

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA PARA A IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO FRUTOS DE CAFÉ¹

Ingrid Gomes Renoldi Heimbeck²; Maura Vianna Prates³; Jorge Alex Taquita⁴ Felipe Vinecky⁵; Gabriel Sérgio Costa Alves⁶; Natália Gomes Vieira⁷; Luciana Pereira Freire²; Carlos Bloch Jr.⁸; Pierre Marraccini⁹; Alan Carvalho Andrade¹⁰

1 Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café com apoio da FINEP e INCT-Café (CNPq/FAPEMIG).

2 Bolsista, M.Sc., Embrapa Café, Brasília-DF, ingridheimbeck@gmail.com

3 Pesquisadora, PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LEM-NTBio)

4 Analista, Bs., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LEM-NTBio)

5 Doutorando, M.Sc., UnB – Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), Brasília-DF

6 Doutorando, M.Sc., Universidade Federal de Lavras-MG

7 Mestranda, Bs., Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG

8 Pesquisador, PhD., Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LEM-NTBio)

9 Pesquisador, PhD, CIRAD UMR AGAP, Montpellier, FR

10 Pesquisador, PhD, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (LGM-NTBio), alan@cenargen.embrapa.br

Resumo: O gênero *Coffea* pertence à família Rubiaceae e compreende aproximadamente 100 espécies. A maioria do café comercialmente disponível consiste de grãos produzidos pelas espécies *C. arabica* e *C. canephora*. O sabor e o aroma da bebida de café são altamente complexos, resultantes da presença combinada de vários constituintes químicos voláteis e não voláteis, que compõem os aromas e sabores. A bebida possui também muitos compostos fenólicos que são metabólitos secundários das plantas e estão envolvidos na adaptação aos estresses. Eles conferem ao café potentes efeitos biológicos, incluindo atividades antioxidantes, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antibióticas, antihipertensivas, antihipercolesterolemias e antiinflamatórias. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma metodologia eficaz para identificar um desses compostos fenólicos, a arbutina, no pericarpo e o endosperma dos grãos de café de *Coffea arabica* var. IAPAR59 (I59). Assim, diferentes estágios de maturação desses dois tecidos foram testados usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (UFLC). Para cada amostra, foi feita uma corrida com o extrato bruto e outra com o extrato contendo o padrão comercial (arbutina). Os resultados mostram que a arbutina não foi detectada nas amostras analisadas. Entretanto, esse composto fenólico pode estar associado ou complexado com outras moléculas, o que alteraria o perfil de eluição desta molécula, quando comparado ao padrão. Estudos posteriores em outros estágios fenológicos do fruto assim como outros tecidos da planta ainda deverão ser feitos para se avaliar esta hipótese.

Palavras-Chave: Arbutina, *Coffea arabica*, compostos fenólicos, cromatografia líquida e espectrometria de massa.

DEVELOPMENT OF A NEW METHOD FOR IDENTIFICATION OF METABOLITES DURING COFFEE FRUIT DEVELOPMENT

Abstract: The genus *Coffea*, a representative of Rubiaceae family, has nearly 100 species. The grains production of *C. arabica* and *C. canephora* species represent most of the traded coffee in the world. The flavor and aroma of coffee brews are highly complex and result from a combined presence of several chemical constituents volatile and nonvolatile that give rise to the aromas and flavor. The drink also has many phenolic compounds which are secondary metabolites of plants and usually involved in adaptation to stresses. Those metabolites give to coffee potent biological effects including several activities as antioxidant, antimutagenic, anticarcinogenic, antimicrobial, antihypertensive, anti-inflammatory and anti-hypercholesterolemic. The aim of this study was to develop an effective methodology to identify one of these phenolic compounds, the arbutin in the pericarp and endosperm of coffee beans of *Coffea arabica* var. IAPAR59 (I59). Thus, different stages of maturation of these two tissues were tested using the technique of ultra fast liquid chromatography (UFLC). For each sample two race was performed, one with the crude extract and another with a extract standard commercial (arbutin). The results show that arbutin was not detected in the samples. However, this phenolic compound may be associated or complexed with other molecules changing its elution profile when compared to a standard profile. In order to evaluate this hypothesis, further studies in other phenological stages of fruit and plant tissue are being done.

Key words: Arbutin, *Coffea arabica*, liquid chromatography, mass spectrometry, phenolic compounds.

INTRODUÇÃO

A cultura do café é uma importante fonte de renda para países produtores de bens agrícolas e figura como a segunda matéria prima mais importante do mundo, atrás somente do petróleo. Acredita-se que uma maior quantidade de açúcares e lipídeos e menor quantidade de ácidos clorogênicos e cafeínas sugerem uma melhor qualidade do café, e favorecem a formação de compostos voláteis do aroma, durante a torração (Clifford, 1985). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários com atividade antioxidante, geralmente envolvidos na defesa contra radiações UV ou agressões de patógenos às plantas e são caracterizados pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos e podem ser classificados de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas às quais estão ligados (Shahidi & Naczki, 1995).

A comunidade científica têm dado significativa atenção a estes compostos pois apresentam propriedades fisiológicas e farmacológicas que conferem à saúde humana, como por exemplo, atividades antioxidantes, antimutagênicas, anticarcinogênicas, antibióticas, antihipertensivas, antihipercolesterolêmicas e antiinflamatórias (Farah & Donangelo, 2006).

O composto fenólico arbutina, descrito anteriormente em pêras (Cui *et al.*, 2005), desperta interesse estético e econômico e já vêm sendo utilizado em alguns produtos cosméticos na despigmentação de manchas na pele, inibindo a ação da enzima tirosinase responsável pela produção de melanina (Tokiwa *et al.*, 2007). Dotada de uma estrutura similar aos ácidos clorogênicos (ACGs), presentes tanto nas folhas quanto nos frutos de café (Ky *et al.*, 2001), a arbutina nunca foi descrita em cafés. Este trabalho teve como objetivo estabelecer uma metodologia adequada para a identificação da arbutina e testá-los em frutos de café em diferentes estágios de desenvolvimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal:

Frutos da espécie *C. arabica* var. IAPAR59 (I59) foram colhidos de forma aleatória durante entre 2008 e 2009 cultivados no campo experimental da Embrapa Cerrados (Planaltina-DF). Após a florada, as coletas foram realizadas com intervalos de 30 dias (30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 237 DAF- dias após a floração). Os frutos foram dissecados em pericarpo, perisperma (quando estiver presente) e o endosperma. Para as análises cromatográficas foram selecionados três diferentes estágios fenológicos do fruto (150, 210 e 237 DAF) e dois tecidos embrionários (pericarpo e endosperma). O material vegetal foi pulverizado em nitrogênio líquido.

Extração do composto fenólico arbutina

O protocolo de extração utilizado baseou-se no método descrito por Cui *et al.* (2005), para cada amostra (2 g) foram adicionados 2 mL de etanol 95 % contendo 0.4 % de ácido fosfórico e homogeneizadas em ultrassom por 40 min. Em seguida, centrifugou-se por 5 minutos a 13.200 g. Os sobrenadantes (2 mL) foram evaporados em uma centrífuga a vácuo, ressuspensos em 1 mL do solvente A (água + TFA 0.1 %) e filtrado através de uma membrana 0.45 µm antes das análises cromatográficas.

Fracionamento de metabólitos por cromatografia líquida

O extrato fenólico foi fracionado em um sistema de cromatografia líquida ultra rápida - UFLC (Shimadzu Co., Kyoto, Japan), usando uma coluna analítica de fase reversa C₁₈ (Shimpack XR-ODS 50 x 2mm) à 30°C. Os solventes utilizados foram água MilliQ 0.1% TFA (como fase móvel **A-FMA**) e acetonitrila 0.1% TFA (fase móvel **B-FMB**). A eluição dos componentes da amostra se realizou em gradiente de concentração de 2-80% **B**, com fluxo de 0.3 mL.min⁻¹. A absorvância das amostras foram monitoradas a 278 e 274 nm. A concentração da amostra padrão da arbutina comercial (Sigma-#A4256) foi de 1 µg.µL⁻¹ com injeções de 10 µL de amostra padrão. As frações foram coletadas separadamente e liofilizadas para análises posteriores.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Afim de se conseguir alguma reprodutibilidade entre os cromatogramas das amostras e do padrão foram testados diferentes parâmetros. O primeiro parâmetro a ser testado foi a utilização de diferentes fluxos de eluição em ordem decrescente 0,3; 0,2 e 0,1. Percebeu-se que quanto menor o fluxo mais difícil foi eluir as amostras. Dois diferentes métodos de eluição também foram testados, sendo o gradiente e o isocrático com diferentes tempos de corrida. O método de eluição gradiente com duração de 18 minutos foi o que obteve uma melhor eluição das amostras. Várias corridas cromatográficas foram feitas afim de se otimizar o experimento e tornar os cromatogramas reprodutíveis, assim como um bom condicionamento da coluna. Primeiramente realizou-se a eluição somente da amostra padrão (arbutina) com o intuito conhecer o tempo de retenção da amostra. Depois foram feitas análises cromatográficas somente do extrato bruto fenólico que quando comparado com o cromatograma da amostra padrão indicava que naquele tempo de retenção não era eluído nenhum composto similar ao da arbutina. Depois, adicionou-se ao extrato fenólico a arbutina industrial para se comparar com os cromatogramas que continham somente o extrato fenólico bruto.

As figuras de 1 a 5, representam os cromatogramas das amostras 150 e 210 DAF (pericarpo e endosperma) e 237 DAF (endosperma). O pico em vermelho corresponde a arbutina comercial, os cromatogramas **A** representam o extrato fenólico bruto e **B** o extrato fenólico contendo a arbutina comercial.

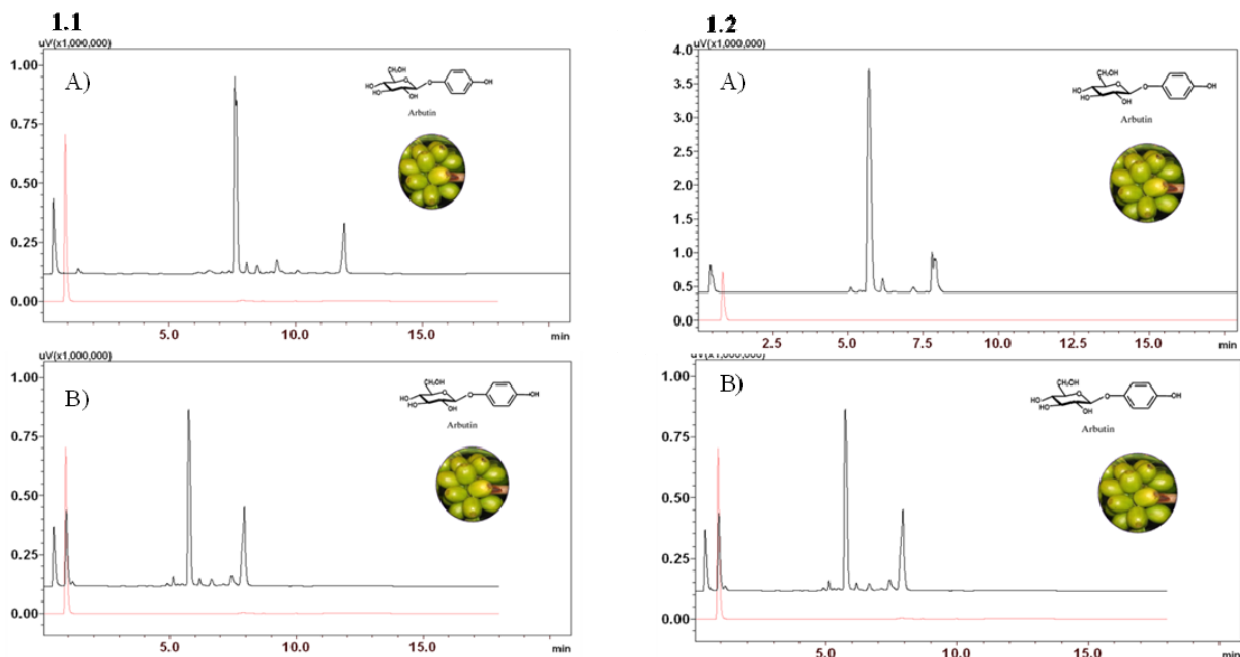


Figura 1 - Fracionamento do extrato fenólico do pericarpo (1.1) e endosperma (1.2), respectivamente, da amostra 150 DAF, de *C. arabica* var. I59 por UFLC em fase reversa utilizando uma coluna Vydac C₁₈. A) Os cromatogramas **A** representam a eluição do extrato fenólico bruto comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho). B) Os cromatogramas **B** representam a eluição (gradiente de eluição de 2-80% **B** AcN + TFA 0,1%-FMB) do extrato fenólico contendo o arbutin comercial comparado com a eluição do arbutin comercial (pico em vermelho).

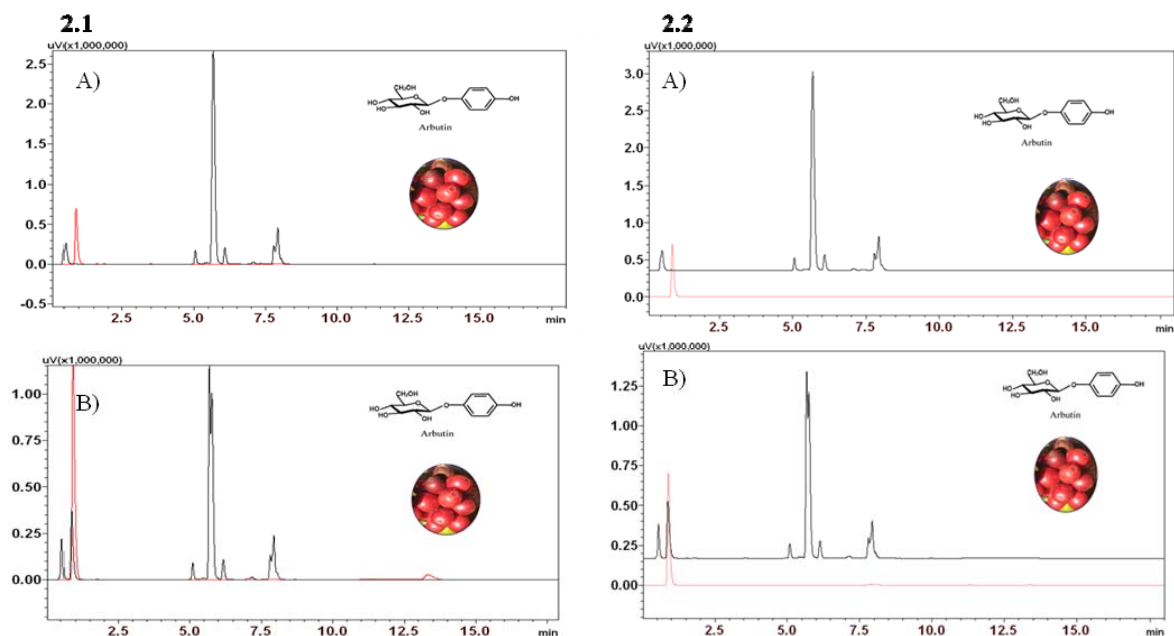


Figura 2 - Fracionamento do extrato fenólico do pericarpo (2.1) e endosperma (2.2), respectivamente, da amostra 210 DAF, de *C. arabica* var. I59 por UFLC em fase reversa utilizando uma coluna Vydac C₁₈, com um gradiente de eluição de 2-80% **B** (AcN + TFA 0,1%-FMB). A) Os cromatogramas **A** representam a eluição do extrato fenólico bruto comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho). B) Os cromatogramas **B** representam a eluição do extrato fenólico contendo a arbutina comercial comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho).

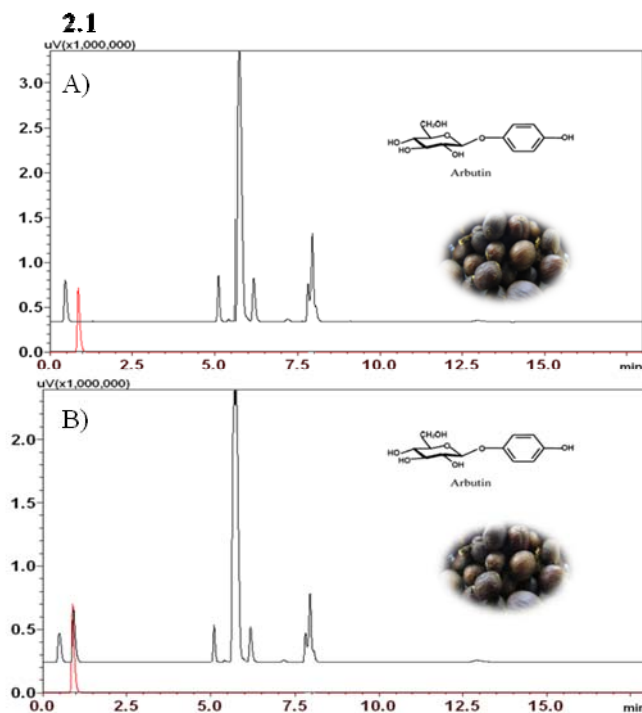


Figura 3 -Fracionamento do extrato fenólico do endosperma da amostra 237 DAF, de *C. arabica* var. I59 por UFLC em fase reversa utilizando uma coluna Vydac C₁₈, com um gradiente de eluição de 2-80% B (AcN + TFA 0,1%-FMB). A) Os cromatogramas **A** representam a eluição do extrato fenólico bruto comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho). B) Os cromatogramas **B** representam a eluição do extrato fenólico contendo a arbutina comercial comparado com a eluição da arbutina comercial (pico em vermelho).

A arbutina comercial foi utilizada como controle para identificar o tempo de retenção deste composto nas análises cromatográficas. Os resultados apresentados (Figuras 1-3), indicam que de acordo com a metodologia utilizada não foi possível identificar a presença da arbutina em nenhum dos tecidos (pericarpo e endosperma) e estágios de desenvolvimento testados. Apesar dos resultados, acredita-se que a arbutina seja sintetizada pela mesma via biossintética dos ácidos clorogênicos, a via dos fenilpropanóides. A arbutina tem sido descrita como um metabólito importante na tolerância de plantas em resposta à condições de estresses ambientais (bióticos e abióticos), como infecção por patógenos microbianos, injúria mecânica, e UV excessiva ou de alto níveis de luz visível (Herrmann, 1995; Haard & Chism, 1996; Crowe *et al.*, 2002). Esse mecanismo é perfeitamente ilustrado na espécie *Myrothamnus flabellifolia*, conhecida popularmente como planta da ressurreição.

Ainda, podemos concluir que esse composto fenólico pode estar associado ou complexado a outras moléculas, o que alteraria o perfil de eluição desta molécula, quando comparado ao controle padrão. Estudos posteriores para avaliar esta hipótese necessitam ser realizados.

CONCLUSÕES

A metodologia utilizada neste trabalho não foi eficiente em detectar moléculas com características similares ao padrão de referência comercial nos extratos obtidos das amostras de frutos de café em diferentes estágios de desenvolvimento. Este fato pode ser devido a arbutina realmente não fazer parte da composição bioquímica do fruto do café naqueles determinados estágios fenológicos. Entretanto, ainda existe a possibilidade deste composto estar complexado com outras moléculas. Os frutos em estágios iniciais de desenvolvimento deverão ser testados, assim como outros tecidos da planta também em diferentes estágios de maturação, como por exemplo folhas, gemas florais, raízes, entre outros, além de diferentes acessos, genótipos, espécies, diferentes regimes hídricos. Estudos posteriores para se avaliar esta hipótese ainda se fazem necessários ou ainda, justificar a ausência da arbutina nos estágios e tecidos testados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CLIFFORD, M.N. Chemical and physical aspects of green coffee and coffee products. In: CLIFFORD, M.N., WILLSON, K.C. (eds), Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage, **Avi Publishing Company**, p.305-374, 1985.
- CROWE, J.H.; OLIVER, A.E.; TABLIN, F. Is there a single biochemical adaptation to anhydrobiosis?. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p.497-503, 2002.

- CUI, T.; NAKAMURA, K.; MA, L.; LI, J-Z.; KAYAHARA, H. Analyses of arbutin and chlorogenic acid, the major phenolic constituents in oriental pear. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.53, p. 3882-3887, 2005.
- FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, p.23-36, 2006.
- HAARD, N. F.; CHISM, G.W. Characteristics of edible plant tissues. In: Fennema OW (ed), **Food Chemistry**, v.3, p.944-1011, 1996.
- HERMANN, K. M. The shikimate pathway as an entry to aromatic secondary metabolism. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.107, p.7-12, 1995.
- KY, C.L.; LOUARN, J.; DUSSERT, S.; GUYOT, B.; HAMON, S.; NOIROT, M. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. **Food Chemistry**, v.75, p.223-230, 2001.
- LEROY, T.; RIBEYRE, F.; BERTRAND, B.; CHARMETANT, P.; DUFOUR, M.; MONTAGNON, C.; MARRACCINI, P.; POT, D. Genetics of coffee quality. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.18, n.1, p.229-242, 2006.
- SHAHIDI, F.; NACZK, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster: Technomic; 1995.
- TOKIWA, Y.; KITAGAWA, M.; RAKU, T.; YANAGITANI, S.; YOSHINO, K. Enzymatic synthesis of arbutin undecylenic acid ester and its inhibitory effect on melanin synthesis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.17, p.3105-3108, 2007.