

FINGERPRINT” METABOLÔMICO DAS FOLHAS DE *Coffea arabica* L. ORIGINADAS DE DIFERENTES OCUPAÇÕES DO ESPAÇO E CONDIÇÕES DE LUZ

Ieda Spacino Scarmínio²; Fernanda Delarozza³; Miroslava Rakocevic⁴; Galileu Bernardes Malta⁵; Carlos Alberto Rossi Salamanca Neto⁶

¹ Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café, CNPq e Fundação Araucária

² Pesquisador e professor no Departamento de Química, DSc. UEL, Londrina-PR, ieda@qui.uel.br

³ Bolsista do CNPq, doutorando Química na UEL, MSc., Londrina-PR, fernandadelarozza@yahoo.com.br

⁴ Bolsista Consórcio Pesquisa Café, DSc., IAPAR, Londrina-PR, miroslava@iapar.br

⁵ Bolsista de IC do CNPq, aluno de Química na UEL, Londrina-PR, galileubm@hotmail.com

⁶ Bolsista de IC do CNPq, aluno de Química da UEL, Londrina-PR, carlos_salamanca87@hotmail.com

RESUMO: O objetivo deste estudo foi verificar se a área (densidade) e a forma de espaço (arranjo) que as plantas podem ocupar no cultivo de cafeeiros arábica (*Coffea arabica* L.) influenciam o perfil metabólico em folhas originadas de duas camadas do dossel vegetal (autossombreadas e expostas ao pleno sol). Cuidou-se que as folhas sejam de mesma idade. Para as análises dos metabolitos primários e secundários foram coletadas folhas de cafeeiros em duas datas (04/11/2010 – 1ª coleta e 07/10/2011 – 2ª coleta) no campo experimental do IAPAR, Londrina - PR. O plantio compreendeu um arranjo quadrado (AQ) de 0,84 m x 0,84 m, disponibilizando espaço para uma planta de 0,71 m² (densidade de 14.000 plantas ha⁻¹) e um arranjo retangular (AR) de 3,0 m x 0,41 m, com o espaço para uma planta de 1.25 m² (densidade de 8.000 plantas ha⁻¹). A extração do material vegetal seguiu o planejamento experimental simplex-centróide com solventes puros, etanol (e), acetona (a), diclorometano (d) e hexano (h). Estes solventes foram combinados em seis misturas binárias (1:1), quatro misturas ternárias (1:1:1) e uma mistura quaternária (1:1:1:1). Os extratos foram analisados por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier e submetidos à análise exploratória de componentes principais. Os extratores que melhores diferenciam os espaços ocupados das folhas autossombreadas foram misturas e:a na 1ª coleta e e:h na 2ª coleta. Os metabolitos em folhas originadas de folhas do pleno sol de cafeeiros cultivados em dois arranjos e densidades foram diferenciados pelos extratores e:d:h na 1ª coleta e e:h na 2ª coleta. As primeiras análises indicam que as folhas autossombreadas originadas de plantas disponibilizadas ao espaço de 1.25 m² planta⁻¹ em AR conteriam mais cafeína e/ou precursores da cafeína e ácido clorogênico do que as autossombreadas originadas de plantas disponibilizadas ao espaço de 0,71 m² e AQ.

PALAVRAS-CHAVE: análise exploratória, autossombreamento, metabolitos, planejamento experimental.

METABOLOMIC “FINGERPRINT” IN LEAVES OF *Coffea arabica* L. ORIGINATED FROM DIFFERENT SPACE OCCUPANCIES AND LIGHT CONDITIONS

ABSTRACT: The aim of this study was to determine whether the space surface (density) and a form (arrangements), that Arabic coffee plants (*Coffea arabica* L.) occupied in a field conditions, influence the metabolomic profile of leaves originated in two canopy layers (self-shaded and exposed to a full sun). The sampled leaves were of the same age. For the analyses of the primary and secondary metabolites, leaves were collected in two dates (4th November, 2010 – 1st sampling and 7th October, 2011 – 2nd sampling) in the field of IAPAR, Londrina – PR. The coffee trees were planted in a rectangular arrangement (AR) of 3.0 m x 0.41 m, leaving a space of 1.25 m² for each plant (density of 8,000 plants ha⁻¹), and a square arrangement (AQ) of 0.84 m x 0.84 m with a space of 0.71 m² for each plant (density of 14,000 plants ha⁻¹). Solvent mixtures followed a statistical simplex-centroid design, consisting of ethanol (e), acetone (a), dichloromethane (d) and hexane (h) pure solvents. Those solvents, in equal proportions, were combined into six binary mixtures (1:1), four ternary mixtures (1:1:1), and one quaternary mixture (1:1:1:1). The extracts of Arabic coffee leaves were analyzed by Fourier transform infrared spectroscopy, and submitted to exploratory analyses of principal components. The extractors that the best differentiate the space occupancies in self-shaded leaves were the mixtures e:a for the 1st sampling and e:h for the 2nd sampling. The metabolites from leaves originated in full sun exposure layer, of coffee plants cultivated in two densities and arrangements, were differentiated by extractors e:d:h referent to a 1st sampling, and e e:h referent to a 2nd sampling. The first analyses indicate that self-shaded leaves, originated on plants grown on 1.25 m² plant⁻¹ available spaces in AR, would contain more caffeine and / or caffeine precursors and chlorogenic acid than the self-shaded ones originated on plants with the available growth space of 0.71 m² in AQ.

KEY WORDS: exploratory analysis, self-shading, metabolites, experimental planning.

INTRODUÇÃO

Cerca de 70 % da produção mundial de café é oriunda de cafeeiros arábica (*Coffea arabica* L.) sendo praticamente a mesma proporção observada no Brasil (Illy & Viani, 2005). Quimicamente, as espécies e genótipos de cafeeiros diferenciam-se pelo seu teor de cafeína, minerais (Martín et al., 1999), compostos fenólicos (Perrone et al., 2008), trigonelina (Casal et al., 2000), aminoácidos (Casal et al., 2003), amins biogênicas (Casal et al., 2004), diterpenos (Speer, & Kölling-Speer, 2001), ácidos graxos (Alves et al., 2003), esteróis (Carrera et al., 1998) e β -carbolinas (Alves et al., 2003), entre outros. A qualidade de bebida do café é associada principalmente a compostos metabólicos como cafeína, açúcares totais, lipídios e trigonelina (Avelino et al., 2005; Lara-Estrada & Vaast, 2007; Geromel et al., 2008). Estes resultados não são conclusivos, se fatores como condições climáticas, processos de pré-coleta, coleta, pós-coleta e características genéticas não forem controlados (Knoop et al., 2005; Moraes et al., 2006). A célula vegetal não está restrita apenas ao metabolismo primário, que se dá a produção de aminoácidos, nucleotídeos, lipídios, carboidratos e clorofila. Por isso, outros compostos, juntamente com os primários, podem ser responsáveis pela qualidade da bebida. Esses compostos, chamados de metabólitos secundários, geralmente ocorrem em baixas concentrações e o seu aparecimento na natureza é determinado por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas, com funções de defesa contra herbívoros e micro-organismos, proteção contra os raios UV, atração de polinizadores e animais dispersores de sementes (Simões et al., 2002).

Os compostos secundários em folhas de cafeeiros podem ser um elo na compreensão da qualidade dos grãos, se for compreendida a soma dos seus metabólitos. O metaboloma (Ellis & Dunn, 2005) representa uma série completa de todos os metabólitos que existem em uma espécie biológica. Na análise metabolômica, o objetivo é analisar tantos metabólitos quanto possível em uma única análise, e sendo assim, o extrato não é usualmente purificado, ao contrário dos procedimentos de rotina usados para análise de metabólitos específicos. Se um sistema de extração não for otimizado, provavelmente muitos metabólitos permanecerão nas matrizes dos órgãos vegetativos analisados. Um caminho efetivo, para extrair as informações significativas desta composição multicomponente de metabólitos presentes neste perfil complexo, é combinar técnicas analíticas com métodos quimiométricos (Scarminio & Bruns, 1989), com a vantagem de que eles são capazes de apontar pequenas diferenças entre os sinais analíticos (Lonni, 2002). O objetivo deste estudo foi verificar se a área (densidade) e a forma de espaço (arranjo) que as plantas podem ocupar no cultivo de cafeeiros arábica (*Coffea arabica* L.) influenciam o perfil metabolômico em folhas originas de duas camadas do dossel vegetal (autossombreadas e expostas ao pleno sol).

MATERIAL E MÉTODOS

Para as análises dos metabólitos primários e secundários foram coletadas folhas do *Coffea arabica* L. em dois arranjos com densidades diferentes em duas posições verticais da planta. As amostragens foram coletadas em duas datas (04/11/2010 1ª coleta e 07/10/2011 – 2ª coleta) no campo experimental do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), Londrina-PR (23°18'S e 51°17'W). Escolheu-se um arranjo quadrado (AQ) - 0.84 m x 0.84 m, em extremamente alta densidade de 14,000 plantas ha⁻¹, disponibilizando de espaço de 0.71 m² para cada planta, e segundo arranjo retangular (AR) - 3.0 m x 0.41 m em alta densidade de 8,000 plantas ha⁻¹, disponibilizando espaço de 1.25m² para cada planta. As amostras compreenderam duas camadas de dossel, uma composta das folhas autossombreadas e outra das expostas ao pleno sol, mas coletadas cuidando que apresentam aproximadamente mesma idade.

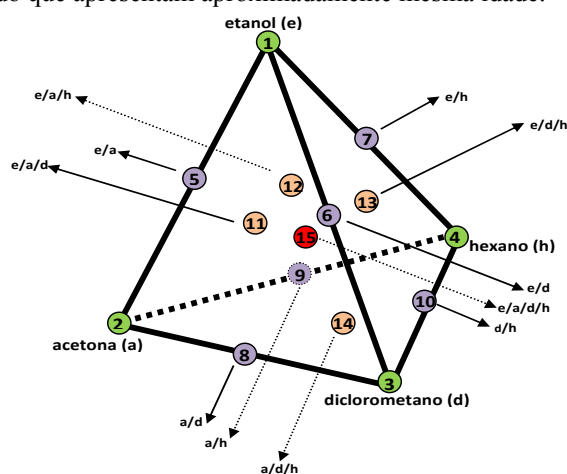


Figura 1. Planejamento experimental para as extrações das folhas de *Coffea arabica* L. do tipo centróide - simplex com quatro componentes.

A extração do material vegetal seguiu o planejamento experimental simplex centróide (Risso et al., 2010) - Figura 1. Os solventes puros: etanol (e), acetona (a), diclorometano (d) e hexano (h) foram combinados em seis misturas binárias (1:1), quatro misturas ternárias (1:1:1) e uma mistura quaternária (1:1:1:1). Este planejamento é representado por um tetraedro, no qual os pontos 1 (e), 2 (a), 3 (d) e 4 (h) (vértices) correspondem aos solventes puros, enquanto os pontos 5 (e:a), 6 (e:d), 7(e:h), 8 (a:d), 9 (a:h) e 10 (d:h) (arestas) às misturas binárias dos solventes puros. Os pontos 11 (e:a:d), 12 (e:a:h), 13 (e:d:h) e 14 (a:d:h) estão no centro de cada face, correspondendo às misturas ternárias, enquanto o ponto 15 (central) é localizado no centro do tetraedro, correspondendo à mistura dos quatro solventes (e:a:d:h). Todas as combinações de solventes mantiveram a mesma proporção de volume.

Para a extração foram pesadas 2,50 g de folhas de *C. arabica* L. secas e trituradas e submetidas à extração exaustiva com 60 ml de solvente orgânico seguindo o planejamento experimental do tipo centróide - simplex. A amostra foi colocada doze vezes em maceração com auxílio de ultrassom a temperatura controlada em 15 °C (± 2). Os extratos foram concentrados em evaporador rotativo e submetidos à ventilação até a obtenção de massas constantes. Os extratos foram analisados em espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), em espectrômetro da marca Thermo Scientific Nicolet iS10 usando um acessório ATR com janela de Ge, no modo de medição em transmitância com 32 varreduras e resolução 4 cm^{-1} , com espectros registrados na faixa de 675 a 4000 cm^{-1} . Os dados foram analisados por componentes principais (ACP).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As diferenças na composição química de folhas entre os espaços ocupados (1,25 e 0,71 $\text{m}^2 \text{planta}^{-1}$) arranjos (AR e AQ), nas condições de autossombreamento e pleno sol de 1ª e 2ª coleta, foram avaliados pelo pré-processamento dos espectros das amostras na região do infravermelho disposto em matriz e submetidas à ACP. As amostras analisadas foram muito semelhantes (mesmo cultivar que é originado do mesmo local), já que foi esperado que as diferenças entre os metabólitos originados em folhas de arranjos AQ e AR sejam mínimas (Figura 2). O gráfico dos escores dos Fatores 3 com 5 junto explicaram somente 0,87 % da variância total dos dados (Figura 2). Mesmo que os Fatores têm baixa variância acumulada trazem informações químicas que conseguem explicar as diferenças. O Fator 3 separou as duas coletas em grande parte dos extratores, mostrando existir diferença metabolômica entre dois anos analisados. Os extratores que melhores diferenciaram os arranjos AR e AQ foram os extratores 5 (e:a) para a 1ª coleta e 7 (e:h) para a 2ª coleta.

O extrator 5 (e:a) separou o AR do AQ localizados na parte positiva e negativa do Fator 3, respectivamente (Figura 2). As diferenças espectrais foram de intensidades dos metabólitos na região de 700 a 1700 cm^{-1} . A região 1700 - 1630 cm^{-1} está relacionada a grupos carbonilas ($\text{C}=\text{O}$). O extrator 7 (e:h) que diferenciou os arranjos pelo Fator 5 na parte positiva onde foi localizado o AR, enquanto na parte negativa o AQ. Nos extratos de e:h, os AQ localizaram-se em uma região mais intensa de absorção em 1649 cm^{-1} ($\text{C}=\text{O}$), que é compatível com a função de amidas e uma banda intensa em 1069 cm^{-1} ($\text{C}-\text{O}$), compatível com álcool.

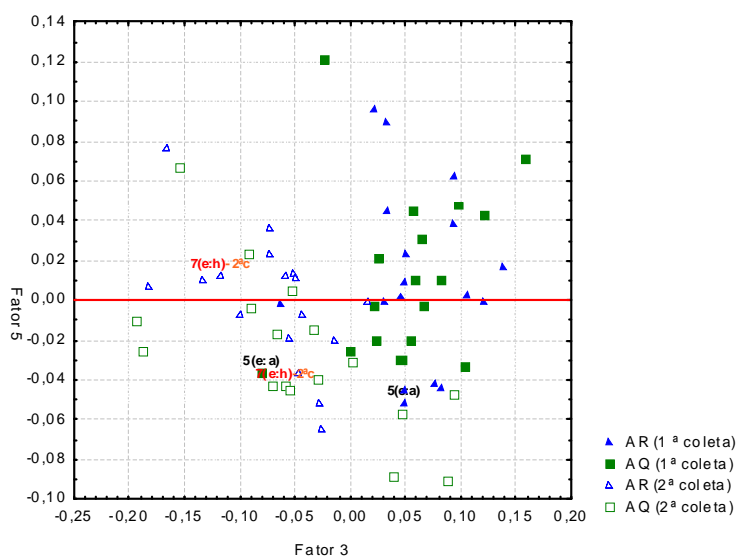


Figura 2. Os escores dos Fatores 3 e 5 das amostras de *Coffea arabica* L. na 1ª coleta (2010) e 2ª coleta (2011) das folhas autossombreadas originadas das plantas dispostas ao espaço de 0,71 $\text{m}^2 \text{planta}^{-1}$ e arranjo quadrado (AQ) e das dispostas ao espaço de 1,25 $\text{m}^2 \text{planta}^{-1}$ e arranjo retangular (AR). Estes escores foram obtidos por análise de infravermelho com os extratores 1 (e), 2 (a) 3 (d), 4 (h), 5 (e:a), 6 (e:d), 7 (e:h), 8 (a:d), 9 (a:h), 10 (d:h), 11 (e:a:d), 12 (e:a:h), 13 (e:d:h), 14 (a:d:h) e 15 (e:a:d:h).

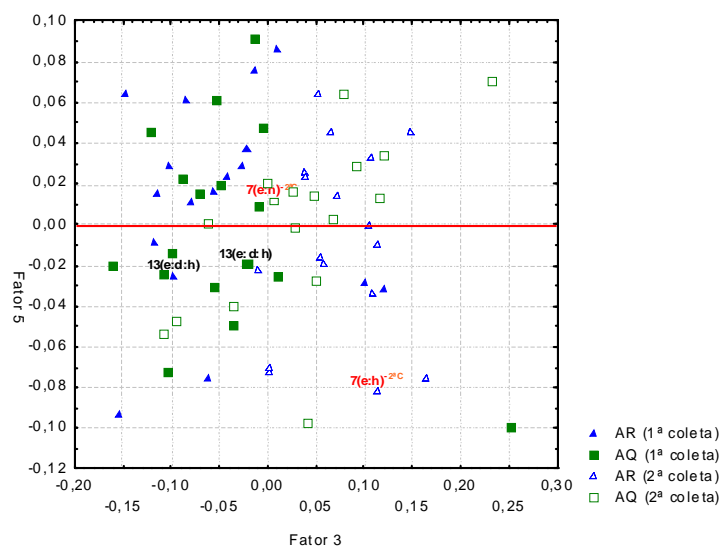


Figura 3. Os escores dos Fatores 3 e 5 das amostras de *Coffea arabica* L. na 1ª coleta (2010) e 2ª coleta (2011) das folhas expostas ao pleno sol originadas das plantas dispostas ao espaço de 0.71 m² planta⁻¹ e arranjo quadrado (AQ) e das dispostas ao espaço de 1.25 m² planta⁻¹ e arranjo retangular (AR). Estes escores foram obtidos por análise de infravermelho com os extratores 1 (e), 2 (a) 3 (d), 4 (h), 5 (e:a), 6 (e:d), 7 (e:h), 8 (a:d), 9 (a:h), 10 (d:h), 11 (e:a:d), 12 (e:a:h), 13 (e:d:h), 14 (a:d:h) e 15 (e:a:d:h).

As análises apresentadas na Figura 3 mostraram a diferenciação de densidades e arranjos (AR versus AQ) para 1ª e 2ª coleta em folhas expostas ao pleno sol. As leituras na região do infravermelho mostraram a discriminação dos espaços ocupados e arranjos no Fator 3 com o Fator 5, que juntos explicaram 1,05 % da variância total dos dados. O Fator 3 separou as duas coletas em grande parte dos extratores, mostrando existir diferenças metabômicas entre dois anos analisados, porém, no mesmo ano de coleta, os espaços ocupados foram poucos diferenciados. A mistura ternária 13 (e:d:h) foi o extrator que separou os arranjos na 1ª coleta, dispostas no Fator 3 negativo o AR e o AQ menos negativo (Figura 3). Esta diferença foi pouco significativa em toda região do infravermelho analisada, apresentando leve intensidade nas regiões de 1732 e 1707 cm⁻¹. Esta região corresponde a cetonas conjugadas.

O Fator 5 positivo separou os espaços ocupados por uma planta e arranjos retangular e quadrado pelo extrator 7 (e:h), pelo quadrante negativo e positivo, respectivamente. Os arranjos mostraram discreta diferença nas intensidades de número de onda em 1076 cm⁻¹ $\nu(\text{C-O})$, compatíveis com função amidas.

CONCLUSÕES

O estudo mostrou a importância de realizar um planejamento de extração em estudos de ocupação de espaço e autossobreamento de cafeeiros. As folhas apresentaram diferenças metabômicas entre os dois anos analisados, tanto quando coletadas de camadas sombreadas, como de camadas superiores e expostas ao pleno sol.

As folhas autossombreadas, originadas de espaço de 1,25 m² planta⁻¹ e coletadas em 2010 (1ª coleta) tiveram maiores intensidades nos números de onda quando comparadas 0.71 m² planta⁻¹ e arranjo quadrado. Esta diferença é possivelmente relacionada aos metabolitos de cafeína ou precursores de cafeína e ácido clorogênico. A diferença de espaço ocupado em folhas autossombreadas se tornou menos acentuada em 2011 (2ª coleta).

Nas folhas expostas ao pleno sol, os espaços ocupados se diferenciaram pouco em dois anos analisados. As diferenças que se apresentaram, estão associadas quantitativamente em alguns metabolitos de origem secundária de grupos carbonilas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. R.; CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, M. A. Contribution of profile obtained by high resolution GC/chemometric techniques to the authenticity of green and roasted coffee varieties. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, v. 80, p. 511, 2003.
- AVELINO, J.; BARBOZA, B.; ARAYA, J. C.; FONSECA, C.; DAVRIEUX, F.; GUYOT, B.; CILAS, C. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa Maria de Dota. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 85, n. 11, p. 1869-1875, 2005.

- CARRERA, F.; LEÓN-CAMACHO, M.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile. **Analytica Chimica Acta**, v. 370, n. 2, p. 131-139, 1998.
- CASAL, S.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; ALVES, M. R.; FERREIRA, M. A. Discriminate analysis of roasted coffee varieties for trigonelline, nicotinic acid, and caffeine content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3420-3424, 2000.
- CASAL, S.; ALVES, M. R.; MENDES, E.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, M. A. Discrimination between arabica and robusta coffee species on the basis of their amino acid enantiomers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 22, p. 6495-6501, 2003.
- CASAL, S.; MENDES, E.; ALVES, M. R.; ALVES, R. C.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, M. A.; Free and conjugated biogenic amines in green and roasted coffee beans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6188-6192, 2004.
- ELLIS, D. I.; DUNN, W. B. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies, **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 285-291, 2005.
- GEROMEL, C.; FERREIRA, L. P.; DAVRIEUX, F.; GUYOT, B.; RIBEYRE, F.; SCHOLZ, M. B. S.; PEREIRA, L. F. P.; VAAST, PH.; POT, DAVID; LEROY, T., ANDROCIOLIFILHO, A., VIEIRA, L. G. E., MAZZAFERA, P. ; MARRACCINI, P. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica*) fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 5-6, p. 569-579, 2008.
- ILLY, A.; VIANI, R. **Espresso Coffee: The Science of Quality**, 2nd. ed, Elsevier Academic Press: London, 2005.
- KNOOP, S.; BYTOF, G.; SELMAR, D. Influence of processing on the content of sugars in green Arabica coffee beans. **European Food Research and Technology**, v. 223, n. 2, p. 195-201, 2005.
- LARA-ESTRADA, L.; VAAST, P. Effects of altitude, shade, yield and fertilization on coffee quality (*Coffea arabica* L. var. Caturra) produced in agroforestry systems of the Northern Central Zones of Nicaragua. In: **Proceedings of 2nd international symposium on multi-strata agroforestry systems with perennial crops**: Making ecosystem services count for farmers, consumers and the environment. Turrialba, CATIE, 2007.
- LONNI, A. S. G. **Caracterização e identificação química de carquejas do gênero Baccharis por métodos quimiométricos**. Tese de Mestrado, julho/2002, UEL.
- MARTÍN, M. J.; PABLOS, F.; GONZÁLEZ, A. G. Characterization of arabica and robusta roasted coffee varieties and mixture resolution according to their metal content; **Food Chemistry**, v. 66, n.3, p. 365-370, 1999.
- MORAIS, H.; CARAMORI, P. H.; RIBEIRO, A. M. A.; GOMES, J. C.; KOGUISHI, M. S. Microclimatic characterization and productivity of coffee plants grown under shade of pige on pea in Southern Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 5, p. 763-770, 2006.
- PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M.; DE PAULIS, T.; MARTIN, P. R. Comprehensive analysis of major and minor chlorogenic acids and lactones in economically relevant Brazilian coffee cultivars. **Food Chemistry**, v. 106, n. 2, p. 859-867, 2008.
- 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 Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 811-816, 2010.
- SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Adaptation of ARTHUR for Microcomputers. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 8, p. 8-9, 1989.
- SIMÕES, C. M. O. SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5^a ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2004.
- SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. **Coffee: Recent Developments**. In: CLARKE, E. J.; VITZTHUM, O. G., eds., Blackwell Sciences: London, 2001.