

INGRID CRISTINA ARAUJO CATARINO

Influência da alta concentração atmosférica de dióxido de carbono ($\uparrow[\text{CO}_2]$) e do déficit hídrico no acúmulo de metabólitos secundários em folhas de *Coffea arabica* L.

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

São Paulo
2020

INGRID CRISTINA ARAUJO CATARINO

Influência da alta concentração atmosférica de dióxido de carbono ($\uparrow[\text{CO}_2]$) e do déficit hídrico no acúmulo de metabólitos secundários em folhas de *Coffea arabica* L.

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria de Infraestrutura e Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADOR(A): EMERSON ALVES DA SILVA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Catarino, Ingrid Cristina Araújo

C357i Influência da alta concentração atmosférica de dióxido de carbono ($\uparrow[\text{CO}_2]$) e do déficit hídrico no acúmulo de metabólitos secundários em folhas de *Coffea arabica* L. / Ingrid Cristina Araújo Catarino -- São Paulo, 2020.
47p.; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2020.

Bibliografia.

1. Mudanças climáticas. 2. Cafeína. 3. Ácido 5-cafeoilquínico . I. Título

CDU: 547.455.65

“...você é o único representante Do

seu sonho NA FACE DA TERRA

Se isso não fizer você correr, chapa

Eu não sei o que vai.”Emicida

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Botânica e ao meu orientador Dr. Emerson Alves da Silva pela oportunidade, confiança, paciência, transmissão de conhecimento e por toda ajuda.

Ao órgão de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

À Dra. Luce Maria Brandão Torres pela colaboração no desenvolvimento do projeto de pesquisa e ao Dr. Marcelo Pena pelo compartilhamento de experiências acadêmicas, pela atenção e colaboração para o desenvolvimento das análises cromatográficas.

Ao aluno de Iniciação científica Gustavo Bellini Monteiro por toda ajuda e colaboração neste trabalho.

À Dra. Claudia Furlan, à Dra. Catarina Nievola e ao Dr. Evandro Vieira pelas críticas e contribuições na banca de qualificação do mestrado.

Ao Sr. Paulo Gilberto Venturini – Viveiro Venturini, pela gentil doação das mudas de Coffea arabica.

Ao técnico de laboratório Pedro Bige Wasinger por toda ajuda e colaboração no uso e manutenção de equipamentos, além dos preparos de soluções.

A todos pesquisadores e funcionários do Instituto de Botânica especialmente ao Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica.

Aos meus amigos por todo tipo de ajuda, parceria, paciência, transmissão de conhecimento e por todo amor e carinho. Não somente agradeço, como também deixo aqui registrado todo meu amor por vocês.

Às minhas irmãs de alma, Nataly e Ingrid, Janaina e Arianne. Irmãs que o Botânico me deu e levarei pra vida. Amo vocês.

Aos meus queridos amigos de laboratório, Athos Poli, Emanuela Joaquim, Karina Delmondes, Cynthia Murakami, Simone Franco, Alessandra Harumi, Cleide Nascimento, Lucas Cardinelli, Maria Fernanda, Evandro Vieira e todos os outros que me ajudaram e estiveram comigo nessa caminhada.

Agradeço em especial a Alessandra, Karina, Athos, Fernanda e Maria Fernanda por toda ajuda e apoio que me deram, por toda a força nos momentos difíceis e de desespero, por todos

os sorrisos nos momentos de alegria, enfim, por tudo. Gratidão.

Agradeço a Ana Karla Lobo por toda ajuda e ensinamentos.

Também deixo aqui registrado o meu agradecimento á minha amiga Cleide, minha parceira das pesquisas em café. Agradeço por toda ajuda e companheirismo, transmissão de conhecimento e amizade. Quando eu crescer quero ser igual a você!

Aos meus queridos pais, Valdenita e Elias, meu irmão Vinicius e a todos os meus familiares por todo apoio para minha formação.

Agradeço em especial aos meus avós Dona Maria (Alice), dona Joana e seu Tadeu, dona Maria e seu Catarino (em memória) por todo amor.

À minha querida terapeuta Aisha Mariá por toda ajuda.

GRATIDÃO!

RESUMO

O aumento da concentração de dióxido de carbono atmosférico ($\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$) não constitui um efeito isolado, mas vem acompanhado por outras alterações no clima, dentre elas, os aumentos na temperatura do ar, que por seu turno contribuem para as alterações nos padrões de precipitação, podendo ocasionar secas mais frequentes e intensas. Nas regiões produtoras de café, a seca é considerada o principal estresse abiótico capaz de afetar o desenvolvimento e produção do cafeeiro, pois modifica o seu metabolismo e, consequentemente, sua produção. O cafeeiro possui uma composição fitoquímica ampla, destacando o ácido 5-cafeoilquínico e a cafeína que, além de atuarem na defesa das plantas, são compostos secundários importantes na qualidade final da bebida. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito conjunto da $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ e déficit hídrico nas trocas gasosas e acúmulo de metabólitos secundários em cafeeiros (*Coffea arabica* L.), em estágio inicial de crescimento. Cento e vinte cafeeiros foram cultivados em Câmaras de Topo Aberto (OTCs), sob as concentrações de CO_2 de 400 ppm - $\text{CO}_{2\text{amb}}$ e 800 ppm - $\uparrow\text{CO}_2$, e submetidos aos regimes hídricos de regas diárias (RD) e suspensão total de rega (DH) no período de 40 dias, constituindo os seguintes tratamentos: $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}$, $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$, $\uparrow[\text{CO}_2]\text{RD}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$. Foram realizadas medidas do potencial da água nas folhas (Ψ_{wf}) da taxa de assimilação líquida do carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiração (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e análises bioquímicas foliares para quantificação de compostos fenólicos (CF) e aminoácidos livres totais (AA), bem como, ácido 5-cafeoilquínico (5-CQA) e cafeína por cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados demonstraram que o déficit hídrico imposto pela suspensão de rega foi suficiente para reduzir a umidade do solo em ca. de 85% em relação aos tratamentos regados diariamente. O Ψ_{wf} por seu turno apresentou reduções de ca. de 42% e 56% nos tratamentos $\text{CO}_{2\text{amb}}\text{DH}$ e $\uparrow\text{CO}_2\text{DH}$ respectivamente. A performance das trocas gasosas, em especial os maiores valores de A foram observados nos cafeeiros cultivados sob alto CO_2 , mesmo sob restrição hídrica, sugerindo que a $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ pode tamponar os efeitos negativos do DH. O aumento das concentrações de AA nos tratamentos sob DH indicam esses compostos atuaram como osmorreguladores ao estresse imposto. As variações nos níveis de CF, 5-CQA e cafeína, apontam para um aumento dessas substâncias nas plantas sob DH, porém sem diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do experimento, sugerindo que no estágio inicial de crescimento das plantas de café, o $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ não afeta o acúmulo dessas substâncias nas folhas, no cenário de mudanças climáticas testado.

Palavras-chave: Mudanças Climáticas; ácido 5-cafeoilquínico; Cafeína; fotossíntese

ABSTRACT

The increase in the atmospheric carbon dioxide concentration ($\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$) is not an isolated effect, but has been accompanied by other changes in the climate, among them, increases in air temperature, which in turn contribute to the changes in precipitation patterns, causing more frequent and intense drought events. In coffee producing regions, drought is considered the main abiotic stress on coffee development and production, modifying its metabolism and final production. The coffee tree has a broad phytochemical composition, highlighting 5-caffeoylquinic acid and caffeine which, in addition to acting in the defence of plants, are important secondary compounds in the final cup quality. This work aimed to evaluate the effect of $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ and water deficit in gas exchange and accumulation of secondary metabolites in coffee trees (*Coffea arabica* L.), in an early stage of growth. One hundred and twenty coffee plants were grown in Open Top Chambers (OTCs) facilities, under the concentrations of CO_2 of 400 ppm - $\text{CO}_{2\text{amb}}$ and 800 ppm - $\uparrow\text{CO}_2$ and submitted to water regimes of daily watered (RD) and total water withholding (DH) for 40 days, constituting the following treatments: $\text{CO}_{2\text{ambRD}}$, $\text{CO}_{2\text{ambDH}}$, $\uparrow\text{CO}_{2\text{RD}}$ and $\uparrow\text{CO}_{2\text{DH}}$. Measurements of leaf water potential (Ψ_{wf}), net carbon assimilation rates (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), stomatal conductance (g_s , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), transpiration (E , $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) and biochemical analyses of leaf phenolic compounds (CF) and total free amino acids (AA), as well as 5-caffeoylquinic acid (5-CQA) and caffeine by high-performance liquid chromatography, were carried out. The results showed that the water deficit imposed by the water withholding was sufficient to reduce the soil moisture in ca. 85% compared to treatments daily watered. The Ψ_{wf} , in turn, showed reductions of ca. 42% and 56% in the $\text{CO}_{2\text{ambDH}}$ and $\uparrow\text{CO}_{2\text{DH}}$ treatments respectively. The performance of gas exchanges, especially the higher values of A were observed in coffee plants grown under high CO_2 , even under water restriction, suggesting that $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ could buffer the negative effects of DH. The increase in AA concentration in DH treatments indicates an osmoregulatory response to the imposed stress. The variations in the levels of CF, 5-CQA and caffeine, point to an increase in these substances in plants under DH, but without significant differences between treatments throughout the experiment, suggesting that in the initial growth stage of coffee plants, $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ does not affect the leaf accumulation of these substances, in the tested climate change scenario.

Keywords: Climate change; 5-caffeoylquinic acid; Caffeine; Photosynthesis

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Ilustração botânica apresentando a morfologia do cafeeiro arábica folha, flor, fruto e semente (A). Disponível em: <<https://br.pinterest.com/pin/211387776244059396/?lp=true>> Acesso: 11 de março 2020. Mudanças de *Coffea arabica* var. Catuaí Vermelho IAC-144 cultivadas em OTC sob $[CO_2]_{amb}$ RD (B).....14
- Figura 2: Via principal da cafeína envolvendo três etapas de metilação (I, III e IV) e uma reação de nucleosídeo. N-1, N-3, N-7 indica a posição do átomo de nitrogênio no anel de purina que é metilado. Caminhos menores são mostrados por setas com linhas pontilhadas. Essas rotas secundárias são provavelmente devidas à ampla especificidade de substrato das N-metiltransferases.....16
- Figura 3: Vias de biossíntese do ácido 5-O-cafeoilquínico. Enzimas: fenilalanina amônia liase (PAL), cinnamato 4-hidroxilase (C4H), 4- cinaminoil CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil CoA: quinato hidroxicinamoil transferase (HQT), p-coumaroil-30-hidroxilase (C3H) e cafeoil-CoA-3-O-metiltransferase (CCoAMT).....17
- Figura 4: Temperatura ($^{\circ}C$); Umidade relativa do ar (U_R) e Radiação fotossinteticamente ativa (RFA), monitoradas no interior das OTCs.....19
- Figura 5: Vista geral das quatro OTCs na Casa de Vegetação - Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica (A); Sensores de monitoramento da radiação solar, temperatura e umidade relativa no interior de uma câmara e cafeeiros submetidos a diferentes tratamentos (B).....20
- Figura 6: Umidade do solo (A) e potencial de água nas folhas (B) de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[CO_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[CO_2]_{amb}$ RD e $[CO_2]_{amb}$ DH, respectivamente) e alto $[CO_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[CO_2]$ RD e $\uparrow[CO_2]$ DH, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. Os pontos representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).....23
- Figura 7: Assimilação líquida de CO_2 (A) e pressão parcial interna de CO_2 em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[CO_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[CO_2]_{amb}$ RD e $[CO_2]_{amb}$ DH, respectivamente) e alto $[CO_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[CO_2]$ RD e $\uparrow[CO_2]$ DH, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).....25
- Figura 8: Transpiração foliar (E , $\mu mol H_2O m^{-2} s^{-1}$) e condutância estomática (g_s , $mol m^{-2} s^{-1}$) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[CO_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[CO_2]_{amb}$ RD e $[CO_2]_{amb}$ DH, respectivamente) e alto $[CO_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[CO_2]$ RD e $\uparrow[CO_2]$ DH, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).....26

Figura 9: Eficiência intrínseca do uso da água (A/g , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{ambRD}}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{ambDH}}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{RD}}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{DH}}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).....27

Figura 10: Fluorescência inicial (F_0), fluorescência máxima (F_m) e Eficiência quântica máxima do FSII (F_v/F_m) da clorofila “a” em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{ambRD}}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{ambDH}}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{RD}}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{DH}}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).....29

Figura 11 Fenóis totais (mg/g MS) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{ambRD}}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{ambDH}}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{RD}}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{DH}}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).....31

Figura 12: Aminoácidos totais ($\mu\text{mol/g MS}$) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{ambRD}}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{ambDH}}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{RD}}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{DH}}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).....32

Figura 13: Teores de Ácido 5-O- Cafeoilquinico (5-CQA) (mg/g MS) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{ambRD}}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{ambDH}}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{RD}}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{DH}}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).....33

Figura 14: Concentração de cafeína (mg/g MS) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{ambRD}}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{ambDH}}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{RD}}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{DH}}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças

significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).....35

Figura 15: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquínico tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$ RD-1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.33 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquínico.....41

Figura 16: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquínico, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$ DH-1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.84 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquínico.....41

Figura 17: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquínico, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]$ RD-1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.81 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquínico.....41

Figura 18: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquínico, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]$ DH-1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.33 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquínico.....42

Figura 19: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquínico, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$ RD-5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.31 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquínico.....42

Figura 20: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquínico, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$ DH-5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.33 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquínico.....42

Figura 21: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquínico, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]$ RD-5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.76 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquínico.....43

Figura 22: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquínico, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]$ DH-5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.33 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquínico.....43

Figura 23: Análise por CLAE da cafeína, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$ RD-1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 4.49 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.....43

Figura 24: Análise por CLAE da cafeína, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$ DH-1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 5.23 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.....43

min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.....44

Figura 25: Análise por CLAE da cafeína, tratamento [$\uparrow\text{CO}_2$]RD - 1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 5.22 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.....44

Figura 26: Análise por CLAE da cafeína, tratamento [$\uparrow\text{CO}_2$]DH - 1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 4.48 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.....45

Figura 27: Análise por CLAE da cafeína, tratamento [CO_2]_{amb}RD - 5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 4.48 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.....45

Figura 28: Análise por CLAE da cafeína, tratamento [CO_2]_{amb}DH - 5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 5.23 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.....46

Figura 29: Análise por CLAE da cafeína, tratamento [$\uparrow\text{CO}_2$]RD - 5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 5.24 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.....46

Figura 30: Análise por CLAE da cafeína, tratamento [$\uparrow\text{CO}_2$]DH - 5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 4.50 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.....46

SUMÁRIO

1. Introdução	14
2. Objetivo	19
3. Material e Métodos.....	19
3.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo	19
3.2. Análises ecofisiológicas.....	21
3.3. Análise bioquímicas	22
3.4. Análises estatísticas	23
4. Resultados e Discussão	23
4.1. Análises ecofisiológicas.....	23
4.2. Análise bioquímicas	31
5. Considerações Finais	36
6. Referências bibliográficas	38
ANEXO I	42

1. Introdução

A concentração de dióxido de carbono no ar atmosférico é um dos fatores ambientais de grande influência no desenvolvimento dos vegetais. As emissões de CO₂ têm aumentado gradativamente nos últimos 150 anos. Atualmente as medições informam concentrações em torno de 415 ppm, caso esse ritmo de emissões se mantenha, estas poderão atingir entre 730 à 1020 ppm até o final do século XXI. A alta concentração de CO₂ promove além do efeito estufa adicional, alterações no padrão de precipitação que também influenciam no crescimento e desenvolvimento das plantas (Solomon *et al.* 2007, NOAA 2020). Estudos apontam que a alta concentração de CO₂ pode diminuir efeitos estressantes, como o déficit hídrico em plantas de café, bem como a densidade estomática nas folhas, porém com as taxas fotossintéticas aprimoradas (Avila *et al.*, 2020; Sanches *et al.*, 2017).

Muitas das alterações nos padrões de precipitação decorrentes da alta concentração de CO₂ estão relacionadas ao déficit hídrico, onde a reposta inicial das plantas a este fator consiste em decréscimo da área foliar, fechamento dos estômatos, aceleração da senescência e abscisão das folhas. Estas respostas são formas da planta tentar economizar a água disponível no solo para períodos posteriores (McCree & Fernández 1998, Santos & Carlesso 1998, Taiz & Zeiger 1991). O déficit hídrico afeta o crescimento e o desenvolvimento de muitas culturas agrícolas em todo o mundo. A prática da irrigação de culturas reflete o fato de que a água é um recurso chave que limita a produtividade agrícola (Taiz & Zeiger 2017).

Um dos maiores cultivos agrícolas conhecidos em todo o mundo é o café. O cafeeiro é uma *Rubiaceae*, cabendo a esta o gênero *Coffea* sp., com mais de 100 espécies descritas, sendo quatro destas com importância econômica global (Bicho *et al.* 2011). O gênero *Coffea* sp. tem sua origem descrita nas florestas de sub bosque onde atualmente se localiza a Etiópia, onde a temperatura varia entre 15° e 20°C, com chuvas anuais bem distribuídas.

O Brasil é o maior produtor e exportador de café em grãos e o segundo mercado consumidor, com produção em alta escala nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia e Paraná (CONAB 2020, Silva & Mazzafera 2008, Bicho *et al.* 2011). Em relação à morfologia, o cafeeiro apresenta sistema radicular geralmente com uma raiz curta e grossa. O caule é cilíndrico com parte aérea arbustiva lenhosa, podendo atingir de 3 a 10 metros de altura. Suas folhas têm pecíolo curto e apresentam forma oval, oval-lanceolada, oval-oblonga ou elíptica, com ápices culminados, de cor verde escura brilhante. As flores são pedunculadas, pentâmeras, com pétalas brancas e apresentam ovário biovalado, originando duas sementes após a fecundação. O fruto é em formato de “pseudo” drupa oval, com coloração verde durante a maturação, alterando-se para vermelho ou amarelo conforme o cultivo (figura 1) (Bicho *et al.*

2011).



Figura 1: Ilustração botânica apresentando a morfologia do cafeeiro arábica folha, flor, fruto e semente (A). Disponível em: <<https://br.pinterest.com/pin/211387776244059396/?lp=true>> Acesso: 11 de março 2020. Mudas de *Coffea arabica* var. Catuaí Vermelho IAC-144 cultivadas em OTC sob $[CO_2]_{amb}$ RD (B).

O cafeeiro apresenta uma composição fitoquímica ampla, destacando a cafeína, ácido cafeico e ácidos clorogênicos. Todas essas substâncias são metabólitos secundários, compostos que não participam dos processos de formação do protoplasto e geração de energia, exibindo ampla diversidade estrutural e sem ocorrência universal (Dey & Harbone 1997). Essas substâncias são produzidas e sintetizadas a partir de quatro vias metabólicas: via do ácido chiquímico, via do ácido malônico, via do ácido mevalônico e via do Metileritritol-fosfato. Esses compostos apresentam funções de defesa contra herbivoria e organismos patogênicos, da mesma maneira que podem atuar na sustentação estrutural ou como pigmentos. Podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos: os terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (Taiz & Zeiger 2017).

Fatores ambientais externos podem alterar a composição química dos vegetais, influenciando a abundância dos precursores na biossíntese de metabólitos secundários; as vias de transdução de sinais; e, eventualmente os genes que controlam a expressão desses metabólitos (Lindroth 2010). Experimentos realizados com *Plantago lanceolata* submetidas a $\uparrow[CO_2]$ apresentaram aumentos positivos de compostos secundários comparando com as plantas cultivadas em condição ambiente (350 ppm). Condições ambientais como estas,

geralmente, apresentam aumentos consideráveis na produção de vários tipos de metabólitos secundários, visto que plantas sob estresse investem mais em mecanismos de sobrevivência e defesa (Neto & Lopes 2007).

Mudanças na precipitação, principalmente quando o nível é baixo, torna-se outro fator que influencia aspectos fisiológicos dos vegetais. Segundo o Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas - IPCC (2013), o déficit hídrico elevado influenciará significativamente o equilíbrio dos processos ecossistêmicos, tanto em nível regional quanto global. Nas regiões produtoras de café, a seca é considerada a principal causa abiótica capaz de afetar o desenvolvimento e a produção do cafeeiro, pois prejudica a fisiologia e modifica o metabolismo vegetal, como a fotossíntese, comportamento estomático e crescimento, levando consequentemente a alterações dos compostos secundários (Revista Campo e Negócios Grãos, 2017) Estudos com plantas de *Hypericum perforatum* submetidas a estresse hídrico obtiveram resultados positivos em relação à concentração de compostos secundários.

Uma das classes importantes de metabólitos secundários, são os compostos fenólicos, substâncias oriundas da via do ácido chiquímico e do ácido malônico e que possuem função de defesa antioxidante nas plantas. O termo substâncias fenólicas engloba um número grande e bem diversificado e enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis (Souza et al. 2007, Vermerris & Nicholson 2006). Há diversos trabalhos sobre a quantificação de compostos fenólicos em situação de elevadas concentrações de CO₂, porém os trabalhos que englobam espécies tropicais são escassos (Rezende 2013). No trabalho de Batista (2015) com *Coffea arabica* L. as plantas submetidas a ↑[CO₂]atm apresentaram aumento nos teores de compostos fenólicos. McElrone et al. (2010) estudaram os efeitos de ↑[CO₂]atm em espécies arbóreas e verificaram poucas alterações significativas nos teores foliares de fenóis após vários anos de avaliações.

Quanto ao déficit hídrico, Moura et al. (2010) observaram uma redução nos teores de compostos fenólicos em seu trabalho. Os compostos fenólicos podem ser originados dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina. Estes e outros aminoácidos são compostos orgânicos formados por um grupo amino (—NH₂) associado a um grupo carboxila (COOH). Sua principal função é atuar como subunidades de estruturação de moléculas proteicas (Tavares & Vannucchi 2016). Segundo Castro (2009) os aminoácidos podem também ser englobados no grupo de antiestressantes, compostos capazes de agir em processos morfofisiológicos do vegetal como precursores de hormônios endógenos ou como ativadores de enzimas e da disponibilização de compostos capazes de promover tolerância a estresses. Quando o estresse é por falta de água o ajuste osmótico também pode ser realizado por meio do acúmulo de

aminoácidos, que funcionam como osmoprotetores. Tornando-se uma alternativa para assegurar a turgescência e o conteúdo de água nas células (Paixão et al. 2014).

Cafeína e ácido 5-O-cafeoilquínico (5-CQA)

A cafeína é o alcaloide purínico mais abundante nos cafeeiros. Conhecida quimicamente por 1,3,7 – trimetilxantina, é sintetizado a partir da via das xantinas (xantosina => 7-metilxantosina => 7-metilxantinas=> teobromina=> cafeína – Figura 2), sendo a primeira, terceira e quarta etapas, catalisadas por N-metiltransferases (Ashihara, 2006; Perrois et al., 2015). Esse composto é encontrado em todas as partes do cafeeiro, com mais abundância nas flores e folhas, dos quais, as folhas jovens têm a maior capacidade da biossíntese de cafeína, apresentando altos teores deste composto. Sua biossíntese começa nos estágios iniciais do desenvolvimento da folha, acumulando-se nas folhas maduras e, posteriormente, sendo translocado para a semente. Estudos na área da saúde apontam a cafeína como um composto excitante psicomotor, que tem propriedade de estimular a atividade mental. Diferentes estudos foram realizados, investigando os fatores que aumentam o conteúdo de cafeína nos tecidos vegetais, e por conta disso, diferentes tipos de estresse têm sido utilizados. A nível de planta, a cafeína atua na defesa contra fatores externos, apresentando alto poder antioxidante. A nível econômico, possui grande importância na qualidade do café como bebida, assim como o ácido clorogênico (Ashihara, 2006; Chaves et al., 2004; Ashihara et al., 1996; Raju & Gopal, 1979).

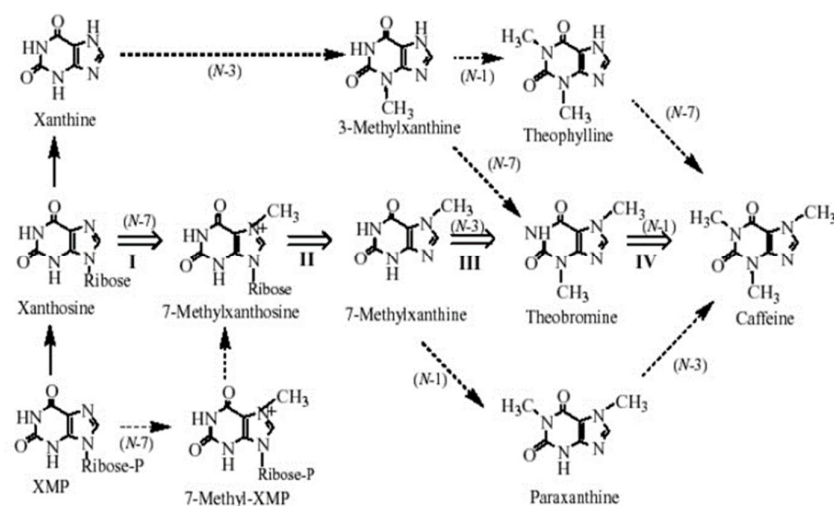


Figura 2: Via principal da cafeína envolvendo três etapas de metilação (I, III e IV) e uma reação de nucleosidase. N-1, N3, N-7 indica a posição do átomo de nitrogênio no anel de purina que é metilado. Caminhos menores são mostrados por setas com linhas pontilhadas. Essas rotas secundárias são provavelmente devidas à ampla especificidade de substrato das N-metiltransferases (Ashihara, 2006).

Um dos ácidos clorogênicos (CGAs) encontrados em grande quantidade no cafeeiro é o 5-O-cafeoilquinico (5- CQA). Segundo Campa et al. (2008), o 5-CQA é um composto obtido pela esterificação entre o ácido quínico (esterificação formada no carbono 5) e o ácido cafeico (Figura 3). São compostos envolvidos, principalmente, na resistência e defesa das plantas, por possuírem propriedades antioxidante, agindo particularmente, contra espécies reativas de oxigênio, mitigando os efeitos de estresses oxidativos, além de possuir propriedades antibióticas. O ácido clorogênico parece estar envolvido na resposta a diferentes estresses abióticos, como observado no trabalho de Grace et al. (1998) em plantas de *Betula pendula*. Além de sua importância na proteção dos vegetais, o ácido 5-O-cafeoilquinico, em especial, é outro composto responsável pela qualidade da bebida do café, além de, possivelmente, estar envolvido na mudança de coloração e maturação dos frutos (Salva & Lima, 2007).

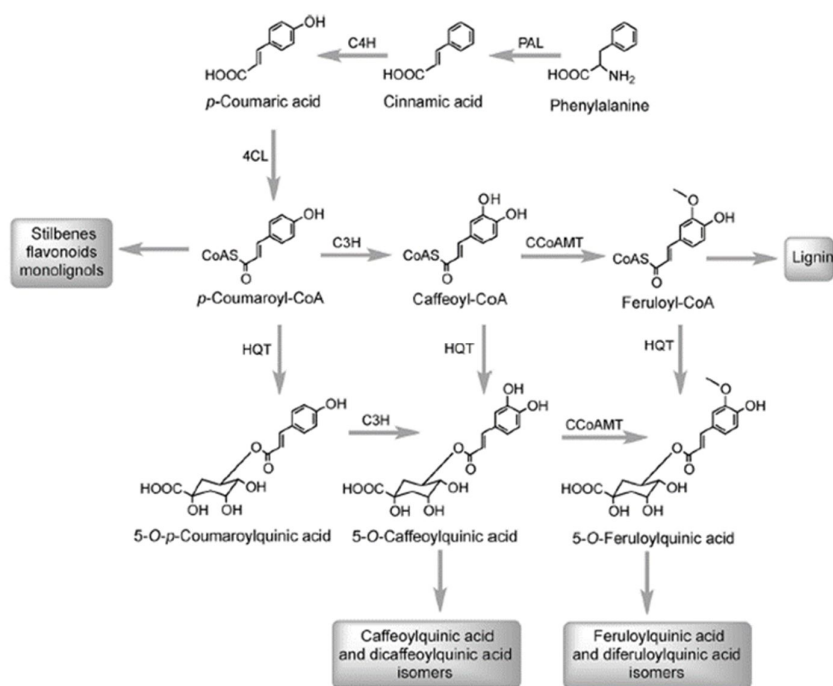


Figura 3: Vias de biossíntese do ácido 5-O-cafeoilquinico. Enzimas: fenilalanina amônia liase (PAL), cinnamato 40-hidroxilase (C4H), 4- cinaminoil CoA ligase (4CL), hidroxicinamoil CoA: quinato hidroxicinamoil transferase (HQT), p-coumaroil-30-hidroxilase (C3H) e cafeoil-CoA-3-O-metiltransferase (CCoAMT) (Clifford et al. 2017).

A despeito da importância da cafeína e de seu precursor o 5-CQA tanto nos mecanismos de defesa das plantas, quanto sua influência na qualidade final da bebida do café, não há até o momento estudos que demonstrem a influência de estresses relacionados às mudanças climáticas globais, em especial no Brasil, do efeito conjunto da $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ e déficit hídrico no acúmulo desses compostos nas folhas do cafeeiro.

2. Objetivo

Avaliar o efeito conjunto da $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ e do déficit hídrico, no status hídrico, trocas gasosas e no acúmulo de metabólitos secundários em folhas de *Coffea arabica* L em estágio inicial de crescimento.

3. Material e Métodos

3.1. Material Vegetal e Condições de Cultivo

Mudas de *Coffea arabica* var. Catuaí Vermelho IAC-144 entre 3 a 4 meses de idade foram transplantadas para vasos de 7 litros contendo como substrato Plantmax Café® (DDL Agroindústria Ltda). Estas foram separadas em quatro lotes de 30 plantas cada e distribuídas em quatro câmaras de topo aberto (OTC) instaladas no interior de uma casa de vegetação do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica (Figura 5). Dois lotes foram mantidos em duas OTCs na atmosfera ambiente de 400 ppm de CO_2 ($[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$), enquanto dois outros lotes foram mantidos em outras duas câmaras à 800 ppm de CO_2 ($\uparrow[\text{CO}_2]$), através de injeção de gás a partir de um cilindro de CO_2 comprimido acoplado ao sistema. As plantas permaneceram nessas condições por 30 dias, período no qual foram supridas com solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950) uma vez por semana e regadas com água diariamente. Passados os 30 dias de aclimação nas condições de OTC, um grupo com 30 plantas cultivadas em $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$ e outro grupo cultivado em $\uparrow[\text{CO}_2]$ foram submetidos a suspensão de rega (DH) durante 40 dias, enquanto as demais plantas foram mantidas em regime de rega diária (RD), caracterizando os seguintes tratamentos: $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}$, $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$, $\uparrow[\text{CO}_2]\text{RD}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$. As coletas foram realizadas a cada 10 dias, totalizando cinco coletas durante todo o período. A densidade do fluxo de fótons fotossinteticamente ativos (DFFFA, $\mu\text{mol s}^{-1}$), a temperatura do ar ($^{\circ}\text{C}$), a umidade relativa do ar (%) e as concentrações atmosféricas de CO_2 no interior das OTCs ao longo do período experimental foram em média: $301 \pm 36 \mu\text{mol fótons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, $27 \pm 3 ^{\circ}\text{C}$, $62 \pm 9\%$, $380 \pm 41 \text{ ppm}$ no grupo CO_2amb e 700 ± 28 no grupo $\uparrow[\text{CO}_2]$, respectivamente (Figura 4).

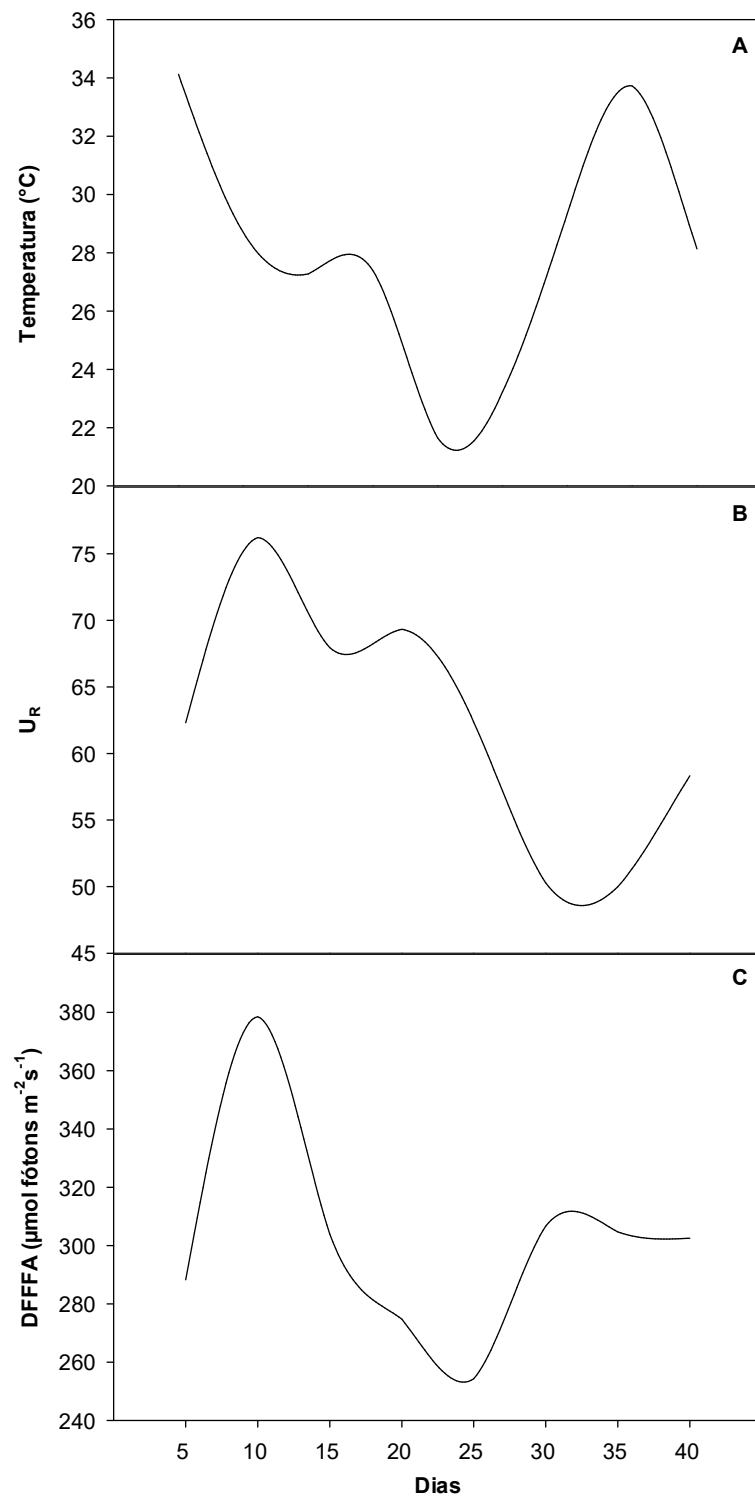


Figura 4: Temperatura (A); Umidade relativa do ar (B) e Densidade de fluxo de f\acute{o}tons fotossinteticamente ativos (C) monitoradas no interior das OTCs.



Figura 5: Vista geral das quatro OTCs na Casa de Vegetação - Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica (A); Sensores de monitoramento da radiação solar, temperatura e umidade relativa no interior de uma câmara e cafeeiros submetidos a diferentes tratamentos (B).

3.2. *Análises ecofisiológicas*

3.2.1. *Umidade do Solo (U_{solo}) e Potencial da Água nas folhas (Ψ_{wfolha})*

A U_{solo} foi medida pelo método de Reflectometria no Domínio do Tempo (TDR), utilizando-se um sensor modelo ML2-x Delta-T Devices (Theta-Probe, Cambridge, UK). O Ψ_{wfolha} foi medido em folhas completamente expandidas do terceiro par a partir do ápice de ramos plagiotrópicos, no período da manhã utilizando-se uma bomba de pressão do tipo Scholander (modelo 1000, PMS InstrumentCo).

3.2.2. *Trocas Gasosas e Fluorescência da Clorofila “a”*

A taxa de assimilação líquida do carbono (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa de transpiração foliar (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a concentração interna de CO_2 (ppm de CO_2) foram determinadas em folhas completamente expandidas do terceiro par (a partir do ápice) de ramos plagiotrópicos. As análises ocorreram no período da manhã (entre 07:00 e 11:30 h), utilizando-se um analisador de gases a infravermelho portátil (IRGA modelo LC-SD Pro, ADC Bioscientific), sob concentrações de CO_2 de 400 ppm e 800 ppm e intensidade luminosa de $600 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Sanches et al. 2017). A emissão da fluorescência da clorofila “a” foi realizada em folhas previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos. As medidas foram realizadas utilizando fluorômetro portátil (OS5p Opti-Sciences, Hudson, NH, USA). As folhas foram inicialmente expostas a um fraco pulso de luz vermelho-distante ($1-2 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), para determinação da fluorescência mínima emitida (F_o), quando todos os centros de reação do fotossistema II (FSII) estão na forma oxidada. Em seguida, um pulso de luz saturante, com irradiância de $3000 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e duração de 1 segundo foi aplicado

para promover, temporariamente, a máxima redução do aceptor primário de elétrons do FSII (Qa), determinando-se assim, a fluorescência máxima (Fm) emitidas pelas amostras adaptadas ao escuro. A partir dessas medidas, a máxima eficiência fotoquímica do FSII [$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m$] foi calculada (Schreiber et al. 1994).

3.3. *Análise bioquímicas*

As folhas foram coletadas nos cinco tempos diferentes ao longo do experimento, foram congeladas em nitrogênio líquido, liofilizadas (Modulyo freezer Dyer 5L, Thermo Electron) e trituradas em moinho de bolas. Aliquotas de 1g foram submetidas à extração em etanol 80% por 48 h sob agitação constante, obtendo-se extratos de 20 mL.

3.3.1. *Quantificação colorimétrica de Fenóis Totais e Aminoácidos Livres Totais*

Os aminoácidos livres foram quantificados nas frações etanólicas conforme Cocking & Yemm (1954), utilizando-se L-leucina (Fluka®) como padrão. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, regulado para um comprimento de onda de 570 nm. Os compostos fenólicos também foram quantificados nas frações etanólicas, de acordo com o método Folin-Ciocalteau (Marinova et al. (2005), modificado de Singleton & Rossi (1965), utilizando-se ácido gálico (Sigma) como padrão. Os teores de fenóis foram determinados em leitor de microplacas de ELISA (KC4, Biotek Instruments) a 750 nm.

3.3.2. *Quantificação dos níveis foliares de Ácido 5 -Cafeoilquínico (5-CQA) e Cafeína por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – (CLAE-UV-DAD)*

Parte do extrato etanólico foi separado para as análises dos perfis de 5-CQA e Cafeína nas folhas dos cafeeiros nos diferentes tratamentos utilizando-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). As amostras foram aliquotadas em 1 mL e secas em speed-vac. O material seco foi ressuspensionado em 1 mL de Metanol e posteriormente filtrado em “vials” para as análises no CLAE. As análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de fotodiodos de varredura do espectro no ultravioleta (CLAE-UV-DAD) foram realizadas em um Cromatógrafo Agilent 1260 equipado com célula de fluxo de 60 mm e detector por arranjo de fotodiodos de varredura de espectro no Ultravioleta. Para as análises foi empregado como fase estacionária uma coluna Zorbax Eclipse plus de fase reversa C18 (150 x 4,6 mm) e 3,5µm de diâmetro de partícula, empregando-se um fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e 1 µL de volume de injeção de amostras. Os comprimentos de onda utilizados foram 254, 280, 325 e 352 nm. O sistema de eluição em modo gradiente foi iniciado com uma mistura de 90% de H₂O

acidificada com 0,1% de ácido acético e 10% de acetonitrila (ACN) até 6 min, de 6 a 7 min, 10 a 15% de ACN, de 7 a 20 min 15% de ACN. Para a obtenção das curvas padrões foram injetados 3 µL de volume de cada concentração das amostras. As áreas dos picos de 5-CQA e Cafeína, foram obtidos nos tempos de retenção de ~3,84 e ~5,23 min, tendo como referência as curvas padrão obtidas.

3.4. Análises estatísticas

Os dados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo todo e qualquer contraste entre médias avaliado pelo teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade pelo software Sisvar, versão 5.6. Para cada tempo de coleta considerou-se seis repetições por tratamento (n=6).

4. Resultados e Discussão

4.1. Análises ecofisiológicas

4.4.1. Umidade do Solo (U_{solo}) e Potencial da Água nas folhas (Ψ_{wfolha})

A figura 6 apresenta as variações na umidade do solo (U_{solo} , %) e no potencial de água nas folhas (Ψ_{wfolha}). Observa-se que o déficit hídrico imposto pela suspensão de rega ao longo dos 40 dias de experimento foi suficiente para promover reduções significativas (até 85%) na U_{solo} , quando comparada com os tratamentos regados diariamente, independente da $[CO_2]_{atm}$. Observa-se ainda que os decréscimos no Ψ_{wfolha} não acompanharam linearmente as reduções na U_{solo} , demonstrando que fatores outros estão envolvidos na manutenção do status hídrico das plantas de café. Sabe-se que o decréscimo na disponibilidade de água no solo ocasiona queda no Ψ_{wfolha} , diminuindo a turgidez celular e a condutância estomática (Sanches *et al.*, 2017; Shalhevet 1993).

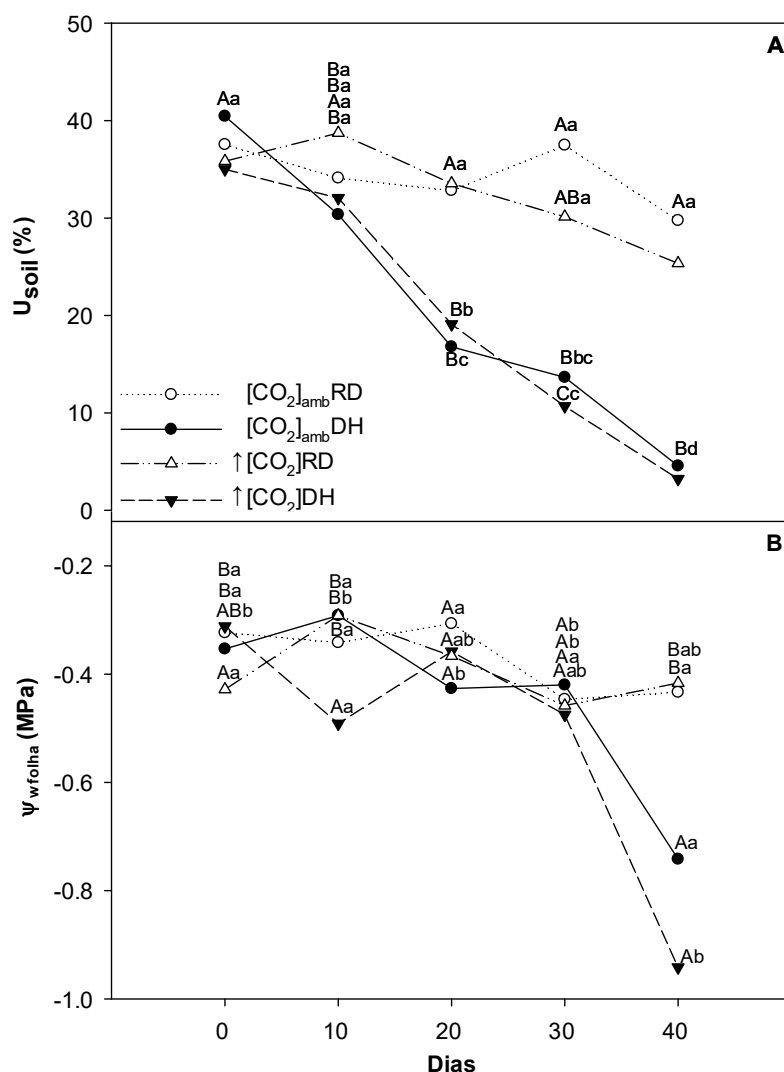


Figura 6: Umidade do solo (A) e potencial de água nas folhas (B) de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[CO_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[CO_2]_{amb}$ RD e $[CO_2]_{amb}$ DH, respectivamente) e alto $[CO_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[CO_2]$ RD e $\uparrow[CO_2]$ DH, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. Os pontos representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

4.1.2. Trocas Gasosas e Fluorescência da Clorofila “a”

A figura 7 apresenta as variações nas taxas de assimilação líquida do carbono (A , $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e da concentração interna de CO_2 na câmara substomática (C_i) ao longo do experimento. Observa-se que as A foram sempre maiores em plantas cultivadas sob $\uparrow[CO_2]_{atm}$, independentemente da disponibilidade hídrica em relação aos tratamentos com $[CO_2]_{amb}$. Assim como já demonstrado por Sanches et al (2017), DaMatta et al. (2016) e Batista (2015), nossos resultados também demonstram que a atual $[CO_2]_{atm}$ é limitante para a fotossíntese do cafeeiro.

As maiores A obtidas mesmo sobre condições de $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$, sugerem que a $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ tampona os potenciais efeitos negativos da seca, mesmo após 40 dias de suspensão da rega, onde, apesar dos declínios de A ao longo do experimento, as taxas foram maiores se comparadas às plantas cultivadas sob concentração atmosférica atual.

As variações na C_i (Figura 7) demonstram que $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ propiciou um acúmulo de CO_2 na câmara subestomática, permitindo o aumento e manutenção de altas A das plantas de café ao longo do experimento nos tratamentos de $\uparrow[\text{CO}_2]\text{RD}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$, corroborando com os dados de Sanches *et al.* (2017), onde, mesmo sob restrição hídrica, as concentrações de C_i tiveram aumentos significativos nos cafeeiros.

Os aspectos positivos da $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ refletem-se também nos valores de condutância estomática (g_s) e transpiração foliar (E). Em ambos os tratamentos $\uparrow[\text{CO}_2]\text{RD}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$, as taxas de g_s associadas aos altos valores de C_i favoreceram a manutenção de altas taxas fotossintéticas (Figura 7 e 8). Observa-se que até os primeiros 20 dias de experimento, onde as reduções na U_{solo} não se refletiram em reduções significativas no Ψ_{wfolha} , tanto a g_s como a E mantiveram valores altos, colaborando para o aumento da C_i e maiores A nos tratamentos sob $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$. Conforme mencionado, esse aumento observado na C_i até os 20 dias de experimento nos tratamentos $\uparrow[\text{CO}_2]\text{RD}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$ explicam em certa extensão a capacidade de manutenção das altas A , quando comparados aos tratamentos $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$. Interessante observar um estreito paralelismo nas respostas desses parâmetros foliares às variações na temperatura e umidade relativa do ar no interior das OTCs (Figura 4). Observa-se inclusive que os menores valores de E e g_s , coincidem com as maiores temperaturas (34°C) e menores UR (49%) do ar.

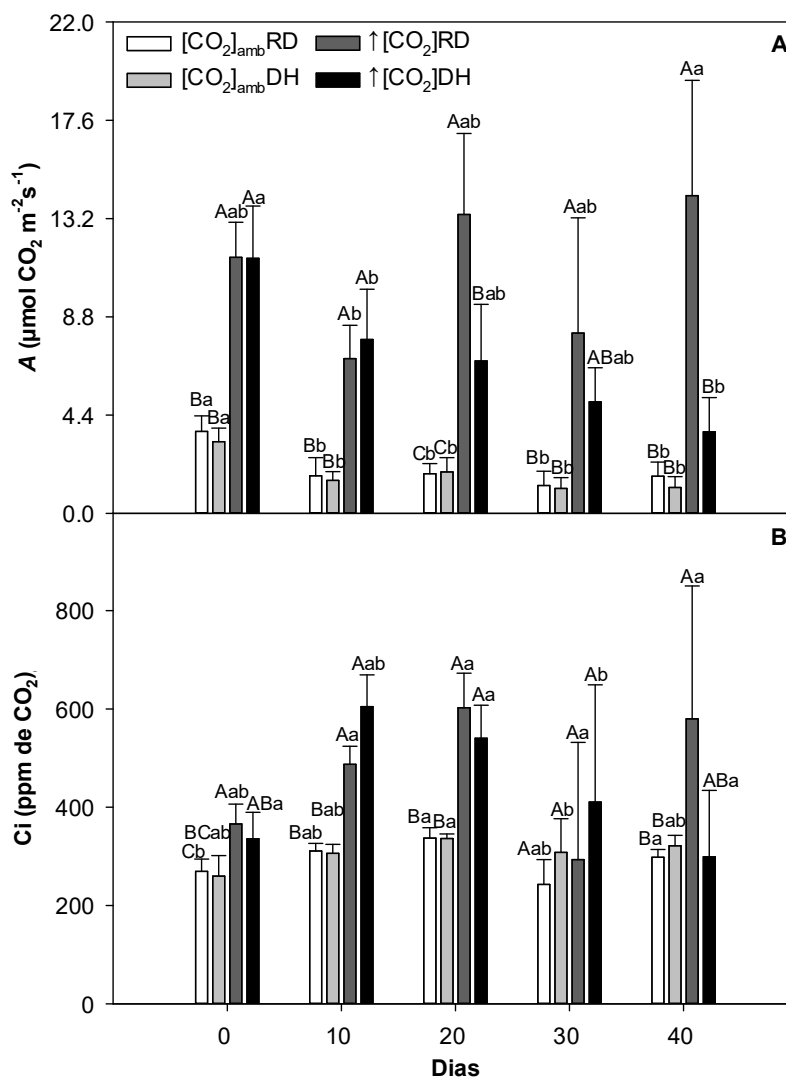


Figura 7: Assimilação líquida de CO_2 (A) e pressão parcial interna de CO_2 em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[CO_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[CO_2]_{amb}RD$ e $[CO_2]_{amb}DH$, respectivamente) e alto $[CO_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[CO_2]RD$ e $\uparrow[CO_2]DH$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

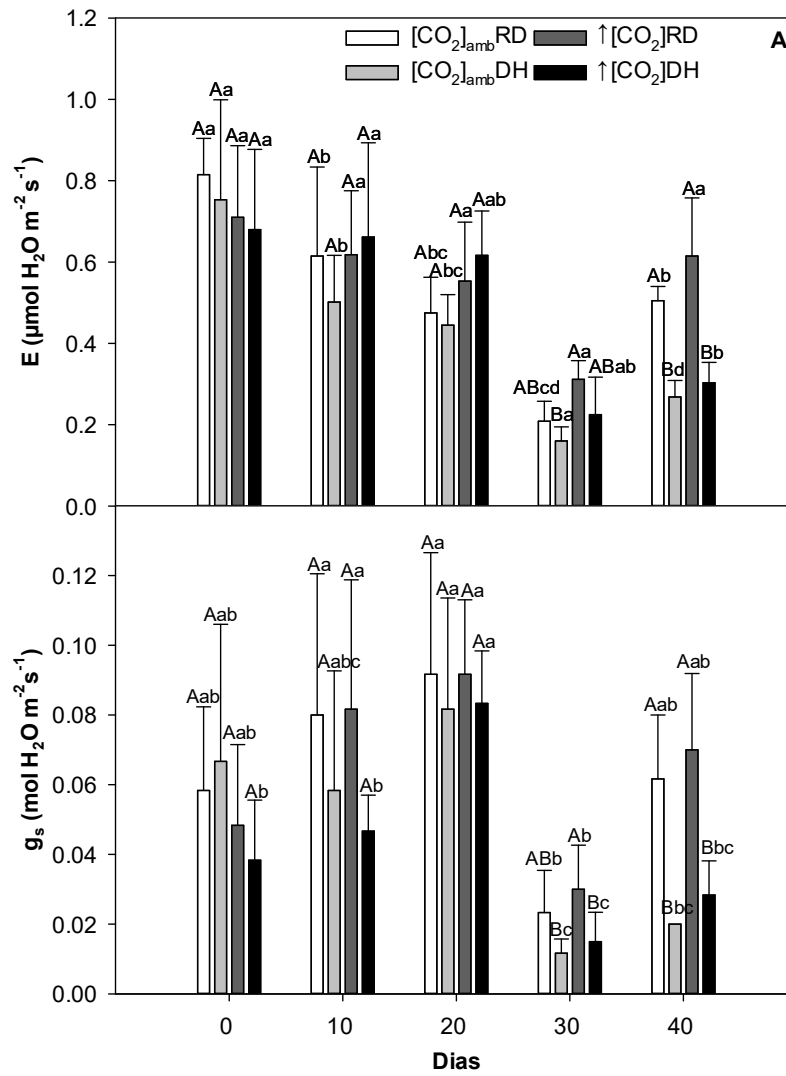


Figura 8: Transpiração foliar (E , $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e condutância estomática (g_s , $\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]\text{RD}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Não obstante, a eficiência intrínseca do uso da água (EiUA) foi maior durante todo o período experimental nas plantas submetidas a $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ independentemente da disponibilidade hídrica, demonstrando mais uma vez a influência positiva do CO_2 elevado nas trocas gasosas das plantas de café, diminuindo os efeitos negativos do déficit hídrico nas respostas estomáticas de curto prazo à falta de água no solo (Figura 9). Observa-se uma flutuação da EiUA, com valores mais altos na primeira e quarta coleta, que podem ser explicados pela diminuição da umidade relativa do ar, refletindo na diminuição de g_s , porém, não afetando a A , resultando em uma maior eficiência intrínseca do uso da água. Também pode-se observar que, sob condições de CO_2 ambiente, a EiUA foi primordialmente limitada pela baixa disponibilidade do substrato, uma vez que os valores de g_s permaneceram altos e até mesmo semelhantes quando comparados aos tratamentos de $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$. Para Ainsworth & Rogers (2007), a alta disponibilidade de CO_2 atmosférico acresce o gradiente de difusão desse gás, da atmosfera para os cloroplastos, e assim, estimula a taxa fotossintética que podem ser obtidas com baixas taxas de g_s e E foliar, o que por seu turno promovem aumentos na eficiência intrínseca do uso da água (EiUA).

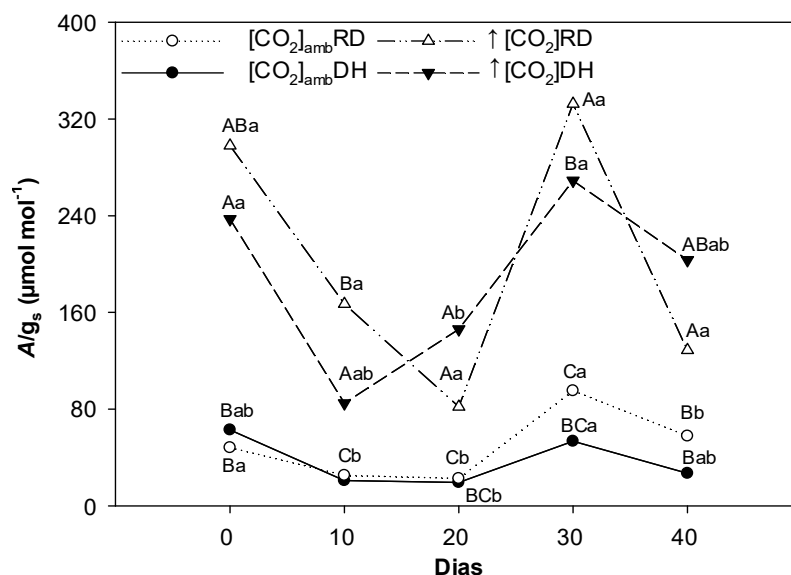


Figura 9: Eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s , $\mu\text{mol mol}^{-1}$) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]\text{RD}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

A figura 10 apresenta os valores de fluorescência basal (F_o), fluorescência máxima (F_m) e eficiência quântica potencial do FSII (F_v/F_m), respectivamente. Os valores de F_v/F_m não apresentaram diferenças significativas entre todos os tratamentos ao longo do tempo, com exceção do $[\uparrow\text{CO}_2]\text{DH}$, que apresentou um declínio dos 30 aos 40 dias de experimento. No geral, a restrição hídrica ao longo dos 40 dias não foi suficiente para causar alterações nos valores de F_v/F_m , ou seja, não afetou o rendimento quântico do FSII. A análise dos parâmetros que compõem essa razão demonstram que a maior redução em F_v/F_m observada aos 40 dias de experimento no tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]\text{DH}$, deveu-se a reduções em F_m , sugerindo que as plantas de café apresentam alta capacidade de dissipação do excesso de energia em resposta ao déficit hídrico imposto (-0,95 Mpa). Resultados semelhantes foram observados por Peloso *et al.* (2017) e Cavatte *et al.* (2012), onde cafeeiros arábica submetidos ao déficit hídrico não apresentaram mudanças nos valores de F_v/F_m , ou seja, houve uma estabilidade da eficiência fotoquímica do FSII, o que pode indicar que os cafeeiros expostos a seca podem não ter sofrido fotoinibição.

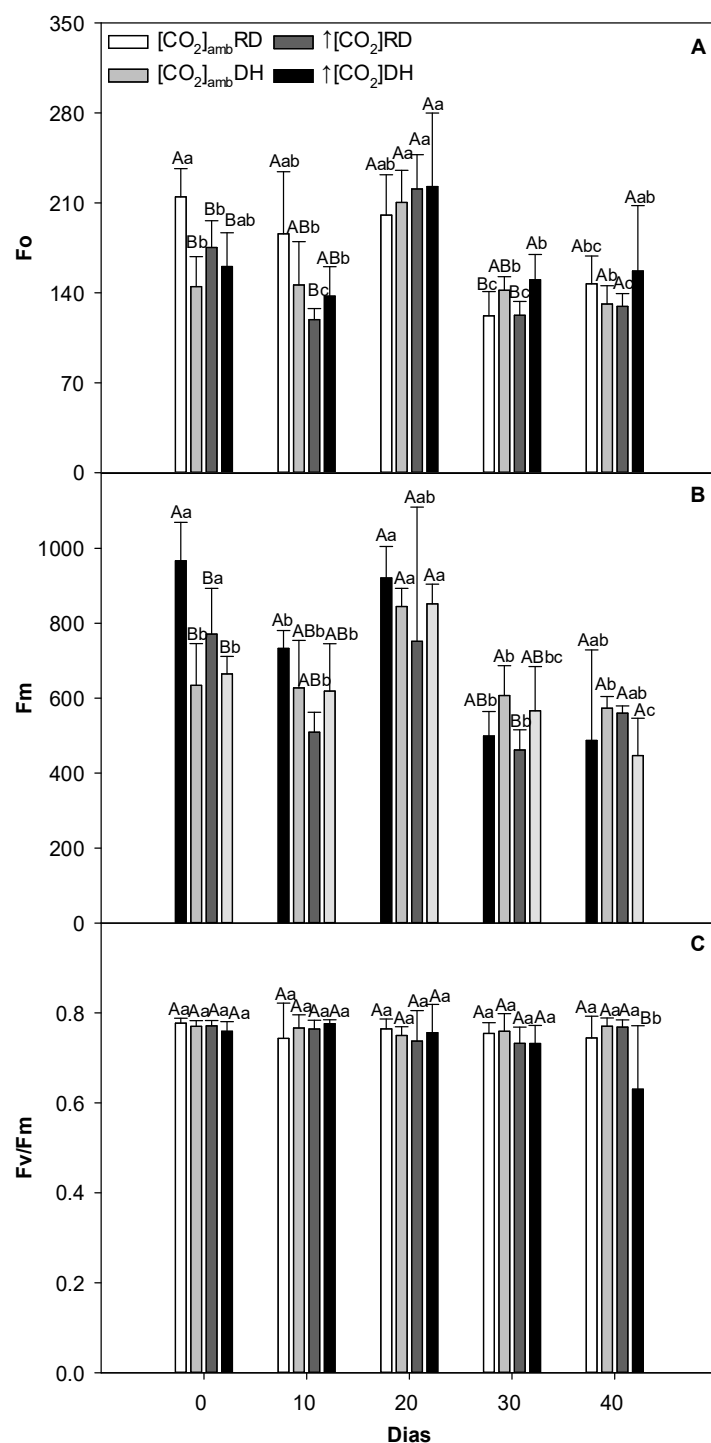


Figura 10: Fluorescência inicial (Fo), fluorescência máxima (Fm) e Eficiência quântica máxima do FSII (Fv/Fm) da clorofila “a” em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de [CO₂] ambiente sob rega diária e déficit hídrico ([CO₂]_{amb}RD e [CO₂]_{amb}DH, respectivamente) e alto [CO₂] sob rega diária e déficit hídrico (↑[CO₂]RD e ↑[CO₂]DH, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições (n = 6) ± DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (P≤0,05).

4.2. Análise bioquímicas

4.2.1. Fenóis Totais e Aminoácidos Livres Totais

A figura 11 apresenta as concentrações de compostos fenólicos nas folhas de café arábica. O tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}$ mostrou um aumento ao longo do tempo, diferente dos outros tratamentos que não sofreram grandes alterações no acúmulo do composto, sugerindo que tanto o DH quanto a $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ podem influenciar no acúmulo desses compostos. Segundo Batista (2015), o mecanismo pelo qual $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ altera a síntese de compostos fenólicos ainda não foi totalmente elucidada, mas é possível que este resulte em alterações do metabolismo primário da planta. Nos tratamentos submetidos a $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$, sugere-se que os esqueletos de carbono estejam sendo mobilizados para o crescimento e desenvolvimento dessas plantas por conta das altas taxas fotossintéticas e uma maior produção de fotoassimilados, bem como para formação de ligninas. Globbo-Neto & Lopes em sua revisão (2007), observaram uma possível correlação inversa entre a atividade metabólica e produção de compostos secundários, ou seja, uma baixa produção destes compostos em períodos de crescimento tecidual rápido, similar ao que ocorreu neste experimento, visto que os cafeeiros estavam em estágio inicial de crescimento. Considerando que Sanches et al. (2017) observaram em cafeeiros no mesmo estágio de crescimento vegetativo que a $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ favoreceu um aumento significativo nos níveis de carboidratos solúveis totais e amido em folhas, é plausível sugerir aqui que o dióxido de carbono adicional é preferivelmente utilizado em vias primárias para produção e uso de esqueletos de carbono para o crescimento das plantas e tolerância ao estresse hídrico imposto.

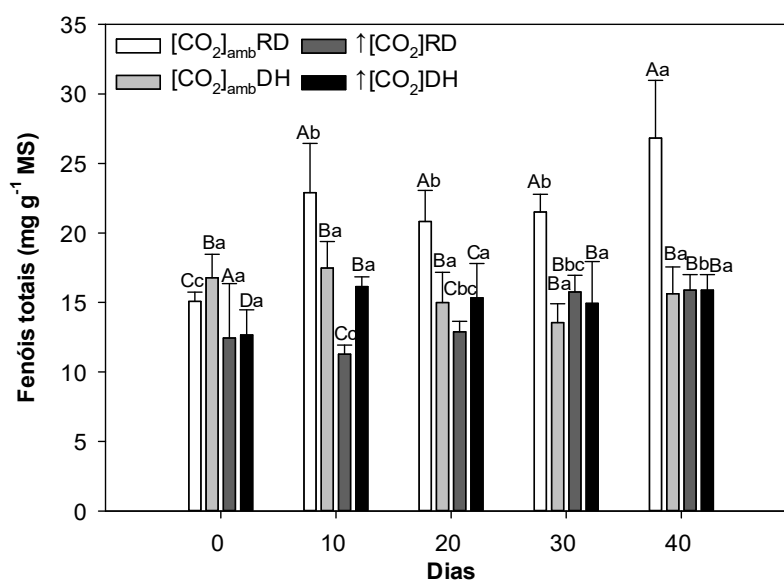


Figura 11: Fenóis totais (mg/g MS) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de [CO₂] ambiente sob rega diária e déficit hídrico ([CO₂]_{amb}RD e [CO₂]_{amb}DH, respectivamente) e alto [CO₂] sob rega diária e déficit hídrico (↑[CO₂]RD e ↑[CO₂]DH, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições (n = 6) ± DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (P≤0,05).

O conteúdo de AA nas folhas foi, no geral, maior nas plantas submetidas ao déficit hídrico quando comparados ao tratamento controle, destacando o aumento no tratamento ↑[CO₂]DH aos 10 dias de experimento seguido por um decréscimo no acúmulo destes compostos. Sanches *et al.* (2007) observaram um aumento de prolina no início de seu experimento, assemelhando-se aos dados de AA obtidos neste trabalho, o que pode indicar um possível acúmulo deste composto nas folhas dos cafeeiros submetidos à restrição hídrica. Este acúmulo é tomado, em alguns casos, como indicador de tolerância ao déficit hídrico, pois o acúmulo de AA pode atuar como osmorregulador, o que pode explicar também a flutuação no acúmulo desses compostos em condição de DH ao longo dos 40 dias. É possível inferir que ↑[CO₂] por si só não interfere no acúmulo de AA, fato observado por Högy *et al.* (2009), que ao analisarem os efeitos do CO₂ elevado no rendimento de grãos e na qualidade do trigo durante três anos, constataram nenhum impacto significativo do enriquecimento de CO₂ nas concentrações da maior parte dos aminoácidos. Entretanto, o ↑[CO₂] associado à seca influencia positivamente no acúmulo de AA, como observado nestes resultados. Segundo Paixão *et al.* (2014), o ajuste osmótico por meio do acúmulo dessa classe de solutos nas plantas é uma das alternativas para assegurar a turgescência e o conteúdo de água nas células.

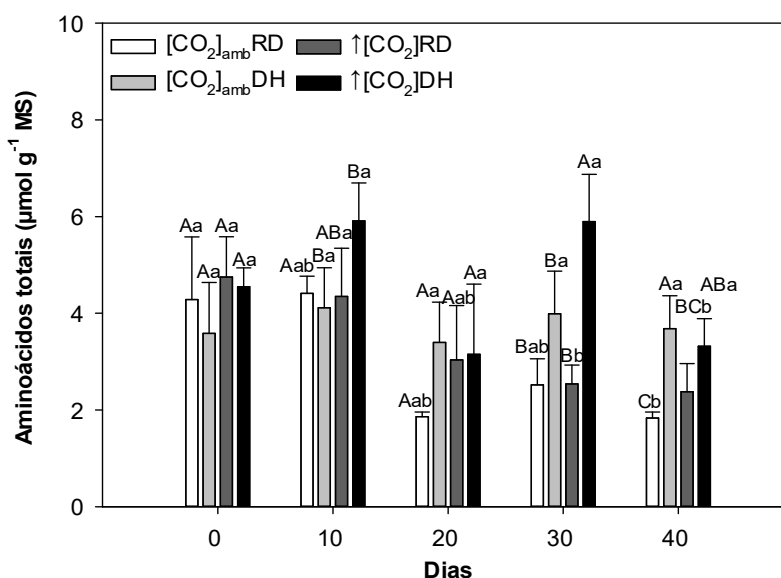


Figura 12: Aminoácidos totais ($\mu\text{mol/g MS}$) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]\text{RD}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

4.2.2. Níveis foliares de Ácido 5-O-Cafeoilquínico (5-CQA) e Cafeína

A análise dos níveis foliares de ácido 5-O- cafeoilquínico (5-CQA) por cromatografia líquida de alta eficiência (Figura 13), demonstra de forma geral que o DH, bem como, a $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ não alteram os níveis desse composto quando comparados ao tratamento controle $\text{CO}_{2\text{amb}}\text{RD}$. No entanto, considerando-se o estágio de crescimento das plantas e o tempo experimental em que as plantas foram submetidas aos diferentes tratamentos de CO_2 e disponibilidade hídrica, vale destacar a tendência de aumento da concentração de 5-CQA ao longo do experimento, principalmente nos tratamentos submetidos à $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$, sendo contínuo e gradual nas plantas sob $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$.

Por se tratar de um experimento de respostas de curto-prazo do cafeeiro ao efeito conjunto da $\uparrow[\text{CO}_2]_{\text{atm}}$ e do DH, medidas de crescimento não foram realizadas. De qualquer modo, pode-se sugerir que o efeito fertilizante do CO_2 adicional observado na fotossíntese, mesmo sob DH, pode favorecer o crescimento vegetativo e explicar o aumento gradual dos níveis de 5-CQA nessas condições. Mondolot *et al.* (2006) em seu trabalho com *Coffea canefora*, observou um acúmulo de 5-CQA em suas folhas durante o crescimento das plantas, sendo que, as folhas jovens apresentaram um maior conteúdo de 5-CQA. Outro aspecto que

pode reforçar esta hipótese é que o aumento das concentrações de 5-CQA no tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$ se deu até os 20 dias de experimento, quando o DH no solo ainda era de 50% em relação ao início do experimento, após este período os valores decresceram progressivamente. A alta produção de carboidratos, ocasionados pela $\uparrow[\text{CO}_2]$ pode levar ao acúmulo de ácido clorogênico, pois este favorece o crescimento vegetativo e pode agir contra radicais livres formados quando a planta está sob estresse (Sanches *et al.*, 2017; Grace *et al.* 1998).

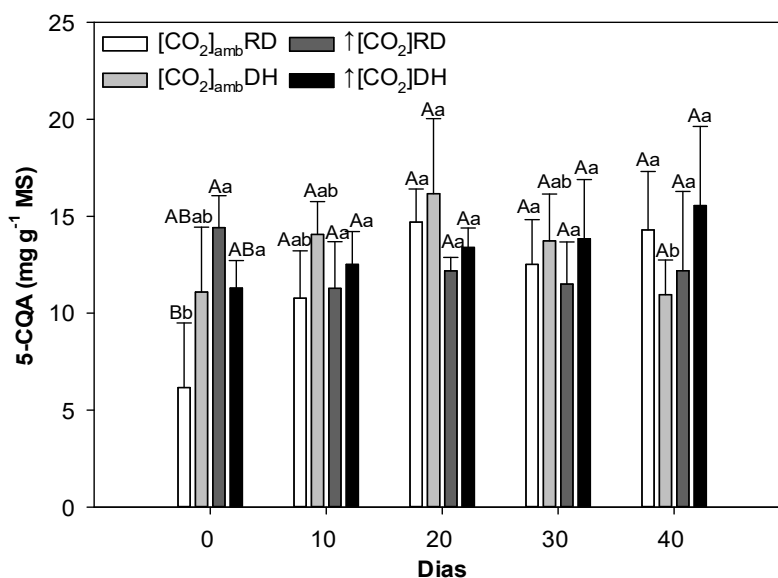


Figura 13: Teores de Ácido 5-O- Cafeoilquinico (5-CQA) (mg/g MS) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de $[\text{CO}_2]$ ambiente sob rega diária e déficit hídrico ($[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}$ e $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$, respectivamente) e alto $[\text{CO}_2]$ sob rega diária e déficit hídrico ($\uparrow[\text{CO}_2]\text{RD}$ e $\uparrow[\text{CO}_2]\text{DH}$, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições ($n = 6$) $\pm$ DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

As concentrações foliares de cafeína são apresentadas na figura 14. Assim como o ácido 5-O-cafeoilquinico (Figura 13), os teores de cafeína não apresentaram diferenças estatísticas ao longo dos 40 dias de experimento. Porém, pode-se observar uma tendência de aumento nos tratamentos $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$ até os 20 dias, seguido por um decréscimo até o fim do experimento, provavelmente pela diminuição da U_{solo} e a baixa A . Segundo Kumar *et al.* (2015), a seca moderada altera o conteúdo de cafeína em folhas de cafeeiro (*C. Canephora*), diminuindo-o, devido sua degradação e, possivelmente, a regulação dos transcritos dos genes envolvidos na biossíntese.

Por outro lado, observa-se ao longo do experimento uma tendência de aumento do teor

de cafeína no tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]\text{DH}$ (23,7% em relação ao início do experimento), sugerindo um efeito positivo da $[\uparrow\text{CO}_2]$ nas concentrações foliares de cafeína, diferente do tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}$, onde houve uma diminuição da concentração em ca. de 12,6%. Recentemente, Vega et al. 2020 em experimento com cafeeiros Arábica e *Canephora* submetidos ao efeito isolado de diferentes concentrações de CO_2 (300, 400, 500 e 600ppm), isto é, sem associação a outro estresse abiótico, concluíram que a $[\uparrow\text{CO}_2]$ não provocam mudanças significativas em relação ao acúmulo de cafeína nas folhas dos cafeeiros, permanecendo com as mesmas concentrações nas quatro condições ambientais de CO_2 . Percebe-se que, em relação aos outros tratamentos, a $\uparrow[\text{CO}_2]$ e o DH não propiciaram uma diminuição no acúmulo de cafeína neste tratamento, sugerindo então, a influência da $\uparrow[\text{CO}_2]$ quando associado ao déficit hídrico no acúmulo deste composto nos cafeeiros.

Assim como os resultados deste trabalho, sabe-se que o conteúdo de 5-CQA é maior do que o de cafeína e ambos são armazenados intracelularmente em grande quantidade no vacúolo. Porém, a cafeína, da mesma forma, é armazenada extracelularmente, devido a sua característica hidrofílica e lipofílica. Sabe-se também que o acúmulo intracelular de cafeína pode ser devido a presença de 5-CQA, ou seja, observa-se que a cafeína está, possivelmente, correlacionada com as concentrações de 5-CQA (Baumann & Rohrig, 1989). Por mais que as concentrações de 5-CQA sejam maiores que as de cafeína, observamos um padrão entre as barras em ambos os gráficos. Segundo Waldhauser e Baumann (1996), o aumento das concentrações de 5-CQA leva a uma maior compartimentação celular de cafeína.

Em relação ao tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]\text{RD}$, houve uma diminuição das concentrações de cafeína, enquanto as concentrações de 5-CQA não houveram alterações. Uma possível explicação para ambas as concentrações, seria a mobilização dos esqueletos de carbono para o metabolismo primário da planta, crescimento e desenvolvimento, ao invés de serem utilizados no metabolismo secundário, visto que, os cafeeiros nestas condições não estavam expostos a nenhum tipo de estresse.

Ainda faltam trabalhos que relacionem a concentração destes metabólitos em cafeeiros submetidos a déficit hídrico, muitos destes estão relacionados a estresses bióticos, devido as propriedades antioxidantes e antibióticas, que auxiliam na resistência e proteção contra pragas e doenças (Guimarães *et al.*, 2011). Porém, segundo o cenário de mudanças climáticas, que altera o índice de precipitação, levando a seca para muitas regiões produtoras de café e sabendo que esta é prejudicial ao cafeeiro, são necessários mais estudos, principalmente relacionados ao metabolismo secundário destas plantas, visto que muitos dos compostos possuem influencia na qualidade da bebida.

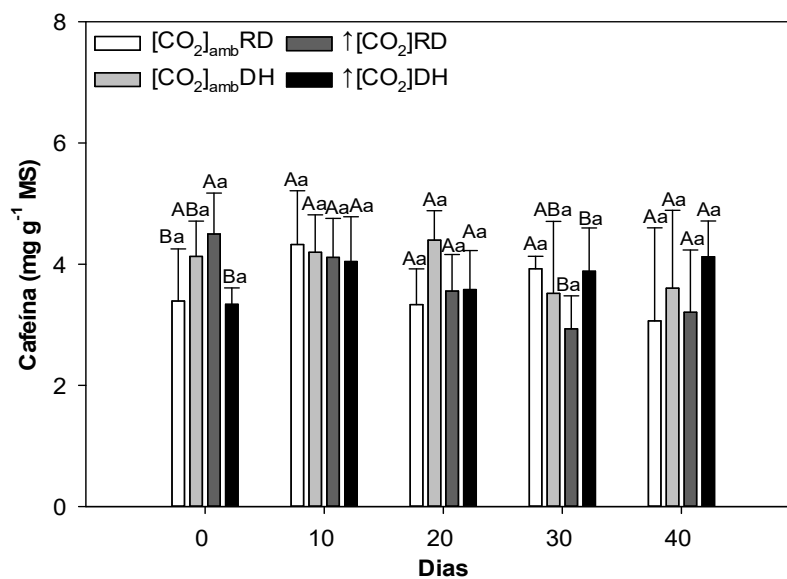


Figura 14: Concentração de cafeína (mg/g MS) em folhas de plantas de *C. arabica* submetidas aos tratamentos de [CO₂] ambiente sob rega diária e déficit hídrico ([CO₂]_{amb}RD e [CO₂]_{amb}DH, respectivamente) e alto [CO₂] sob rega diária e déficit hídrico (↑[CO₂]RD e ↑[CO₂]DH, respectivamente) ao longo de 40 dias em condições de casa de vegetação. As barras representam a média de 6 repetições (n = 6) ± DP. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos da mesma coleta e letras minúsculas diferentes representam diferenças significativas entre os tratamentos ao longo do tempo de acordo com o teste de Tukey em nível de 5% de probabilidade (P ≤ 0,05).

5. Considerações Finais

De acordo com DaMatta et al (2007) o café mostra taxas fotossintéticas relativamente baixas e provavelmente requer grandes quantidades de carboidratos para manter alta produção agrícola, mas as interações complexas entre fotossíntese, alocação e armazenamento de carbono ainda não foram examinados adequadamente.

Neste trabalho o ↑[CO₂]_{atm} teve um efeito positivo nas taxas fotossintéticas, mitigando os possíveis efeitos da seca. O acúmulo líquido e significativo de AA livres nas folhas em resposta a ↑[CO₂]_{atm} e ao déficit hídrico aponta para uma função osmorreguladora em resposta ao estresse imposto, bem como, para uma via primária preferencial para o acúmulo de esqueletos carbônicos.

O efeito conjunto do déficit hídrico e a ↑[CO₂] influenciaram o acúmulo de 5-CQA e cafeína ao longo do período experimental, desempenhando um papel importante no conteúdo desses compostos na fase vegetativa das plantas de café.

Experimentos de longo prazo, em especial sob condições de campo que permitam

avaliar a sazonalidade da influência desses cenários climáticos, nas respostas vegetativas e reprodutivas do cafeeiro, principalmente na composição dos frutos do café e qualidade da bebida. Para tal a tecnologia de enriquecimento de CO₂ ao ar livre é requerida.

6. Referências bibliográficas

- Aidar, M.P.M., Costa, P.F., Martinez, C.A., Dietrich, S.M.C. & Buckeridge, M.S.** 2002. Effect of atmospheric CO₂ enrichment on the establishment of seedlings of jatobá, *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). *Biota Neotropica* 2: 1-10.
- Ainsworth, E.A. & Rogers, A.** 2007. The response of photosynthesis and stomatal conductance to rising (CO₂): mechanisms and environmental interactions. *Plant, Cell and Environment* 30: 258-270.
- Ashihara, H.** 2006. Metabolismo of alkaloids in coffee plants. Minireview. Department of Biology, Faculty of Science, Ochanomizu University, Tokyo.
- Ashihara H, Monteiro A. M.; Moritz T, Gillies F. M. & Crozier A.** 1996. Catabolism of caffeine and related purine alkaloids in leaves of *Coffea arabica* L. *Planta* 198: 334-339.
- Batista, E.R.** 2015. Respostas fisiológicas e metabólicas de duas cultivares de *Coffea arabica* L. submetidas a atmosferas enriquecidas em CO₂ em câmaras de topo aberto e sistema FACE. Tese de Doutorado, Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo.
- Baumann, T. W. & Rohrig, L.** 1989. Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea arabica*. *Phytochemistry* 28: 2667-2669.
- Bicho, N.C.C., Oliveira, J.F.S., Lidon, F.J.C., Ramalho, J.C. & Leitão, A.E.O.** 2011. Café: Origens, produção, processamento e definição de qualidade. Escolar Editora, Lisboa.
- Castro, P.R.C.** 2009. Princípios da adubação foliar. FUNEP, Jaboticabal.
- Cavatte, P.C., Oliveira, A.A.G., Morais, L.E., Martins, S.C.V., Sanglard, L.M.V.P. & DaMatta, F.** 2012. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. *Physiologia Plantarum* 144: 111-122.
- Chaves, J. C. D; Miyazawa, M; Bloch, M. F. M & Yamakami, K.** 2004. Estimativa do teor de cafeína nas sementes de café baseada na sua concentração nas folhas de mudas e de plantas adultas. *Acta Scientiarum. Agronomy* 26: 287-292.
- Cia, M. C.** 2010. Resposta antioxidativa em variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob déficit hídrico. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba.
- Campa, C.; Jacques, R. J. & Kochko, A.** 2008. Chlorogenic acids: diversity in green beans of wild coffee species. *Advances in Plant Physiology* 10: 421-437.
- Clifford, M. N.; Jaganath, I. B.; Ludwig, I. A. & Crozier, A.** 2017. Chlorogenic acids the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Natural Product Reports* 34: 1391-1421.
- DaMatta, F.M., Godoy, A.G., Menezes-Silva, P.E., Martins, S.C.V., Sanglard, L.M.V.P., Morais, L.E., Torre-Neto, A. & Ghini, R.** 2016. Sustained enhancement of photosynthesis in coffee trees grown under free-air CO₂ enrichment conditions: disentangling the contributions of stomatal, mesophyll, and biochemical limitations. *Journal of Experimental Botany* 67: 341-352.
- DaMatta, F. M.** 2012. Could shading reduce the negative impacts of drought on coffee? A morphophysiological analysis. *Physiologia Plantarum* 22: 144-111.
- Dey, P.M. & Harbone, J.B.** 1997. Plant biochemistry. Academic Press, San Diego.
- Farah, A. & Donangelo, C.M.** 2006. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiology* 18: 23-36.

- Grace SC, Logan BA, Adams III WW.** 1998. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant, Cell and Environment* 21: 513–521.
- Kumar, A., Naik, G. K., Simmi, P.S. & Giridha, P.** 2015. Salinity and drought response alleviate caffeine content of young leaves of *Coffea canephora* var. Robusta cv. S274. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 3: 050-060
- Leitão, S., Guerra-Guimarães, L., Bronze, M. R., Vilas Boas, L., Sá, M., Almeida, M. H. G. & Silva, M.C.** 2011. Chlorogenic Acid Content in Coffee Leaves: Possible Role in Coffee Leaf Rust Resistance. 23rd Int. Conf. on Coffee Science (ASIC).
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I.** 1950. The Water Culture Method for Growing Plants without Soil, vol. 347. Station of University of California, Berkeley.
- Högy, P., Wieser, H., Köhler, P., Schwadorf, K., Breuer, J., Franzaring, J., Muntifering, R. & Fangmeier, A.** 2009. Effects of elevated CO₂ on grain yield and quality of wheat: results from a 3-year free-air CO₂ enrichment experiment. *Plant Biology* 1: 60-69.
- IPCC- Working Group I Contribution to the IPCC Fifth Assessment Report: The Physical Science Basis.** Climate Change 2013.
- Kumar, A.; Naik, G. K.; Simmi, P.S. & Giridhar, P.** 2015. Salinity and drought response alleviate caffeine content of Young leaves of *Coffea canephora* var. Robusta cv. S274. *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 3: 050-060.
- Lindroth, R.L.** 2010. Impacts of elevated CO₂ and O₃ on forests: phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. *J Chem Ecol* 36: 2-21.
- Long S.P., Ainsworth E.A., Rogers A. & Ort, D.R.** 2004. Rising atmospheric carbon dioxide: plants FACE the future. *Annual Review of Plant Biology* 55: 591–628
- Leakey, A.D.B., Ainsworth, E.A., Bernacchi, C.J., Rogers, A., Long, S.P. & Ort, D.R.** 2009. Elevated CO₂ effects on plant carbon, nitrogen, and water relations: six important lessons from FACE. *Journal of Experimental Botany* 60: 2859-2876. 21
- Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M.** 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy* 40: 255-260.
- Mazzafera, P; Crozier, A & Magalhães, A. C.** 1991. Caffeine metabolism in *Coffea arabica* and other species of coffee. *Phytochemistry* 30: 3913-3916.
- McCree, K.J. & Fernández, C.J.** 1989. Simulation model for studying physiological water stress responses of whole plants. *Crop Science* 29: 353-360.
- McElrone, A.J., Hamilton, J.G., Krafnick, A.J., Aldea, M., Knepp, R.G. & DeLucia, E.H.** 2010. Combined effects of elevated CO₂ and natural climatic variation on leaf spot diseases of redbud and sweetgum trees. *Environmental Pollution* 158: 108-114.
- Mondolot, L.; La Fiska, P.; Buatois, B.; Talansier, E.; Kochko, A. & Campa, C.** 2006. Evolution in Caffeoylquinic Acid Content as Histolocalization During *Coffea canephora* Leaf Development. *Annals of Botany*. 98: 33 – 40.
- Moura, J.C.M.S., Bonine, C.A.V., Viana, J.O.F., Dornelas, M.C. & Mazzafera, P.** 2010. Abiotic and biotic stresses and changes in the lignin content and composition in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 360-376.
- Neto, L.G. & Lopes, N.P.** 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova* 30: 374-381.

- NOAA (National Climatic Data Center, State of the Climate).** 2013. Global Analysis for March 2013. Disponível em <http://www.ncdc.noaa.gov/sotc/global/2013>. (acesso em 02/ 03/ 2019).
- Paixão, C.L., Jesus, D.S., Costa, D.P., Pereira, P.P.A. & Neto, A.D.A.** 2014. Caracterização fisiológicas e bioquímicas de genótipos de girassol com tolerâncias diferenciada ao estresse hídrico. *Enciclopédia Biosfera* 10: 2011-2022 22
- Peloso, A.F., Tatagiba, S.D., Reis, E.F., Pezzopane, J.E.M. & Amaral, J.F.T.** 2017. Limitações fotossintéticas em folhas de cafeeiro arábica promovidas pelo déficit hídrico. *Coffee Science* 12: 389-399.
- Penuelas J. & Estiarte, M.** 1998. Can elevated CO₂ affect secondary metabolism and ecosystem function? *Trends in Ecology & Evolution* 13: 20-24.
- Perrois, C.; • Susan R. Strickler, S. R.; Guillaume Mathieu, G.; Lepelley, M.; Lucie Bedon, B.; Michaux, S.; Husson, J.; Mueller, J. & Privat, I.** 2014. Differential regulation of caffeine metabolism in *Coffea arabica* (Arabica) and *Coffea canephora* (Robusta). *Planta* 241: 179-191
- Raju, K.I. & Gopal, N.H.** 1979. Distribution of caffeine in arabica and robusta coffee plants. *J. Coffee Res.*, Karnataka. 9:83-90.
- Revista Campos e Negócios Grãos.** Disponível em <<https://revistacampoenegocios.com.br/>>. Acesso em 13/03/2020.
- Rezende, F. M.** 2013. Efeito da atmosfera enriquecida com CO₂ em mudas de *Psidium guajava* L. cv. Pedro Sato. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Salva, T J. G & Lima, V. B.** 2007. A composição química do café e as características da bebida e do grão. Instituto Agrônômico, Centro de Café Alcides Carvalho.
- Sanches, R.F.E., Catarino, I.C.A., Braga, M.R. & Silva, E.A.** 2017. Influência da alta concentração atmosférica de CO₂($\uparrow[CO_2]_{atm}$) × disponibilidade hídrica nas relações hídricas, trocas gasosas e acúmulo de carboidratos em *Coffea arabica* L. *Hoehnea* 44: 635-643.
- Santos, R.F. & Carlesso, R.** 1998. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. *R. Bras. Eng. Agric. Amb.* 2: 287-294.
- Schreiber, U., Bilger, W. & Neubauer, C.** 1994. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D. & Caldwell, M.M. (eds). *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer, Berlin, pp. 49-70.
- Shalhevet, J.** 1993. Plants under salt and water stress. In: Fowden, L.; Mansfield, T. & Toddart, J. (Ed.). *Plant adaptation to environmental stress*. Chapman e Hall, London 133-154.
- Silva, C. J. R S.; Benjamim, C. J. R.; Carvalho, L. B.; Rocha, E. M. B & Mori, E.** 2018. Determinação do teor de cafeína em diferentes tipos de cafés. *Demetra: Alimentação, Nutrição & Saúde*. 13: 477 -484.
- Silva, E.A. & Mazzafera, P.** 2008. Influence of temperature and water on coffee culture. *The Americas Journal of Plant Science and Biotechnology* 2: 32-41.
- Singleton, V.L. & Rossi, J.A.** 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 16: 144-158.
- Solomon, S., Quin, B., Manning, M., Marquis, M., Averyt, K., Tignor, M.M.B., Miller JR, H.L. & Chen, Z.** 2007. Climate Change: The Physical Science Basis. In: Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Cambridge,

pp. 01-989.

Sousa, C.M. de M., Silva, H.R., Vieira-Jr, G.M., Ayres, M.C.C., Costa, C.L.S. da., Araújo, D.S., Cavalcante, L.C.D., Barros, E.D.S., Araújo, P.B. de M., Brandão, M.S. & Chaves, M.H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova* 30: 351-355.

Taiz, L. & Zeiger, E. 1991. *Plant Physiology*. Benjamim Cummings Publishing, Redwood City.

Taiz, L. & Zeiger, E. 2017. *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal*. Artmed, Porto Alegre.

Tavares, H.F.M. & Vannucchi, H. 2016. Aminoácidos: Funções e Segurança. In: J.S. Marchini, H. Vannucchi, V. Marques, M. Suen & S.F.C. Cunha. *Aminoácidos*. International Life Sciences Institute do Brasil, São Paulo, pp. 1-117.

Vega, F. E., Ziska, L. H., Simpkins, A., Infante, F., Davis, A. P., Rivera, J. A., Barnaby, J. Y. & Wolf, J. 2020. Early growth phase and caffeine content response to recent and projected increases in atmospheric carbon dioxide in coffee (*Coffea arabica* and *C. canephora*). *Nature Research Sci Rep* 10, 5875.

Vermeris, W. & Nicholson, R. 2006. *Phenolic compound biochemistry*. Springer, Dordrecht.

Waldhauser, S. S. M. & Baumann, T. W. 1996. Compartmentation of caffeine and related purine alkaloids depends exclusively on the physical chemistry of their vacuolar complex formation with chlorogenic acids. *Phytochemistry*, 42: 985-996.

ANEXO I

Perfis do ácido 5-O-cafeoilquinico e Cafeína obtidos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

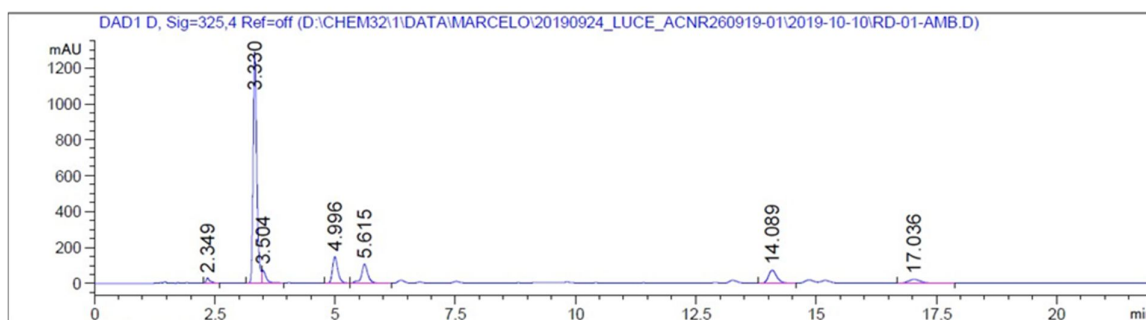


Figura 15: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquinico, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$ RD-1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.33 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquinico.

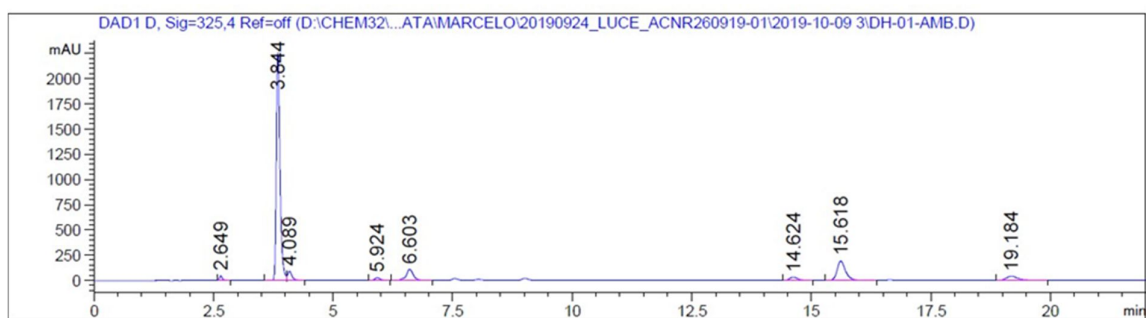


Figura 16: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquinico, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}$ DH-1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.84 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquinico.

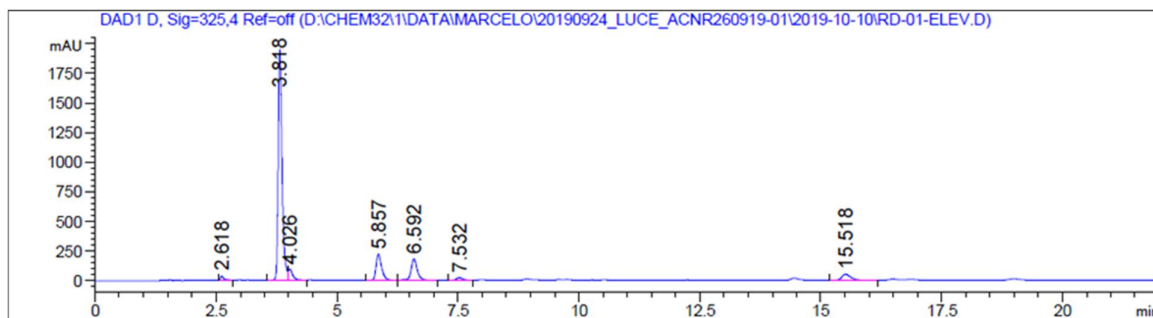


Figura 17: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquinico, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]$ RD-1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.81 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquinico.

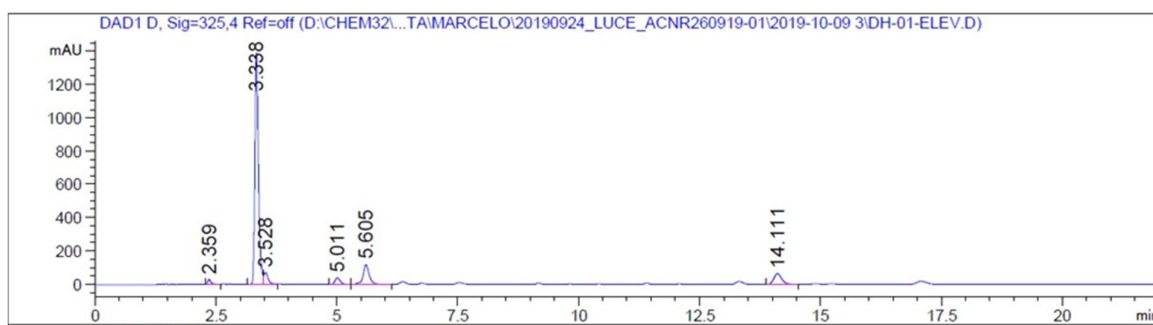


Figura 18: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquinico, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]\text{DH}-1^{\text{a}}$ coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.33 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquinico.

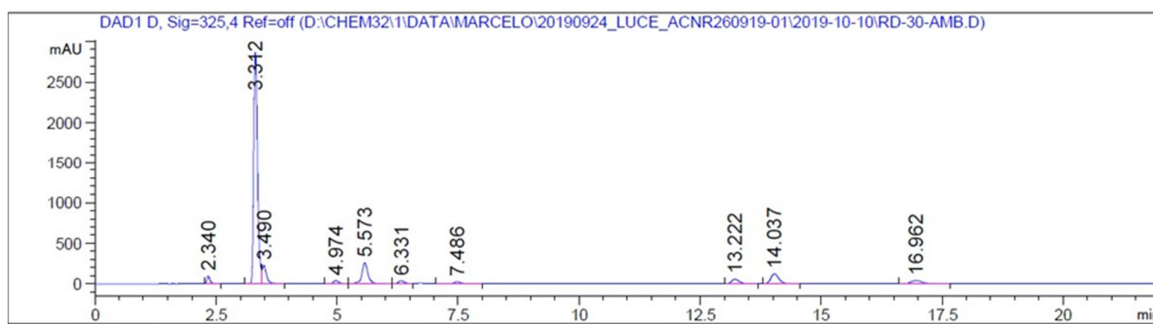


Figura 19: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquinico, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}-5^{\text{a}}$ coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.31 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquinico.

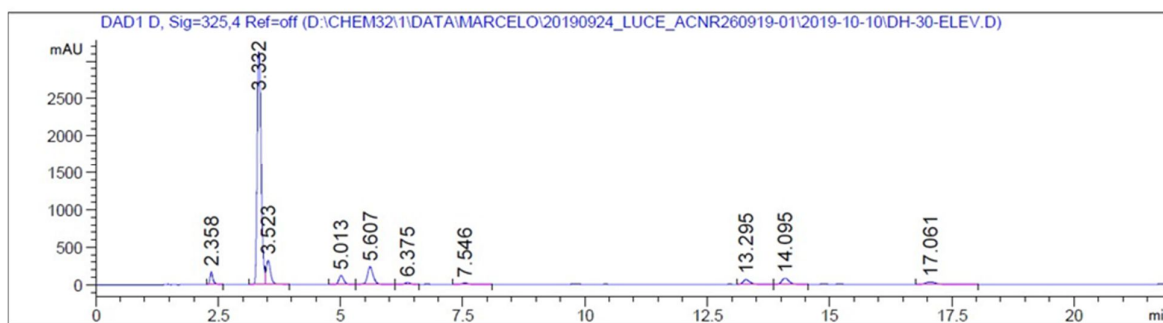


Figura 20: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquinico, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH}-5^{\text{a}}$ coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.33 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquinico.

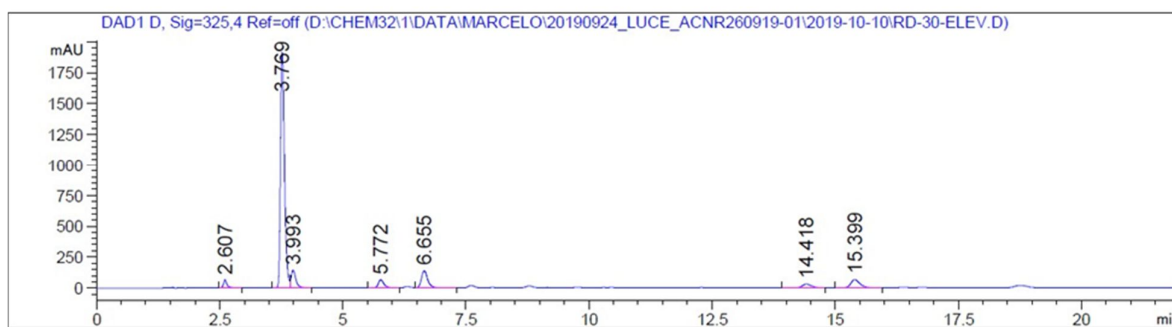


Figura 21: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquinico, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]\text{RD}$ -5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.76 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquinico.

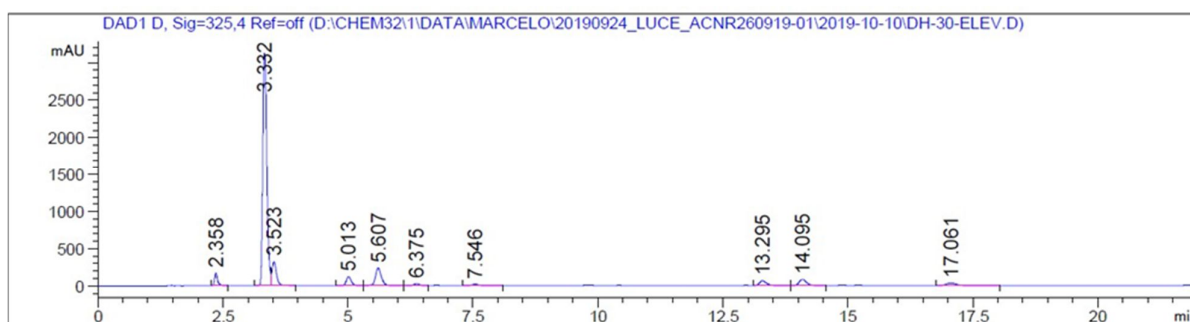


Figura 22: Análise por CLAE do ácido 5-O-cafeoilquinico, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]\text{DH}$ -5ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 3.33 min., tendo como referência a curva padrão de ácido 5-O-cafeoilquinico.

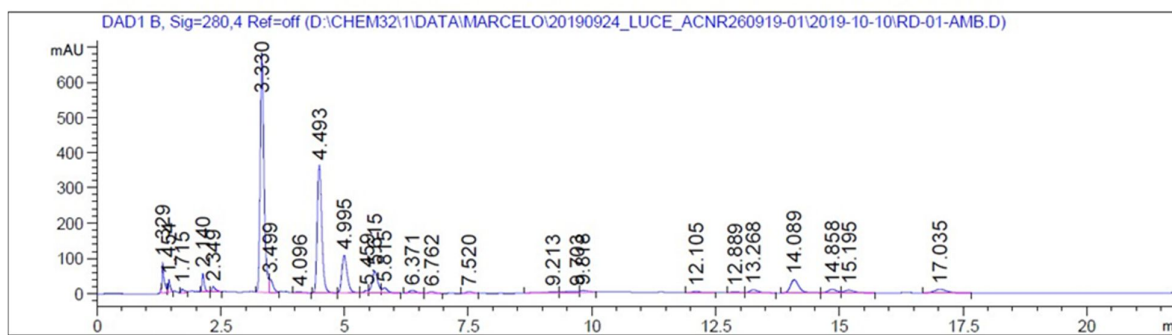


Figura 23: Análise por CLAE da cafeína, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{RD}$ -1ª coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 4.49 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.

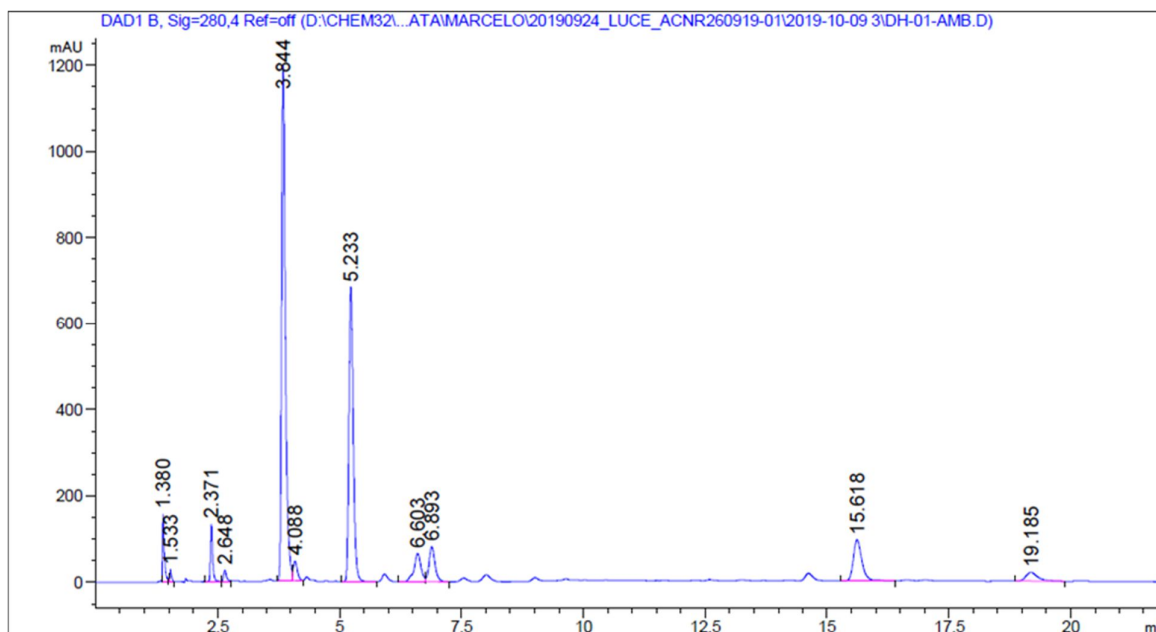


Figura 24: Análise por CLAE da cafeína, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH} - 1^{\text{a}}$ coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 5.23 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.

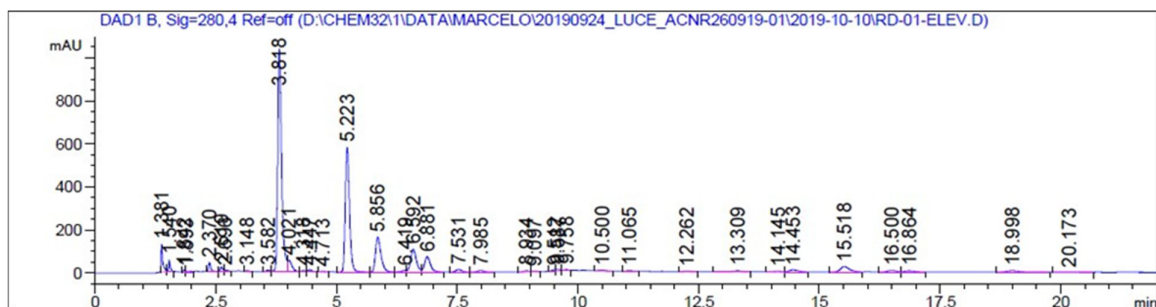


Figura 25: Análise por CLAE da cafeína, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]\text{RD} - 1^{\text{a}}$ coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 5.22 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.

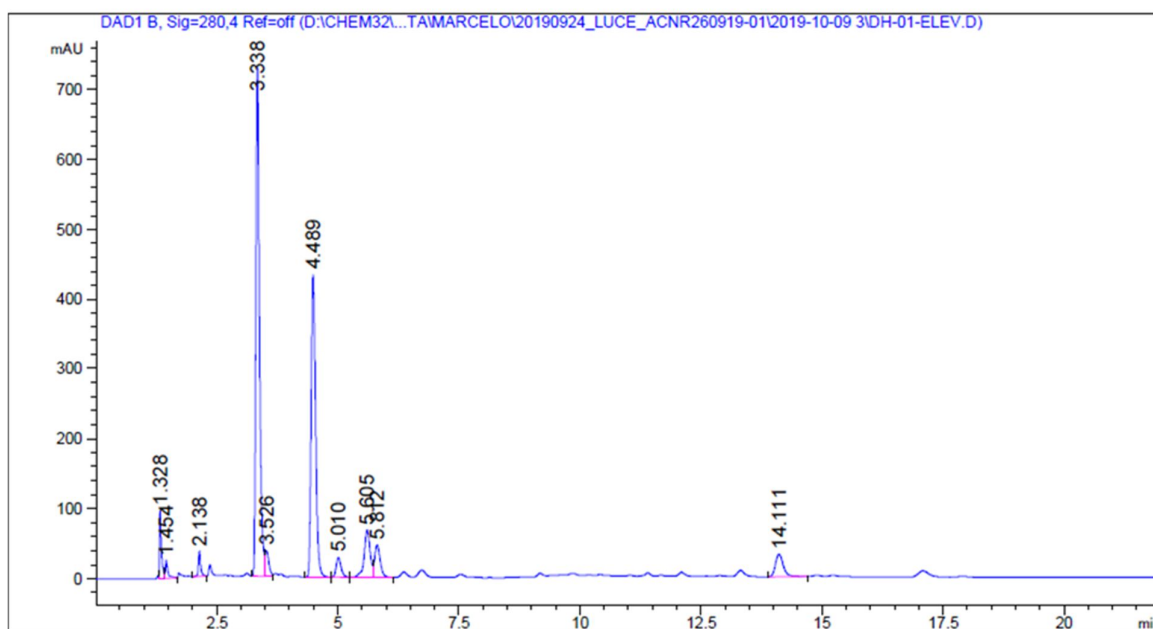


Figura 26: Análise por CLAE da cafeína, tratamento [$\uparrow\text{CO}_2$]DH-1^a coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 4.48 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.

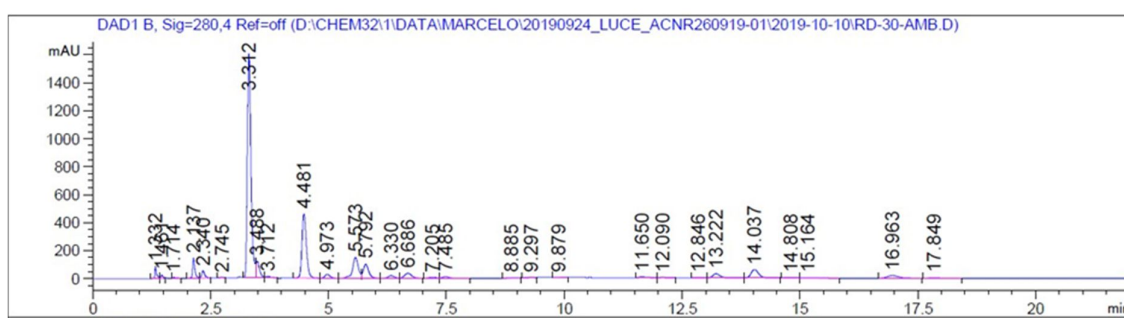


Figura 27: Análise por CLAE da cafeína, tratamento [CO_2]_{amb}RD-5^a coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuaí vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 4.48 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.

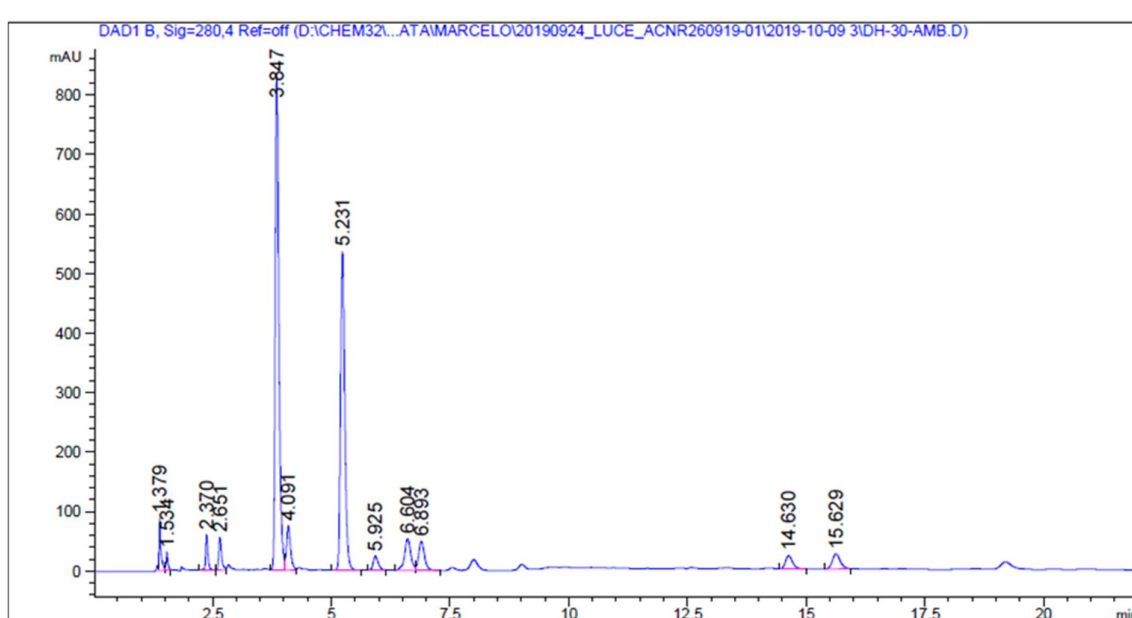


Figura 28: Análise por CLAE da cafeína, tratamento $[\text{CO}_2]_{\text{amb}}\text{DH-5}^{\text{a}}$ coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 5.23 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.

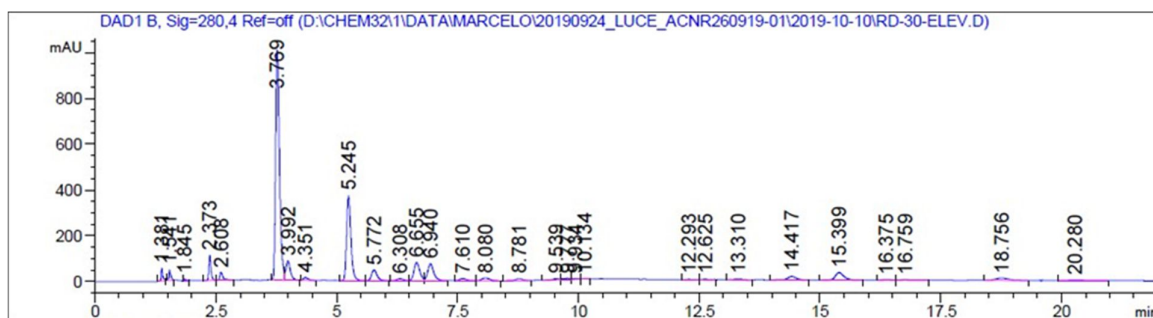


Figura 29: Análise por CLAE da cafeína, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]\text{RD-5}^{\text{a}}$ coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 5.24 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.

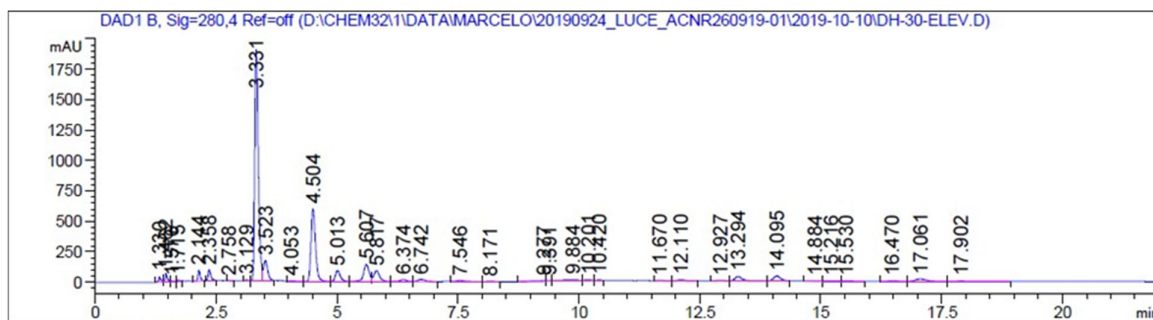


Figura 30: Análise por CLAE da cafeína, tratamento $[\uparrow\text{CO}_2]\text{DH-5}^{\text{a}}$ coleta, em extrato foliar de *Coffea arabica* cv. Catuai vermelho. A área do pico foi obtida no tempo de retenção de 4.50 min., tendo como referência a curva padrão de cafeína.