas nossas experiências.

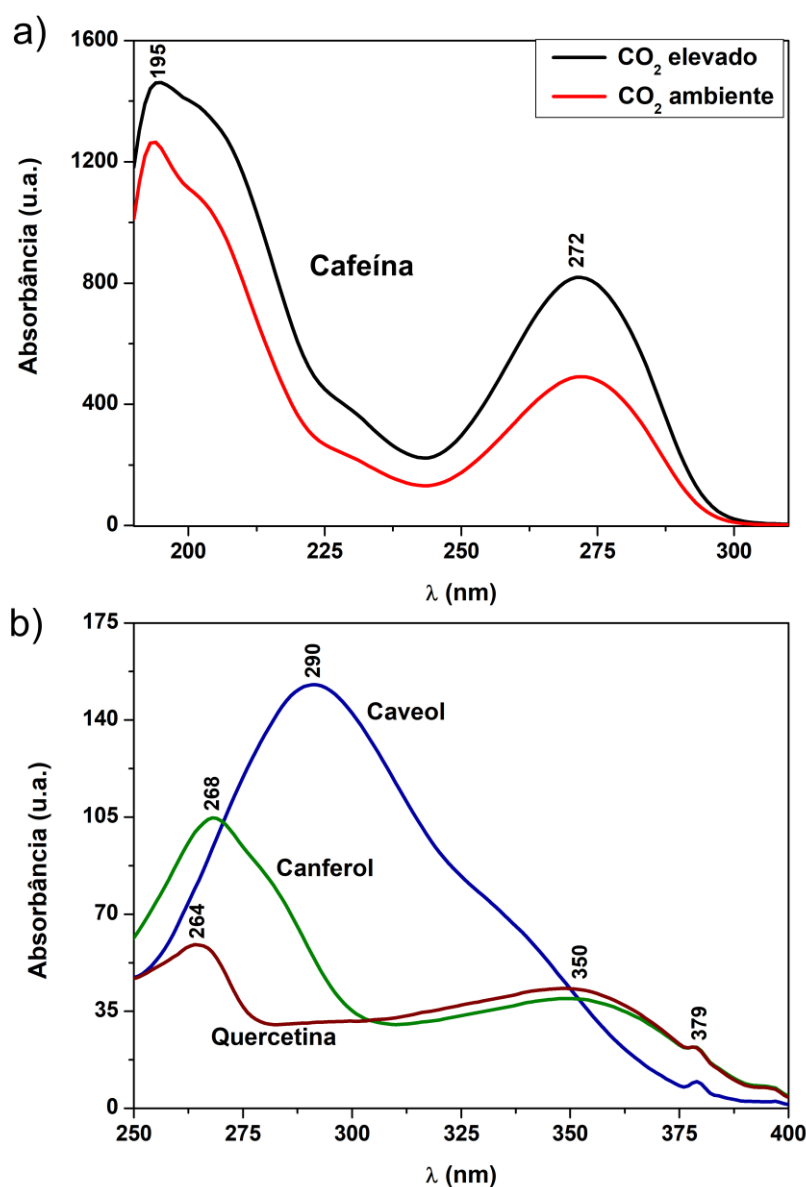


Figura 10. a) Espectros de cafeína obtidos a partir dos extratos **edm** de folhas de *Coffea arabica* coletadas de plantas cultivadas em níveis de CO₂ ambiente e elevado no experimento FACE. b) Espectros característicos para caveol, canferol e quercetina presentes nas folhas de *Coffea arabica*.

Os ácidos fenólicos exibem intensas absorções na região de 250-350 nm⁶⁹, assim como a cafeína (273 nm), que provavelmente se sobrepôs às bandas moleculares nos espectros das frações (Figura 6) e consequentemente contribuiu para os *loadings* (Figura 8b). Para estes *loadings*, o perfil da região de 250-300 nm indicou que as folhas de plantas crescidas sob elevado CO₂ foram discriminadas devido às absorbâncias nesta região espectral. Nas análises espectrais de massa, os ácidos fenólicos apresentaram maiores abundâncias relativas nas folhas das plantas cultivadas sob o nível de CO₂ elevado que o atual. Uma tendência semelhante é encontrada em gengibre cultivado sob alto CO₂.⁷⁰ A presença de ácido fenólico é considerada como parte da resposta ativa de defesa da planta contra doenças.⁷¹ Nossos resultados sugerem que as plantas de café podem ter maior resistência ativa à doença sob níveis elevados de CO₂.

Os metabólitos mais divergentes encontrados nas folhas de café foram cafeína e ácidos fenólicos. Em resumo, o café mostrou o potencial para lidar com alguns dos futuros estresses abióticos, a julgar pelo perfil metabólico orientado para a produção de metabólitos ativos defensivos sob alta concentração de CO₂ atmosférico. Por outro lado, também pode refletir a resposta da planta à adaptabilidade às condições ambientais existentes sob condições climáticas futuras.⁷²

2.3.6. *Efeito epigenético no perfil metabólico em folhas de café para plantas cultivadas em concentrações de CO₂ elevado e posteriormente em CO₂ ambiente*

Após cinco anos de cultivo nas instalações do FACE, o efeito epigenético de CO₂ para essas plantas foi avaliado. Para as folhas coletadas sete meses após a interrupção da injeção de CO₂ não existe a discriminação antes observada no gráfico dos escores para as folhas, como pode ser visto na Figura 11. A ausência desse efeito epigenético pode ser explicado por a)

efeito direto do aumento de CO₂ nas folhas e gemas de café, b) curta vida das folhas dos eixos plagiotrópicos e ramos de segunda ordem que é em média de dois a sete meses.⁷³

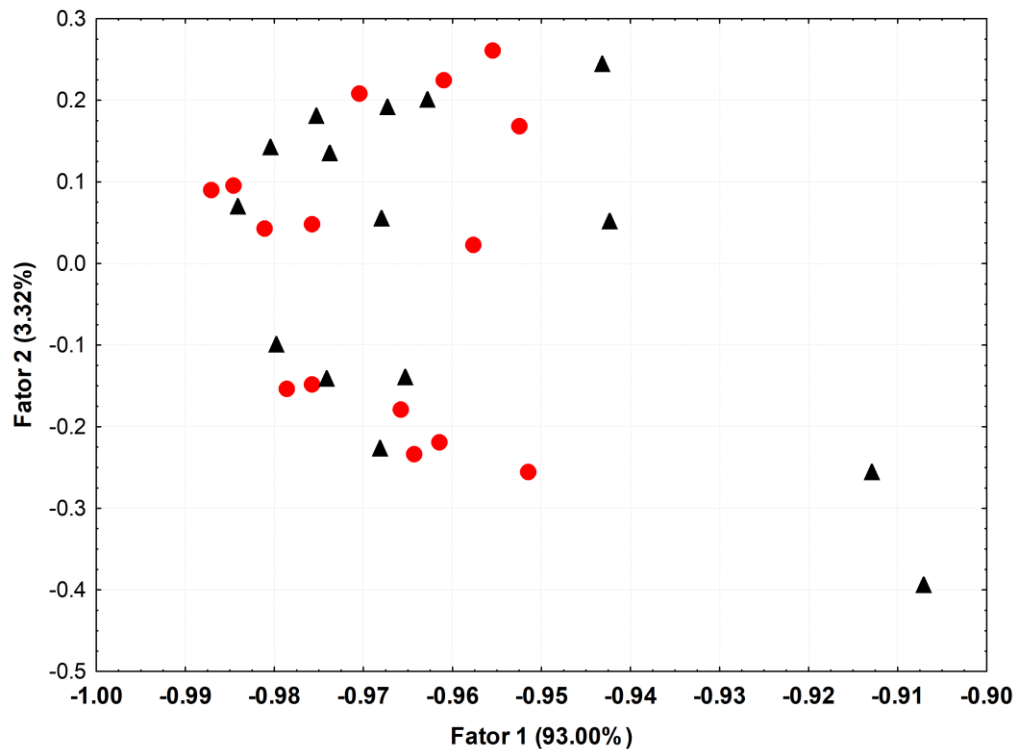


Figura 11. Gráfico dos escores dos espectros de UV-Vis para amostras de folhas de *Coffea arabica* coletadas sete meses (Fevereiro, 2017) após a suspensão da injeção de CO₂ nos campos para os extratos de **edm** CO₂ ambiente (●) e sete meses após a injeção de CO₂ ser interrompida (▲).

2.4. CONCLUSÃO

Folhas e gemas de *Coffea arabica* L. cultivadas em atmosfera de dióxido de carbono elevado e ambiente foram discriminadas por espectros de UV-Visível. Discriminação das gemas utilizando extrato de diclorometano indicou que CO₂ elevado afeta o desenvolvimento da planta em sua fase inicial. A mistura ternária éter etílico/diclorometano/metanol permitiu a discriminação das amostras de folhas. O espectro de UV-Vis da CLAE-PDA mostrou que as

amostras de folhas enriquecidas com CO₂ contêm substancialmente mais compostos do tipo metilxantinas, como a cafeína, ao passo que nenhum aumento foi observado para bandas de caveol, canferol e quercetina. Para as folhas da planta, são encontrados maiores níveis de ácidos fenólicos em folhas cultivadas em alta concentração de CO₂. A cafeína e os ácidos fenólicos são componentes ativos de defesa nas folhas, o que indica que as plantas de café lidariam com algumas das futuras pressões abióticas e bióticas. Após sete meses da suspensão do CO₂, as folhas de café apresentaram composições químicas similares às aquelas cultivadas em condições atmosféricas o que confirma a influência direta das condições de CO₂ atmosférico. O planejamento estatístico de misturas permitiu a amplificação do poder discriminatório para folhas e gemas, permitindo um estudo metabolômico detalhado. O uso integrado de planejamento estatístico de misturas, quimiometria, extração em fase sólida e detectores analíticos comuns é uma estratégia promissora para elucidar as mudanças metabólicas em matrizes complexas.

REFERÊNCIAS

1. Medlyn, B. E. *et al.* Using ecosystem experiments to improve vegetation models. *Nat. Clim. Chang.* **5**, 528–534 (2015).
2. Ainsworth, E. A. & Rogers, A. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising [CO₂]: mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell Environ.* **30**, 258–270 (2007).
3. Pritchard, S. G., Rogers, H. H., Prior, S. A. & Peterson, C. M. Elevated CO₂ and plant structure: A review. *Glob. Chang. Biol.* **5**, 807–837 (1999).
4. Rakocevic, M., Ferrandes, R., Marchiori, P. E. R. & Ribeiro, R. V. Estimating the canopy architecture and photosynthesis of *Coffea arabica* L. plants cultivated under long-term elevated air CO₂ concentration. *Proc. - 2016 IEEE Int. Conf. Funct. Plant Growth Model. Simulation, Vis. Appl. FSPMA 2016* 175–182 (2017).
5. Ramalho, J. C. *et al.* Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. *PLoS One* **8**, 1–19 (2013).
6. Schütz, M. & Fangmeier, A. Growth and yield responses of spring wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Minaret) to elevated CO₂ and water limitation. *Environ. Pollut.* **114**, 187–94 (2001).
7. Rogers, H. H., Runion, G. B. & Krupa, S. V. Plant responses to atmospheric CO₂ enrichment with emphasis on roots and the rhizosphere. *Environ. Pollut.* **83**, 155–189 (1994).
8. Rezende, F. M. de, Amanda Pereira de Souza, M. S. B. & Furlan, C. M. Is guava phenolic metabolism influenced by elevated atmospheric CO₂? *Environ. Pollut.* **196**, 483–488 (2015).
9. Novriyanti, E. *et al.* High nitrogen and elevated [CO₂] effects on the growth, defense and photosynthetic performance of two eucalypt species. *Environ. Pollut.* **170**, 124–130 (2012).
10. Runion, G. B. Climate change and plant pathosystems – future disease prevention starts here. *New Phytol.* **159**, 531–538 (2003).
11. Zullo, J. *et al.* Potential for growing arabica coffee in the extreme south of Brazil in a

- warmer world. *Clim. Change* **109**, 535–548 (2011).
12. Villers, L., Arizpe, N., Orellana, R., Conde, C. & Hernández, J. Impactos del cambio climático en la floración y desarrollo del fruto del café en veracruz, méxico. *Interciencia* **34**, 322–329 (2009).
 13. Bunn, C. *et al.* Multiclass classification of agro-ecological zones for arabica coffee: an improved understanding of the impacts of climate change. (2015).
 14. Chemura, A., Kutwayo, D., Chidoko, P. & Mahoya, C. Bioclimatic modelling of current and projected climatic suitability of coffee (*Coffea arabica*) production in Zimbabwe. *Reg. Environ. Chang.* **16**, 473–485 (2016).
 15. Martins, L. D., Tomaz, M. A., Lidon, F. C., DaMatta, F. M. & Ramalho, J. C. Combined effects of elevated [CO₂] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. *Clim. Change* **126**, 365–379 (2014).
 16. Davis, A. P., Gole, T. W., Baena, S. & Moat, J. The impact of climate change on indigenous arabica coffee (*Coffea arabica*): Predicting future trends and identifying priorities. *PLoS One* **7**, 10–14 (2012).
 17. Ghini, R. *et al.* Coffee growth, pest and yield responses to free-air CO₂ enrichment. *Clim. Change* **132**, 307–320 (2015).
 18. Rakocevic, M., Ribeiro, R. V., Ribeiro Marchiori, P. E., Filizola, H. F. & Batista, E. R. Structural and functional changes in coffee trees after 4 years under free air CO₂ enrichment. *Ann. Bot.* **121**, 1065–1078 (2018).
 19. Bruce, T. J. A., Matthes, M. C., Napier, J. A. & Pickett, J. A. Stressful “memories” of plants: Evidence and possible mechanisms. *Plant Sci.* **173**, 603–608 (2007).
 20. Delaroza, F., Rakocevic, M., Malta, G. B., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Spectroscopic and chromatographic fingerprint analysis of composition variations in *Coffea arabica* leaves subject to different light conditions and plant phenophases. *J. Braz. Chem. Soc.* **25**, 1929–1938 (2014).
 21. Afonso, S., Pisano, P. L., Silva, F. B., Scaminio, I. S. & Olivieri, A. C. Discrimination of *Annona muricata* and *Rollinia mucosa* extracts by using multivariate curve resolution and Partial Least-Squares regression of Liquid Chromatography-Diode Array data. *J. Braz. Chem. Soc.* **26**, 2241–2248 (2015).

22. Lonni, A. A. S. G., Longhini, R., Lopes, G. C., De Mello, J. C. P. & Scarminio, I. S. Statistical mixture design selective extraction of compounds with antioxidant activity and total polyphenol content from *Trichilia catigua*. *Anal. Chim. Acta* **719**, 57–60 (2012).
23. Moreira, I. & Scarminio, I. S. Chemometric discrimination of genetically modified *Coffea arabica* cultivars using spectroscopic and chromatographic fingerprints. *Talanta* **107**, 416–22 (2013).
24. Pauli, E. D., Scarminio, I. S. & Tauler, R. Analytical investigation of secondary metabolites extracted from *Camellia sinensis* L. leaves using a HPLC-DAD-ESI/MS data fusion strategy and chemometric methods. *J. Chemom.* **30**, 75–85 (2016).
25. Soares, P. K. & Scarminio, I. S. Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus *Bauhinia*. *Phytochem. Anal.* **19**, 78–85 (2008).
26. Borges, C. N., Breitzkreitz, M. C., Bruns, R. E., Silva, L. M. C. & Scarminio, I. S. Unreplicated split-plot mixture designs and statistical models for optimizing mobile chromatographic phase and extraction solutions for fingerprint searches. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **89**, 82–89 (2007).
27. Borges, C. N., Bruns, R. E., Almeida, A. A. & Scarminio, I. S. Mixture-mixture design for the fingerprint optimization of chromatographic mobile phases and extraction solutions for *Camellia sinensis*. *Anal. Chim. Acta* **595**, 28–37 (2007).
28. de Almeida, A. A. & Scarminio, I. S. Statistical mixture design optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea. *J. Sep. Sci.* **30**, 414–420 (2007).
29. Pauli, E. D., Malta, G. B., Sanchez, P. M., Moreira, I. C. & Scarminio, I. S. Mixture design analysis of solvent extractor effects on epicatechin, epigallocatechin gallate, epigallocatechin and antioxidant activities of the *Camellia sinensis* L. leaves. *Anal. Chem. Res.* **2**, 23–29 (2014).
30. Soares, P. K., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Original Paper Statistical mixture design – principal component optimization for selective compound extraction from plant material. *J. Sep. Sci.* **30**, 3302–3310 (2007).

31. Garcia, L. M. Z., Oliveira, T. F. de, Soares, P. K., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Statistical mixture design — Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **103**, 1–7 (2010).
32. De Souza, E. B. R., Da Silva, R. R., Afonso, S. & Scarminio, I. S. Enhanced extraction yields and mobile phase separations by solvent mixtures for the analysis of metabolites in *Annona muricata* L. leaves. *J. Sep. Sci.* **32**, 4176–4185 (2009).
33. Moreira, I., Scheel, G. L., Hatumura, P. H. & Scarminio, I. S. Efeito do solvente na extração de ácidos clorogênicos, cafeína e trigonelina em *Coffea arabica*. *Quimica Nova* **37**, 39–43 (2014).
34. Delaroza, F. & Scarminio, I. S. Mixture design optimization of extraction and mobile phase media for fingerprint analysis of *Bauhinia variegata* L. *J. Sep. Sci.* **31**, 1034–1041 (2008).
35. Justo, R., Afonso, S., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Open column, reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography with diode array detection and chemometric strategy for investigation of metabolic fingerprints of complex systems. *Anal. Methods* **6**, 9567–9574 (2014).
36. Soares, P. K., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Statistical mixture design investigation of fractionated and total extracts from *Erythrina speciosa* Andrews leaves. *J. Sep. Sci.* **32**, 644–652 (2009).
37. Soares, D. X., Scarminio, I. S. & Bruns, R. E. Mixture designs for exploring class diversity and metabolite fingerprinting: An efficient column chromatographic strategy. *Anal. Chim. Acta* **702**, 288–294 (2011).
38. Soares, P. K., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Principal component and Tucker3 analyses of High Performance Liquid Chromatography with diode-array detection fingerprints of crude extracts of *Erythrina speciosa* Andrews leaves. *Anal. Chim. Acta* **736**, 36–44 (2012).
39. Risso, W. E., Scarminio, I. S. & Moreira, E. G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. *Indian J. Exp. Biol.* **48**, 811–816 (2010).
40. Passari, L. M. Z. G., Scarminio, I. S. & Bruns, R. E. Experimental designs

- characterizing seasonal variations and solvent effects on the quantities of coumarin and related metabolites from *Mikania laevigata*. *Anal. Chim. Acta* **821**, 89–96 (2014).
41. Afonso, S. *et al.* Seasonal effects on HPLC-DAD-UV and UPLC-ESI-MS fingerprints and analgesic activities of *Vernonia condensata* Baker extracts. *J. Braz. Chem. Soc.* **26**, 350–358 (2015).
 42. Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D. Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrom. Rev.* **26**, 51–78 (2007).
 43. Forcisi, S. *et al.* Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research: Mass analyzers in ultra high pressure liquid chromatography coupling. *J. Chromatogr. A* **1292**, 51–65 (2013).
 44. Lin, L. & Lin, J.-M. Development of cell metabolite analysis on microfluidic platform. *J. Pharm. Anal.* **5**, 337–347 (2015).
 45. Anastas, P. T. Green chemistry and the role of analytical methodology development. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **29**, 167–175 (1999).
 46. Raynie, D. E. & Essel, V. Green chemistry perspectives on analytical extractions. *LC GC North Am.* **31**, 18–21 (2013).
 47. Rakocevic, M. & Matsunaga, F. T. Variations in leaf growth parameters within the tree structure of adult *Coffea arabica* in relation to seasonal growth, water availability and air carbon dioxide concentration. *Ann. Bot.* **122**, 117–131 (2018).
 48. Jardim, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida : Fundamentos teóricos e novas estratégias para preparação de fases sólidas. *Sci. Chromatogr.* **2**, 13–25 (2010).
 49. Collins, C. H. & Braga, G. L. Introdução a Métodos Cromatográficos. (Editora da Unicamp, 1988).
 50. Mukherjee, K. D. & Weber, N. Handbook of Chromatography: Analysis of Lipids. (CRC Press, 1993).
 51. Snyder, L. R., Carr, P. W. & Rutan, S. C. Solvatochromically based solvent-selectivity triangle. *J. Chromatogr. A* **656**, 537–547 (1993).
 52. Souto, U. T. C. P. *et al.* UV-Vis spectrometric classification of coffees by SPA-LDA. *Food Chem.* **119**, 368–371 (2010).

53. Scott, A. I. *Interpretation of the ultraviolet spectra of natural products*. (Pergamon press, 1964).
54. Özdemir, Y. & Güçer, S. Speciation of manganese in tea leaves and tea infusions. *Food Chem.* **61**, 313–317 (1998).
55. Ziegler, J. & Facchini, P. J. Alkaloid biosynthesis: Metabolism and trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 735–769 (2008).
56. Ashihara, H., Sano, H. & Crozier, A. Caffeine and related purine alkaloids: Biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering. *Phytochemistry* **69**, 841–856 (2008).
57. Ashihara, H., Monteiro, A. M., Gillies, F. M. & Crozier, A. Biosynthesis of caffeine in leaves of coffee. *Plant Physiol.* **111**, 747–753 (1996).
58. Ashihara, H. & Suzuki, T. Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Front. Biosci.* **9**, 1864–1876 (2004).
59. Zalkin, H. & Dixon, J. E. *De Novo* Purine nucleotide biosynthesis. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* **42**, 259–287 (Elsevier, 1992).
60. Dias, R. C. E., De Faria, A. F., Mercadante, A. Z., Bragagnolo, N. & De Benassi, M. T. Comparison of extraction methods for kahweol and cafestol analysis in roasted coffee. *J. Braz. Chem. Soc.* **24**, 492–499 (2013).
61. Hvattum, E. & Ekeberg, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **38**, 43–49 (2003).
62. Rajbhandari, R. *et al.* Determination of cranberry phenolic metabolites in rats by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **59**, 6682–6688 (2011).
63. Poon, G. K. Analysis of catechins in tea extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **794**, 63–74 (1998).
64. Sánchez-Rabaneda, F. *et al.* Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1008**, 57–72 (2003).

65. Kammerer, D., Carle, R. & Schieber, A. Characterization of phenolic acids in black carrots (*Daucus carota* ssp. *sativus* var. *atrorubens* Alef.) by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**, 1331–1340 (2004).
66. Chen, H.-J., Inbaraj, B. S. & Chen, B.-H. Determination of phenolic acids and flavonoids in taraxacum formosanum kitam by liquid chromatography- tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 260–285 (2012).
67. Martin, D. M., Gershenzon, J. & Bohlmann, J. Induction of volatile terpene biosynthesis and diurnal emission by methyl jasmonate in foliage of norway spruce. *Plant Physiol.* **132**, 1586–1599 (2003).
68. Amalesh, S., Das, G. & Das, K. S. Roles of flavonoids in plants. *Int J Pharm Sci Tech* **6**, 12–35 (2011).
69. Rojas, J., Londoño, C. & Ciro, Y. The health benefits of natural skin uva photoprotective compounds found in botanical sources. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **8**, 13–23 (2016).
70. Ghasemzadeh, A., Jaafar, H. Z. E. & Rahmat, A. Elevated carbon dioxide increases contents of flavonoids and phenolic compounds, and antioxidant activities in malaysian young ginger (*Zingiber officinale* Roscoe.) Varieties. *Molecules* **15**, 7907–7922 (2010).
71. Nicholson, R. L. & Hammerschmidt, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **30**, 369–389 (1992).
72. Rodrigues, W. P. *et al.* Long-term elevated air [CO₂] strengthens photosynthetic functioning and mitigates the impact of supra-optimal temperatures in tropical *Coffea arabica* and *C. canephora* species. *Glob. Chang. Biol.* **22**, 415–431 (2016).
73. Rakocovic, M. & Matsunaga, F. T. Variations in leaf growth parameters over the tree structure of adult *Coffea arabica* in relation to seasonal growth, water availability and air carbon dioxide concentration. *Ann. Bot.* **In press**, (2018).



CAPÍTULO III

DISCRIMINAÇÃO DE FOLHAS DE *Coffea arabica* L. CULTIVADAS SOB INCREMENTO DE GÁS CARBÔNICO POR ESPECTROSCOPIA NIR E PLS-DA

3.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR, do inglês *near-infrared*) tem se tornado uma técnica analítica crescente e popular para analistas de alimentos, rações e também para estudos ambientais, principalmente por ser uma técnica rápida, de baixo custo e ambientalmente correta (por não necessitar de preparo de amostras e não ser destrutiva).^{1,2} A espectroscopia NIR extrai informações dos componentes experimentais, e é importante saber que as bandas de absorção ocorrem devido à sobretons (do inglês *overtone*) e combinações de vibrações fundamentais. Por isso o espectro de NIR não é de fácil interpretação.^{3,4} A grande quantidade de dados requer o desenvolvimento de um modelo de previsão preciso e robusto se fazendo necessário a utilização de métodos quimiométricos para uma análise mais profunda.^{1,5}

Mínimos quadrados parciais (PLS, *Partial Least Squares*) é um método que reduz a dimensão dos dados eficientemente em análises de espectroscopia no infravermelho próximo.⁶⁻⁸ A ferramenta mínimos quadrados parciais com análise discriminante, PLS-DA⁹ (*Partial Least Squares with Discriminant Analysis*) é um método de reconhecimento de padrões supervisionado, fundamentado na regressão PLS, que pode ser aplicado a dados de primeira ordem.^{10,11} O método de PLS-DA pode ser aplicado aos espectros de NIR resultando em modelos de calibração, utilizados para prever propriedades de interesse.⁷

A espectroscopia NIR é uma técnica versátil e abrangente, já reportada em diversas áreas de estudo¹²⁻¹⁴, e vem sendo largamente usada em análises de café.^{5,8,15-17} Como se sabe, o café é uma planta com desenvolvimento perene e, por passar por todo o ciclo climático sazonal, é sensível a mudanças climáticas e do ambiente.¹⁸ Sendo assim, o contínuo aumento

da concentração atmosférica de dióxido de carbono (CO₂) afeta o desenvolvimento dessas plantas.

No último ano, a concentração atmosférica de CO₂ ultrapassou a marca dos 400 ppm, chegando a aproximadamente 406 ppm segundo *Earth System Research Laboratory, Global Monitoring Division*, e é previsto que este valor dobre até o final do século.^{19,20} A principal causa do aumento da concentração de CO₂ atmosférico é a ação antrópica, seja ela pela queima de combustíveis fósseis ou pelas atividades industriais e agrícolas.^{21,22} De acordo com a *Carbon Dioxide Information Analysis Center (CDIAC)*, a estimativa das emissões pela queima de combustíveis fósseis em 2014 foi de 9,8 milhões de toneladas métricas de carbono.²³

A concentração de dióxido de carbono na atmosfera é primordial na fotossíntese e, além disso, provoca uma série de mudanças nas plantas, principalmente aquelas com metabolismo C3, como o café.²⁴ Dentre essas mudanças estão o aumento do rendimento dos grãos, redução da condução estomática, diminuição da fotorrespiração e aumento da área foliar.^{18–21,25,26} A exposição das plantas a estresses provoca formação de mecanismos de tolerância e resistência.²⁷ Dentro desses mecanismos está a formação de uma memória vegetal ou efeito epigenético metabólico que é caracterizado por respostas moleculares elevadas após a exposição a esse estresse.²⁸

A combinação de espectroscopia no infravermelho próximo e análise multivariada são aplicáveis em muitos alimentos e *commodities* agrícolas para prever composição química dessas amostras.^{12,29} Portanto, o objetivo deste trabalho é utilizar a técnica NIR associado com PLS-DA como uma ferramenta rápida e não destrutiva para discriminação de folhas de *Coffea arabica* L. cultivadas em atmosfera com CO₂ elevado daquelas cultivadas em CO₂ ambiente e também avaliar qual o comportamento após a interrupção da injeção de CO₂ no meio.

3.2. MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1. Cultivo do café

Sementes de Catuaí Vermelho IAC 144' foram cultivadas sob a primeira instalação do *Free Air Carbon Enrichment* (FACE) na América do Sul, localizada na Embrapa Meio Ambiente, em Jaguariúna SP, Brasil (22°43'S, 47°01'O, 570 m de altitude). A injeção direta de CO₂ puro foi usada na metade dos anéis octogonais disponíveis, visando aumentar a abundância de CO₂ em 200 µL CO₂ L⁻¹ acima do nível da concentração atmosférica durante o período diurno (390 µL CO₂ L⁻¹). O enriquecimento do ar com CO₂ começou em 25 de Agosto de 2011 e foi mantida até o final de Junho de 2016, por um período de cinco anos, maiores detalhes estão disponíveis na Seção 2.2.1 do Capítulo 2.

A coleta foi realizada em triplicata em diferentes posições da planta, evitando interferência durante a análise. As posições das coletas para as folhas foram 1, 2, 3, 4 e 5 (Figura 1). A segunda coleta foi realizada no início de Fevereiro de 2017, sete meses após a interrupção da injeção de CO₂ nessas plantas. Essa coleta também foi realizada em triplicata nas mesmas posições indicadas.

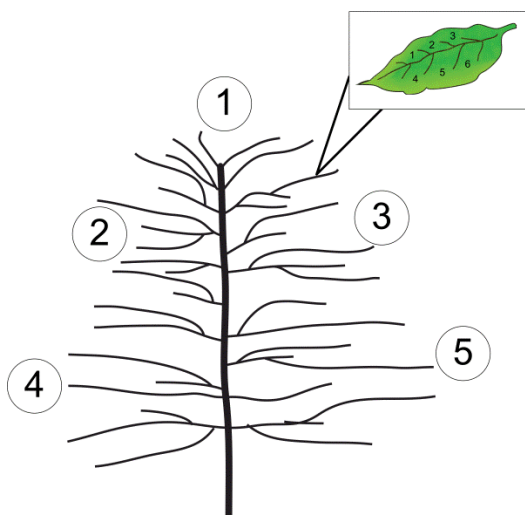


Figura 1. Posições esquemáticas das folhas de *Coffea arabica* L. coletadas de plantas cultivadas em atmosferas elevada e ambiente de CO₂ sob o experimento FACE.

3.2.2. Medida espectroscópica no infravermelho próximo

As folhas de diferentes posições foram submetidas à desidratação durante dois dias em uma estufa de ar forçado até atingir massa constante.

Medidas de reflectância espectral na região do infravermelho próximo foram efetuadas nas folhas de café. Foram realizadas seis diferentes leituras na superfície adaxial de cada folha (Figura 2) evitando o pecíolo, para folhas cultivadas em CO₂ elevado e ambiente coletadas em cinco posições, totalizando 60 espectros. Os espectros de reflectância foram obtidos utilizando o NIR *scan nano*. Cada espectro foi adquirido como resultado de seis varreduras na faixa espectral de 900 nm a 1700 nm com uma resolução digital de 228 e temperatura controlada próximo aos 20°C.

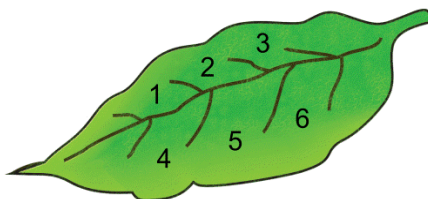


Figura 2. Esquema das medidas de reflectância realizada nas folhas de *Coffea arabica* L. cultivadas nos dois ambientes de CO₂.

3.2.3. Tratamento dos dados

O *software* Origin Pro 8 foi utilizado para a construção da matriz de dados e dos gráficos. Os pré-processamentos dos espectros e o método PLS-DA foram realizados usando o *software* Matlab R2007b com o auxílio das ferramentas do PLS-Toolbox 5.8.

O PLS-DA pode construir modelos que permitem a máxima separação entre classes utilizando um conjunto de variáveis preditoras $\mathbf{X}$ e categorias definidas $\mathbf{y}^{30,31}$. Nesse procedimento a matriz $\mathbf{X}$ é composta pelos espectros de NIR enquanto o vetor $\mathbf{y}$ é associado a duas classes diferentes, CO₂ elevado e CO₂ ambiente. A matriz $\mathbf{X}$ é definida por 60 linhas e

228 colunas, nas quais as linhas estão relacionadas às amostras e as colunas estão relacionadas às variáveis, no caso, comprimento de onda.

Do conjunto total de 60 espectros, 42 (70%) foram selecionadas pelo algoritmo Kennard-Stone³² em um subconjunto de calibração e 18 (30%) em um subconjunto de validação. Dos 42 espectros do subconjunto de calibração 25 correspondem às folhas cultivadas em CO₂ ambiente e 17 às folhas cultivadas em CO₂ elevado. Já para o subconjunto de validação, dos 18 espectros, 13 pertencem as folhas cultivadas em CO₂ elevado enquanto 5 as folhas CO₂ ambiente. Para reduzir as fontes de variação que não trazem informações relevantes na construção do modelo de calibração multivariada, e considerando efeitos de dispersão da luz³³, aplicou-se ao conjunto dos espectros a correção multiplicativa de dispersão (MSC, *Multiplicative Scatter Correction*). Em seguida, a segunda derivada (polinômio de segunda ordem com janela de 17 pontos) baseada no algoritmo de *Savitzky-Golay* foi aplicada para corrigir as linhas de base, e por fim os dados foram centrados na média. Esses foram os pré-processamentos que proporcionaram os valores menores ou mais estáveis de RMSECV dentre vários pré-processamentos testados.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 3 apresenta os espectros obtidos após o pré-tratamento (MSC e 2ª derivada) da medida de reflectância na região do infravermelho próximo das amostras de folhas de *Coffea arabica* cultivadas em CO₂ elevado e ambiente. As principais bandas encontradas estão localizadas na região de 1300-1700 nm. Contudo, devido ao fato das bandas serem amplas e por haver a possibilidade de sobreposição, a utilização do sinal do infravermelho próximo para a identificação de moléculas é intrincado, principalmente para folhas de café que são combinações de numerosas moléculas orgânicas^{8,15}. Por isso, a utilização do método

PLS-DA pode melhorar a interpretação desses dados e construir modelos de calibração baseados em todas as informações espectrais e com a máxima separação entre as classes.³⁴

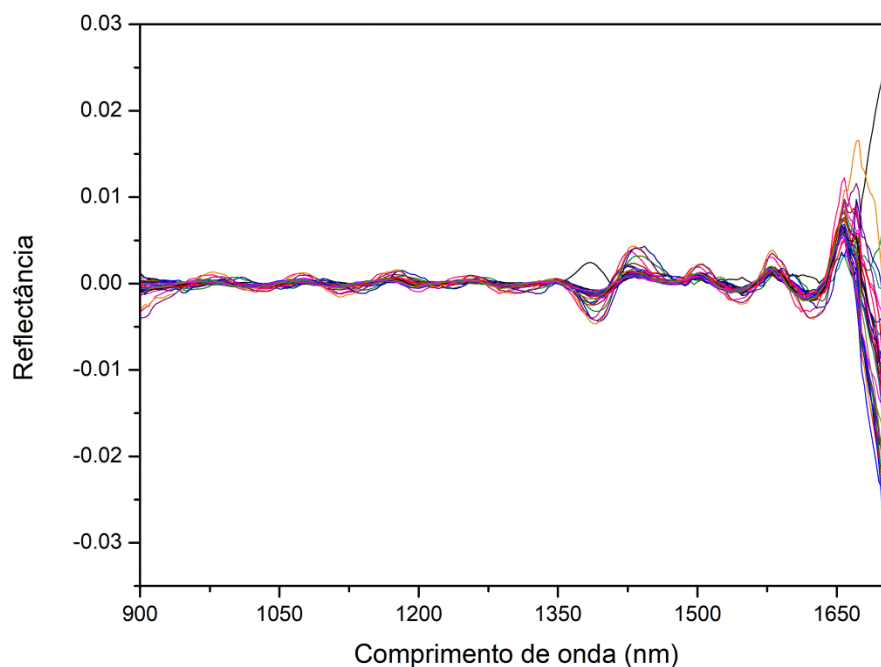


Figura 3. Espectros do infravermelho próximo das amostras de folhas de *Coffea arabica* L. cultivadas em CO₂ ambiente e CO₂ elevado após a aplicação de MSC e segunda derivada conjuntamente.

O modelo PLS-DA foi construído utilizando a matriz X de calibração, contendo os espectros das folhas de *Coffea arabica* cultivadas com enriquecimento de CO₂ e ambiente. O método de validação cruzada (CV, do inglês *Cross-Validation*) foi utilizado na avaliação dos erros de previsão e na escolha do número de variáveis latentes para desenvolvimento do modelo de calibração.³⁵ Com base no menor valor da raiz quadrada da soma do quadrado dos erros de validação cruzada (RMSECV - do inglês, *Root Mean Square Error of Cross Validation*) usando o critério das venezianas (*venetian blinds*), com 6 divisões, o valor encontrado foi 0,33.³⁵ Para o desenvolvimento do modelo de calibração foram necessárias cinco variáveis latentes (VL), representando 99,11% em X e 71,49% em y. Já a exatidão do conjunto de previsão foi avaliada pelo erro médio quadrático de previsão (RMSEP - do inglês, *Root Mean Squares Error of Prediction*), igual a 0,26. A proximidade entre esses dois valores

demonstra a construção de um bom modelo¹¹, evidenciando que a escolha do número de variáveis latentes foi correta, promovendo a construção de um modelo bem ajustado.

Os escores do modelo PLS-DA são apresentados na Figura 4a, onde uma separação entre as amostras cultivadas em diferentes condições de CO₂ pode ser observada. A primeira variável latente explica 33,93% da variância do eixo y enquanto a terceira explica 21,35%. Neste caso, as amostras cultivadas em CO₂ ambiente estão discriminadas na região positiva da projeção da VL1 *versus* VL3, enquanto que as amostras cultivadas em CO₂ elevado estão discriminadas na região negativa. A Figura 4b, mostra a projeção dos *loadings* entre as VL1 e VL3 das folhas de café que receberam duas condições de CO₂. Para a VL1, os comprimentos de onda que mais contribuíram para a classificação das folhas cultivadas em CO₂ ambiente, indicados pelos *loadings* positivos, foram em 1672 e 1684 nm^{8,36}, relacionados ao estiramento C-H e em 1502 e 1580 nm, atribuídos ao estiramento N-H e O-H, respectivamente. Já os comprimentos de onda que tiveram uma maior contribuição na classificação das folhas cultivadas em CO₂ elevado, indicados pelos *loadings* negativos, foram em 1388 e 1621 nm, devido ao estiramento C-H e em 1539 nm, relativo ao estiramento O-H. Para a VL3, os comprimentos de onda, com valores de *loadings* positivos, em 1197, 1378, 1533 e 1610 nm são atribuídos ao estiramento C-H e em 1014 nm característico do estiramento N-H, classificaram as folhas cultivadas em CO₂ ambiente. Já os comprimentos de onda, com valores de *loadings* negativos, em 1657 nm relacionado ao estiramento C-H, 1495 e 1572 nm característicos do estiramento N-H e em 1539 e 1160 nm relacionados aos estiramentos O-H e C=O, respectivamente, classificaram as folhas cultivadas em CO₂ elevado. Por fim, a banda em 1698 nm foi importante para ambas as condições de CO₂, apresentando valores de *loadings* negativos na VL1 e positivo na VL3.

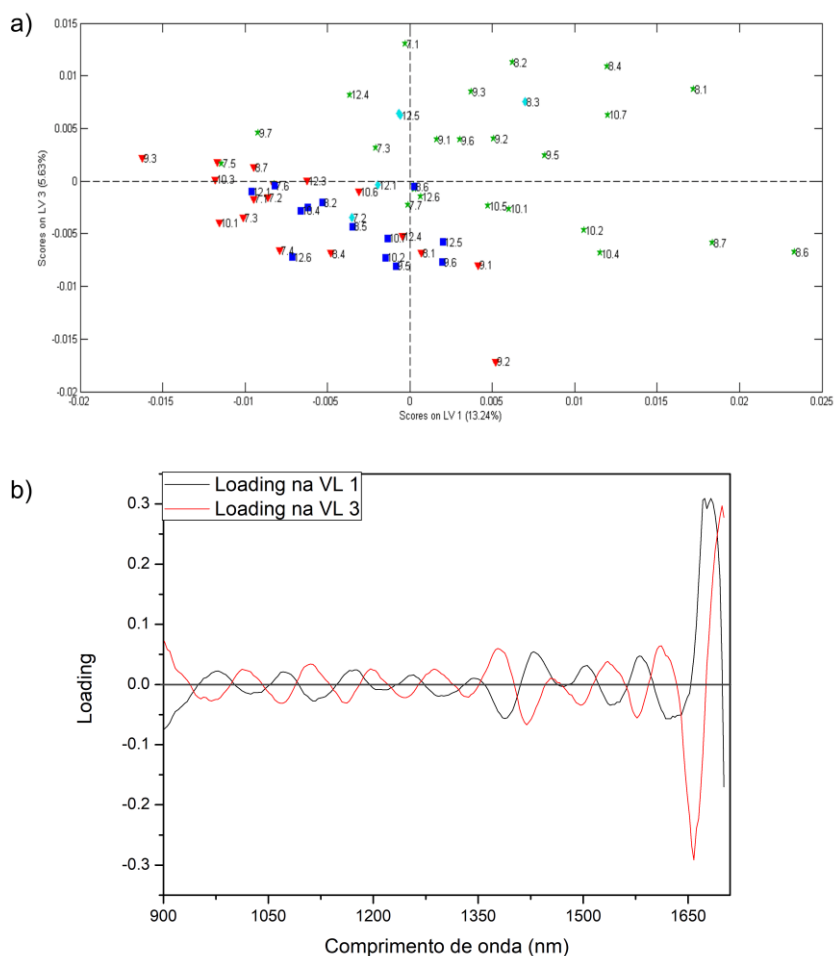


Figura 4. a) Escores entre LV1 vs. LV3 do modelo PLS-DA para as folhas de *Coffea arabica* L. cultivadas em atmosfera de CO₂ elevada e ambiente. **b)** Gráfico dos *loadings* das LV1 e LV3. Folhas em: CO₂ elevado de calibração (▼), CO₂ elevado de validação (■), CO₂ ambiente de calibração(★) e CO₂ ambiente de validação(◆).

A fim de identificar a importância relativa das variáveis preditoras no modelo, utilizou-se o parâmetro do modelo da importância da variável na projeção (VIP – do inglês, *Variable Importance in Projection*). Os valores dos escores do VIP avaliam a importância das variáveis individuais, contribuem na definição do espaço da matriz na modelagem de PLS-DA e fornecem uma ferramenta útil na interpretação de cada variável.^{30,37} Normalmente a média dos escores do VIP é 1 e por isso esse valor é tomado como um limiar de significância: os preditores que possuem um VIP maior que 1 são considerados como contribuintes de forma relevante para o modelo, enquanto os demais são marcados como não-significativos.³⁷ A Figura 5 mostra o gráfico do VIP escores para as amostras cultivadas em CO₂ ambiente e CO₂

elevado, sendo que os comprimentos de onda encontrados acima da média 1 foram 1572, 1610, 1664, 1684 e 1698 nm, indicando que estas são as bandas mais importantes na separação das amostras.

As bandas de maior importância na discriminação das amostras encontradas entre 1600-1700 nm são características de estiramentos C-H.⁸ O comprimento de onda de 1698 nm corresponde ao primeiro sobretom (*overtone*) da banda de estiramento fundamental (2ν) de C-H assimétrico.³⁶ Os comprimentos de onda de 1684 e 1672 nm são correspondentes ao estiramento C-H que podem estar relacionados às moléculas de metilxantinas, principalmente a cafeína⁸. A banda indicada no comprimento de onda de 1657 nm corresponde ao estiramento C-H de aromático. A banda encontrada no comprimento de onda de 1610 nm é característica de estiramento C-H. Já o comprimento de onda encontrado em 1572 nm está relacionado ao estiramento da ligação N-H e flexão no plano N-H característica de amidas, como proteínas e xantinas.³⁶

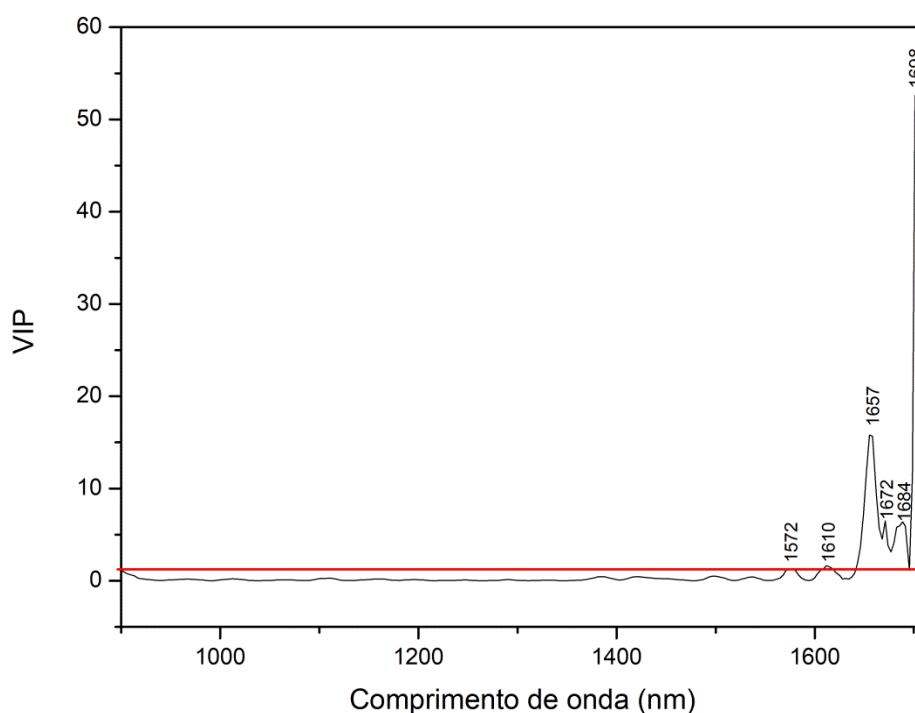


Figura 5. Gráfico dos VIP escores para o modelo PLS-DA para as amostras cultivadas em CO₂ ambiente e CO₂ elevado.

A distribuição, das amostras de calibração e validação nas classes de CO₂ elevado e CO₂ ambiente, separadas pelo valor limite (*threshold*), estabelecido pelo modelo PLS-DA, é apresentado na Figura 6. Nesse caso, o valor limite é indicado como uma linha horizontal com valores de 0,59 para CO₂ elevado e 0,41 para CO₂ ambiente. O valor limite dividirá melhor as classes com a menor probabilidade de falsas classificações para previsões futuras. Valores acima desse limite indicam que a amostra pertence à classe modelada e valores abaixo do limite indicam que a amostra não pertence à classe.^{11,31,35}

A sensibilidade do modelo corresponde à capacidade de prever corretamente todas as amostras de validação de uma determinada classe. Se todas as amostras de validação de uma determinada classe forem classificadas corretamente então a sensibilidade do modelo é igual a 1.^{11,31,38} No modelo construído, a sensibilidade para a classe das folhas cultivadas em CO₂ elevado foi 0,94 enquanto que para a classe das folhas cultivadas em CO₂ ambiente foi 0,92. Com base nesses resultados, o modelo foi capaz de classificar corretamente 94% das folhas cultivadas em CO₂ elevado e 92% das folhas cultivadas em CO₂ ambiente.

A especificidade corresponde à previsão incorreta de outras amostras de validação em uma dada classe, dessa forma, se não apresentar erros de previsão a especificidade será 1.^{11,31,38} Para as folhas cultivadas em CO₂ elevado a especificidade foi 0,92 devido à predição errônea de folhas cultivadas em CO₂ ambiente como pertencente à classe CO₂ elevado. A classe de folhas cultivadas em CO₂ ambiente apresentou especificidade igual a 0,94 devido à predição errônea de folhas cultivadas em CO₂ elevado como pertencente à classe CO₂ ambiente.

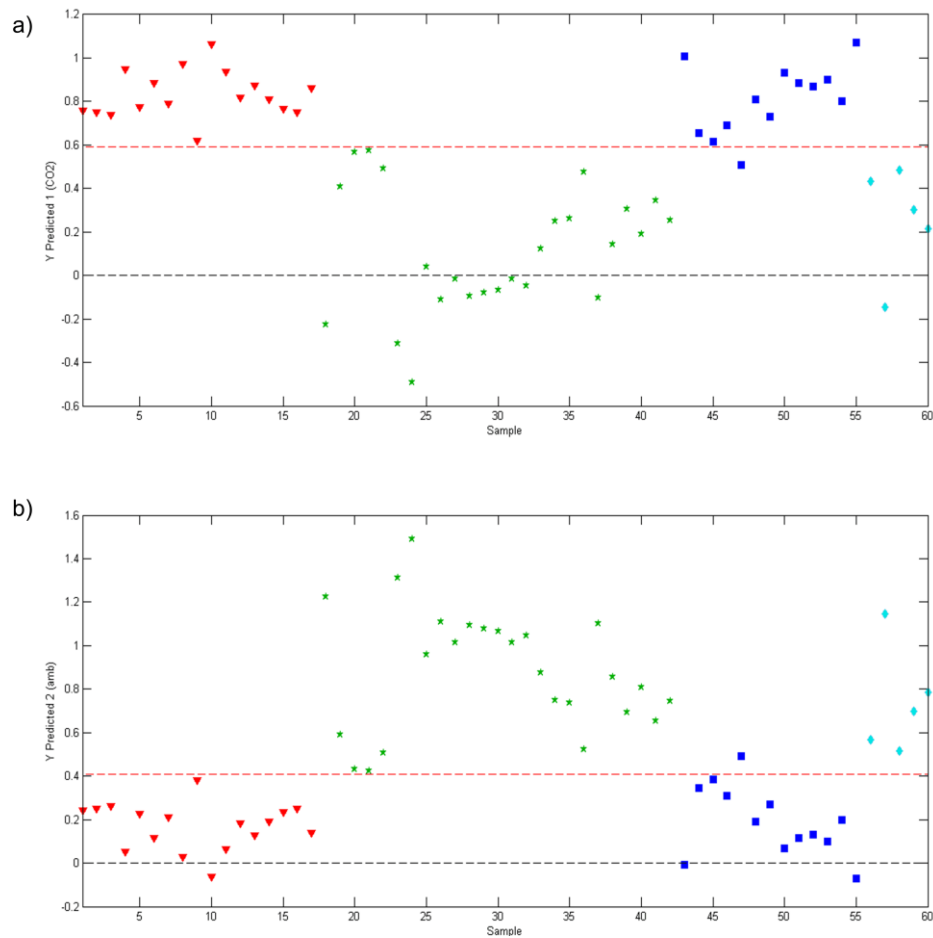


Figura 6. Distribuição das amostras de calibração e validação nas classes para folhas de *Coffea arabica* L. cultivadas em **a)** CO₂ elevado e **b)** CO₂ ambiente. Folhas em: CO₂ elevado de calibração (▼), CO₂ elevado de validação (■), CO₂ ambiente de calibração (★) e CO₂ ambiente de validação(◆).

O modelo PLS-DA construído foi então utilizado para testar as amostras de folhas coletadas sete meses após a interrupção da injeção de CO₂ (Figura 7) para verificar se as folhas apresentam a mesma classificação que na coleta anterior uma vez que as partes aéreas das plantas, como as folhas, são as que mais sofrem variações do estresse, como a mudança da concentração do dióxido de carbono na atmosfera.³⁹

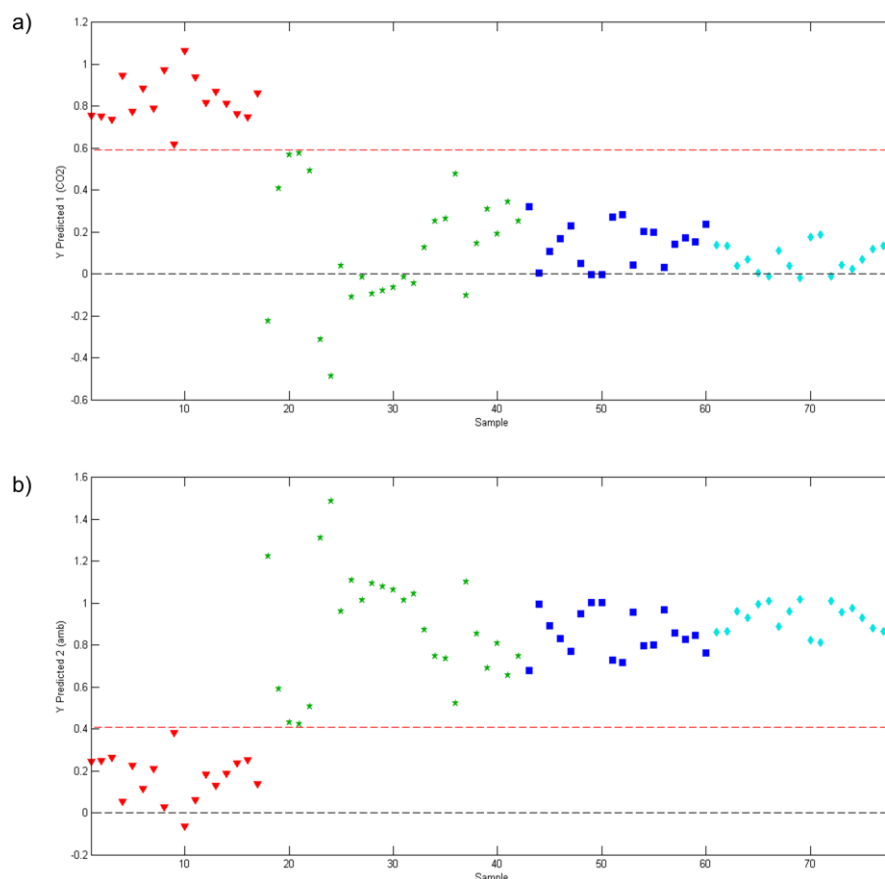


Figura 7. Distribuição das amostras de folhas de *Coffea arabica* coletadas após sete meses de interrupção de CO₂ cultivadas em condições anteriormente **a)** CO₂ elevado e **b)** CO₂ ambiente, utilizando o modelo PLS-DA desenvolvido a partir do conjunto de espectros (NIR) de calibração das folhas enriquecidas de CO₂ e ambiente. Folhas em: CO₂ elevado de calibração (▼), CO₂ sete meses depois (■), CO₂ ambiente de calibração (★) e ambiente sete meses depois (◆).

A flexibilidade do seu metabolismo permite que as plantas lidem com a flutuação do ambiente em que está envolvida.²⁸ Como as plantas estão presas em seus lugares e não podem evitar as mudanças no seu ambiente elas desenvolvem estratégias moleculares para se defender contra o estresse abiótico, muitas vezes causando um aumento significativo de substâncias intracelulares como já investigado anteriormente.⁴⁰⁻⁴² Como pode se observar na Figura 7, as amostras coletadas após a interrupção da injeção de CO₂ apresentam similaridade com as amostras cultivadas apenas em dióxido de carbono ambiente. Não há nenhuma indicação de que ocorreu a memória epigenética. Possivelmente a estratégia utilizada pelas plantas foi a redefinição e recuperação.²⁸

Os resultados apresentados corroboram com aqueles descritos no Capítulo 2 e já publicados⁴¹ provando que através de uma técnica simples e não destrutiva, como o NIR, utilizando a quimiometria foi possível discriminar as duas condições de CO₂ em que as plantas de café (*Coffea arabica* L.) foram cultivadas. Além do mais, foi possível a utilização do modelo PLS-DA para classificar amostras coletadas após a interrupção da injeção de CO₂ provando que não ocorreu efeito de memória epigenética na planta.

3.4. CONCLUSÃO

A discriminação de amostras cultivadas em duas atmosferas de CO₂ pode ser realizada associando a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) com o método quimiométrico PLS-DA. Os comprimentos de onda responsáveis pela separação das classes foram 1572, 1610, 1664, 1684 e 1698 nm, comprimentos de ondas que podem estar relacionados, principalmente, as moléculas de metilxantinas.

As principais vantagens da aplicação do método sugerido é a análise rápida e não destrutiva das folhas, sem qualquer preparação da amostra. Além disso, foi possível a utilização do modelo para a classificação de folhas coletadas após o término da injeção de CO₂ no ambiente, em que estas amostras foram cultivadas mostrando que há similaridade entre as folhas cultivadas apenas em atmosfera ambiente com aquelas haviam sido cultivadas em atmosfera elevada de CO₂. Portanto, para a planta de café, não há nenhuma indicação de que a memória epigenética ocorre, possivelmente a planta utilizou de uma estratégia de recuperação e redefinição.

REFERÊNCIAS

1. Fernández-Cabanás, V. M., Garrido-Varo, A., Pérez-Marín, D. & Dardenne, P. Evaluation of pretreatment strategies for near-infrared spectroscopy calibration development of unground and ground compound feedingstuffs. *Appl. Spectrosc.* **60**, 17–23 (2006).
2. Porep, J. U., Kammerer, D. R. & Carle, R. On-line application of near infrared (NIR) spectroscopy in food production. *Trends Food Sci. Technol.* **46**, 211–230 (2015).
3. Costa, R. E. L. Discriminação de madeiras similares por NIRS e PLS-DA considerando variações de temperatura e umidade. (2015).
4. Franca, A. S. & Oliveira, L. S. Spectroscopic methods for chemometric identification of defective and nondefective coffees. *Coffee in Health and Disease Prevention* 943–952 (Elsevier Inc., 2014).
5. Marquetti, I. *et al.* Partial least square with discriminant analysis and near infrared spectroscopy for evaluation of geographic and genotypic origin of arabica coffee. *Comput. Electron. Agric.* **121**, 313–319 (2016).
6. Chen, H., Song, Q., Tang, G., Feng, Q. & Lin, L. The combined optimization of Savitzky-Golay smoothing and Multiplicative Scatter Correction for FT-NIR PLS models. *Int. Sch. Res. Not.* **2013**, 1–9 (2013).
7. Rambo, M. K. D., Amorim, E. P. & Ferreira, M. M. C. Potential of visible-near infrared spectroscopy combined with chemometrics for analysis of some constituents of coffee and banana residues. *Anal. Chim. Acta* **775**, 41–49 (2013).
8. Páscoa, R. N. M. J. *et al.* Use of Near-Infrared Spectroscopy for Coffee Beans Quality Assessment. *Coffee in Health and Disease Prevention* (Elsevier Inc., 2014).
9. Barker, M. & Rayens, W. Partial Least Squares for discrimination. *J. Chemom.* **17**, 166–173 (2003).

10. Alves, F. C. G. B. S. & Valderrama, P. Ultraviolet spectroscopy and supervised pattern recognition methods for authentication of transgenic and non-transgenic soybean oils. *Anal. Methods* **7**, 9702–9706 (2015).
11. Valderrama, L., Gonçalves, R. P., Março, P. H. & Valderrama, P. Espectroscopia UV-Vis e método quimiométrico na avaliação de adulterações e fraudes em azeite de oliva extra virgem. *Rev. Bras. Pesqui. em Aliment.* **5**, 32–40 (2014).
12. Steidle Neto, A. J., Lopes, D. C., Pinto, F. A. C. & Zolnier, S. Vis/NIR spectroscopy and chemometrics for non-destructive estimation of water and chlorophyll status in sunflower leaves. *Biosyst. Eng.* **155**, 124–133 (2017).
13. Frizon, C. N. T. *et al.* Determination of total phenolic compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) combining near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate analysis. *LWT - Food Sci. Technol.* **60**, 795–801 (2015).
14. Lohr, D. *et al.* Non-destructive determination of carbohydrate reserves in leaves of ornamental cuttings by near-infrared spectroscopy (NIRS) as a key indicator for quality assessments. *Biosyst. Eng.* **158**, 51–63 (2017).
15. Mazur, L., Peralta-Zamora, P. G., Demczuk, B. & Ribani, R. H. Application of multivariate calibration and NIR spectroscopy for the quantification of methylxanthines in yerba mate (*Ilex paraguariensis*). *J. Food Compos. Anal.* **35**, 55–60 (2014).
16. Buratti, S. *et al.* Discrimination between washed Arabica, natural Arabica and Robusta coffees by using near infrared spectroscopy, electronic nose and electronic tongue analysis. *J. Sci. Food Agric.* **95**, 2192–2200 (2015).
17. Winkler-Moser, J. K. *et al.* Detection of corn adulteration in brazilian coffee (*Coffea arabica*) by tocopherol profiling and NIR spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 10662–10668 (2015).
18. Dubberstein, D. *et al.* Mitigation of the negative impact of warming on the coffee crop:

- The role of increased air [CO₂] and management strategies. *Clim. Resilient Agric. - Strateg. Perspect.* (2018).
19. Paudel, J. R. *et al.* Effect of atmospheric carbon dioxide levels and nitrate fertilization on glucosinolate biosynthesis in mechanically damaged *Arabidopsis* plants. *BMC Plant Biol.* **16**, 1–12 (2016).
 20. Jin, J., Tang, C. & Sale, P. The impact of elevated carbon dioxide on the phosphorus nutrition of plants: A review. *Ann. Bot.* **116**, 987–999 (2015).
 21. Ramalho, J. C. *et al.* Sustained photosynthetic performance of *Coffea* spp. under long-term enhanced [CO₂]. *PLoS One* **8**, 1–19 (2013).
 22. Dixon, R. K. & Turner, D. P. The global carbon cycle and climate change: Responses and feedbacks from below-ground systems. *Environ. Pollut.* **73**, 245–262 (1991).
 23. Andres, B., Marland, G. & Carolina, N. Global CO₂ emissions from fossil-fuel burning, cement manufacture, and gas flaring. 1–5 (2014).
 24. Kirkham, M. B. Elevated carbon dioxide: Impacts on soil and plant water relations. (2011).
 25. Dusenge, M. E., Duarte, A. G. & Way, D. A. Plant carbon metabolism and climate change: Elevated CO₂ and temperature impacts on photosynthesis, photorespiration and respiration. *New Phytol.* **2017**, (2018).
 26. Rakocevic, M. *et al.* Structural and functional changes in coffee trees after 4 years under free air CO₂ enrichment. *Ann. Bot.* 1–14 (2018).
 27. Boyko, A. & Kovalchuk, I. Epigenetic control of plant stress response. *Environ. Mol. Mutagen.* **49**, 61–72 (2008).
 28. Crisp, P. A., Ganguly, D., Eichten, S. R., Borevitz, J. O. & Pogson, B. J. Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Sci. Adv.* **2**, (2016).

29. Mees, C. *et al.* Identification of coffee leaves using FT-NIR spectroscopy and SIMCA. *Talanta*. **177**, 4-11. (2017).
30. Scheel, G. L., Pauli, E. D., Rakocevic, M., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Environmental stress evaluation of *Coffea arabica* L. leaves from spectrophotometric fingerprints by PCA and OSC-PLS-DA. *Arab. J. Chem.* (2016).
31. Pereira, J. M., Leme, L. M., Perdoncini, M. R. F. G., Valderrama, P. & Marçó, P. H. Fast discrimination of milk contaminated with *Salmonella* sp. via Near-Infrared spectroscopy. *Food Anal. Methods* **11**, 1878–1885 (2018).
32. Kennard, R. W. & Stone, L. A. Computer aided design of experiments. *Technometrics* **11**, 137–148 (1969).
33. Metrohm. NIR Spectroscopy : A guide to near-infrared spectroscopic analysis of industrial manufacturing processes. *Monograph* 1–46 (2013). doi:8.108.5026EN – 2013-02
34. Carlos, C., Maretto, D. A., Poppi, R. J., Sato, M. I. Z. & Ottoboni, L. M. M. Fourier transform infrared microspectroscopy as a bacterial source tracking tool to discriminate fecal *E. coli* strains. *Microchem. J.* **99**, 15–19 (2011).
35. Ássimos, A. A. Avaliação da concentração e dos tipos de flavonoides na própolis utilizando métodos quimiométricos de classificação e calibração. (2014).
36. Workman, J. & Weyer, L. Practical guide to interpretive near-infrared spectroscopy. *CRC Press* (2007).
37. Marini, F. Chemometrics in food chemistry. (2013).
38. Alves, F. C. G. B. S. Autenticação de óleos comestíveis empregando espectroscopia uv-vis e quimiometria. (2015).
39. Gaspar, T. *et al.* Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.* **37**, 263–286 (2002).

40. Tormena, C. D., Marcheafave, G. G., Rakocevic, M., Bruns, R. E. & Scarminio, I. S. Sequential mixture design optimization for divergent metabolite analysis: Enriched carbon dioxide effects on *Coffea arabica* L. leaves and buds. *Talanta* **191**, 382–389 (2019).
41. Hirayama, T. & Shinozaki, K. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: Past, present and future. *Plant J.* **61**, 1041–1052 (2010).
42. Bruce, T. J. A., Matthes, M. C., Napier, J. A. & Pickett, J. A. Stressful “memories” of plants : Evidence and possible mechanisms. **173**, 603–608 (2007).



CAPÍTULO IV

4.1. CONCLUSÃO GERAL

As espectroscopias na região ultravioleta e visível e infravermelho próximo, a espectrometria de massas e a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de arranjo de fotodiodos permitiram, juntamente com a quimiometria, a discriminação das amostras de folhas e gemas de *Coffea arabica* L. quando cultivadas em atmosfera de CO₂ ambiente e CO₂ elevado.

A discriminação das gemas a partir do solvente diclorometano indica que a influência dos estresses abióticos já ocorre na fase inicial da planta. A discriminação das folhas ocorreu pela mistura ternária de éter etílico/diclorometano/metanol. O espectro de UV-Vis de um pico da CLAE-PDA indicou o aumento da substância cafeína para as folhas cultivadas em CO₂ elevado e a espectrometria de massas indicou um aumento substancial na concentração de ácidos fenólicos para as folhas cultivadas nessa condição. A espectroscopia NIR indica que possivelmente a substância discriminadora para as amostras de folhas são metilxantinas por apresentar bandas em 1572, 1610, 1664, 1684 e 1698 nm, características dessas substâncias e indicadas pelos valores dos VIPs do modelo PLS-DA.

Após a suspensão da injeção de CO₂ as amostras de folhas apresentaram similaridade na composição química àquelas cultivadas em CO₂ ambiente tanto na AF quanto no PLS-DA. Indicando que a memória epigenética não ocorre, possivelmente a estratégia escolhida pela planta é defesa e recuperação, para o cafeeiro.