INSTITUTO AGRONÔMICO DE CAMPINAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL E SUBTROPICAL

VARIABILIDADE DE DITERPENOS E ESTRESSE HÍDRICO EM *Coffea* spp.

GUSTAVO AKIO OGASAWARA

Orientador: Oliveiro Guerreiro Filho

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre** em Agricultura Tropical e Subtropical, Área de Concentração em Genética, Melhoramento e Biotecnologia Vegetal.

Campinas, SP
Abril 2015

SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA
DOS AGRONEGÓCIOS
INSTITUTO AGRONÔMICO
Pós-Graduação
Av. Barão de Itapura, 1481 Caixa Postal 28
13001-970 Campinas, SP - Brasil
(19) 2137-0601
pgiac@iac.sp.gov.br

INSTITUTO AGRONÔMICO

Curso de Pós-Graduação

Agricultura Tropical e Subtropical

Certificado de Aprovação

Título: **Variabilidade de diterpenos e estresse hídrico em *Coffea* spp.**

Aluno: **Gustavo Akio Ogasawara**

Área de Concentração: **Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia**

Processo SAA nº: **2.694/2013**

Orientador: **Dr. Oliveiro Guerreiro Filho**

Aprovado pela Banca Examinadora:

Dr. Oliveiro Guerreiro Filho - IAC

Dra. Julieta Andrea Silva de Almeida - IAC

Dra. Juliana Costa de Rezende Abrahão - EPAMIG

Campinas, 17 de abril de 2015

Visto:

Márcio Koiti Chiba
Coordenador Pós-Graduação
Instituto Agronômico

Ao Chico Spinella.

DEDICO.

Aos meus pais**.**

OFEREÇO.

AGRADECIMENTO

À Força superior que tornou possível toda a existência e o consequente trabalho.

À Pesquisadora Cássia Regina Limonta Carvalho pela orientação, dedicação, paciência, tempo e motivação.

Ao meu orientador Oliveiro Guerreiro Filho pela orientação, paciência, auxílio à redação, ensinamentos e liberdade.

A minha companheira Ariane e minha família pelo apoio.

Aos professores do curso e pesquisadores que me ajudaram.

À Dona Ivone pela ajuda nas coletas.

Aos de colegas de laboratório Alex, Bárbhara, Lucas, Vinicius, Juliana, Vanessa, Daniela Matsumoto, Rodrigo e Sheila e aos colegas de turma Isadora, Fabio, Tamires, Estela e Amanda.

Aos meus amigos dos grupos de Whatszap República Área 51, Sorriso Vertical, Os meias e Familia que estiveram sempre presentes.

Ao Laboratório de Fitoquímica e à Dra. Rose Marry Araújo Gondim Tomaz pelos reagentes cedidos e por disponibilizar os equipamentos.

Ao Centro de Café "Alcides Carvalho", à Dra. Julieta Andréa Silva de Almeida pela orientação sobre o estresse hídrico do café e ao Centro de Ecofisiologia e Biofísica pelos dados climatológicos cedidos.

Ao Instituto Agronômico de Campinas pela oportunidade de estágio

` Ao Consórcio Pesquisa Café e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

OBRIGADO!

“ipse se nihil scire id unum sciat”.

Sócrates

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS....vi
LISTA DE FIGURAS....vii
RESUMO....viii
ABSTRACT....ix
1 INTRODUÇÃO....1
2 REVISÃO DE LITERATURA....4
2.1 A cultura do café....4
2.2 Melhoramento Genético do Cafeeiro....5
2.3 Biossíntese de Diterpenos....6
2.4 Caveol e Cafestol....8
2.5 Estresse Hídrico....12
3 OBJETIVOS....14
4 MATERIAL E MÉTODOS....15
4.1 Material Vegetal....15
4.1.1 Experimento 1....15
4.1.2 Experimento 2....17
4.2 Preparo das amostras de frutos....18
4.3 Reagentes....19
4.4 Equipamentos....19
4.5 Análise de Diterpenos....19
4.6 Preparo das amostras de folhas....21
4.7 Análises de Umidade....22
4.8 Estresse Hídrico e Diterpenos....22
4.9 Análises estatísticas....23
4.10 Ajuste de metodologia....24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO....29
5.1 Teores de diterpenos em grão verdes....29
5.1.1 Espécies de *Coffea*....29
5.1.2 Teores de diterpenos em *C. arabica*....31
5.1.3 Teores de diterpenos em *C. canephora*....34
5.2 Análises da umidade em amostras de grãos de café....40
5.3 Relação entre o teor de diterpenos em folhas e o estresse hídrico em condições de campo....40
5.3.1 Avaliação do estresse hídrico de cafeeiros em campo....40
5.3.2 Avaliação do teor de diterpenos em folhas de cafeeiro tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico....42
5.3.3 Variações no teor de cafestol em função do horário e do período de amostragens....44
6 CONCLUSÕES....47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS....48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Germoplasma de *Coffea* spp. avaliado na pesquisa. 16

Tabela 2 - Germoplasma de *Coffea arabica* avaliado na pesquisa..... 16

Tabela 3 - Germoplasma de *Coffea canephora* avaliado na pesquisa. 17

Tabela 4 - Escala visual de atribuição de notas utilizada na avaliação de estresse hídrico. 23

Tabela 5 – Teores de caveol, cafestol e diterpenos totais, em base seca, nas safras 2012/2013 e 2013/2014 para *Coffea* spp. 30

Tabela 6 - Teores de caveol, cafestol e de diterpenos totais, em base seca, nas safras 2012/2013 e 2013/2014 em grãos de cultivares e variedades de *C. arabica*. 32

Tabela 7 - Teores de caveol, cafestol e de diterpenos totais, em base seca, nas safras 2012/2013 e 2013/2014 em grãos de cultivares e variedades de *C. canephora*. 35

Tabela 8 – Frequência de notas dos avaliadores para o estresse hídrico em progênies de cafeeiro resistentes ao bicho-mineiro, em Campinas, SP.. 41

Tabela 9 - Análise da variância realizada com os teores de cafestol e de umidade em folhas de cafeeiro tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico, em Campinas, SP..... 43

Tabela 10 - Médias dos teores de umidade e de cafestol, em base seca, em folhas de cafeeiros tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico. 44

Tabela 11 - Teor de cafestol (mg.100g^{-1}), em base seca, em folhas de cafeeiros tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico amostradas em diferentes horários do dia e período do ano, em Campinas, SP..... 455

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipótese da ação dos diterpenos sobre o estresse hídrico. 3

Figura 2 - Biossíntese de terpenos em plantas. MVA: Ácido mevalônico. MEP: Metileritol Fosfato (Adaptado de CHENG et al., 2007). 7

Figura 3 – Estrutura química do Cafestol (A) e Caveol (B). 8

Figura 4 - Atividade do acetato de cafestol sobre o efetor FXR (Adaptado de HENRICH & WEINBERGER, 2005). 11

Figura 5 – Progênie H13685-1-25. A: Planta tolerante ao estresse hídrico à esquerda e planta sensível ao estresse hídrico à direita. B: Detalhe das folhas da planta tolerante ao estresse hídrico. C: Detalhe das folhas da planta sensível ao estresse hídrico. 18

Figura 6 - Fluxograma da extração de diterpenos. MTBE: tercbutil metil éter. 20

Figura 7 - Cromatograma de um extrato de grão de café, com a detecção de caveol e cafestol a 225 nm e de caveol a 290 nm, obtidos por CLAE-DAD. 24

Figura 8 - Espectro de absorção do caveol gerado pelo DAD (λ_{max}= 290nm). 255

Figura 9 - Espectro de absorção do cafestol gerado pelo DAD (λ_{max} = 225nm). 255

Figura 10 - Curvas de calibração dos diterpenos caveol e cafestol. 26

Figura 11 - Fórmula utilizada para o cálculo da concentração de caveol, sendo A2 a área total do pico de caveol em mAU 266

Figura 12 - Fórmula utilizada para o cálculo da concentração de cafestol, sendo A1 a área total do pico de caveol em mAU. 27

Figura 13 - Possível diterpeno em cromatograma de *C. salvatrix* 277

Figura 14 - Análise em componentes principais. Associação entre as variáveis teor de caveol 2012/13 (CV13) e 2013/14 (CV14), teor de cafestol em 2012/13 (CF13) e 2013/14 (CF14) e diterpenos totais em 2012/13 (DT13) e 2013/14 (DT14). Representação no plano ½ de acessos de *C. arabica*. 377

Figura 15 - Análise em componentes principais. Associação entre as variáveis teor de caveol 2012/13 (CV13) e 2013/14 (CV14), teor de cafestol em 2012/13 (CF13) e 2013/14 (CF14) e diterpenos totais em 2012/13 (DT13) e 2013/14 (DT14). Representação no plano ½ de acessos de *C. canephora*. 399

Figura 16 - Balanço hídrico 2012, 2013 e 2014 em Campinas, SP. 41

Figura 17 - Mapa do campo com nota de 3 avaliadores (a1, a2, a3) e média das avaliações (m) para as 4 progênies (A, B, C, D). Plantas selecionadas para avaliação dos diterpenos em folhas: tolerantes em verde, sensíveis em vermelho. 42

Variabilidade de diterpenos e estresse hídrico em *Coffea* spp.

RESUMO

O melhoramento genético clássico de plantas tem alcançado excelentes resultados no manejo de fenótipos tradicionais como porte de planta, produção, cor de frutos e resistência a pragas, doenças e nematoides. Já outros caracteres carecem de estudos, como substâncias químicas produzidas pelo metabolismo secundário das plantas. Caveol e cafestol são diterpenos específicos do café. Ambos são importantes na saúde humana como substâncias capazes de elevar o nível de colesterol e de atuar contra proteínas carcinogênicas. Nas plantas em geral, os diterpenos podem ter papel de antioxidantes e podem atuar como agentes de resistência a estresses bióticos e abióticos. Neste trabalho estudou-se a variabilidade de diterpenos em *Coffea* spp., bem como, em populações intraespecíficas de *C. arabica* e *C. canephora* visando futuro melhoramento relacionado com a qualidade do café. Foram avaliadas 11 seleções de *C. arabica*, 12 seleções de *C. canephora* e 9 outras espécies do gênero *Coffea* em duas safras (2012/2013 e 2013/2014). Os diterpenos foram extraídos de grãos verdes, por saponificação direta a quente (SDQ) em sequentes partições com tercbutil metil éter. O extrato foi resuspendido em fase móvel de acetonitrila/água (45/55), armazenado em freezer (-20ºC) e posteriormente injetado 20 µL em cromatógrafo líquido de alta eficiência com fluxo de 1 $mL.min^{-1}$ à 25ºC em coluna ODS-3. Caveol foi detectado pelo espectro de 290 nm com tempo médio de retenção (TR) de 24,9 min e cafestol a 225 nm com TR de 26,5 min. Os teores médios para *C. arabica* nos dois anos de colheita foram: 279,8 $mg.100g^{-1}$ para caveol e 477,5 mg.100g para cafestol. Para *C. canephora* os respectivos valores foram 5,0 e 318,7 $mg.100g^{-1}$. As demais espécies apresentaram teores variando de 0 a 735 $mg.100g^{-1}$ para caveol e de 179,4 a 968,0 $mg.100g^{-1}$ para cafestol. Em outro experimento, buscou-se relacionar os teores de diterpenos em folhas com o estresse hídrico apresentado por cafeeiros segregantes tolerantes e sensíveis em campo de progênies. Determinou-se o teor de diterpenos nas folhas por metologia similar para grãos e umidade por método gravimétrico. Caveol não foi encontrado na folha, apenas cafestol. O teor médio de cafestol nas folhas de plantas tolerantes e sensíveis foi de 153,3 e 153,5 $mg.100g^{-1}$ e o teor de umidade de 58,7 e 52,2 %, respectivamente. As plantas tolerantes e sensíveis não diferiram quanto ao teor de diterpenos nas folhas, sugerindo que os diterpenos não devem ter correlação na tolerância do cafeeiro a estresses de natureza abiótica.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, *C. canephora*, caveol, cafestol, diterpenos, estresse hídrico.

Variability of diterpenes and water stress in *Coffea* spp.

ABSTRACT

Classical plant breeding has achieved excellent results in the management of traditional phenotypes such as plant size, production, fruit color and resistance to pests, diseases and nematodes. Other characters have lack of studies, such as chemical substances produced by plant secondary metabolism. Kahweol and cafestol are specific diterpenes to the coffee plant. Both are important in human health as substances capable of raising the cholesterol level and to act against carcinogenic proteins. In plants in general, diterpenes can act as antioxidants and agents for biotics and abiotics stresses resistance. This work studied the variability of diterpenes in *Coffea* spp. and in intraspecific populations of *C. arabica* and *C. canephora* seeking further improvement related to the quality of coffee. We evaluated 11 selections of *C. arabica* , 12 selections of *C. canephora* and 9 other species of the genus *Coffea* in two harvest years (2012/2013 e 2013/2014) . The diterpenes were extracted from green beans by direct hot saponification (DHS) in sequential partitions with methyl *tert*- butyl ether, the extract was resuspended in mobile phase of acetonitrile / water (45/55), stored in a freezer (-20 ° C) and subsequently injected 20 μL in high efficiency liquid chromatography (HPLC) with flow rate of 1 $mL.min^{-1}$ at 25 ° C in ODS-3 column. Kahweol was detected at 290 nm spectrum with mean retention time (RT) of 24.9 min and cafestol to 225 nm with RT 26.5 min. The average levels for *C. arabica* in the two years of harvest were 279.8 $mg.100g^{-1}$ to kahweol and 477.5 $mg.100g^{-1}$ to cafestol, for *C. canephora* the respective values were 5.0 and 318.7 $mg.100g^{-1}$. The other species had levels ranging 0-735 $mg.100g^{-1}$ to kahweol and 179.4 to 968.0 $mg.100g^{-1}$ to cafestol. In another experiment, we tried to relate the diterpenes content in leaves with water stress presented by coffee tolerant and sensitive in segregating progenies field. The diterpenes content was determined in leaves by methodology similar to grain and moisture by gravimetric method. Kahweol was not found in leaf, only cafestol . The average content of cafestol in leaves tolerant and sensitive plants was 153.3 and 153.5 mg.100g -1 and the moisture content of 58.7 and 52.2 %, respectively. The tolerant and sensitive plants did not differ for diterpenes content in leaves, suggesting that diterpenes should not have correlation in coffee stress tolerance of abiotic nature.

Key words: *Coffea arabica*, *C. canephora*, kahweol, cafestol, diterpenes, water stress.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do café, além de sua importância para a agricultura, se tornou um fator essencial para o bem estar da população, seja por hábito, necessidade ou pelo simples prazer que os detalhes envolvidos proporcionam. A bebida do café é um dos principais produtos consumidos no mundo em termos de frequência de consumo.

O Brasil é o maior produtor e exportador de café, sendo que atualmente o produto é o quinto item agrícola mais exportado pelo país, com área plantada de 2,26 milhões de hectares. Na safra de 2014 foram colhidas mais de 45,3 milhões de sacas beneficiadas, correspondentes a 32,3 milhões de café arábica e 13,0 milhões de café conilon. A escassez e irregularidades de chuvas em 2014 foram marcantes e impactaram a produção nesse período, coincidindo com a quebra do ciclo de bienalidade da cultura (CONAB, 2015). Mesmo assim, em 2015, espera-se colher entre 44,11 e 46,6 milhões de sacas.

O café é uma das principais fontes de divisas para diversos países das regiões tropicais do globo. Mais da metade da produção mundial tem origem na Colômbia, Indonésia, Vietnã e no Brasil. O agronegócio mundial do café envolve, anualmente, recursos da ordem de 100 bilhões de dólares e tem a participação de cerca de 8% da população mundial. A previsão da safra de 2015 é de 149,8 milhões de sacas (USDA, 2014).

Estratégias de valorização do café visando ao aumento de consumo interno e também das exportações vêm sendo adotadas pelo Brasil. Avanços apreciáveis têm sido conquistados a partir de substancial melhoria na qualidade do café brasileiro para bebida. No entanto, outros usos para o café brasileiro têm sido objetos de investigação e encontram-se entre as prioridades estratégicas dos formuladores de políticas públicas.

O sucesso da cafeicultura brasileira é explicado, em grande parte, pelo desempenho das cultivares disponíveis que reúnem características diversas, como elevada capacidade de produção, vigor e rusticidade, longevidade, boa arquitetura, resistência a agentes bióticos e excelente qualidade física e sensorial (EIRA et al., 2007).

O melhoramento do cafeeiro no Brasil é realizado desde o início da década de 30. No princípio, os objetivos do programa se relacionavam com a eficiência de novas cultivares, ou seja, com a redução de custo que elas proporcionavam. Assim, diversas cultivares mais produtivas, de menor porte e resistentes, especialmente à ferrugem, foram selecionadas e se constituem na base da cafeicultura brasileira (FAZUOLI et al., 2000).

Em uma fase seguinte, o melhoramento do cafeeiro passou a ser dirigido à qualidade, agregando valor ao café produzido. Variedades com características sensoriais especiais, cultivares com baixo teor de cafeína (SILVAROLLA et al., 2004), entre outras vêm sendo selecionadas, com este objetivo.

Estudos recentes conduzidos por WAGEMAKER et al. (2011) evidenciaram a possibilidade de obtenção de novas cultivares de cafeeiros com elevados teores de óleo nos grãos, assim como, do uso do óleo e/ou de componentes da matéria insaponificável como protetores contra a radiação UVB. Entre estes componentes, destacam-se os diterpenos, substâncias presentes no café que têm despertado grande interesse para a saúde humana, por desempenharem também funções antioxidantes e anti-inflamatórias, com efeitos hepatoprotetores e anticarcinogênicos (HUBER et. al., 2008).

Por outro lado, o aumento do nível de colesterol no organismo humano está relacionado às concentrações de diterpenos, encontrados na forma livre e como ésteres de ácidos graxos na fração lipídica do café (BAK & GROBBE, 1989).

Caveol e cafestol são os principais diterpenos do óleo de café e essas substâncias podem discriminar espécies de café por estarem presentes nos grãos em diferentes concentrações (SPEER & KÖLLING-SPEER, 2006).

DE ROOS et al. (1997) encontraram grande variabilidade em *Coffea spp*. e descobriram quatro novas formas de diterpenos, não identificados, trabalhando com *C. canephora*, *C. stenophylla*, *C. liberica*, *C. congensis*, *C. racemosa*, *C. salvatrix*, *C. pseudozanguebarieae* e *C. sessiliflora*.

Diversos autores já quantificaram teores de diterpenos em frutos verdes de café (DE ROOS et al. 1997; DIAS et al. 2010; KITZBERGER et al. 2013; KOLLING-SPEER & SPEER, 2001), entretanto, nenhum deles trabalhou com um grande número de cultivares e espécies em dois anos de colheita, nem tiveram como foco o levantamento em banco de germoplasma visando melhoramento genético. Além disso, os teores de diterpenos de *C. anthonyi e C. humilis* não haviam sido descritos ainda em literatura.

A determinação desses compostos também se torna relevante para a avaliação do metabolismo no cafeeiro, visto a falta de informações das suas funções para a planta e das vias de produção. A provável associação dessas substâncias seria em relação à função de defesa contra agentes bióticos, assim como, contra estresses abióticos (CHENG et al., 2007).

O estresse oxidativo é um processo pelo qual a planta, ao acumular energia recebida do sol, não é capaz de processá-la, com isso ocorre oxidação e morte celular. O estresse hídrico

promove o estresse oxidativo, pois para resistir à falta de água, a planta reduz as trocas gasosas com o meio e, consequentemente, a capacidade de processar a energia solar.

Como os diterpenos são compostos do metabolismo secundário da planta com elevado poder antioxidante e com fator de proteção UV, é possível que estas moléculas tenham uma ação protetora contra o estresse oxidativo podendo, portanto, atribuir tolerância ao estresse hídrico em cafeeiros.

A relação entre o teor de diterpenos em folhas e o estresse hídrico de plantas em condições de campo foi investigada com base em evidências dessa associação em trabalhos com alecrim (MUNNÉ-BOSH et. al., 1999) e sálvia (MUNNÉ-BOSH et. al., 2001) e levando-se também em conta a função antioxidante e a possibilidade da redução do estresse oxidativo ilustrada na figura 1.

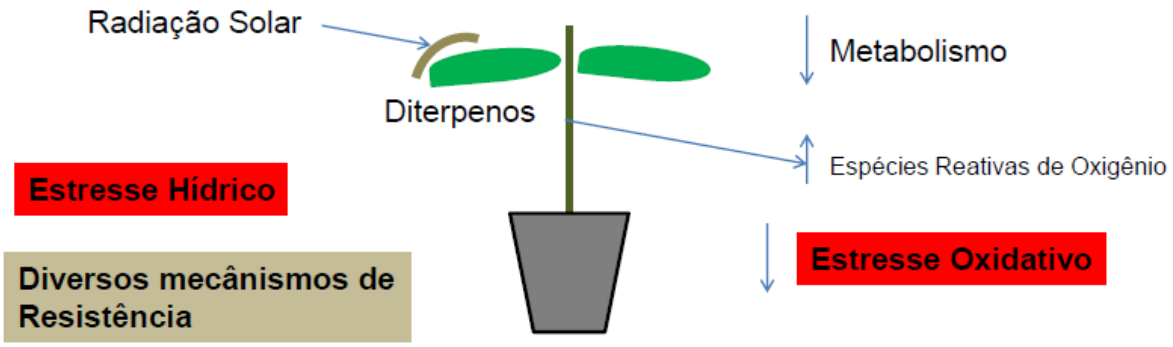


Figura 1 - Hipótese da ação dos diterpenos sobre o estresse hídrico.

Segundo a hipótese, os diterpenos atuariam inibindo o efeito da radiação solar e, como antioxidantes, isso diminuiria o estresse oxidativo e o metabolismo, bloqueando também as espécies reativas de oxigênio (ROS), contribuindo para a redução do estresse hídrico.

Neste trabalho os principais diterpenos presentes em cafeeiros, caveol e cafestol foram quantificados nos grãos verdes de diferentes espécies de *Coffea* no sentido de evidenciar a diversidade apresentada na coleção de cafeeiros do Instituto Agronômico, assim como, em folhas de cafeeiros tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico das espécies *C. arabica* e visando à identificação de marcadores naturais de tolerância nas plantas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A cultura do café

Café é o nome dado aos frutos das plantas do gênero *Coffea*, família Rubiaceae com cerca de 120 espécies conhecidas (DAVIS, 2011). Entre essas, 19 estão preservadas no banco de germoplasma do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), reconhecido internacionalmente como um dos maiores contribuintes para o melhoramento genético do cafeeiro.

Apenas duas espécies são consideradas importantes comercialmente: *C. arabica* L., popularmente conhecido como café arábica e *C. canephora* Pierre ex A. Froehner conhecido como café robusta ou conilon. A produção comercial dessas duas espécies ainda mantém uma proporção histórica de 70% de arábica para 30% de robusta. No entanto, especialistas afirmam que o café robusta tende a aumentar a participação na produção comercial.

A espécie *C. arabica* L., a mais importante do gênero, é também a mais diferenciada principalmente por ser alotetraploide (2n = 4x = 44 cromossomos) e autógama com cerca 90% das flores autofecundadas. A maioria das demais espécies é diploide (2n = 2x = 22 cromossomos), alógama e autoincompatível (FAZUOLI et al., 2000). Essas diferenças são fundamentais na identificação dos métodos de melhoramento genético adotados na seleção de novas cultivares.

Outra diferença importante se relaciona à origem das espécies. *C. arabica* L. é originária do Sudoeste da Etiópia, Sudeste do Sudão e Norte do Quênia, regiões geralmente de altitude e clima diferenciado (CHEVALIER, 1947). As demais espécies são originárias de diferentes regiões da África de menor altitude e diferentes climas. Isso faz com que as exigências climáticas para o cultivo sejam também diferenciadas.

Os principais problemas da cultura se relacionam à incidência de pragas, doenças e nematoides e, mais recentemente, a estresses de natureza abiótica. Além da seleção de cultivares resistentes a cada um destes agentes bióticos ou abióticos, a seleção de plantas com boa qualidade da bebida tem ganhado atenção nos últimos anos (CLARKE & VITZTHUM, 2001).

Adicionalmente, o conhecimento sobre o grão de café vem crescendo, e diversos estudos recentes têm sido desenvolvidos com foco na saúde humana (CLARKE & VITZTHUM, 2001).

O grão do café é a semente seca extraída do fruto do café sem a casca (pergaminho). Cada fruto, geralmente, contém duas sementes. O grão é considerado verde, antes de passar pelo processo de torra, ou torrado, quando submetido a esse processo. Os grãos podem ser obtidos de

frutos em diferentes estágios de maturação (verde, cereja, passa e seco), no entanto, o estágio cereja é o estágio considerado maduro e que proporciona melhor qualidade ao produto final.

A bebida do café consumida diariamente pode ser considerada como um alimento funcional e pode alterar o metabolismo humano. É possível agregar valor nutricional ao café, assim como reduzir os efeitos negativos por meio do melhoramento genético.

2.2 Melhoramento Genético do Cafeeiro

O uso de cultivares melhoradas foi o principal fator responsável pelo sucesso da produção de café no Brasil. O IAC é pioneiro no tema e ainda hoje a maior parte das cultivares de café arábica são produtos do melhoramento desenvolvido na Instituição (MEDINA FILHO et al. 2007).

As principais estratégias de melhoramento genético adotadas para o cafeeiro são baseadas em métodos tradicionais para espécies autógamas, no caso de *C. arabica* e para espécies alógamas, no caso de *C. canephora.* Ainda, é possível a adoção de métodos mistos e a realização de cruzamentos interespecíficos com utilização de retrocruzamentos (MENDES, 1951).

O uso de métodos de biotecnologia, como a tecnologia do DNA recombinante, ainda é pouco explorado, principalmente pela dificuldade com os ajustes dos protocolos de transformação, no entanto, trata-se de uma tendência, assim como para todas as demais culturas comerciais, mas especialmente para culturas perenes que necessitam de muitos anos para o desenvolvimento de cultivares pelos métodos tradicionais (RIBAS et al., 2006).

O melhoramento, além de ser usado para incorporação de genes que conferem características desejáveis às plantas, como resistência a doenças, nematoides e pragas, também é usado para conferir ao produto características nutritivas e farmacêuticas, sendo possível o desenvolvimento de variedades com teores de vitaminas e sais minerais desejáveis, de acordo com a necessidade do consumidor (CONAGIN & MENDES, 1961).

A identificação e acesso aos genes só é possível por meio dos Bancos Ativos de Germoplasma (BAGs), onde se preserva a diversidade em um grande número de espécies silvestres e raras e formas botânicas unidas. No Brasil, o BAG do IAC possui 19 espécies de cerca das 120 espécies conhecidas do gênero *Coffea*. O BAG do IAC também inclui coleções de acessos *C. arabica* e *C. canephora* oriundas da África, centro de origem e diversificação das espécies, onde as plantas crescem espontaneamente, mas cuja diversidade vem sendo há anos, ameaçada pelo desenvolvimento da agricultura e urbanização (MÔNACO et al., 1974).

São reconhecidos como objetivos clássicos do melhoramento genético do cafeeiro, a obtenção de cultivares adaptadas aos diferentes tipos de ecossistemas, aos sistemas de cultivo, com resistência à pragas e doenças, de maturação uniforme, mais produtivas e com melhor qualidade no sabor da bebida (CARVALHO et al., 1991).

Em virtude das atuais mudanças climáticas e dos altos custos de produção, a maior preocupação do melhoramento genético do cafeeiro ainda é com os caracteres agronômicos clássicos.

VAN DER VOSSEN et al. (2015) fizeram uma revisão sobre a próxima geração de variedades desenvolvidas para uma produção sustentável do café arábica e destacaram a resistência à ferrugem e à antracnose como principais objetivos, mas mostraram também, a qualidade da bebida, fator que justifica o melhor preço do café arábica em relação ao café conilon.

Trabalhos sobre o melhoramento do cafeeiro visando à qualidade da bebida são frequentes (VAN DER VOSSEN, 2009; TESSEMA et al., 2011), porém, trabalhos visando à redução ou ao aumento dos teores de determinados compostos químicos são escassos, mesmo para o produto químico mais conhecido do café, a cafeína. Neste caso, o objetivo do melhoramento é atender a demanda de uma parte da população que consome o café descafeinado industrialmente e oferecer uma variedade naturalmente desprovida de cafeína (SILVAROLLA et al., 2004). Outro objetivo, para o caso da cafeína, poderia ser a obtenção de uma variedade com alto teor de cafeína que atendesse ao interesse das indústrias que extraem esse alcaloide principalmente para adicioná-lo em produtos diversos da indústria alimentícia e também, para o uso na indústria farmacêutica. Outras fontes naturais de cafeína para essa finalidade vêm de plantações de guaranazeiros e de subprodutos da indústria do café.

Todavia, o gênero *Coffea* oferece uma série de especialidades químicas que podem ser mais bem exploradas por diversas indústrias, como no caso dos diterpenos, uma das mais importantes classe de produtos naturais e objeto dessa tese.

2.3 Biossíntese de Diterpenos

Entre os diversos metabólitos de plantas, os terpenoides formam o grupo mais abundante e diverso, com dezenas de milhares de estruturas descritas, responsável por diversas funções, em geral, relacionadas à defesa da planta em resposta a condições de estresse, a ataque de herbívoros e atração a polinizadores (TRAPP & CROTEAU, 2001; CHENG et al., 2007). Muitos dos

terpenoides, em virtude da sua natureza bioquímica, apresentam potencial para uso comercial (LANGE & AHKAMI, 2013).

Eles são derivados das moléculas precursoras, de cinco carbonos, isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP) por duas vias biossintéticas, ilustradas na figura 2, conhecidas como via do ácido mevalônico (MVA) e via do metileritol fosfato (MEP). As sínteses podem ocorrer no citoplasma ou no plastídio da célula, sendo as enzimas responsáveis pela produção de terpenos conhecidas como terpeno sintases (CHENG et al., 2007).

Na via do mevalonato, também conhecida por via clássica, as unidades básicas IPP (C_5) são sucessivamente condensadas, conduzindo à formação dos sesquiternos (C_{15}) e dos triterpenos (C_{30}), enquanto que pela via mevalonadato-indenpendente, as unidades DMAPP dão origem à formação dos monoterpenos (C_{10}), diterpenos (C_{20}) e tretaterpenos (C_{40}) (THEIS & LERDAU, 2003).

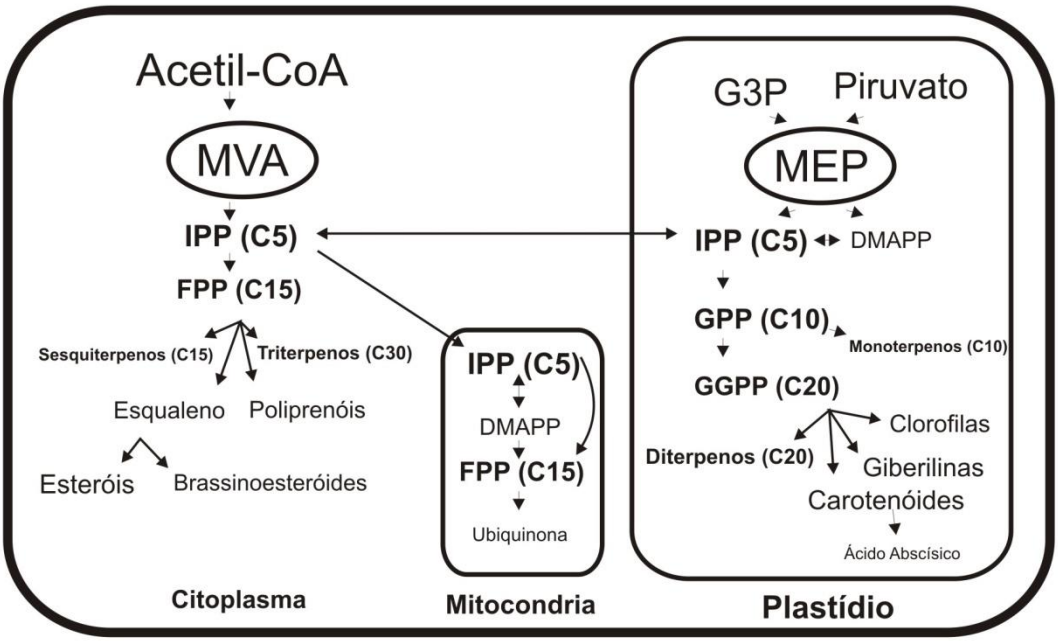


Figura 2 - Biossíntese de terpenos em plantas. MVA: Ácido mevalônico. MEP: Metileritol Fosfato (Adaptado de CHENG et al., 2007).

As espécies de *Coffea* são as únicas capazes de sintetizar diterpenos como o cafestol, caveol e compostos derivados (16-O-metilcafestol, 16-O-metilcaveol) e, até o momento, há resultados parciais sobre os genes envolvidos no metabolismo de diterpenos do café (FERREIRA, et al., 2009).

A partir do sequenciamento de genes expressos pelo Projeto Genoma Café, em 2006, tornou-se possível o estudo funcional dos genes que codificam as enzimas envolvidas nas vias biológicas do cafeeiro, dentre elas as dos álcoois diterpênicos. Um estudo *in silico* permitiu observar a expressão de três genes que codificam as primeiras etapas da biossíntese dos diterpenos – copalil difosfato sintase (CPS), caureno sintase (KS) e caureno oxidase (KO). Esse estudo permitiu identificar DNAs complementares parciais correspondentes a um gene de CPS, dois de KO e um de KS. Análises de expressão desses genes pela técnica RTq-PCR quantitativa, em tecidos separados, indicaram que os quatro genes alvos apresentam expressão diferencial durante o desenvolvimento dos tecidos do fruto. Os padrões de acúmulo durante o desenvolvimento do fruto sugerem que há transferências de cafestol e caveol, na fase maternal, do perisperma para o endosperma, sendo o perisperma o tecido de formação principal dos diterpenos. Copalil fosfato sintase (CPS) parece ser uma das enzimas chave no controle do acúmulo de diterpenos e se destaca por apresentar maior expressão no perisperma do que no endosperma (FERREIRA, et al., 2007; FERREIRA, et al., 2009).

2.4 Caveol e Cafestol

Caveol e cafestol são os principais diterpenos do gênero *Coffea*, sendo classificados como alcoóis diterpênicos pentacíclicos. São formados, a partir da fusão de unidades de isopreno (C_5), por um esqueleto caurano de 20 átomos de carbono. A diferença entre as duas moléculas é uma dupla ligação entre o carbonos 1 e 2 na molécula de caveol (Figura 3). Essa diferença permite que as moléculas absorvam radiação ultravioleta em diferenciados comprimentos de onda. O comprimento de onda de máxima absorção para o caveol é de 290 nm e para o cafestol, de 225 nm. Essa propriedade permite a identificação e, portanto, a quantificação das substâncias ao serem avaliadas por métodos espectrofotométricos de absorção molecular ou por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD).

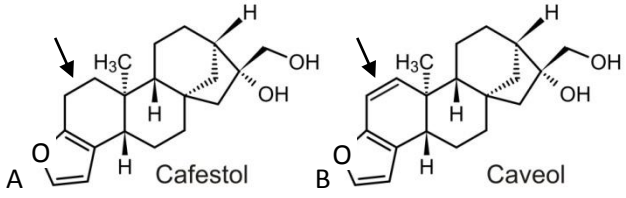


Figura 3 – Estrutura química do cafestol (A) e caveol (B).

Caveol e cafestol são moléculas constituintes da fração lipídica do café, parte da matéria insaponificável. Até o momento, estão presentes em toda a planta, mas em maior quantidade nos frutos. Nos grãos, normalmente, estão esterificados com diferentes ácidos graxos (18,5%) e apenas uma pequena quantidade de cafestol e caveol, cerca de 0,4 a 3,5%, está presente como álcoois diterpênicos livres (FOLSTAR, 1985; KOLLING-SPEER et al., 1999).

PETTITT (1987) determinou a distribuição dos ésteres de ácidos graxos de cafestol e de caveol em uma série de grãos de café *C. arabica* e *C. canephora*. Verificou-se que a distribuição foi semelhante em ambos os tipos de café, com a maioria dos ésteres diterpênicos caracterizados representados apenas como ésteres do ácido palmítico. KURZROCK & SPEER (2001), ao analisarem cafés de *C. arabica*, identificaram 14 ésteres de ácidos graxos ligados ao cafestol e 12 derivados do caveol. Os resultados foram semelhantes aos encontrados por PETTITT (1987), com a distribuição dos principais ésteres correspondendo principalmente ao ácido palmítico (40-50%), seguido pelo ácido linoléico (24-30%); os demais foram quantificados no óleo de café em menores proporções, como o ácido oléico (9-15%), esteárico (9-11%), araquídico (3-6%) e behênico (0,6-1,3%), que totalizaram aproximadamente 98% dos ésteres caracterizados (SPEER & KÖLLING-SPEER, 2006).

Há apenas um relato na literatura sobre a distribuição dos diterpenos nos diferentes tecidos do fruto fresco (pericarpo, perisperma e endosperma) e em raízes, botão floral e ramos do cafeeiro. DIAS (2009) avaliou tecidos de *C. arabica* (cv. IAPAR-59); botão floral foi avaliado em dois períodos, em intervalos de 15 dias, mas o tecido não apresentou caveol, somente cafestol foi encontrado em maior concentração na amostra menos desenvolvida (299,1 $mg.100g^{-1}$) do que na segunda amostra coletada, com 15 dias a mais de permanência na planta (117,0 $mg.100g^{-1}$). O teor de caveol em ramos de planta adulta foi igual a 143,4 $mg.100g^{-1}$, valores próximos aos de cafestol (113,4 $mg.100g^{-1}$), enquanto que a concentração de caveol nas raízes de mudas (361,5 $mg.100g^{-1}$) foi aproximadamente 3 vezes maior do que o valor quantificado para o cafestol (134,3 $mg.100g^{-1}$).

DIAS (2009) também avaliou folhas e frutos frescos de plantas de *C. arabica* (cv. IAPAR-59) e *C. canephora* (cv. Apoatã), e encontrou cafestol em todos os tecidos vegetais da espécie arabica (49 $mg.100g^{-1}$ no pericarpo, 304 $mg.100g^{-1}$ no endosperma, 132 $mg.100g^{-1}$ no perisperma e 45 $mg.100g^{-1}$ nas folhas); os teores de cafestol nos tecidos de *C. canephora* foram menores (36 $mg.100g^{-1}$ no pericarpo, 94 $mg.100g^{-1}$ no endosperma, 109 $mg.100g^{-1}$ no perisperma), não sendo encontrado esse composto nas folhas. Em relação ao diterpeno caveol, o autor apenas o detectou, em elevadas concentrações, no endosperma (589 $mg.100g^{-1}$) e no

perisperma (516 mg.100g^{-1}) da cultivar arabica; os tecidos de *C. canephora* não apresentaram esse composto.

O primeiro trabalho com folhas foi realizado por KOLLING-SPEER & SPEER (1997); os valores médios de cafestol determinados foram próximos de 80 mg.100g^{-1} de folhas de *C. arabica* e 5 mg.100g^{-1} de folhas de *C. canephora*, enquanto que as concentrações de caveol foram baixas para ambas as espécies.

A principal importância dessas moléculas está relacionada à saúde humana pelas conhecidas funções antioxidantes, com efeitos hepatoprotetores e anticarcinogênicos (HUBER et al., 2008), anti-angiogênicos e anti-inflamatórios (CÁRDENAS et al., 2011), assim como, aquelas relacionadas ao aumento do nível de colesterol (BAK & GROBBE, 1989; URGERT et al., 1995a).

URGERT et al. (1995b) estimaram que o consumo de cinco xícaras de café expresso elevam, teoricamente, o nível de colesterol LDL em 4 mg.dL^{-1}. Esse efeito não cabe ao café filtrado, uma vez que o filtro retêm os diterpenos, mas apenas no café expresso e outras formas de preparo sem filtração de papel.

Os efeitos positivos na saúde humana como anticarcinogenese, anti-angiogenese, anti-inflamação e citoproteção estão mais relacionados ao caveol, enquanto que o efeito negativo do aumento do nível de colesterol está, por sua vez, mais relacionado ao cafestol, embora esse último composto esteja relacionado também com anticarcinogenese e como um possível fator positivo contra o mal de Parkinson (TRINH et al., 2010). A obtenção de cultivares com níveis reduzidos de diterpenos, ou ainda, com reduzido teor de cafestol e elevado teor de caveol, podem se constituir em um dos objetivos de programas de melhoramento genético do cafeeiro.

Já as propriedades anticarcinogênicas dos diterpenos podem ter importância destacada para a indústria farmacêutica e cultivares com elevados teores de diterpenos podem ser selecionadas para esta finalidade.

TSUKUI et al. (2014), em artigo de revisão sobre caveol e cafestol, destacaram diversos trabalhos que mostram a importância dessas moléculas e ressaltaram que o café é uma *commodity* agrícola e fonte de cafeína, mas poderia ser melhor aproveitado para a produção de especialidades químicas, tendo em vista os seus elevados teores de ácidos clorogênicos, fibras e diterpenos.

A função destes diterpenos para o cafeeiro é desconhecida (DIAS, 2009). Porém, uma patente de HENRICH & WEINBERGER. (2005) sugere que a principal função para as plantas tem relação com a resistência contra insetos agindo no receptor de farnesoide (FXR, ligante

acido biliar) da fisiologia destas (Figura 4). FXR, (*farnesol X receptor*) é um fator responsável por modular o crescimento dos insetos.

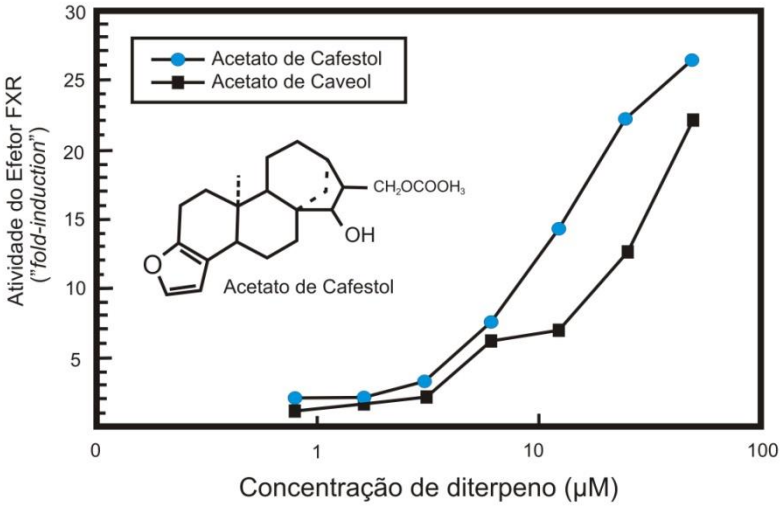


Figura 4 - Atividade do acetato de cafestol sobre o efetor FXR (Adaptado de HENRICH & WEINBERGER, 2005).

A atividade do acetato de cafestol sobre o fator FXR foi parecida com as atividades de moléculas inseticidas comerciais como o clorfenapir e fipronil (HENRICH & WEINBERGER, 2005).

Os teores de diterpenos, principalmente o caveol, podem também estar relacionados ao fator de proteção solar (FPS). WAGEMAKER (2009) trabalhou com o estudo da fração lipídica de grãos de café verde em acessos do banco de germoplasma do IAC e identificou genótipos que apresentaram óleo com bom FPS para uso na indústria cosmética. O estudo do óleo do café, mais especificamente dos diterpenos caveol e cafestol, é um desdobramento das pesquisas conduzidas por WAGEMAKER et al. (2011) no Instituto Agronômico.

É possível que a presença de diterpenos esteja relacionada com a tolerância ao estresse hídrico. Trabalhos com alecrim (MUNNÉ-BOSH et al., 1999) e sálvia (MUNNÉ-BOSH et al., 2001) mostraram relação entre a concentração de diterpenos em folhas e tolerância dessas espécies ao estresse hídrico.

A relação entre a presença destes diterpenos e a tolerância ao estresse hídrico em cafeeiros foi investigada neste trabalho de pesquisa.

2.5 Estresse Hídrico

O estresse hídrico, considerado o maior agente abiótico que afeta a produção de café, vem sendo estudado por diversas abordagens na busca por cultivares tolerantes (DAMATTA, 2004). As pesquisas sugerem que as mudanças climáticas podem aumentar os problemas relacionados ao estresse hídrico. Assim, nas principais regiões cafeeiras do país, o desenvolvimento de estratégias para a produção em condições de estresse torna-se imprescindível (DAMATTA & RAMALHO, 2006).

Os mecanismos responsáveis pela tolerância ao estresse hídrico são diversos e podem ser de natureza anatômica e fisiológica, de características genéticas qualitativas e quantitativas. As plantas usam estratégias diversas para tolerar o estresse, como a arquitetura de raiz, o fechamento de estômatos, o uso eficiente de água, entre outros (DAMATTA, 2004).

A identificação dos fatores que são responsáveis por tornar uma planta tolerante ou sensível é complexa, dentro de um mesmo genótipo podem existir genes que favorecem a tolerância e outros que favorecem a sensibilidade. Um dos caminhos é trabalhar com plantas mutantes com superexpressão ou silenciamento de determinados genes de tolerância ao estresse hídrico, pois dessa forma é possível isolar o fator responsável pela tolerância ao estresse. No entanto, esse tipo de trabalho em cafeeiro ainda é restrito.

De maneira mais prática, para o uso em programas de melhoramento genético, é possível identificar genótipos tolerantes e sensíveis, sem a necessidade de identificar os fatores que conferem tolerância ou sensibilidade, por meio de ensaios e avaliações do banco de germoplasma.

ALMEIDA et al. (2007) e TORRES et al. (2009) trabalharam com plantas jovens de café em casa de vegetação, submetidas a dois ciclos de restrição hídrica. Os autores, ao avaliarem as plantas quanto ao grau de murchamento, umidade da parte aérea e conteúdo endógeno de prolina, identificaram no banco de germoplasma de *Coffea* do IAC, alguns genótipos tolerantes ao estresse: Laurina, Semperflorens, Moca Grande, EP131 C188B, EP131 C91; e outros sensíveis: Bourbon Vermelho, Apoatã e Robustão Capixaba. Os demais acessos avaliados foram classificados como intermediários.

ALMEIDA et al. (2011) submeteram o genótipo tolerante Semperflorens a restrições hídricas de 30 e 40 dias e mostraram a redução do potencial hídrico foliar e menor altura comparado ao controle irrigado. O padrão de crescimento e desenvolvimento da planta foi prejudicado pelo estresse hídrico e mesmo quando as plantas voltaram a ser irrigadas de forma

contínua, o seu desenvolvimento não foi resgatado, ou seja, mesmo sendo considerada tolerante ao estresse hídrico, a planta apresentou perdas com a restrição hídrica.

A busca por cultivares que não apresente perdas por estresse hídrico, ou seja, resistente, pode ser considerada inviável, uma vez que a água, assim como o sol e o solo, são recursos limitantes para as plantas. Por isso, para diminuir os prejuízos da restrição hídrica, o trabalho do programa de melhoramento genético visa obter cultivares com maior grau de tolerância possível ao estresse.

O estudo dos fatores envolvidos no processo de tolerância ao estresse hídrico, nesse sentido, torna-se fundamental para o avanço tecnológico nessa área. É possível que os diterpenos do café, caveol e cafestol, tenham participação nesse processo, uma vez visto que isto acontece com diterpenos de alecrim (MUNNÉ-BOSH et. al., 1999) e sálvia (MUNNÉ-BOSH et. al., 2001).

3 OBJETIVOS

Objetivo geral:

Caracterizar acessos do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) de *Coffea* do IAC em relação à concentração dos principais diterpenos que ocorrem no gênero e investigar sua relação com o estresse hídrico de cafeeiros.

Objetivos específicos:

1) Determinar os teores de diterpenos em grãos verdes de café provenientes de frutos em estágio cereja dentro do BAG do IAC em dois anos agrícolas (2012/2013 e 2013/2014).
2) Investigar a relação entre diterpenos e estresse hídrico em cafeeiro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

A apresentação do material vegetal foi dividida em “experimento 1”, que corresponde ao material utilizado para a determinação dos teores de diterpenos em grãos verdes de café dentro do BAG do IAC em dois anos agrícolas (2012/2013 e 2013/2014), e “experimento 2”, material utilizado para investigar a relação entre o teor de diterpenos em folhas e estresse hídrico em cafeeiro.

4.1.1 Experimento 1

Nove espécies de *Coffea* (Tabela 1), dez cultivares e uma variedade botânica de *C. arabica* (Tabela 2), assim como, doze acessos de *C. canephora* (Tabela 3), foram selecionadas para os estudos relacionados à quantificação dos teores de diterpenos em amostras de café verde, considerando a diversidade do material genético e a aceitação como cultivar comercial.

Tabela 1 - Germoplasma de *Coffea* spp. avaliado na pesquisa.

Espécie	Variedade	Lote	Planta
C. stenophylla	IAC 1090	Coleção de espécies	Mistura de plantas
C. stenophylla	IAC 1070-13-1	Coleção de espécies	C2
C. stenophylla	IAC 1070-13	Coleção de espécies	C3
C. racemosa	H 6611-2	Coleção de espécies	C1
C. salvatrix	IAC 1288	Coleção de espécies	C10
C. salvatrix	IAC 1288	Coleção de espécies	C4
C. liberica	var dewevrei “Abeokutae”	Coleção de espécies	C10
C. liberica	var dewevrei “Uganda”	Coleção de espécies	C11
C. liberica	var dewevrei “Excelsa”	Coleção de espécies	C6
C. eugenioides	IAC 1140-24	Coleção de espécies	C1
C. eugenioides	IAC 1098-7	Coleção de espécies	C3
C. kapakata	IAC 4511	Coleção barrica	C19-1
C. congensis	IAC 4349	Coleção de Clones	C14
C. congensis	IAC 4350	Coleção de Clones	C17
C. congensis	var bangelan IAC 576	Coleção de Clones	C4
C. congensis	var bangelan IAC 239	Coleção de Clones	C2
C. congensis	var bangelan IAC 792	Coleção de Clones	C14
C. anthonyi	IAC 4345	Coleção barrica	Mistura de plantas
C. humilis	IAC 4348	Coleção barrica	Mistura de plantas

Tabela 2 - Germoplasma de *Coffea arabica* avaliado na pesquisa.

Germoplasma	Lote	Plantas
C. arabica cv Catuaí Vermelho IAC 99	Lote 106	55
C. arabica cv Catuaí Vermelho IAC 144	Lote 106	Mistura de plantas
C. arabica cv Mundo Novo IAC 376-4	Lote 106	Mistura de plantas
C. arabica cv Mundo Novo IAC 501	Lote 106	Mistura de plantas
C. arabica cv Obatã IAC 1669-20	Lote 106	20
C. arabica cv Tupi IAC 1669-33	Lote 106	33
C. arabica cv IAC 125 RN	Lote 106	Mistura de plantas
C. arabica cv Icatu Vermelho IAC 2945	Lote 106	46
C. arabica cv Icatu Amarelo IAC 2944	Lote 106	40
C. arabica cv Acaiá IAC 474-19	Lote 106	67
C. arabica var semperflorens	Coleção de *C. arabica*	Mistura de plantas

Tabela 3 - Germoplasma de *Coffea canephora* avaliado na pesquisa.

Germoplasma	**Lote**	**Planta**
C. canephora cv Apoatã IAC 3600	Coleção de espécies	Col 8
C. canephora cv Apoatã IAC 3597	Coleção de espécies	Col 2
C. canephora cv Apoatã IAC 3598	Coleção de espécies	Col 1
C. canephora var robusta IAC 1646	EP133	C358
C. canephora var robusta IAC 801	Coleção de espécies	C10
C. canephora var robusta IAC 2292	EP202	C999
C. canephora var bokubensis IAC 451	Coleção de espécies	C1 P1
C. canephora var bokubensis IAC 451	Coleção de espécies	C4
C. canephora var kouilou IAC 66	Coleção de espécies	Col 9
C. canephora var kouilou IAC 67	Coleção de espécies	Col 3
C. canephora var kouilou IAC 68	Coleção de espécies	Col 3
C. canephora var guarini IAC 447	Coleção de espécies	Col 6

4.1.2 Experimento 2

Para a análise de correlação entre as concentrações de diterpenos em folhas de cafeeiros e níveis de tolerância ao estresse hídrico, utilizou-se um campo de progênies com quatro anos de idade, com quatro tratamentos e dez repetições de *C. arabica* selecionados para resistência ao bicho mineiro. A figura 5 ilustra plantas contrastantes em relação ao estresse, manifestado em condições de campo.

Para o estudo, foram selecionadas 10 plantas da progênie H13685-1-25 pertencente à geração F_3 RC_4. Os cafeeiros, com mesmo '*background'* genético, foram separados em dois grupos contrastantes caracterizados respectivamente pela tolerância e sensibilidade ao estresse hídrico achados em condições de campo em 2014 (Figura 5). Os níveis de diterpenos dosados em folhas foram correlacionados com a resposta das plantas ao estresse hídrico.



Figura 5 – Progênie H13685-1-25. A**:** Planta tolerante ao estresse hídrico à esquerda e planta sensível ao estresse hídrico à direita. B: Detalhe das folhas da planta tolerante ao estresse hídrico. C: Detalhe das folhas da planta sensível ao estresse hídrico.

4.2 Preparo das amostras de frutos

As amostras foram coletadas no Banco de Germoplasma de *Coffea* do Instituto Agronômico, sendo provenientes de um conjunto de indivíduos previamente selecionados ou de plantas individuais no caso de algumas espécies em menor número.

Foram selecionados apenas os grãos provenientes de 100 frutos em estágio cereja. Os mesmos foram despolpados imediatamente após a colheita. Em seguida, foram levados para secagem em terreiro até aproximadamente 10% de umidade no grão, mantidos no processo de secagem por no máximo duas semanas. Após a secagem, os grãos foram colocados em sacos de papel devidamente identificados e armazenados em temperatura ambiente para posteriores

análises. O material foi coletado entre maio e julho nas safras 2012/2013 e 2013/2014, de forma que os resultados corresponderam a dois anos de colheita.

4.3 Reagentes

Para as extrações e avaliações cromatográficas de diterpenos foram utilizados os seguintes produtos químicos: éter metil *terc*-butílico p.a. (MTBE) (Sigma-Aldrich Co.), álcool etílico 95% (Synth), hidróxido de potássio p.a. (Sinth), acetonitrila grau cromatográfico (Merck), padrões de caveol e cafestol (Cayman Chemical Company), membranas de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,45 μm (Analítica) e água deionizada (Elga).

4.4 Equipamentos

As análises dos diterpenos, caveol e cafestol, foram realizadas com auxílio dos equipamentos: cromatografo líquido de alta eficiência (Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity Quaternary LC), centrifuga refrigerada (Hettich, modelo Rotina 380R), moinho de faca (Marconi, modelo MA-048), sistema de purificação de água (Elga, modelo Purelab Ultra), estufa de ventilação forçada (Precision Scientific Co., modelo Thelco 18), freezer -20ºC (Fricon), ultrafreezer -80ºC (ColdLab, modelo CL120-86V) e balança analítica (Mettler Toledo, modelo AB304-S/FACT).

4.5 Análise de Diterpenos

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Centro de Recursos Genéticos Vegetais, IAC.

A extração e determinação de diterpenos foram feitas seguindo os métodos descritos por DIAS et al. (2010) e KITZBERGER et al. (2013), com pequenas alterações. Todas as análises foram realizadas com duas repetições.

Aproximadamente 100g de grãos verdes foram processados em moinho de faca, até a obtenção de partículas de 0,5 mm. Imediatamente, 10g do material moído foram retirados e subdivididos em duas placas de Petri, previamente pesadas; as placas com o material vegetal

foram levadas à estufa por 48h, à 60ºC, para a determinação dos teores de umidade/ matéria seca e consequente expressão da concentração de diterpenos em base seca.

Para a quantificação dos diterpenos, foram pesados 0,2000g de cada amostra moída em tubos Falcon de 15 mL, adicionando-se 2 mL de KOH 2,5 M (em etanol 95%). Com o objetivo de liberar os diterpenos do meio, os tubos com o material vegetal foram mantidos em banho-maria à 80ºC por 1h. Em seguida, foram adicionados aos tubos 2 mL de água destilada e 2 mL de terc-butil metil éter (MTBE), sendo homogeneizados e levados à centrifugação por 3 min com força centrífuga relativa (RCF) de 3,87 x g. A fase orgânica foi recolhida e repetiu-se por mais duas vezes o processo de adição do solvente e centrifugação. Os sobrenadantes de cada extração foram combinados e 2 mL de água destilada foram adicionados ao meio, com homogeneização, para retirada dos interferentes. A fase aquosa foi descartada e o extrato levado à estufa, à 60ºC, até a completa evaporação. O resíduo foi ressuspendido em 3 mL da fase móvel, filtrado com membrana PTFE de 0,45 μm em *vial* de 2mL e armazenado a -20ºC para posterior análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), como ilustrado na figura 6.

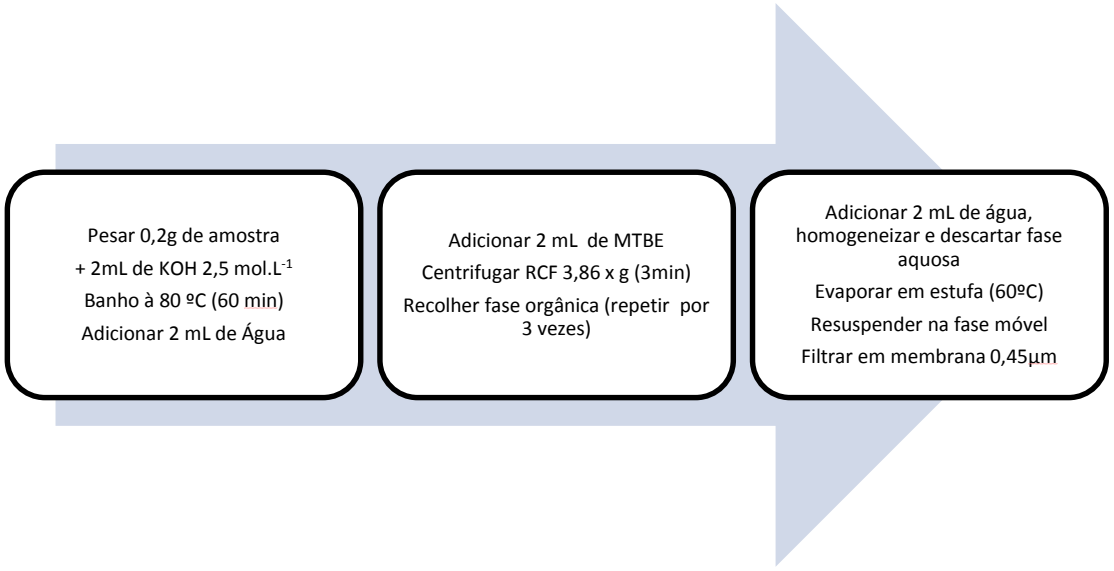


Figura 6 - Fluxograma da extração de diterpenos. MTBE: tercbutil metil éter.

Empregou-se, para separação e identificação dos diterpenos, um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity Quaternary LC), equipado com bomba quaternária (1260 Quat Pump, G1311B), injetor automático (1260 ALS, G1329B), forno com controle de temperatura (1260 TCC, G1316A), detector de arranjo de fotodiodos (1260 DAD VL+, G1315C) e um sistema de software (Agilent OpenLAB CDS, versão A.01.04) para a aquisição de dados.

Para a separação dos diterpenos, foi utilizada coluna de fase reversa inertsil-ODS3 (GL Sciences Inc.) (4,6mm x 250 mm, partículas de 5 μm) acoplada a uma pré-coluna C18 (ZORBAX Eclipse Plus –C18) e um sistema de solventes constituído pela fase móvel: 45% de acetonitrila grau HPLC e 55 % de água, em sistema de eluição isocrático, com um tempo de corrida de 30 minutos. Os parâmetros foram adaptados de DIAS et al. (2010). O volume de injeção foi de 20 μL, a vazão de 1,0 mL/minuto e a temperatura da coluna foi mantida a 25°C. O detector UV/Vis foi monitorado a 225 e 290 nm e o espectro de absorção foi gravado na faixa de comprimento de onda de 200 a 400 nm. Os diterpenos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção com os respectivos padrões e por comparação com dados da literatura (DIAS et al., 2010; SILVA et al., 2012). A quantificação dos diterpenos foi realizada por padronização externa e, para tanto, foram construídas curvas de calibração com sete pontos para ambos os diterpenos, na faixa de concentração de 0,08 a 0,20 $mg.mL^{-1}$.

Os resultados das repetições analíticas dos diterpenos analisados em cada amostra, expressos em $mg.100g^{-1}$, foram comparados e os CV (%) máximos, aceitáveis e obtidos por fórmula estabelecida por HORWITZ (1982), foi igual ou menor do que 11,3 %.

4.6 Preparo das amostras de folhas

A determinação dos teores de diterpenos em folhas foi feita com o mesmo método adotado para os frutos, porém, devido a menor quantidade dos diterpenos presentes nas folhas, foram pesados 0,3000g do material vegetal e o extrato final foi ressuspenso em 2mL da fase móvel, a fim de aumentar a concentração dos compostos a serem avaliados.

Imediatamente antes da pesagem, as amostras armazenadas em ultrafreezer (-80ºC) foram moídas, com auxílio de pistilo e almofariz, em presença de nitrogênio líquido; foram pesadas rapidamente nos tubos Falcon, tomando-se o cuidado para evitar reações de oxidação.

As análises de diterpenos em folhas foram conduzidas em plantas selecionadas do mesmo tratamento e dentro da mesma parcela de plantas tolerantes e sensíveis, formando 5 blocos selecionados entre as 10 repetições do campo total, ou seja, o experimento avaliado foi composto por dois tratamentos, sensível e tolerante, em 5 blocos (escolhidos entre as 10 repetições de uma progênie do campo total) e com duas repetições por tratamento dentro de cada bloco, somando 10 repetições por tratamento.

Todos os resultados foram analisados pelo delineamento de blocos casualizados com 10 repetições, sendo 5 blocos, 2 tratamentos (tolerante e sensível) com duas repetições por tratamento por bloco.

4.7 Análises de Umidade

As análises de umidade das amostras de folhas e frutos foram realizadas seguindo método descrito em CARVALHO et al. (1990). Para os frutos, pesaram-se cerca de 5g dos grãos recém-moídos em placas de Petri secas e taradas, mantidas em dessecadores com sílica gel. Anotou-se a massa da placa de Petri (P) e a massa da amostra fresca (AMF). As placas com as amostras foram levadas à estufa, a 60ºC, por 48h e obteve-se a massa de amostra seca (AS). Os cálculos de matéria seca (MS) e umidade (U) foram realizados pelas seguintes fórmulas:

$$MS(\%) = \frac{AS - P}{AMF} * 100$$

$$U(\%) = 100 - MS(\%)$$

As determinações da umidade em folhas seguiram o mesmo procedimento acima citado. As folhas do terceiro par, completamente expandidas, foram coletadas com luvas, de forma aleatória; imediatamente levadas ao laboratório, parte das folhas foram armazenadas em ultrafreezer (-80ºC) para análises dos diterpenos. Outra parte das folhas foi destinada à avaliação de umidade, sendo pesadas cerca de 10g, com duas repetições. As amostras foram levadas à estufa a 60ºC até atingir o peso constante.

O mesmo procedimento foi aplicado para as análises de umidade em solo. A amostragem foi composta, sendo retiradas três repetições com cerca de 25g cada, com o auxílio do trado à 20 cm de profundidade.

4.8 Estresse Hídrico e Diterpenos

O campo de progênies com quatro tratamentos, sendo três progênies com resistência ao bicho-mineiro e uma testemunha, Obatã IAC 1669-20, distribuídas em dez repetições com parcelas representadas por uma planta, foi avaliado visualmente por três avaliadores mediante uso de escala de 1 a 5 pontos, como descrito na tabela 4.

Tabela 4 - Escala visual de atribuição de notas utilizada na avaliação de estresse hídrico.

Pontos	Classificação	Descrição
1	Muito Tolerante	Ausência de sintoma.
2	Tolerante	Sintoma leve, folhas um pouco murchas, mas com boa retenção de folhas.
3	Moderadamente tolerante	Folhas bem murchas, mas com retenção das folhas
4	Sensível	Folhas muito murchas e com perda de folhas.
5	Muito sensível	Folhas muito murchas, acentuada perda de folhas, início de folhas secas.

4.9 Análises estatísticas

Os testes estatísticos de análise de variância e comparação de médias foram realizados com auxílio do software ASSISTAT 7.7 beta e as avaliações de componentes principais foram feitas empregando o software Statistica 11.

4.10 Ajuste de metodologia

As condições cromatográficas para separação dos diterpenos foram baseadas em trabalho desenvolvido por DIAS et al. (2010), que empregaram uma coluna Spherisorb ODS 1 (4,6mm x 250 mm, partículas de 5 μm) e com fase móvel acetonitrila/água, na proporção de 55/45 % (v/v), em eluição isocrática e vazão de 0,9 mL/min. Neste estudo, foi usada uma coluna de fase reversa com as mesmas dimensões e tamanho das partículas, mas de outra marca: inertsil-ODS3 (GL Sciences Inc.). Desse modo, houve necessidade de realizar alteração da proporção da fase móvel para 45/55% de acetonitrila/água e de sua vazão (1,0 mL/min), a fim de se obter melhor resolução dos compostos em análise. Nas condições cromatográficas utilizadas, o tempo de retenção médio do caveol foi de 24,9 min e do cafestol de 26,5 min. (Figura 7). A quantificação dos compostos foi realizada empregando os seus comprimentos de onda máximos, ou seja, o caveol foi quantificado a 290 nm e o cafestol a 225 nm.

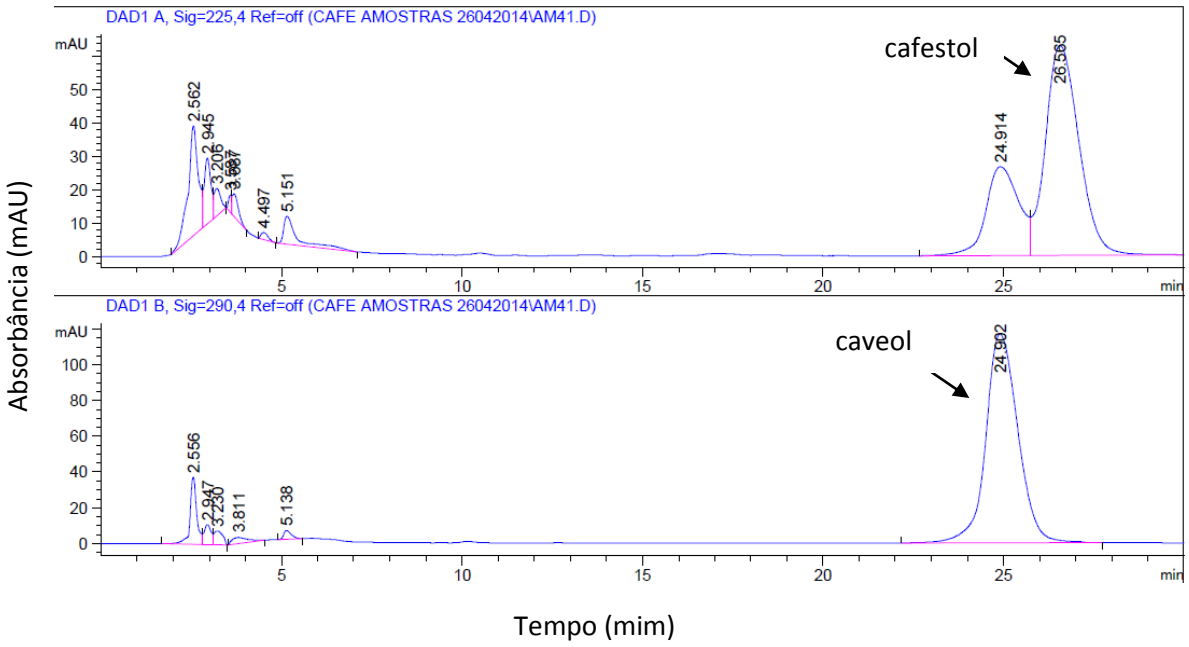


Figura 7 - Cromatograma de um extrato de grão de café, com a detecção de caveol e cafestol a 225 nm e de caveol a 290 nm, obtidos por CLAE-DAD.

A identificação dos diterpenos nas amostras avaliadas foi feita no cromatógrafo a líquido, comparando-se o tempo de retenção de cada um dos componentes separados e registrados nos cromatogramas com os tempos de retenção dos padrões diterpênicos, bem como por meio de

comparação dos espectros de absorção gerados pelo detector de arranjo de diodos (DAD). Como exemplo, o espectro de absorção de caveol encontrado está ilustrado na figura 8, e o espectro de absorção de cafestol, na figura 9.

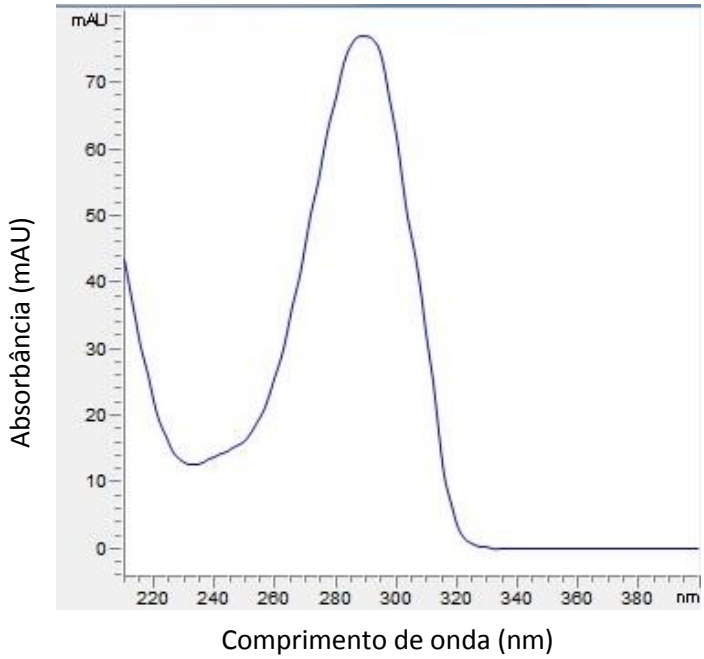


Figura 8 - Espectro de absorção do caveol gerado pelo DAD (λ_{max}= 290nm).

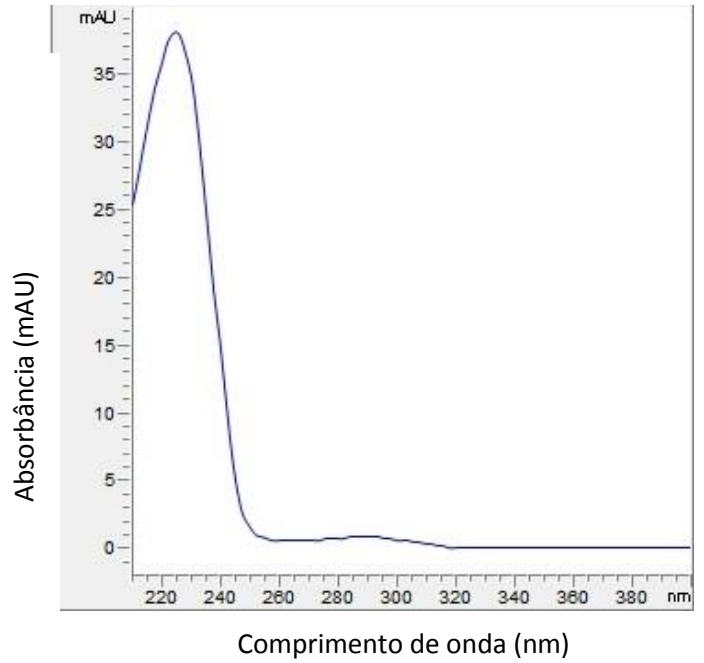


Figura 9 - Espectro de absorção do cafestol gerado pelo DAD (λ_{max} = 225nm).

A Figura 10 demonstra as curvas de calibração feitas com os valores das áreas obtidas de cada um dos picos cromatográficos dos padrões comerciais, injetados no cromatógrafo líquido

em sete diferentes concentrações: 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18 e 0,20 mg.mL^{-1}. As curvas analíticas passaram pela origem e apresentaram-se lineares nas faixas estudadas, demonstrando elevados coeficientes de determinação (R^2), respectivos de 0,9984 e 0,9976 para caveol e cafestol.

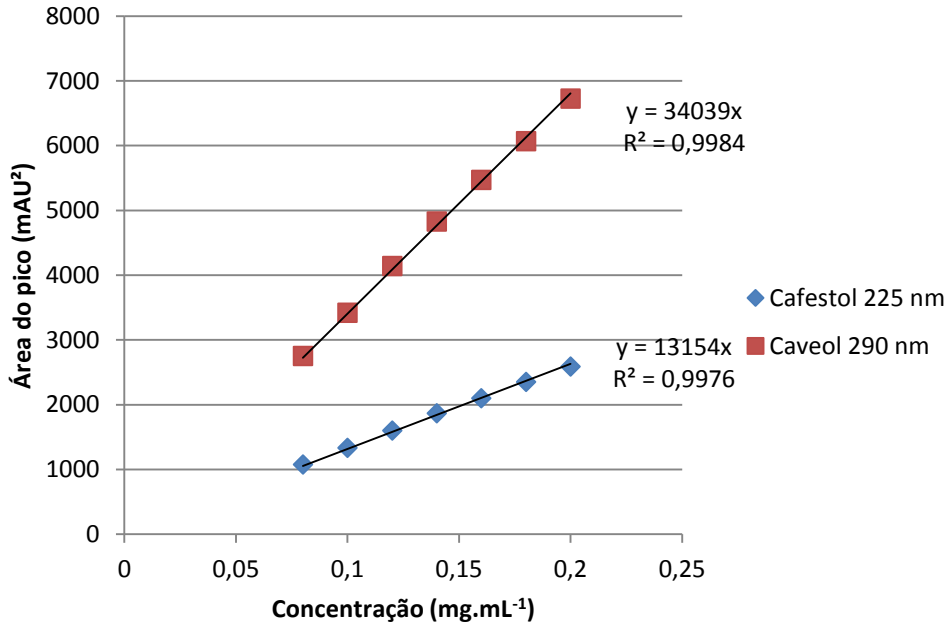


Figura 10 - Curvas de calibração dos diterpenos caveol e cafestol.

Utilizando-se das fórmulas apresentadas nas figuras 11 e 12, respectivamente, as concentrações do caveol e do cafestol foram estimadas. Os teores de diterpenos foram convertidos para base seca, descontando-se o valor da umidade de cada amostra, logo, os valores foram expressos em mg de diterpeno/100g de amostra em base seca.

$$[\mathbf{Caveol}]\left(\frac{\mathbf{mg}}{\mathbf{mL}}\right) = \frac{\mathbf{A2(290nm)}}{\mathbf{34039}} \quad \mathbf{R^2 = 0,9984}$$

Figura 11 - Fórmula utilizada para o cálculo da concentração de caveol, sendo A2 a área total do pico de caveol em mAU

$$[\mathbf{Cafestol}]\left(\frac{\mathbf{mg}}{\mathbf{mL}}\right) = \frac{\mathbf{A1(225nm)}}{\mathbf{13154}} \quad \mathbf{R^2 = 0,9976}$$

Figura 12 - Fórmula utilizada para o cálculo da concentração de cafestol, sendo A1 a área total do pico de cafestol em mAU.

Outros aparentes diterpenos foram detectados na cromatografia líquida de alta eficiência, como o encontrado no cromatograma de amostras da espécie *C. salvatrix* (Figura 13). No entanto, não foi possível identificá-los por não possuirmos os padrões adequados.

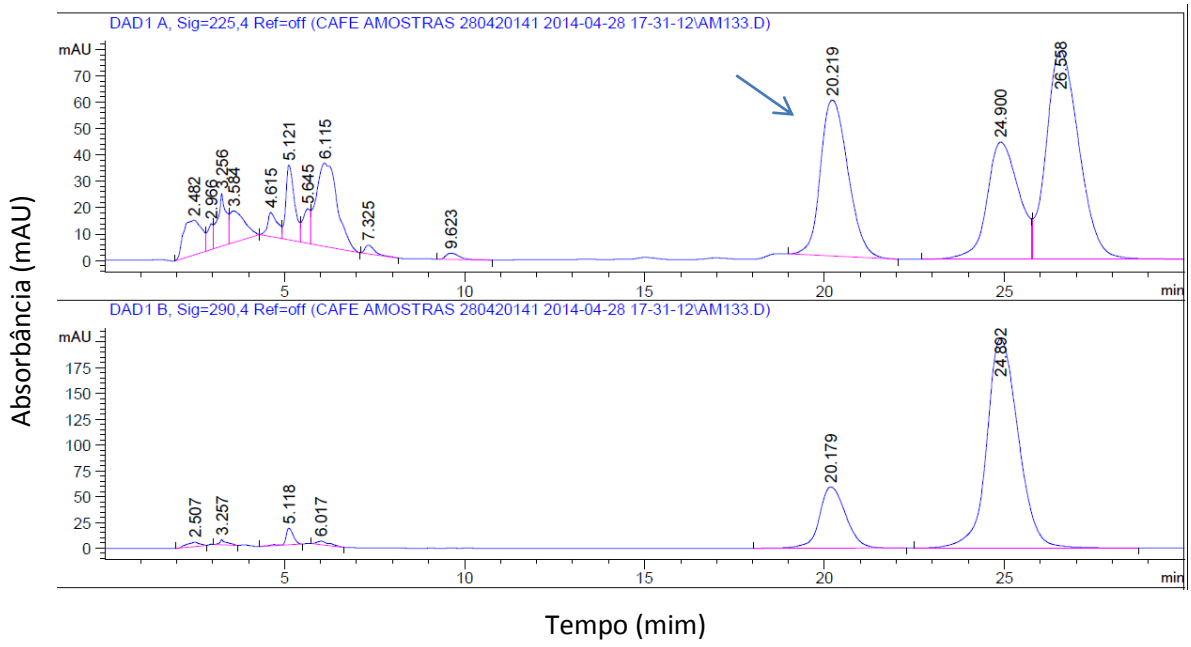


Figura 13 - Possível diterpeno em cromatograma de *C. salvatrix*.

O diterpeno 16-OMC relatado na literatura como exclusivo da espécie *C. canephora* (DIAS, 2009) e presente em quantidades consideráveis foi também avaliado. Devido ao maior tempo de retenção desse composto, amostras de *C. canephora* foram injetadas em corrida de 70 min, em condições semelhantes àquelas utilizadas para o caveol e cafestol. Como não foi possível detecção do pico pelo método isocrático, adotou-se um gradiente para análise: até 30 min em condições normais da fase móvel Acetonitrila/Água (45/55); de 30 a 45 min (55/45); de 45 a 60 min (60/40); 60 a 70 min (65/45). Nessas novas condições um pico considerável foi detectado com cerca de 60 minutos. É muito provável que esse pico seja o 16-OMC, que em condição de fase móvel isocrática aplicada nas análises deve ficar retido na coluna.

A literatura científica monstra uma ampla faixa de concentrações de diterpenos quantificados em frutos frescos inteiros ou em grãos secos. Em termos gerais, caveol e cafestol

são os principais diterpenos presentes no café arábica, porém no café robusta há maior quantidade de cafestol e ausência ou apenas traços de caveol. Há ainda outros derivados de caveol e cafestol presentes no café em menores quantidades (KOLLING-SPEER & SPEER, 2001). O 16-O-metilcafestol é um dos compostos diterpênico do café que merece destaque por ser indicador do café robusta em misturas de café, uma vez que é exclusiva de grãos de *C. canephora*. Porém, ao se analisar folhas de variedades de *C. canephora*, essa substância não foi detectada, mas apenas pequenas quantidades de cafestol e caveol (KOLLING-SPEER & SPEER, 1997).

Para validar a extração, uma concentração conhecida de padrões foi adicionada a uma amostra em branco e submetida a todo o processo em duplicata. A recuperação final foi de 98,4% para caveol e 99,6% para cafestol.

O teor de caveol, cafestol e diterpenos totais foi quantificado em duas safras (2012/2013 e 2013/2014) para quase todas as amostras com exceção de algumas que não estiveram presentes em algum dos anos, devido à indisponibilidade do material (Tabelas 5, 6 e 7). Nesse caso, os valores nas tabelas aparecem como N/A (Não Avalidado). Considerou-se diterpenos totais à soma dos teores de caveol e cafestol. O coeficiente de variação máximo entre as repetições foi de 11,3 %.

Em síntese, os teores médios para *C. arabica* nos dois anos de colheita foram: 279,8 $mg.100g^{-1}$ para caveol e 477,5 $mg.100g^{-1}$ para cafestol; para *C. canephora* os respectivos valores foram 5,0 e 318,7 $mg.100g^{-1}$. As demais espécies apresentaram teores variando entre 0 a 735 $mg.100g^{-1}$ para caveol e de 179,4 a 968,0 $mg.100g^{-1}$ para cafestol. Houve aumento nos teores de diterpenos em 2014, mostrando ser um caráter altamente influenciado pelo ambiente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Teores de diterpenos em grão verdes

5.1.1 Espécies de *Coffea*

Os teores de caveol, cafestol e diterpenos totais observados em diferentes espécies de *Coffea* encontram-se na tabela 5. Observou-se grande diversidade, com teores variando entre 0 e 708,3 mg.100g^{-1} de caveol e entre 187,7 e 933,2 mg.100g^{-1} de cafestol.

Valores reduzidos ou nulos de caveol foram observados em cafeeiros das espécies *C. kapakata*, *C. liberica* (var dewevrei 'Abeokutae', var dewevrei 'Excelsa' e var dewevrei 'Uganda') e *C. congensis* (var bangelan, IAC 239 Col 2A, IAC 576 Col 4A e IAC 792 C14A). Os cafeeiros IAC 4350 Col 17 e IAC 4349 Col 14 também identificados como *C. congensis* apresentaram teores bem mais elevados de caveol.

Fenotipicamente, estes dois grupos de *C. congensis* apresentam características muito distintas e de acordo com a classificação taxonômica de CHEVALIER (1942), revisada por BRIDSON & VERDCOURT (1988) e por DAVIS et al. (2006), os cafeeiros do primeiro grupo, denominados 'Bangelan' se assemelham mais a cafeeiros da espécie *C. canephora* enquanto os cafeeiros IAC 4349 e IAC 4350 seriam formas típicas da espécie *C. congensis*. A variação no teor de caveol parece confirmar esta hipótese que também se sustenta em características outras diversas, como produção de frutos, arquitetura da planta, tamanho, forma e coloração de frutos, entre outras (Dados não apresentados).

O teor de caveol em *C. eugenioides*, assim como *C. canephora*, um dos parentais de *C. arabica* variou entre 685,3 (2012/2013) e 462,4 (2013/2014) mg.100g^{-1} (Tabela 5). Analisando-se o conjunto de respostas relacionado a estas três espécies, o caveol parece ser um bom indicador da origem interespecífica de *C. arabica* já determinada a partir de estudos de natureza diversa e confirmada pela abordagem molecular utilizada por LASHERMES et al. (1999).

Os teores de cafestol também apresentaram variação (entre 187,7 e 933,2 mg.100g^{-1}) permitindo seleções de materiais com teores maiores ou menores. Apesar da variação entre espécies, não houve grande variação entre os anos agrícolas.

Tabela 5 – Teores de caveol, cafestol e diterpenos totais, em base seca, nas safras 2012/2013 e 2013/2014 para *Coffea* spp.

Cultivar	Caveol		Cafestol		Diterpenos Totais	
	2012/2013	2013/2014	2012/2013	2013/2014	2012/2013	2013/2014
	----------mg.100g^{-1}----------					
C. congensis IAC 4350 C17	316,6 cA	255,7 dB	426,1 cA	441,1 dA	742,7 bA	696,8 dB
C. congensis IAC 4349 C14	502,8 bA	377,1 cB	564,3 bA	453,6 dA	1067,1 aA	830,7 cB
C. liberica var dewevrei 'Uganda' C 11	36,2 dA	47,9 eA	482,1 cB	552,8 bA	518,3 bA	600,7 eA
C. liberica var dewevrei 'Abeokutae' C 10	29,2 dA	38,0 eA	393,3 cA	415,9 dA	422,5 bA	453,9 gA
C. stenophylla IAC 1090	708,3 aA	701,6 aA	366,8 cB	416,3 dA	1075,1 aA	1117,9 aA
C. eugenioides IAC 1098-7 C3	685,3 aA	462,4 bB	617,6 bA	468,3 dB	1302,9 aA	930,7 bB
C. congensis var bangelan IAC 239 C4	40,0 dA	0,0 eB	288,3 cB	503,8 cA	328,3 bB	503,8 fA
C. congensis var bangelan IAC 576 C2	97,9 dA	0,0 eB	187,7 cA	251,6 fA	285,6 bA	251,6 iA
C. anthonyi IAC 4345	251,7 cA	226,6 dA	933,2 aA	867,7 aB	1184,9 aA	1094,3 aB
C. kapakata IAC 4511 C 19-1	0,0 dA	0,0 eA	580,0 bA	352,5 eB	580,0 bA	352,5 hB
C. salvatrix IAC 1288 C10	557,3 bA	639,3 aA	466,2 cA	384,1 eB	1023,5 aA	1023,4 aA
C. salvatrix IAC 1288 C4	612,3 a	N/A	625,6 b	N/A	1237,9 a	N/A
C. racemosa IAC 6611-2 C1	287,9 c	N/A	847,3 a	N/A	1135,2 a	N/A
C. stenophylla IAC 1070-13	584,5 a	N/A	413,6 c	N/A	998,1 a	N/A
C. liberica var dewevrei 'Excelsa' C6	39,9 d	N/A	305,8 c	N/A	345,7 b	N/A
C. humilis IAC 4348	131,6 d	N/A	371,2 c	N/A	502,8 b	N/A
C. eugenioides IAC 1140-24 C1	641,1 a	N/A	575,3 b	N/A	1216,4 a	N/A
C. congensis var bangelan IAC 792 C14	75,3 d	N/A	353,3 c	N/A	428,6 b	N/A
C. stenophylla IAC 1070-13^{-1}	418,2 b	N/A	304,3 c	N/A	722,5 b	N/A
CV%	20,6	8,1	13,7	4,6	14,1	5,2

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, nas colunas e médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de *t* a 5% de probabilidade.

A partir da análise global dos resultados, nota-se que, no BAG do IAC, materiais com baixos teores e altos teores de diterpenos disponíveis para o programa de melhoramento genético visando desenvolver cultivares com alteração nos teores de diterpenos. Todavia, não foi encontrado nenhum material com ausência de diterpenos, provavelmente porque os diterpenos devem ter função importante para a planta de café, principalmente cafestol.

A utilização de algumas espécies como *C. eugenioides, C. anthonyi,* C. *salvatrix* e *C. stenophylla* que apresentaram altos teores de diterpenos, poderiam ser consideradas no melhoramento genético do cafeeiro visando o efeito benéfico anticarcinogênico dos diterpenos.

WAGEMAKER (2009) observou que *C. salvatrix* e *C. stenophylla* foram as espécies cujos óleos apresentaram os maiores fatores de proteção solar. Os resultados da tabela 5 mostraram altos teores de caveol para estas mesmas espécies, sugerindo que esta molécula pode estar correlacionada ao fator de proteção solar do óleo de café.

5.1.2 Teores de diterpenos em *C. arabica*

A variabilidade nos teores de caveol e de cafestol em cafeeiros da espécie *C. arabica* pode ser observada nos resultados apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Teores de caveol, cafestol e de diterpenos totais, em base seca, nas safras 2012/2013 e 2013/2014 em grãos de cultivares e variedades de *C. arabica*.

Variedades	Caveol		Cafestol		Diterpenos Totais	
	2012/2013	2013/2014	2012/2013	2013/2014	2012/2013	2013/2014
	----------mg.100g^{-1}----------					
cv Mundo Novo IAC 501	396,6 a	N/A	460,2 b	N/A	856,8 a	N/A
cv Mundo Novo IAC 376-4	326,4 bB	492,0 aA	364,4 cB	757,2 cA	690,7 aB	1249,2 aA
cv Tupi IAC 1669-33	154,9 cB	239,6 cA	281,2 cB	509,1 dA	436,1 bB	748,7 cA
cv Catuaí IAC 99	388,6 aB	534,6 aA	421,8 bB	743,9 cA	810,4 aB	1278,5 aA
cv Catuaí IAC 144	160,0 cA	193,3 cA	685,8 aB	1015,2 aA	845,8 aB	1208,5 aA
cv Acaiá IAC 474-19	238,6 cB	443,5 bA	307,0 cB	473,0 dA	545,6 bB	916,5 bA
cv Obatã IAC 1669-20	157,2 cA	221,4 cA	659,7 aA	794,1 cA	816,8 aB	1015,5 bA
cv Icatu Vermelho IAC 2945	272,7 bB	399,5 bA	187,1 dB	378,8 eA	459,8 bB	778,3 cA
cv Icatu Amarelo IAC 2944	129,8 cA	207,3 cA	150,5 dA	194,2 fA	280,3 bB	401,5 dA
cv IAC 125 RN	171,3 cA	189,2 cA	174,4 dA	114,5 gA	345,7 bA	303,7 dA
var semperflorens	N/A	110,1 d	N/A	879,0 b	N/A	989,1 b
CV%	16,1	8,1	13,7	4,6	14,1	5,2

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, nas colunas e médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de *t* a 5% de probabilidade.

O teor de caveol variou entre 110,1 mg.100g^{-1} e 534,6 mg.100g^{-1} e o teor de cafestol variou entre 114,5 e 1015,2 mg.100g^{-1} no germoplasma selecionado para o estudo em dois anos agrícolas.

Além da variabilidade genética intraespecífica, os resultados apresentados na tabela 6 evidenciam um efeito ambiental bastante acentuado. Os teores de caveol que variaram entre 129,8 e 396,6 mg.100g^{-1} na safra 2012/2013, atingiram mais amplitude no ano agrícola subsequente com variação entre 110,1 e 534,6 mg.100g^{-1} (Tabela 6). O efeito ambiental foi também significativo na análise do teor de cafestol que variou entre 150,5 e 685,8 mg.100g^{-1} em 2012/2013 e entre 114,5 e 1015,2 mg.100g^{-1} em 2013/2014. A cultivar Mundo Novo IAC 501 e a variedade semperflorens não foram incluídas nessa análise, uma vez que as análises químicas dos diterpenos foram realizadas em apenas um dos anos agrícolas.

Com exceção dos teores de cafestol na cultivar IAC 125 RN, que sofreu redução de 34,3% da safra 2012/2013 para a safra 2013/2014, os teores dos dois diterpenos aumentaram significativamente no mesmo período. O aumento no teor de caveol variou entre 10,4% na cultivar IAC 125 RN a 85,9% na cultivar Acaiá IAC 474-19 e o cafestol aumentou 20,4% na cultivar Obatã IAC 1669-20 e 107,8% na cultivar Mundo Novo IAC 376-4.

Segundo URGERT et al.(1995b), o consumo médio diário de cinco xícaras de café preparado sem auxílio de filtro de papel, que retém o cafestol, tem consequência direta no aumento do colesterol LDL (colesterol "ruim") no organismo.

Sob esta ótica, os cultivares IAC 125 RN e Icatu Amarelo IAC 2844 seriam mais apropriadas especialmente para o mercado de café expresso. Ambas apresentaram teores de cafestol inferiores a 200 $mg.100g^{-1}$ nos dois anos agrícolas avaliados. Nas cultivares Catuaí e Mundo Novo que apresentam hoje, cerca de 80% do café arábica plantado no Brasil, o teor de cafestol variou entre 421,8 e 1015,2 $mg.100g^{-1}$, no mesmo período experimental.

A influência ambiental nas safras 2012/2013 e 2013/2014 foi caracterizada pela escassez e irregularidades de chuva (Figura 16), isso altera uma série de processos do metabolismo da planta, o que pode contribuir para a variação dos teores de diterpenos.

Apesar do efeito ambiental significativo, notou-se estreita correlação entre as médias de cada uma das variáveis nos dois anos agrícolas, ou seja, os teores de caveol, cafestol e de diterpenos totais variam de um ano a outro, mas as cultivares com teores mais altos em um ano permanecem com o mesmo comportamento no ano seguinte, não havendo interação entre genótipo e ano agrícola.

5.1.3 Teores de diterpenos em *C. canephora*

Os teores de caveol, cafestol e diterpenos totais encontradas nas análises realizadas em plantas de cafeeiros da espécie *C. canephora* encontram-se na tabela 7. Como encontrado na literatura científica (DIAS, 2009), o caveol é praticamente inexistente na espécie.

Assim como observado em *C. arabica*, o efeito ambiental foi significativo na análise de variância realizada. Variações importantes, de grande magnitude foram observadas no teor de cafestol em grãos de alguns acessos de *C. canephora* em duas safras subsequentes. Reação semelhante foi observada nas variedades bokubensis col1, robusta IAC 801, kouilou 66-9 e na cultivar Apoatã (IAC 3600 e IAC 3597), nas quais o teor de cafestol foi significativamente superior na segunda avaliação (2013/2014) (Tabela 7). No sentido contrário, destaca-se a variedade bokubensis col4, com redução do teor de cafestol em 2013/2014.

A porcentagem de aumento do teor de cafestol variou entre as duas colheitas, de 12,9% (*C. canephora* var kouilou IAC 68-3) a 164,7% (*C. canephora* cv Apoatã IAC 3597), enquanto a redução porcentual significativa na variedade bokubensis col 4 foi de 47,3%.

Como o teor de caveol foi praticamente inexistente, a variação anual no teor de diterpenos totais é a mesma, que descreve o efeito ambiental na expressão do cafestol em seleções de *C. canephora*.

Tabela 7 - Teores de caveol, cafestol e de diterpenos totais, em base seca, nas safras 2012/2013 e 2013/2014 em grãos de cultivares e variedades de *C. canephora*.

Variedades	Caveol		Cafestol		Diterpenos Totais	
	2012/2013	2013/2014	2012/2013	2013/2014	2012/2013	2013/2014
	----------mg.100g^{-1}----------					
var kouilou IAC 67 Col 3	0,0 aA	2,8 bA	271,2 bA	332,3 cA	271,2 bA	335,1 cA
var bukobensis IAC 451 Col 1	2,5 aA	0,0 bA	202,0 bB	344,0 cA	204,5 bB	344,0 cA
cv Apoatã IAC3600 Col 8	5,2 aA	0,0 bA	281,0 bB	569,7 aA	286,2 bB	569,7 aA
var guarini IAC 447 Col6	19,5 aA	0,0 bA	223,5 bA	203,0 dA	243,0 bA	203,0 dA
cv Apoatã IAC 3597 Col 2	19,7 aA	0,0 bA	263,4 bB	697,2 aA	283,1 bB	697,2 aA
var robusta IAC 801 C10	2,7 aA	16,6 aA	194,9 bB	358,5 cA	197,5 bB	375,1 cA
var kouilou IAC 66 Col 9	0,0 aA	0,0 bA	204,0 bB	446,9 bA	204,0 bB	446,9 bA
var bukobensis IAC 451 Col4	20,7 aA	0,0 bA	271,4 bA	143,0 eB	292,1 bA	143,0 eB
var kouilou IAC 68 Col 3	6,0 aA	6,6 bA	471,2 aA	532,0 aA	477,1 aB	538,6 aA
var robusta IAC 2292 C999	0,0 a	N/A	269,1 b	N/A	269,1 b	N/A
cv Apoatã IAC 3598 Col 1	0,0 a	N/A	234,9 b	N/A	234,9 b	N/A
var robusta IAC1646 C358	3,1 a	N/A	179,2 b	N/A	182,3 b	N/A
CV%	156,2	122,9	17,2	5,6	19,6	5,7

Médias seguidas de uma mesma letra minúscula, nas colunas e médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de *t* a 5% de probabilidade.

Os mais baixos teores de cafestol foram encontrados nas seleções bokubensis Col 4, robusta IAC 1646 e guarini Col 6 (Tabela 7). É interessante observar, que esse tipo de café é o mais empregado pela indústria solubilizadora, e que para esse tipo de bebida, não há até o momento estudos aprofundados sobre os teores de diterpenos. É provável que a forma de extração não remova o cafestol e que, portanto, a preocupação com o efeito maléfico (aumento do nível de colesterol "ruim" no sangue) do mesmo, seja importante. Adicionalmente, outras formas de diterpenos podem ainda surgir a partir do cafestol com efeitos não conhecidos.

Como a indústria de café solúvel usa basicamente as cultivares Conilon ou kouilou (cerca de 95%) e Robusta, e o teor de cafestol nesse germoplasma é mais elevado, estudos mais aprofundados devem ser dirigidos à prospecção de cafeeiros com baixo teor de cafestol.

Com algumas exceções, teores mais baixos de caveol foram observados em cultivares de *C. arabica* derivados da introgressão de genes de *C. canephora* visando resistência à ferrugem alaranjada. Uma estrutura de grupos pode ser notada a partir da análise da figura 14, sendo o grupo 1 formado pelas cultivares de café arábica suscetíveis à *H. vastatrix*, denominado como *C. arabica* "puro" apenas para destacar a ausência de introgressão do genoma de *C. canéfora*, e o grupo 2, representado pelas cultivares com algum nível de resistência à ferrugem, ou seja, com parte do genoma de *C. canephora.*

As cultivares Obatã IAC 1669-20 (659,7 e 794,1 $mg.100g^{-1}$) e Catuaí Vermelho IAC 144 (685,8 e 1015,2 $mg.100g^{-1}$) apresentaram os maiores teores de cafestol nos anos agrícolas 2012/2013 e 2013/2014, ocupando posição destacada em cada um dos grupos identificados na figura 14.

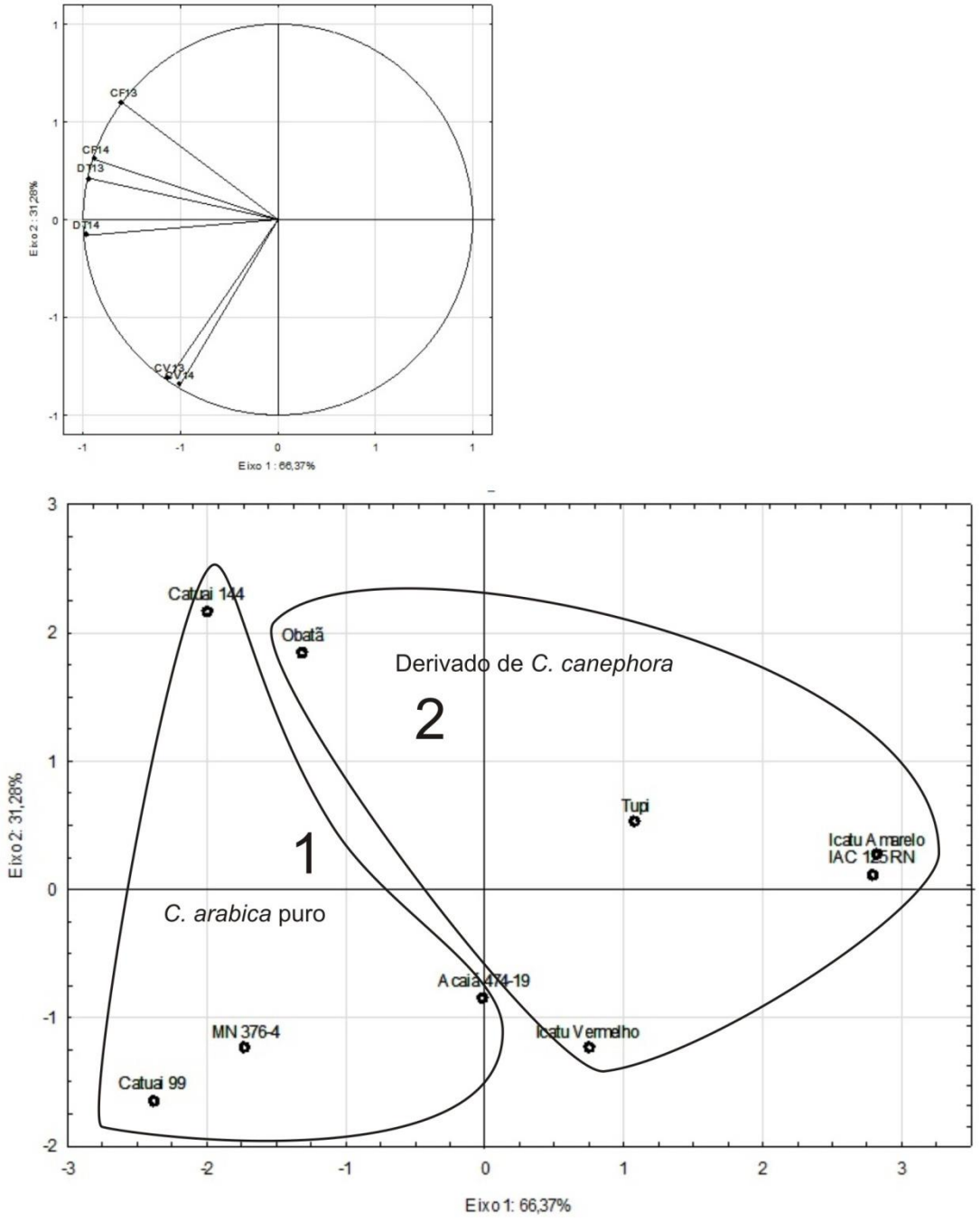


Figura 14 - Análise em componentes principais. Associação entre as variáveis teor de caveol 2012/13 (CV13) e 2013/14 (CV14), teor de cafestol em 2012/13 (CF13) e 2013/14 (CF14) e diterpenos totais em 2012/13 (DT13) e 2013/14 (DT14). Representação no plano ½ de acessos de *C. arabica.*

Esses resultados podem ser exemplificados pela utilização da espécie *C. canephora* como parental no programa de seleção de cultivares resistentes, uma vez que a espécie é caracterizada

pela ausência, em alguns casos, ou pelos teores reduzidos, em sua grande maioria, do diterpeno no endosperma do cafeeiro.

Enquanto no café arabica o teor de caveol pode ser próximo à 500 mg.100g^{-1}, na maior parte das variedades de *C. canephora* o teor de caveol é próximo a zero e nas condições experimentais realizadas, jamais superou a 21 mg.100g^{-1}.

Por outro lado, o teor de cafestol, se aproxima a daqueles observados em seleções de *C. arabica*, não havendo agrupamentos relacionados à origem do germoplasma (Figura 15).

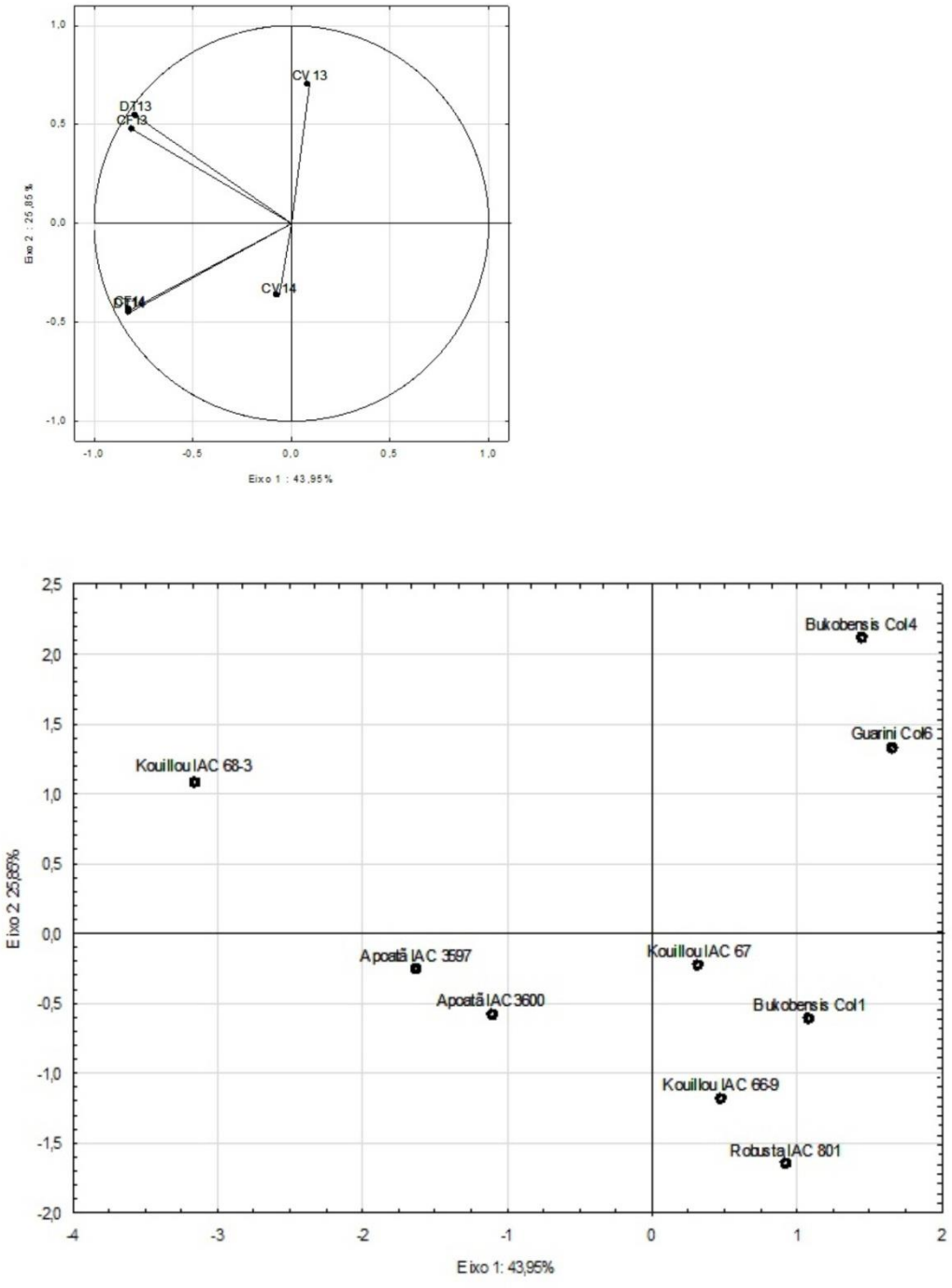


Figura 15 - Análise em componentes principais. Associação entre as variáveis teor de caveol 2012/13 (CV13) e 2013/14 (CV14), teor de cafestol em 2012/13 (CF13) e 2013/14 (CF14) e diterpenos totais em 2012/13 (DT13) e 2013/14 (DT14). Representação no plano ½ de acessos de *C. canephora*.

Ao contrário, variações significativas podem ser observadas dentro de uma mesma população, como acontece com a variedade kouilou. O cafeeiro kouilou IAC 67 apresentou em 2012/2013 271 mg.100g^{-1} enquanto, na mesma safra, o teor de diterpenos na seleção kouilou 68-3 foi de 471,2 mg.100g^{-1} (Tabela 7).

5.2 Análises da umidade em amostras de grãos de café

Os resultados das análises dos teores de umidade, no caso dos grãos de café, serviram apenas como base para a transformação dos teores de diterpenos para a base seca, ou seja, desconsiderando o teor de água presente no grão de café.

Os valores de umidade em todas as amostras de grãos de café foram muito semelhantes com valores entre 7,4 e 10,4%, sendo a média de 8,7 % e o desvio padrão de 0,6.

5.3 Relação entre o teor de diterpenos em folhas e o estresse hídrico em condições de campo

5.3.1 Avaliação do estresse hídrico de cafeeiros em campo

A escassez de chuvas em 2014 permitiu a fácil identificação de cafeeiros com diferentes níveis de tolerância ao estresse hídrico em condições de campo. A figura 16 ilustra o balanço hídrico em Campinas, SP, mais precisamente, na Fazenda Santa Elisa onde os cafeeiros foram avaliados.

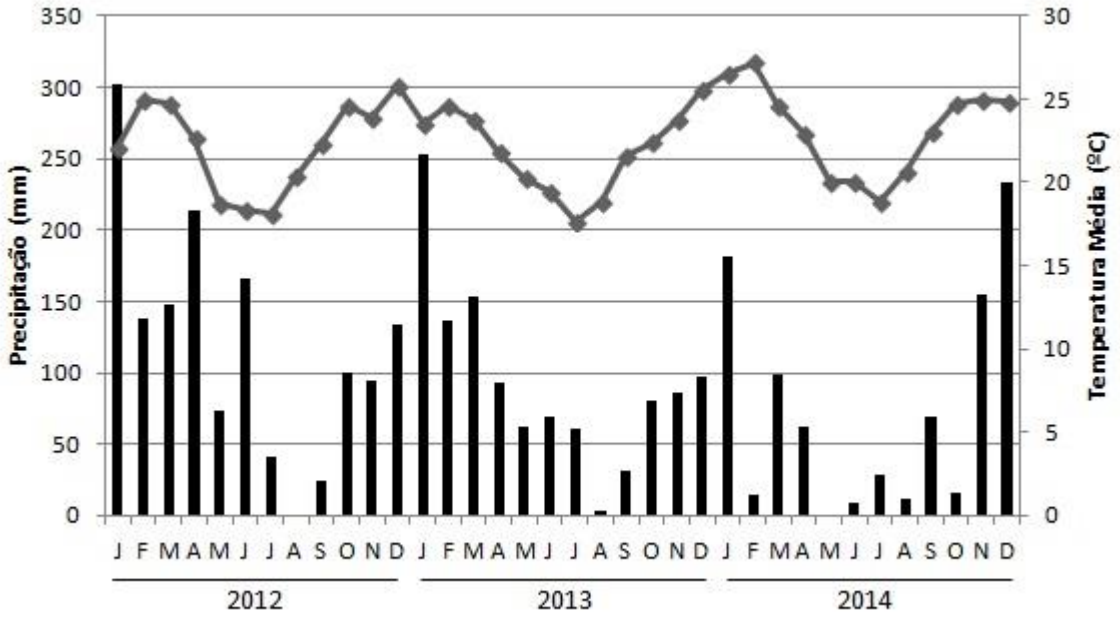


Figura 16 - Balanço hídrico 2012, 2013 e 2014 em Campinas, SP.

O estresse hídrico foi avaliado em julho de 2014, período de déficit hídrico acentuado, como ilustrado na figura 16, em um ensaio de progênies de cafeeiros com resistência ao bicho mineiro, por meio de escala de atribuição de notas de 1 a 5 pontos, sendo 1 ponto atribuído às plantas túrgidas, consideradas tolerantes e cinco pontos às plantas sensíveis ao estresse hídrico, ou seja, àquelas com sintoma de murcha foliar acentuada. Os resultados encontram-se na tabela 8.

Tabela 8 – Frequência de notas dos avaliadores para o estresse hídrico em progênies de cafeeiro resistentes ao bicho-mineiro, em Campinas, SP.

Progênie	**Escala de pontos [1]**					**Média**	**Plantas**
	1	**2**	**3**	**4**	**5**		
	----------nº----------					**pontos**	**nº**
Obatã		8	60	58	6	3,47	44
IAC 1669-20[2]							
H13685-1-25	2	31	46	34	7	3,11	40
H14954-46		15	61	43	4	3,29	41
H14954-23		22	67	44	5	3,23	46

[1]Escala de 1 a 5 pontos, sendo 1 ponto atribuído por três avaliadores às plantas mais tolerantes e 5 pontos àquelas mais sensíveis ao estresse hídrico em campo. Avaliações realizadas em Julho de 2015, com temperatura média de 19ºC [2] Testemunha experimental.

Os valores médios obtidos não foram muito distintos entre as progênies segregantes e a cultivar Obatã IAC 1669-20, usada como testemunha experimental, e variaram entre 3,11 e 3,47 pontos, na escala de 1 a 5 pontos adotada. No entanto, das 132 notas atribuídas por três avaliadores às 44 plantas da testemunha, 124 (94%) foram iguais ou superiores a 3.

A progênie H13685-1-25 apresentou média de 3,11 pontos das 120 notas atribuídas por três avaliadores às 40 plantas da progênie, 33 (27,5%) foram iguais a 1 ou 2 pontos, maiores níveis de tolerância ao estresse hídrico, razão pela qual a progênie foi selecionada para a sequência do estudo.

5.3.2 Avaliação do teor de diterpenos em folhas de cafeeiro tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico

Para análise do teor de diterpenos em folhas foram selecionados dez cafeeiros da progênie H13685-1-25, sendo cinco tolerantes e cinco sensíveis ao estresse hídrico. Os cafeeiros foram selecionados entre os 40 representantes da progênie em função do fenótipo contrastante e também da posição ocupada nas parcelas experimentais. Dessa forma, cinco pares de plantas, sendo uma sensível e uma tolerante, localizadas uma ao lado da outra, representaram os blocos ou repetições do experimento cujo delineamento foi o de blocos casualizados, com os dois tratamentos distribuídos em cinco repetições, em parcelas de uma planta. A disposição dos blocos avaliados no campo está ilustrado na figura 17.

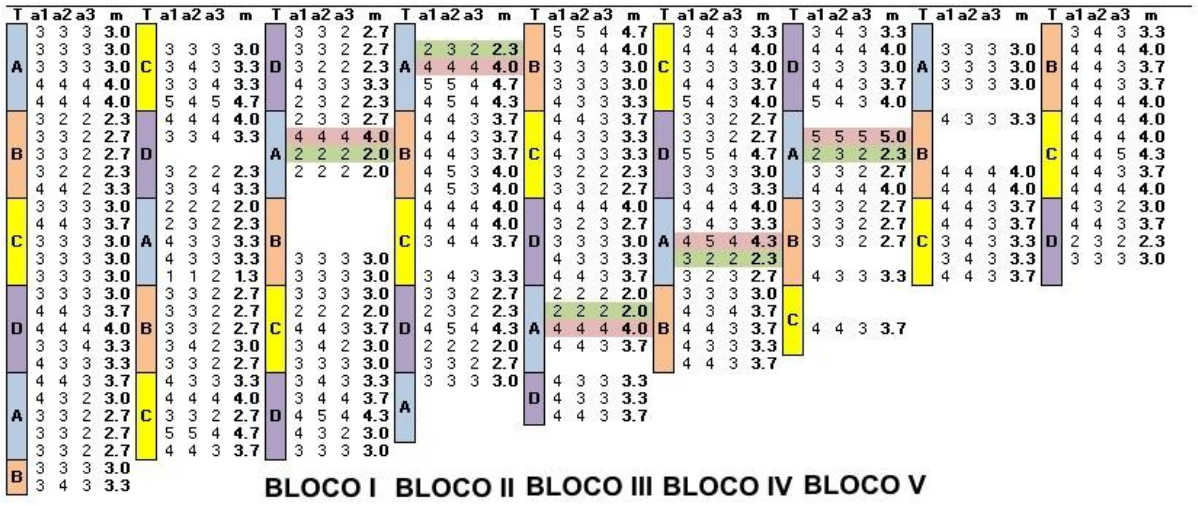


Figura 17 - Mapa do campo com nota de 3 avaliadores (a1, a2, a3) e média das avaliações (m) para as 4 progênies (A – H13685-1-25, B – H14954-46, C – H14954-23, D – Obatã IAC 1669-20). Plantas selecionadas para avaliação dos diterpenos em folhas: tolerantes em verde, sensíveis em vermelho.

O teor médio de umidade do solo avaliado nas parcelas experimentais foi de 10,3%, valor considerado bastante baixo em relação a experimentos de natureza semelhante (BRUNINI & CARDOSO, 1998).

Os teores de caveol e cafestol foram avaliados nas folhas, porém o teor de caveol foi zero em todas as análises. Aparentemente, *C. arabica* não apresenta caveol na folha, embora o caveol esteja presente nos frutos (DIAS, 2009), já *C. canephora* pode apresentar caveol nas folhas, contudo, não está presente nos frutos, assim como o 16-OMC está presente nas folhas de *C. arabica*, mas não está presente nos frutos. (KOLLING-SPEER & SPEER, 1997). Não há, até o momento, um trabalho que explique essa diferença da presença de caveol e 16-OMC entre folhas e frutos. É possível dizer que, analisando a planta toda, caveol, cafestol e 16-OMC estão presentes em *C. canephora* e *C. arabica*, porém algum fator impede que o caveol seja levado das folhas aos frutos de *C. canephora* e algum fator semelhante impede que o 16-OMC seja levado das folhas aos frutos de *C. arabica*.

As análises de variância realizadas com os dados obtidos a partir das determinações dos teores de cafestol e de umidade em folhas de cafeeiros tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico revelaram a existência de diferenças significativas entre variâncias de tratamentos, assim como, de blocos, não havendo efeito da interação entre blocos e tratamentos, como ilustrado na tabela 9.

Tabela 9 - Análise da variância realizada com os teores de cafestol e de umidade em folhas de cafeeiro tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico, em Campinas, SP.

Fonte de variação		**Teor de cafestol**			**Teor de umidade em folhas**		
	GL	**SQ**	**QM**	**F**	**SQ**	**QM**	**F**
Tratamentos (T)	1	0,17	0,17	0,0002*	149,33	149,33	11,27**
Blocos (B)	4	12582,71	3145,67	4,23*	33,60	9,65	$0,73^{ns}$
Interação (TXB)	4	3381,41	845,35	$1,14^{ns}$	69,60	17,40	$1,31^{ns}$
Resíduo	10	7441,91	744,19		132,48	13,25	
Total	19	23406,19			390,02		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ^{ns} não significativo. GL = grau de liberdade; SQ = soma de quadrados; QM = quadrado médio; F = teste F de variância.

As médias dos teores de umidade e de cafestol e de umidade nas folhas, efeitos significativos na análise de variância, encontram-se na tabela 10.

Tabela 10 - Médias dos teores de umidade e de cafestol, em base seca, em folhas de cafeeiros tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico.

Variável	**Tratamentos ***		**Bloco ***				
	Tolerante	**Sensível**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**
Teor de umidade (%)	58,7 a	52,2 b	56,8 a	53,9 a	56,1 a	54,9 a	57,9 a
Teor de cafestol ($mg.100g^{-1}$)	153,3 a	153,5 a	198,2 a	150,4 b	121,7 b	154,4 b	142,1 b

* médias de tratamentos e de blocos seguidas por uma mesma letra não diferem entre si segundo teste *t* a 5% de probabilidade.

Nota-se pelos resultados apresentados na tabela 10 que cafeeiros tolerantes ao estresse hídrico, apresentaram maiores teores de umidade na folha (58,7%) do que as plantas sensíveis (52,2%). No entanto, não houve diferença estatística significativa para o teor de cafestol em folhas dos dois grupos de plantas, sugerindo que os diterpenos não parecem, em condições de campo, ser uma das componentes importantes do mecanismo de tolerância ao estresse hídrico. É importante ressaltar que o caveol não foi detectado em folhas de cafeeiro sensíveis ou tolerantes.

5.3.3 Variações no teor de cafestol em função do horário e do período de amostragens

Apesar de as análises terem evidenciado que, o teor de cafestol não está relacionado com o nível médio de tolerância ou sensibilidade dos cafeeiros, investigou-se se o horário de coletas das folhas e o período de amostragens poderiam exercer alguma influência sobre esta relação. Os resultados obtidos encontram-se na tabela 11.

Tabela 11 - Teor de cafestol (mg.100g^{-1}), em base seca, em folhas de cafeeiros tolerantes e sensíveis ao estresse hídrico amostradas em diferentes horários do dia e período do ano, em Campinas, SP.

Tratamento *	Horário de amostragem			Período de amostragem		
	8h	12h	16h	maio	junho	Julho
Tolerante	170 aA	135 bC	155 aC	169	215 aA	135 bB
Sensível	147 aB	167 aA	151 aA	168	181 bA	167 aB

* Médias de tratamentos seguidas por uma mesma letra minúscula nas colunas ou maiúscula nas linhas não são estatisticamente diferentes segundo o teste *t* a 5% de probabilidade.

Os resultados referentes ao horário de amostragem revelaram comportamento distinto de cafeeiros tolerantes de sensíveis, com variações de importante magnitude no teor de cafestol no horário mais quente do dia. Ao meio dia, o teor de cafestol em cafeeiros tolerantes foi de 135 mg.100g^{-1} valor significativamente diferente daquele observado em cafeeiros sensíveis (167 mg.100g^{-1}). No entanto, o menor valor dos diterpenos está presente em cafeeiros tolerantes, fato que reforça a ausência de correlação positiva entre os efeitos estudados.

Quando se analisa o período de amostragem das folhas, percebe-se um mesmo padrão de resposta para os dois tratamentos, ou seja, aumento do teor de cafestol em junho, em relação ao mês anterior e queda no teor do diterpeno no mês seguinte.

O teor de diterpenos não foi determinado em frutos dos cafeeiros da progênie H13685-1-25, selecionados para o estudo de relação com o estresse hídrico. Entretanto, os resultados das análises realizadas com cafeeiros do banco de germoplasma de *Coffea* do IAC, apresentados nos capítulos 5.2, 5.3 e 5.4 indicaram níveis elevados de diterpenos totais em frutos de espécies de *Coffea* e de cultivares e variedades das espécies *C. arabica* e *C. canephora*.

Possivelmente, a escassez de chuva em 2014 (Figura 16) tenha papel relevante na expressão dessa característica em frutos, constituindo-se em uma possível estratégia das plantas visando à perpetuação, ou seja, à produção de frutos em sementes quando exposta à condições ambientais adversas como o estresse hídrico.

A relação entre o teor de diterpenos em folhas e o estresse hídrico de plantas em condição de campo foi investigada com base em evidências dessa associação encontrada por MUNNÉ-BOSH et al. (2001) em sálvia (*Salvia officinalis*) e MUNNÉ-BOSH et al. (1999) em alecrim

(*Rosmarinus officiinalis*), levando em conta também sua função antioxidante com possibilidade de redução do estresse oxidativo.

Segundo esta hipótese, os diterpenos atuariam inibindo o efeito da radiação solar e, como antioxidantes, diminuiriam o estresse oxidativo e o metabolismo, bloqueando também as espécies reativas de oxigênio, contribuindo assim, para a redução do estresse hídrico.

A principal função dos diterpenos caveol e cafestol para a planta do café parece estar mais associada ao fruto, visto o maior teor acumulado no grão comparado ao teor da folha e seu efeito na fisiologia dos insetos (HENRICH & WEINBERGER, 2005).

A função do caveol e do cafestol como fatores de tolerância ao estresse hídrico é pouco provável, mesmo assim ainda é possível, com menor expressão ou indiretamente por ativação de outros mecanismos de tolerância, vias e substâncias como hormônios vegetais ou outros metabolitos relacionados com ajustamento osmótico. Ou ainda, é possível que o estágio de desenvolvimento das folhas ou o estádio fenológico das plantas tenham interferido na reposta do teor endógeno dos diterpenos.

6 CONCLUSÕES

Existe variabilidade no teor de diterpenos em espécies do gênero *Coffea* e em cultivares e variedades das espécies cultivadas *C. arabica* e *C. canephora* presentes no Banco de Germoplasma do IAC para uso no melhoramento genético do cafeeiro.

O cafestol esteve presente em todas as amostras de café enquanto que o caveol, ausente em algumas delas e principalmente em representantes da espécie *C. canephora*.

O teor de cafestol revelou-se variável em folhas de café em função do horário de amostragem, do período de coleta e do nível de tolerância/sensibilidade das plantas, analisado em condições de campo.

Não foi observada qualquer relação entre a tolerância de cafeeiros ao estresse hídrico em campo e o teor de diterpenos em folhas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, J.A.S.; CARVALHO,, C.R.L.; SILVAROLLA,, M.B.; ARRUDA, F.; BRAGHINI, M.T.; LIMA, V.B.; FAZUOLI, L.C. Caracterização de respostas morfológicas e fisiológicas de diferentes genótipos de *Coffea* submetidos a estresse hídrico. **In: *V Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*.** 2007

ALMEIDA, J.A.S; SAKAI, E.; MEDINA, P. F.; SILVAROLLA, M. B. Aspéctos fisiológicos do desenvolvimento de plantas de *Coffea arabica* submetidas ao estresse hídrico. **In: *VII Simpósio de Pesquisas do Café do Brasil***. 2011.

BAK AAA, GROBBEE DE. The effect on serum cholesterol levels of coffee brewed by filtering or boiling. **New England Journal Medicine**. v.321. p.1432-7. 1989.

BRIDSON, D.M.; VERDCOURT, B. Flora of Tropical East África – Rubiceae (Part 2). **POLHILL R. M.**. 1988.

BRUNINI, O.; CARDOSO, M. Efeito do déficit hídrico no solo sobre o comportamento estomático e potencial da água em mudas de Seringueira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.33. n.17. p. 1053-1060. 1998.

CÁRDENAS, C.; QUESADA, A.R.; MEDINA, M.A. Anti-Angiogenic and Anti-Inflammatory Properties of Kahweol, a Coffee Diterpene. **PLoS ONE**. v6. e8. 2011.

CARVALHO, A.; MÔNACO, L.C. Transferência do fator caturra para o cultivar Mundo Novo de *Coffea arabica*. **Bragantia.** v.31, p.379-399, 1972.

CARVALHO, A.; MEDINA FILHO, H.P.; FAZUOLI, L.C.; GUERREIRO FILHO, O.; LIMA, M. M.A. Aspectos genéticos do cafeeiro (Genetic Aspects of the coffee tree). **Revista Brasileira de Genetica**. v. 14, p. 135-183, 1991.

CARVALHO, A.M. de; PEREIRA A.A.; CARVALHO, G.R; MENDES, A.N.G.; BOTELHO, C.E. Avaliação de progênies de cafeeiros obtidas do cruzamento entre Catuaí e Híbrido de Timor. **Scientia Agraria**. v. 9, p. 249-253, 2008.

CARVALHO, C.R.L.; MANTOVANI, D.M.B.; CARVALHO, P.R.N.; MORAES, R.M. Análises químicas de alimentos. **Instituto de Tecnologia de Alimentos.** 121p. 1990.

CHENG, A; LOU, Y.; MAO, Y.; LU, S.; WANG, L.; CHEN, X.; Plant Terpenoids: Biosynthesis and Ecological Functions. **Journal of Integrative Plant Biology.** v.49. p.179−186. 2007.

CHEVALIER, A. Les caféiers du globe. II. Iconographie des caféiers sauvages et cultivés et des Rubiacées prises pour des caféiers. **In: *Encyclopedia Biology***. (Lechevalier, P., ed.). 1942.

CHEVALIER, A. Les caféiers du globe III, systhématique des caféiers et faux caféiers, maladies et insects nuisibles. **Encyclopédie Biologique**. v.281, p.356, 1947.

CLARKE, R. J.; VITZTHUM, O. G. Coffee: Recent developments (1st ed.). L. **Wiley-Blackwell.** 2001.

CONAB. Acompanhamento da Safra Brasileira Brasileira de Café, safra 2015, primeiro levantamento. Janeiro 2015. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_14_11_57_33_boletim_cafe_janeiro_2015.pdf . Acesso em: 5 fev. 2015.

CONAGIN, C.H.T.M.; MENDES, A.J.T. Pesquisas citológicas e genéticas de três espécies de Coffea – autoincompatibilidade em *C. canephora*. **Bragantia.** v. 20, p. 787-804, 1961.

DAMATTA, F.M. Exploring drought tolerance in coffee: a physiological approach with some insights for plant breeding. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.16. i.1. p.1-6. 2004.

DAMATTA, F.M.; RAMALHO, J. D. C. Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.18. i.1. p.55-81. 2006.

DAVIS, A.P.;GOVAERTS, R.;BRIDSON, D.M.;STOFFELEN, P. An annotated checklist of the genus *Coffea* L. (Rubiaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society.** v.152. p.465-512. 2006.

DAVIS, A.P. *Psilanthus mannii,* the type species of *Psilanthus*, transferred to *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 29, e.4, p. 471–472, 2011.

DE ROOS, B.; VAN DER WEG, G; URGERT, R.; VAN DE BOVENKAMP, P.; CHARRIER, A.; KATAN, MB. Levels of cafestol, kahweol, and related diterpenoids in wild species of the coffee plant *Coffea.* **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.45. p.3065-3069. 1997.

DIAS R.C.E. Diterpenos em café: desenvolvimento de metodologia para análise, avaliação em cafés torrados e em diferentes tecidos do fruto e estudo da estabilidade com o processo de torra. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual de Londrina. 2009.

DIAS, R. C. E.; CAMPANHA, F. G; VIEIRA, L. G. E.; FERREIRA, L. P.; POT, D.; MARRACINI, P.; BENASSI, M. T. Evaluation of Kahweol and Cafestol in Coffee Tissues and Roasted Coffee by a New High-Performance Liquid Chromatography Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.58. i. 1. p. 88-93. 2010.

DIAS, R. C. E.; SCHOLZ, M. B. S.; BENASSI, M. T. (2006) Metodologia para análise de diterpenos em café torrado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **In: *Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos***. 2006.

EIRA, M. T. S.; FAZUOLI, L. C.; GUERREIRO-FILHO, O.; SILVAROLLA, M. B.; FERRÃO, M. A. G.; FONSECA, A. F.; FERRÃO, R.G.; SERA, T.; PEREIRA, A. A.; SAKIYAMA, N. S.; ZAMBOLIM, L.; CARVALHO, C. H.; PADILHA, L.; SOUZA, F. F. Bancos de germoplasma de café no brasil: Base do melhoramento para produtividade e qualidade. **Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil.** 2007.

FAZUOLI, L.C.; MEDINA-FILHO, H. P.; GUERREIRO-FILHO, O.; GONÇALVES, W.; SILVAROLLA, M. B.; GALLO, P. B. Cultivares de café selecionadas pelo Instituto Agronômico de Campinas. **Simpósio de Pesquisas dos Cafés do Brasil**. 2000.

FERREIRA, L. P.; DIAS, R.C.E. ; DURAND, N. ; GUYOT, B. ; RAMOS, J. ; PERTHUIS, B. ; SANDRIN-GARCIA, P. ; BENASSI, M. T. ; MARRACCINI, P. ; PEREIRA, L. F.P. ; LEROY, T. ; VIEIRA, L. G.E. ; POT, D. Determinismo genético e molecular de diterpenos em *Coffea* spp. **VI Simpósio de pesquisas dos cafés do Brasil**. 2009.

FOLSTAR, P. Lipids. In: Macrae R (eds). **Coffee Chemistry**. v. 1. p.203-222. 1985.

HENRICH, V.C.; WEINBERGER, C.A. Compound tha act to modulate insect growth and methods and system to identifying such compounds. **U.S. Patent Application Publication.** US 2005/0049230. 2005.

HORWITZ, W. Evaluation os analytical methods used for regulation of foods and drugs. **Anal. Chem.**, v.54, n. 1, p. 67A – 76A, 1982.

HUBER, W. W.; ROSSMANITH, W.; GRUSCH, M.; HASLINGER, E.; PRUSTOMERSKY, S.; PETER-VOROSMARTY, B.; PARZEFALL, W.; SCHARF, G.; SCHULTER-HERMANN, R. Effects of coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol on cytochrome P450 and sulfotransferase in rat liver. **Food and Chemical Toxicology.** 2008.

KITZBERGER, C.S.G.; SCHOLZ, M. B. dos S.; PEREIRA, L.F.P; VIEIRA, L.G.E; SERA, T.; SILVA, J.B.G.D; BENASSI, M. de T. Diterpenes in green and roasted coffee of Coffea arabica cultivars growing in the same edapho-climatic conditions. **Journal of Food Composition and Analysis.** v.30. p.52–57. 2013.

KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. Diterpenes in coffee leaves. In**: 17th International Colloquium on the Chemistry of Coffee**. p.150-4. 1997.

KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. 16-O-methylkahweol in Robusta coffee. **In: 19th International Colloquium on the Chemistry of Coffee**, 2001.

KURZROCK, T., SPEER, K. Diterpenes and Diterpene Esters in Coffee. **Food Review Internacional.** V.17. p.433-450. 2001.

LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT, P.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular Characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Molecular and General Genetics** v.261.p.259-266.1999.

LANGE, B. M.; AHKAMI, A. Metabolic engineering of plant monoterpenes, sesquiterpenes and diterpenes – current status and future opportunities. **Plant Biotechnology Journal**. e11. 2013.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDINGNON, R.; GUERREIRO FILHO, O.; MALUF, M.P; FAZUOLI, L.C. Breeding of Arabica Coffee at IAC, Brazil: objectives, problems, and prospects. **Acta Horticulturae**, v. 745, p. 393-408, 2007.

MENDES, J.E.T. Ensaio de variedades de cafeeiros. III. **Bragantia**. v.11. p.29-43, 1951.

MÔNACO, L.C.; CARVALHO, A.; FAZUOLI, L.C. Melhoramento do cafeeiro. Germoplasma do café Icatu e seu potencial no melhoramento**. In: Congresso Brasileiro de Pesquisas Cafeeiras**. v. 2. p. 103. 1974.

MUNNÉ-BOSH, S.; SCHUARZ, K.; ALEGRE, L. Enhanced Formation of a-Tocopherol and Highly Oxidized Abietane Diterpenes in Water-Stressed Rosemary Plants. **Plant Physiology**. V. 121. p. 1047–1052. 1999.

MUNNÉ-BOSH, S.; MUELLER, M.;. SCHUARZ, K.; ALEGRE, L. Diterpenes and antioxidative protection in drought-stressed *Salvia officinalis* plants. **Journal of Plant Physiology**. v. 158. p. 1431-1437. 2001.

PETTITT JR, B.C. Identification of the diterpene esters in Arabica and Canephora coffees. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v.35. p.549-551. 1987.

RIBAS, A. F.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Genetic transformation of coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v.18. n1. p.83-94. 2006.

SILVA, J.A.; BORGES, N.; SANTOS, A.; ALVES, A. Method Validation for Cafestol and Kahweol Quantification in Coffee Brews by HPLC-DAD. **Food Analytical Methods**, v.5.p. 1404-1410. 2012.

SILVAROLLA, M. B.; MAZZAFERA, P.; FAZUOLI, L.C. A naturally decaffeinated arabica coffee. **Nature.** v. 428. p. 429:826. 2004.

SPEER, K.; KÖLLING-SPEER, I. The lipid fraction of the coffee bean. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. V.18. 2006.

TESSEMA, A.; ALMEREW, S.; KUFA, T.; GAREMEW, W. Genetic Diversity Analysis for Quality Attributes of Some Promising *Coffea arabica* Germplasm Collections in Southwestern Ethiopia**. Journal of Biological Sciences**. v 11. e 3. 2011.

THEIS, N.; LERDAU, M. The evolution of function in plant secondary metabolites. **International Journal of Plant Sciences.** v.164. p.S93-S102. 2003

TORRES, L. D.; ALMEIDA, J. A. S. de; CARVALHO, C. R. L.; SILVAROLLA, M. B. Caracterização do conteúdo endógeno de prolina em genótipos de Coffea submetidos à condição de restrição hídrica. **In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil**. 2009.

TRAPP, S.; CROTEAU, R. Defensive resin biosynthesis in conifers. **Annual Review Plant Molecular Biology**. v.52. p.689-724. 2001.

TRINH, K.; ANDREWS, L.; KRAUSE, J.; HANAK, T.; LEE, D.; GELB, M.; PALLANCK, L. Decaffeinated Coffee and Nicotine-Free Tobacco Provide Neuroprotection in *Drosophila* Models of Parkinson's Disease through an NRF2-Dependent Mechanism. **The Journal of Neuroscience**. v30. e16. 2010.

TSUKUI, A; OIGMAN, S.S.; REZENDE, C.M. Óleo de grãos de café cru: Diterpenos cafestol e caveol. **Revista Virtual Química**. v.6. 2014.

URGERT, R.; SCHULS, A. G. M; KATAN, M. B. Effects of cafestol and kahweol from coffee grounds on serum lipids and serum liver enzymes in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.61. p. 149-54. 1995a.

URGERT, R.; VAN DER WEG, G.; KOSMEIJER-SCHUIL, T. G.; VAN DE BOVENKAMP, P.; HOVENIER, R.; KATAN, M. B. Levels of the cholesterol elevating diterpenes cafestol and kahweol in various coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry.** v.43. p. 2167-2172. 1995b.

USDA. Coffe: world markets and trade. **USDA.** December 2014. Disponível em: http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/coffee.pdf Acesso em: 21 jan 2015.

VAN DER VOSSEN, H. A. M. The cup quality of disease-resistant cultivars of arabica coffee (*Coffea arabica*). **Experimental Agriculture**. v.45. e3. 2009.

VAN DER VOSSEN, H.; BRETRAND, B.; CHARRIER, A. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. **Euphytica**. 2015.

WAGEMAKER, T. A. L. Variabilidade para rendimento de óleo e componentes da fração lipídica do gênero *Coffea* visando usos alternativos aos grãos. **Dissertação (Mestrado em Genética, Melhoramento Vegetal e Biotecnologia)** – Pós-Graduação – IAC. 95p. 2009.

WAGEMAKER, T. A. L.; CARVALHO, C. R. L.; MAIA, N. B.; BAGGIO, S. R.; GUERREIRO-FILHO, O. Sun protection factor, content and composition of lipid fraction of green coffee beans. **Industrial Crops and Products**. v33. i2. p469-473. Março. 2011.