

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

DEFICIÊNCIAS MINERAIS EM RELAÇÃO
AO METABOLISMO INTERMEDIÁRIO NO
CAFEEIRO, *Coffea arabica* L.

Tese apresentada para a obtenção do título
«Magister Scientiae» em Nutrição de Plantas

GERMAN VALENCIA ARISTIZABAL

PIRACICABA - SÃO PAULO - BRASIL

1967

BIHATA

<u>Page</u>	<u>Page</u>	<u>Conte de la</u>	<u>Devisé de la</u>
1	29	16	17
1	27	RANJAN	RANJAN et al
4	1	BRUN	BRUN
6	3	15°0	15°0
8	24	SELMAN	SELMAN et al
9	19	570	540
10	2	610	660
10	17	BUSH	BUSH et al.
12	10	1041,5	1041,5
16	12	2%	5%
16	23	4,15	5,26
16	23	5,26	4,15
17	14	certificat	certificat
17	19	% ac. glutarico	% ac. glutarico
20	4	industrial	industrial
20	20	quantité	quantité
28	20	TBO et al	TBO & BO MONTAG
28	21	encours	encours
31	27	arrêté	arrêté

AGRADECIMENTOS

Sinceros agradecimentos são devidos às seguintes pessoas e instituições:

Ao Professor EURÍPEDES MALAVOLTA, Catedrático da Cadeira de Química Biológica da ESALQ, por tudo o que fêz por mim, pela orientação, ensinamentos e estímulo recebidos no desenvolvimento deste estudo.

Ao Dr. JOSÉ DAL POZZO ARZOLLA, Professor Associado da Cadeira de Química Biológica da ESALQ, pela sua valiosa colaboração e ensinamentos durante a realização da presente tese.

A todos aquêles que de um modo ou de outro contribuíram para a execução deste trabalho.

À Federación Nacional de Cafeteros de Colombia.

Ao Instituto Colombiano de Especialización Técnica en el Exterior.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP.

Ao Ministério das Relações Exteriores do Brasil.

Ao Instituto Brasileiro do Café.

À Fundação Rockefeller.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas.

<u>INDICE</u>	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS	5
3.1. Material	5
3.1.1. Amostras	5
3.1.2. Tratamentos	5
3.2. Métodos	6
3.2.1. Conservação das amostras	6
3.2.2. Liofilização	6
3.2.3. Análise química	6
3.2.4. Preparação e purificação dos extratos	6
3.2.5. Preparação da coluna de resina	7
3.2.6. Isolamento e purificação dos aminoácidos livres	7
3.2.7. Tratamento da fração contendo ácidos orgânicos, e açúcares	7
3.3. Cromatografia em papel de filtro	7
3.3.1. Cromatografia dos aminoácidos livres	7
3.3.2. Cromatografia dos ácidos orgânicos não voláteis	10
3.3.3. Análise cromatográfica dos açúcares	11
4. RESULTADOS	13
4.1. Análise química dos teores totais	13
4.1.1. Análise da variância e teste de Tukey	14
4.2. Análise cromatográfica dos aminoácidos livres....	15
4.2.1. Análise da variância e teste de Tukey	16
4.2.2. Nitrogênio amínico e amídico total e porcenta-- gem dos aminoácidos em cada cromatograma.....	16
4.3. Análise cromatográfica dos ácidos orgânicos não voláteis	16
4.3.1. Análise da variância e teste de Tukey	19
4.4. Análise cromatográfica dos açúcares	19
4.4.1. Análise da variância e teste de Tukey	20
4.5. Cálculo dos coeficientes de correlação	20
5. DISCUSSÃO	23
5.1. Análise química dos teores totais	23

5.2. Aminoácidos livres na fôlha de café	23
5.3. Ácidos orgânicos não voláteis na fôlha de café..	26
5.4. Açúcares na fôlha de café	27
5.5. Efeito dos tratamentos de deficiências minerais.	27
5.5.1. Efeito das deficiências minerais no conteúdo - de aminoácidos	28
5.5.2. Efeito das deficiências minerais no conteúdo - de ácidos orgânicos	31
5.5.3. Efeito das deficiências minerais no conteúdo - de açúcares	32
6. CONCLUSÕES	36
7. RESUMO	38
8. RESUMEN	41
9. SUMMARY	44
10. BIBLIOGRAFIA	46

INDICE DAS TABELAS

1. Valôr dos teores totais nas amostras dos diversos tra- tamentos (médias de 5 repetições)	13
2. Valôres de "F" para tratamentos, coeficientes de va- riação (C.V.) e D.M.S. entre médias pelo teste de Tu- key	14
3. Microgramas de N por grama de material liofilizado - (média de 5 repetições)	15
4. Valôres de "F" para tratamentos, coeficientes de varia- ção (C.V.) e D.M.S. entre médias pelo teste de Tukey.	16
5. Total de N amínico e amídico e porcentagem dos amino- ácidos em cada cromatograma (dados de 5 repetições)..	17
6. Valôres de "F" para tratamentos, coeficientes de va- riação (C.V.) e D.M.S. entre médias pelo teste de Tu- key	18
7. Microgramas dos ácidos orgânicos não voláteis por gra- ma de material liofilizado (média de 5 repetições....	18

8.	Valôres de "F" para tratamentos, coeficientes de variação (C.V.) e D.M.S. para a comparação das médias pelo teste de Tukey	19
9.	Miligramas de açúcar por grama de material liofilizado (médias de 5 repetições)	20
10.	Valôres de "F" para tratamentos, (C.V.) e D.M.S.. para comparação das médias pelo teste de Tukey...	21
11.	Coeficientes de Correlação (r), graus de liberdade (G.L.) e valôres de "t" para o teste de significância de "r".....	22

1. INTRODUÇÃO

Na realidade conhece-se muita pouca coisa das relações existentes entre a nutrição mineral e as alterações bioquímicas - no metabolismo geral do cafeeiro, a pesar de ser o café produto tão amplamente usado e de ter tanta importância não só económica mas política, em cuja comercialização encontram-se comprometidas tão grande número de nações; como consequência não concordam os resultados e as opiniões dos poucos investigadores que têm se interessado nesses estudos.

Sabe-se que uma deficiência mineral afeta direta ou indiretamente o metabolismo normal do vegetal e altera o equilíbrio entre os seus constituintes químicos; geralmente a alteração desse balanço encontra-se associada ao aparecimento de sintomas que podem até caracterizar uma deficiência mineral.

O uso da cromatografia em papel chegou a ser um dos métodos relativamente recentes e mais interessantes nos estudos do metabolismo do nitrogênio e na separação de diversos tipos de compostos orgânicos celulares, como se deduz da boa quantidade dos trabalhos publicados nos últimos doze anos sobre fatores que podem alterar o metabolismo normal das plantas.

De acordo com o já referido, vê-se que um estudo da relação entre o estado nutricional do cafeeiro e alguns dos compostos que constituem a parte metabólica, tais como aminoácidos livres, ácidos orgânicos não voláteis e açúcares, poderá contribuir para o melhor entendimento desse tipo de relações.

Do ponto de vista prático é de grande valor conhecer o comportamento desses compostos orgânicos já que RAMAIAH(1964) menciona uma acumulação de alguns dos aminoácidos mesmo antes de se notar anormalidades na folha. Detectada assim uma deficiência mineral é possível corrigi-la oportunamente, quer dizer, antes do aparecimento de sintomas visíveis, evitando assim diminuição ou perda de colheitas, o que é de muito interesse para os países produtores.

O estudo aqui apresentado foi planejado com o fim de conhecer as variações qualitativas e quantitativas dos aminoácidos li

vres, dos ácidos orgânicos não voláteis e dos açúcares presentes nas folhas de cafeeiro de acordo com o tipo e grau de deficiência mineral que estas apresentem e como uma contribuição para a diagnose precoce de dita deficiência.

Considera-se este trabalho como sendo uma investigação básica, que amplia o conhecimento sobre a composição da folha de café, cujos resultados poderão servir a estudos posteriores de nutrição mineral, de nutrição orgânica, patologia e fertilidade de solos. Constitui, além disso, uma utilização adicional para a diagnose foliar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

De acôrdo com as consultas bibliográficas realizadas, parece que o primeiro estudo de metabolismo feito em fôlhas de cafeeiro foi o de CAIN(1956) o qual aplicou uréia em fôlhas de café, cacau e banana, tendo demonstrado aumento do teor de nitrogênio assim como de aminoácidos e amidas. MALAVOLTA e colaboradores(1958), analisaram aminoácidos livres em fôlhas de cafeeiro que haviam sido pulverizadas com uréia e nelas encontraram um aumento no teor de asparagina e ácido glutâmico.

CROCOMO(1959), fez um estudo sôbre o metabolismo da uréia- C^{14} aplicada a fôlhas de cafeeiro cultivado em solução nutritiva e nêle apresenta resultados da análise cromatográfica em papel, - tanto dos aminoácidos, como dos açúcares e ácidos orgânicos contidos nas fôlhas de plantas normais e deficientes em nitrogênio; aliás, êste parece ser o primeiro e único trabalho em que es estudam, no cafeeiro, os três tipos de compostos orgânicos.

Estudos de aminoácidos livres no cafeeiro em relação com a nutrição mineral têm sido muito recentes: segundo referem ---- CARVAJAL & MACHICADO(1964), Fargas em 1963 apresentou uma tese para M.S. em Turrialba, na qual estudou a influência de algumas deficiências minerais sôbre o conteúdo de substâncias nitrogenadas simples em fôlhas de cafeeiro cultivados em solução nutritiva, tendo encontrado que a deficiência de nitrogênio causa uma diminuição altamente significativa de alguns aminoácidos e a consequente diminuição do nitrogênio solúvel total. Observou ainda que a deficiência de potássio altera a concentração de algumas frações, - sem afetar, porém, o nitrogênio total.

Na India iniciaram-se recentemente estudos desta natureza e RAMAIAH et al.(1964) publicaram os primeiros resultados da sua investigação, tendo encontrado um acúmulo da maioria dos aminoácidos nas fôlhas de cafeeiros adultos que apresentavam sintomas de deficiência de zinco, inclusive no estado de deficiência incipiente; sugeriu que o acúmulo de certos aminoácidos pode causar tóxicos na planta, tóxicos que pode ser a causa parcial das anormalidades típicas que apresentam as plantas com deficiência de zinco.

Encontrou uma maior quantidade de proteina formada nas fôlhas com sintomas de deficiência em relação as fôlhas normais e a composição da proteina foi idêntica em ambos os tipos de fôlha.

CARVAJAL & MACHICADO(1964) estudaram o metabolismo do nitrogênio nas fôlhas de cafeeiro durante a floração e salientaram a sensibilidade relativa dos aminoácidos e amidas diante duma alteração fisiológica.

3. MATERIAL E METODOS

3.1. Material

3.1.1. Amostras - De acôrdo com a descrição de sintomas visuais de deficiências minerais que fazem MALAVOLTA e colaboradores (1962) amostras foram colhidas num cafezal estabelecido no ano de 1954, formando-se amostras compostas com as fôlhas que apresentavam determinados sintomas, as que foram posteriormente subdivididas para ter repetições das análises completas. Cada um dos diversos tipos de deficiência foi considerado como sendo um tratamento.

As amostras foram colhidas num experimento fatorial 2x2x2 - com fertilização NPK com plantas da variedade "Bourbon vermelho", instalado num terreno da Cadeira nº 2 da ESALQ, caracterizado como sendo um solo pobre, arenoso profundo, da formação Corumbataí, de pH 5,7, reconhecidamente pobre em azôto e potássio, segundo AMORIM et al. (1965) e PIMENTEL et al. (1965). As amostras com sintomas de deficiência de potássio foram colhidas nas parcelas que não haviam recebido adubação potássica. As amostras com sintomas de deficiência de nitrogênio pertenciam às parcelas sem este elemento e as amostras com sintomas de deficiência de zinco foram colhidas sem se ter em conta os tratamentos de fertilização das parcelas. As amostras com sintomas de deficiência de boro foram trazidas da fazenda "São Quirino" em Campinas.

3.1.2. Tratamentos - Os tratamentos foram sete no total:

fôlhas com sintomas de deficiência de zinco,

fôlhas com sintomas de deficiência de boro,

fôlhas com sintomas de deficiência inicial de nitrogênio

fôlhas com sintomas de deficiência avançada de nitrogênio

fôlhas com sintomas de deficiência inicial de potássio

fôlhas com sintomas de deficiência avançada de potássio

fôlhas normais (testemunha)

3.2. Métodos

3.2.1. Conservação das amostras - Imediatamente após colhidas as amostras, foram conservadas em congelador a 15°C até o seu processamento.

3.2.2. Liofilização - Das amostras compostas tirou-se uma alíquota para a determinação do conteúdo de umidade e, com o fim de preservá-las contra qualquer transformação dos seus compostos orgânicos, foram logo submetidas ao processo de liofilização nas dependências da cadeira de Tecnologia de Alimentos da ESALQ e então divididas em cinco sub-amostras, as quais foram consideradas como repetições para fins das análises completas.

3.2.3. Análise química - Em cada sub-amostra ou repetição foi feita a análise química dos teores totais de nitrogênio, fósforo, potássio, boro e zinco seguindo-se os métodos em uso nos laboratórios da ESALQ, descritos por MALAVOLTA(1965,b); para a determinação de cálcio e magnésio foi seguido o método do EDTA segundo GLÓRIA(1965).

3.2.4. Preparação e purificação dos extratos - A preparação dos extratos reveste-se da maior delicadeza, na medida que uma extração imperfeita pode falsear todos os resultados. Após cuidadoso estudo dos diversos processos propostos na bibliografia e de acordo com as possibilidades de trabalho, foram experimentados alguns métodos, como o de OLIVEIRA(1962), ROMBERGER(1960), OWENS & SPECHT(1966), ARZOLLA & FONSECA(1966) e SELMAN(1961); tendo em vista a utilização de pequena quantidade da amostra, foi decidida uma modificação dos procedimentos a qual deu bons resultados, já que a extração foi muito proveitosa; sumariamente o método utilizado consistia em: pesar uma grama do material liofilizado e colocá-lo num almofariz contendo um pouco de areia lavada; triturar até o material ficar finamente moído. Adicionar 12,5 ml de etanol a 80% e deixar em maceração durante uma hora. Transferir o conteúdo do almofariz para tubo de centrifuga e lavar o almofariz com mais 12,5ml de etanol a 80%, recebendo-se tudo no mesmo tubo de centrifuga. Centrifugação por 15 minutos a 1.500 rpm. Transferir diretamente o sobrenadante para a coluna de resina previamente preparada.

3.2.5. Preparação da coluna de resina - A resina AG-50W-X8 100-200 "mesh", forma H^+ com 5,1 miliequivalentes de capacidade total por grama seco foi suspensa em etanol 50% e colocada até uma altura de 5 cm, ficando assim pronta para receber o extrato obtido em 3.2.4.

3.2.6. Isolamento e purificação dos aminoácidos livres - O procedimento seguido foi fundamentalmente o descrito por ARZOLLA & FONSECA(1966): o extrato foi passado pela coluna a uma velocidade de fluxo de 1,5 ml por minuto e depois lavou-se a coluna com 20 ml de água desmineralizada, recebendo-se o percolado que contém os ácidos orgânicos e açúcares, num frasco para ser conservado a 15°C. Num copo de 50 ml foi recebido o líquido de eluição da coluna que continha os aminoácidos, os quais foram retirados da resina mediante passagem de NH_4OH 3N, até reação positiva com a fenolftaleína, o que se conseguiu adicionando-se uns 20 ml de hidróxido.

O líquido contendo os aminoácidos foi evaporado à secar em banho de areia a 60°C. O conteúdo uma vez seco foi dissolvido em 1 ml de isopropanol 10%, ficando assim pronto para os estudos cromatográficos.

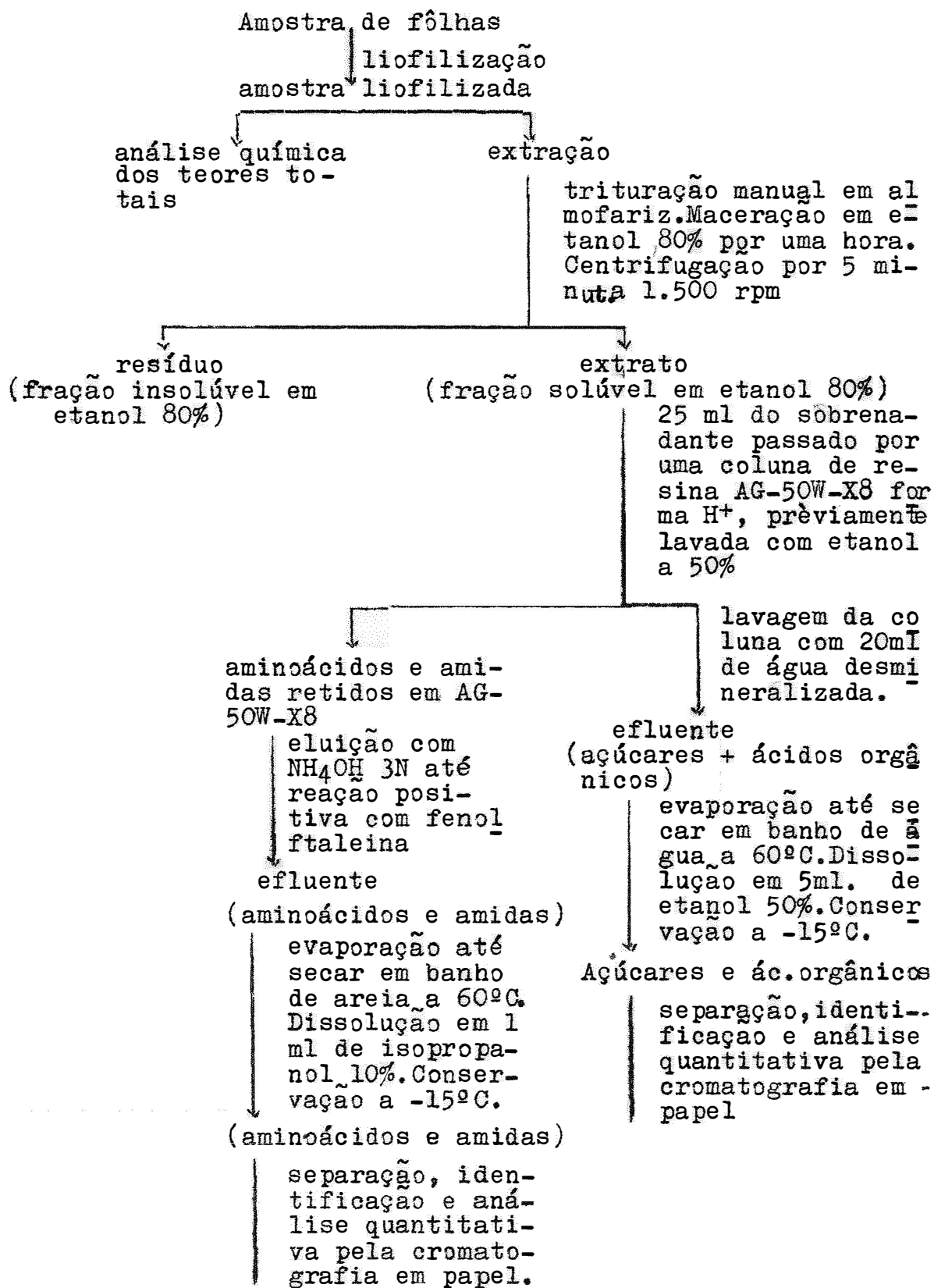
3.2.7. Tratamento da fração contendo ácidos orgânicos e açúcares - O líquido contendo os ácidos orgânicos e açúcares foi evaporado até secar em banho de água a 60°C com ajuda de corrente de ar purificado através de H_2SO_4 6N. O conteúdo, uma vez seco, dissolveu-se em 5 ml de etanol 50%, ficando pronto para as análises cromatográficas.

Esquemáticamente o processo foi o seguinte:(ver página 8).

3.3. Cromatografia em papel de filtro

3.3.1. Cromatografia dos aminoácidos livres

O procedimento seguido na análise cromatográfica qualitativa foi o de ARZOLLA & FONSECA(1966) e a identificação dos diversos aminoácidos foi feita pelo professor J.D.P.Arzolla da Cadeira nº 20 da ESALQ; para isso foram corridos cromatogramas com compostos puros (padrões), utilizando-se 10 microlitros de soluções 0,06 M em isopropanol 10% mais 1 ml de HCl 1N. Às vezes foram

Esquema

corridos padrões juntamente com os extratos no mesmo cromatograma.

Para a análise cromatográfica quantitativa, seguiu-se a técnica de ARZOLLA(1966,b), a qual sumariamente consiste em obter uma boa separação das manchas no cromatograma bidimensional-corrido com o extrato obtido em 3.2.6., usando-se papel de filtro Whatman nº 1 e fenol: água(80:20, p:v), como primeiro solvente e n-butanol:ácido acético:água (4:1:1, v:v:v) como segundo solvente. Revelar com ninhidrina a 0,5% em etanol a 95%. Nesta altura do processo foi feita uma pequena modificação, que consistiu em colocar no fundo de uma proveta de 500 ml, umas gôtas de etanol-95% a fim de provocar uma atmosfera saturada de álcool e logo introduzir nela o cromatograma pulverizado com ninhidrina, para evitar que o cromatograma se secasse antes de se dar a reação dos aminoácidos com a ninhidrina, como sugerem PORTER et al.(1957). A secagem do cromatograma foi feita em estufa a 70°C por 30 minutos. Cortadas as manchas dos aminoácidos, foram eluidas durante uma noite com uma solução tampão de fosfato pH 7,0 e feita a leitura no colorímetro a 570 milimicras de comprimento de onda(filtro verde) para a maioria dos aminoácidos. Fazia-se necessário correr em cada cromatograma um padrão de leucina e um padrão de asparagina. Para êste último ao fazer a leitura precisava-se usar filtro vermelho já que a sua côr com a ninhidrina era parda.

Na determinação quantitativa da prolina, a qual dá uma côr amarela com a ninhidrina, usou-se a isatina com a qual a prolina reage dando uma côr azul intensa num fundo côr de rosa; para isso seguiu-se o método tirado de ARZOLLA(1966,a) correndo-se um cromatograma unidirecional do extrato e padrão de prolina em butanol normal:ácido acético:água (4:1:1, v:v:v) como solvente. O cromatograma uma vez sêco ao ar foi mergulhado numa solução de: 0,5 gramas de isatina, 1,5 gramas de acetato de zinco, 1 ml de ácido acético, 95 ml de isopropanol, 5 ml de água e logo secado na estufa a 80°C por 30 minutos. Depois de sêco o papel foi lavado com água corrente até ficar branco, levada a mancha azul da prolina a tubo de colorímetro e feita a eluição com 5 ml de fenol saturado com água, deixando durante 15 minutos no escuro e agi-

tando os tubos por rotação cada 5 minutos. A transmissão foi lida no colorímetro com filtro vermelho(610 m μ).

3.3.2. Cromatografia dos ácidos orgânicos não voláteis

Para a análise cromatográfica qualitativa, foram experimentadas com o extrato obtido em 3.2.7., uma diversidade de misturas de solventes encontradas na literatura, sendo que a que melhores resultados deu foi a de n-butanol:ácido acético:água (4:1:5, v:v:v) tanto na cromatografia circular como na cromatografia descendente, ARZOLLA & VALENCIA(1967).

Foi experimentada uma grande série de reveladores recomendados para ácidos, como o azul de bromofenol e o verde de bromocresol de RODRIGUES(1962); anilina-xilose; iodeto-iodato de potássio; hidrocloreto de semicarbazida-dinitrofenilhidrazina; cloreto férrico, recomendados por BLOCK et al.(1958) e SMITH (1958); a cloramina-fenol vermelho e o azul de bromofenol que sugeridos por MERK(s.d.); nitrato de prata-azul de bromofenol de SMITH (1958) nitrato de prata amoniacal usado por BUSH(1952) e nenhum deles permitiu fixar as manchas correspondentes além de um ou dois minutos. O que conservou as manchas no cromatograma durante mais de 10 dias foi a pulverização com a seguinte mistura:40 miligramas de púrpura de bromocresol, 100 miligramas de ácido bórico, 100 ml de metanol, 7,5 ml de solução 1% de bórax. Esta mistura é recomendada por diversos autores para identificação e localização de açúcares e alcoois polihídricos: GARDNER(1955), HATHWAY(1956), BLOCK et al.(1958); foi primeiro proposta por Bradfield, em 1950, segundo GARDNER(1955); êste sugere que provavelmente forma-se um complexo entre o açúcar e o ácido bórico, dando origem a um ácido mais forte do que o ácido bórico isolado. No caso presente todos os padrões dos ácidos puros utilizados apareceram como manchas amarelas em fundo azul, tal como ocorre com os açúcares segundo os autores citados. De qualquer modo, a reação que aqui pode ocorrer não é bem conhecida e muito possivelmente acontece uma esterificação parcial dos ácidos.

Correndo-se o extrato obtido em 3.2.7. num cromatograma descendente juntamente com 10 microlitros de soluções padrões a 2% em acetona a 50%, logrou-se a identificação da maioria dos

ácidos orgânicos contidos na fôlha de café.

Para a análise cromatográfica quantitativa dos ácidos orgânicos foi seguido o processo seguinte, ver ARZOLLA & VALENCIA - (1967): uma vez identificados os ácidos conforme descrito, em cromatogramas descendentes correram-se extratos e mistura dos - padrões paralelamente e ao lado correu-se mais um extrato que serviria como guia; após sêco o cromatograma foi cortada a faixa correspondente à linha guia e revelada por separado como já foi dito; voltando dita faixa ao seu lugar de origem e sob luz-ultravioleta foram localizadas as posições dos ácidos nos outros extratos e dos padrões, pela posição das substâncias fluorescentes intercaladas entre os ácidos, sem necessidade de impurificação com indicadores. As áreas de papel assim assinaladas eram - cortadas para eluição durante meia hora com 5 ml de água a 60°C e descarbonatada, agitando-se por rotação suave para posterior - titulação com NaOH aproximadamente 0,002N e com fenol vermelho como indicador, preparado misturando-se 0,1 grama de indicador - com 0,1 ml de NaOH 0,05 N e completado o volume a 250 ml.

3.3.3. Análise cromatográfica dos açúcares

A análise cromatográfica qualitativa foi feita mediante - cromatografia monodirecional descendente, de acôrdo com a técnica descrita por FONSECA & ARZOLLA(1965) e por cromatografia circular em que se corriam junto ao extrato obtido em 3.2.7., 10 microlitros dos padrões 0,06 M em água destilada, utilizando a mistura n-butanol:ácido acético:água (4:1:0,5, v:v:v) como solvente; logrou-se a identificação dos açúcares presentes na fôlha de cafeeiro, revelando os cromatogramas após sêcos ao ar com a mistura de 1 ml de anilina, 1 grama de difenilamina, 100 ml de acetona, 1 ml de ácido fosfórico 85% e secagem na estufa a 100°C durante 5 minutos.

Entre os diversos métodos experimentados para a análise cromatográfica quantitativa, estão os de BLOCK et al.(1958), GARDNER (1955), HATHWAY(1956), PRIDHAM(1956) do cloridrato de p-anisidina, o de JOHANSON(1953) da antrona, o da difenilamina de BLOCK (1958); o que melhor funcionou foi o do cloreto de trifeniltetra

zolum o qual é reduzido pelos açúcares redutores dando o cloreto de trifenilformazan, composto insolúvel e de cor rosa intensa. O método, ver VALENCIA & ARZOLLA(1967), consiste do seguinte: mergulhar o cromatograma após seco ao ar, na mistura de 20 ml de cloreto de trifeniltetrazolium 2% em metanol, 30 grâmas de NaOH, 300 ml de metanol. Secar o cromatograma a 80° C durante 10 minutos: os açúcares dão uma cor de rosa intenso sobre um fundo de rosa pálido. Cortar o papel contendo as manchas dos açúcares dos extratos e dos padrões e um branco, todos do mesmo tamanho e fazer a eluição com metanol:ácido acético glacial (10:1:5,v:v) durante 10 minutos com agitação ocasional e ler no colorímetro usando filtro vermelho. Com este revelador, entretanto, não reagem a rafinose e a sacarose, já que não são redutores, razão pela qual não foram determinados quantitativamente.

4. RESULTADOS

Conforme foi dito em 3.2.2., as amostras compostas e liofilizadas, foram divididas em cinco sub-amostras (repetições), - nas quais realizaram-se tôdas as análises planejadas. Nas tabelas de resultados apresentadas em seguida encontram-se marcados com dois asteriscos (**) os valores das médias que, pelo teste de Tukey, diferiram significativamente ao nível de 1% de probabilidade, quando comparadas com o correspondente valor da testemunha, e com um asterisco (*) as que diferiam significativamente - ao nível de 5% de probabilidade.

4.1. Análise química dos teores totais

Na tabela 1 apresentam-se os dados médios dos teores totais nas cinco repetições, além da porcentagem de umidade nas amostras compostas.

Tabela 1. Valôr dos teores totais nas amostras dos diversos tratamentos (médias de 5 repetições).

Elemento	Tratamentos (deficiências minerais)						Testemunha
	Zinco	Boro	inicial de K	avançada de K	inicial de N	avançada de N	
Nitrogênio %	2,98	2,67**	2,90	2,71**	2,53**	2,27**	3,03
Fósforo %	0,163	0,117	0,133	0,148	0,147	0,145	0,132
Potássio %	1,92**	2,39	0,84**	0,62**	2,39	2,57	2,45
Cálcio %	0,78**	0,76**	1,10**	1,49**	0,82	0,83	0,83
Magnésio %	0,46**	0,27**	0,72**	0,90**	0,35**	0,33	0,32
Boro ppm	91*	63	117**	152**	110**	108**	76
Zinco ppm	20*	18**	24	22	24	26	26
% de umidade nas amostras.	57,45	33,33	61,25	62,79	57,14	63,63	70,50

** indica diferenças significativas ao nível 1% em relação a testemunha

* indica diferenças significativas ao nível 5% em relação à testemunha.

Nesta tabela pode-se verificar que na testemunha (normal) os teores de nitrogênio, potássio, boro e zinco, considerados como tratamentos neste trabalho, e os teores de fósforo, cálcio e magnésio, estão entre os níveis que para Coffea arabica consideram como normais diversos investigadores; veja-se MALAVOLTA(1965 a).

No caso dos tratamentos correspondentes a deficiência inicial e avançada, tanto de nitrogênio como de potássio, as diferenças dos teores em relação à testemunha foram altamente significativas; os teores dos elementos nos tratamentos correspondentes a deficiência avançada foram sempre menores do que os teores encontrados quando a deficiência era inicial.

A pesar de que o teor de boro no caso de deficiência tenha sido menor do que na testemunha, não houve diferenças significativas. No caso do teor de zinco, foi este menor a 5% de probabilidade em relação à testemunha; nas amostras do tratamento relativo à deficiência de boro, o teor de zinco foi menor ainda do que nas amostras correspondentes a deficiência neste elemento.

4.1.1. Análise da variância e teste de Tukey

Em continuação são apresentados os valores de "F" para tratamentos, os coeficientes de variação (C.V.) e as diferenças mínimas significativas (D.M.S.) aos níveis de 1% e de 5% de probabilidade para a comparação das médias dos teores totais pelo teste de Tukey, segundo PIMENTEL GOMES(1966), para $n=7$ e $n'=24$.

Tabela 2. Valores de "F" para tratamentos, coeficientes de variância (C.V.) e D.M.S. entre médias pelo teste de Tukey para $n=7$ e $n'=24$.

Elementos	F(tratamentos)	C.V.	D.M.S. pelo teste Tukey	
			1%	5%
Nitrogênio	32,91	3,85	0,22	0,18
Fósforo		17,86	0,05	0,04
Potássio	332,70	5,38	0,21	0,17
Cálcio	44,00	2,95	0,06	0,05
Magnésio	141,00	2,92	0,03	0,02
Boro	65,06	7,92	17,01	13,93
Zinco	4,19	14,93	7,12	5,83

F (tratamentos) 1% = 3,67
5% = 2,51

4.2. Análise cromatográfica dos aminoácidos livres

Na Tabela 3 apresentam-se os aminoácidos livres encontrados nas fôlhas de café nos diversos tratamentos; os dados são expressos como microgramas de nitrogênio por grama de material liofilizado.

Tabela 3. Microgramas de N por grama de material liofilizado. (Médias de 5 repetições)

Aminoácidos livres, solú- is em álcool	Tratamentos (deficiências minerais)						Test.
	Zinco	Boro	inicial de K	avanzada de K	inicial de N	avanzada de N	
do aspártico	7,78	11,78	10,97	11,01	7,30	12,26	10,66
do glutâmico	52,93	44,63	56,81	39,76	62,15	39,51	77,24
ina	11,97	12,99	14,89	10,33	14,51	22,19	14,52
cina	27,66	15,12	19,22	14,16	13,65	19,27	30,27
onina	11,62	15,74	16,29	12,15	18,71	26,87	16,69
nina	14,52	13,77	19,23	12,69	13,77	22,04	21,27
aragina	115,56 ⁵⁵	82,87 ⁵⁵	88,16 ⁵⁵	148,99 ⁵⁵	52,25	33,60 ⁵⁵	58,01
lina	79,58	106,41 ⁵⁵	92,87 ⁵⁵	72,54	56,65	31,65 ⁵⁵	64,12
tamina	8,18	3,04 ⁵⁵	6,04	6,74	3,36 ⁵⁵	6,63	9,21
osina	1,02	tr.	3,24	1,45	1,90(1)	7,53(1)	tr.
do gamma- nobotírico	2,50	3,12	3,44	3,75	2,38	4,33	2,51
ilalanina	0,91	1,36	0,89	2,98	tr.	4,71	tr.
ionina + ina	1,07(4)	3,45	2,09(3)	4,48	tr.	2,38(4)	0,95(2)
cina	1,41	3,32	2,35(3)	3,59	1,26(2)	2,49(2)	1,60(2)
leucina	tr.	tr.	1,38(1)	1,70(2)	tr.	tr.	tr.
do pipercolico	1,45	2,73	3,14	3,02(3)	0,48(1)	3,48(2)	1,30(2)
teína	0,65	0,66	0,48	1,10	0,73	4,97 ⁵⁵	0,72
stina	tr.	1,28(3)	tr.	tr.	tr.	4,39(4)	tr.
sina	2,00	0,94(2)	1,10(3)	0,78(1)	tr.	0,77(4)	0,98(3)
stidina	0,70(2)	0,93(1)	0,48(1)	0,63(1)	2,17(1)	2,11(4)	tr.
sinina	tr.	tr.	tr.	1,10(1)	tr.	1,29(1)	tr.
arulina	tr.	2,09(4)	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
totais	341,51	326,23	338,23	352,95	251,27	252,47	310,05

55 indica diferenças significativas ao nível de 1% em relação à testemunha
 55 indica diferenças significativas ao nível de 5% em relação a testemunha
 = menos de 0,20 microgramas de N no cromatograma
 o nº entre parentesis indica o número de repetições, diferente de cinco,
 em que o composto foi detectado.

4.2.1. Análise de variância e teste de Tukey

Em seguida apresentam-se os valores de "F" para tratamentos, os coeficientes de variação (C.V.) e as diferenças mínimas significativas (D.M.S.) entre médias pelo teste de Tukey com $n=7$ e $n'=24$. Esta análise só foi feita para os aminoácidos que foram encontrados nas cinco repetições de cada tratamento.

Tabela 4. Valores de F para tratamentos, coeficientes de variação e D.M.S. entre médias pelo teste de Tukey com $n=7$ e $n'=24$.

N-aminoácido	F (tratamentos)	C.V.	D.M.S. pelo teste de Tukey	
			1%	2%
ácido aspártico	0,59	54,99	11,84	9,69
ácido glutâmico	2,17	122,56	137,15	112,33
serina	1,29	51,28	15,61	12,78
glicina	1,71	56,97	23,80	19,49
treonina	2,38	43,74	15,50	12,69
alanina	1,03	51,94	18,28	14,97
asparagina	51,44	14,94	25,98	21,28
prolina	25,95	14,94	22,59	18,50
glutamina	5,23	36,29	4,70	3,85
ácido gamma-aminobutírico	1,11	49,62	3,28	2,69
fenilalanina	3,72	88,49	4,15	5,26
cisteína	3,50	145,19	4,06	3,32

F(tratamentos) 1%=3,67
5%=2,51

4.2.2. Nitrogênio amínico e amídico total e porcentagem dos aminoácidos em cada cromatograma.

Na tabela 5 apresentam-se o total de nitrogênio amínico e amídico e as porcentagens do nitrogênio dos aminoácidos sobre dito total para os compostos que atingiam valores individuais de mais de 4%, os dados apresentados são as médias das cinco repetições.

Na tabela 6 aparecem os valores de "F" para tratamentos,-

os coeficientes de variação (C.V.) e as diferenças mínimas significativas (D.M.S.) entre as médias para a sua comparação pelo teste de Tukey com $n=7$ e $n'=24$.

4.3. Análise cromatográfica dos ácidos orgânicos não voláteis.

Os dados médios dos teores de ácidos encontrados nas folhas de café são apresentados na tabela 7, expressos como microgramas de ácido por grama de material liofilizado.

Tabela 5. Total de N amínico e amídico e porcentagem dos aminoácidos em cada cromatograma (Dados médios de cinco repetições).

Aminoácidos	Tratamentos (deficiências minerais)						Testemunha
	Zinco	Boro	inicial de K	avançada de K	inicial de N	avançada de N	
Total de N amínico+amídico	339,65	323,80	339,62	349,12 ^{xx}	246,88 ^{xx}	237,80 ^{xx}	306,87
% ác. aspártico	2,20	3,51	3,18	3,07	2,96	4,73	3,43
% ác. glutárico	15,44	13,26 ^{xx}	16,73	11,43 ^{xx}	24,73	17,98	24,99
% serina	3,38	3,90	4,30	2,94	5,98	8,70 ^{xx}	4,68
% glicina	7,94	4,67	5,73	3,80 ^{xx}	5,41	7,48	9,92
% treonina	3,35	4,97	4,71	3,34	7,35	10,99 ^{xx}	5,45
% alanina	4,05	4,21	5,62	3,55 ^{xx}	5,39	8,43	6,96
% asparagina	34,09 ^{xx}	26,13	26,13	43,25 ^{xx}	21,57	15,15	19,00
% prolina	24,09	33,14 ^{xx}	27,40	20,91	23,55	14,57	20,95
% glutamina	2,44	0,92 ^{xx}	1,74 ^{xx}	1,89 ^{xx}	1,33 ^{xx}	2,38	3,01

^{xx} indica diferença significativa a 1% de probabilidade em relação à testemunha

^x indica diferença significativa a 5% de probabilidade em relação à testemunha.

Na separação cromatográfica lograda, encontraram-se três manchas de reação ácida com o indicador usado na localização dos ácidos, as quais não correspondiam a nenhum dos padrões de ácidos experimentados: cis-aconítico, α -ceto-glutárico, oxalo-acético, tartárico, fumárico, oxálico, málico, pirúvico, succínico, iso-

Tabela 6. Valores de F para tratamentos, coeficientes de variação (C.V.) e D.M.S. entre médias pelo teste de Tukey com $n=7$ e $n'=24$.

Aminoácidos	F		D.M.S. pelo teste de Tukey	
	(tratamentos)	C.V.	1%	5%
Total de N amínico+amídico	24,97	6,69	43,04	35,25
% ác. aspártico	1,41	43,55	3,02	2,47
% ác. glutâmico	4,16	32,59	12,17	9,97
% serina	3,80	46,55	4,73	3,88
% glicina	2,14	50,65	6,83	5,59
% treonina	7,63	37,93	4,57	3,74
% alanina	3,89	36,26	4,16	3,41
% asparagina	19,14	18,45	10,26	8,40
% prolina	8,23	1,92	9,48	7,77
% glutamina	7,30	30,05	1,24	1,01

F (tratamentos) 1%= 3,67
5%= 2,51

Tabela 7. Microgramas dos ácidos orgânicos não voláteis por grama de material liofilizado (Médias de cinco repetições)

Ácidos orgânicos não voláteis em etanol	Tratamentos (deficiências minerais)						Testemunha
	Zinco	Boro	inicial de K	avançada de K	inicial de N	avançada de N	
succínico	10,44 ^x	6,44	5,99	11,11 ^{xx}	14,55 ^{xx}	7,44	3,61
pirúvico	6,17	4,29	6,11	3,47	4,25	3,89	2,78
málico	5,90	3,91	17,61 ^{xx}	10,87	5,30	3,83	5,40
isocítrico	12,50 ^x	12,84 ^x	10,00	5,64	6,31	14,83 ^{xx}	5,71
cítrico	14,16	16,29	7,62	6,15	8,81	14,33	7,92

^{xx} indica diferença significativa ao 1% com relação à testemunha

^x indica diferença significativa ao 5% com relação à testemunha.

cítrico, cítrico.

Os Rf dêesses compostos em n-butanol:ácido acético:água (4:1:5, v:v:v) foram em cromatograma descendente: para o composto A, Rf=0,92; para o composto B, Rf=0,50; para o composto C, Rf=0,37. Estes valores não foi possível comparar com Rfs referidos na literatura porque a mistura de solventes empregada não foi nela encontrada. É bem possível que entre as substâncias referidas estejam o ácido clorogênico, o ácido cafeico ou algum álcool polihídrico. Não foram analisadas quantitativamente, já que era preciso correr padrões nas mesmas condições.

4.3.1. Análise de variância e teste de Tukey

Na tabela 8 apresentam-se os valores de F para tratamentos, os coeficientes de variação (C.V.) e as diferenças mínimas significativas (D.M.S.) para a composição das médias pelo teste de Tukey com n=7 e n'=24.

Tabela 8. Valores de F para tratamentos, coeficientes de variação (C.V.) e D.M.S. para a comparação das médias pelo teste de Tukey.

Ácidos orgânicos	F (tratamentos)	C.V.	D.M.S. pelo teste de Tukey	
			1%	5%
ác.succínico	5,51	41,55	7,43	6,09
ác. pirúvico	0,55	87,10	8,08	6,62
ác. málico	11,90	43,18	6,85	5,61
ác.isicítrico	5,84	36,53	7,43	6,09
ác.cítrico	1,07	89,12	20,11	16,48
F (tratamentos)			1%=3,67	5%=2,51

4.4. Análise cromatográfica dos açúcares

Os dados médios para os açúcares encontrados no material estudado, são apresentados na tabela 9, onde se encontram expressos como miligramas de açúcar por grama de material liofilizado.

Com os padrões utilizados na identificação dos açúcares: manose, glicose, rafinose, frutose, sacarose, ribose, xilose, D-ga-

lactose, arabinose, não foi possível identificar uma substância-reutora que apareceu em pequena quantidade em todos os extratos, com um Rf = 0,45 em n-butanol:ácido acético:água (4:1:0,5,v:v:v) descendente; é bem possível que se trate de um triholosídeo pelo seu grande deslocamento.

Tabela 9. Miligramas de açúcar por grama de material liofilizado (Dados médios das cinco repetições).

Açúcar	Tratamentos (deficiências minerais)						Testemunha
	inicial		avançada	inicial		avançada	
	Zinco	Boro de K	de K	de N	de N	de N	
frutose	9,55	9,54	10,16	11,10	8,94	7,20	8,64
glucose	8,37	11,30 ^{xx}	6,56 ^{xxx}	11,30 ^{xx}	7,49	7,38 ^{xx}	9,21
ribose	0,72(4)	1,85	2,53	1,55	1,10(4)	0,60(2)	1,31
sacarose	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.
rafinose	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.	tr.

xx indica diferenças significativas a 1% com relação à testemunha.

x indica diferenças significativas a 5% com relação à testemunha
tr. traços, indica que foram encontrados, mas não quantizados.

() o nº entre parentesis indica o número de repetições diferente de cinco em que o composto foi detectado.

4.4.1. Análise de variância e teste de Tukey

Na tabela 10 apresentam-se os valores de F obtidos para - tratamentos, os coeficientes de variação (C.V.) e as diferenças mínimas significativas (D.M.S.) para a comparação das médias pelo teste de Tukey com n=7 e n'=24.

4.5. Cálculo dos coeficientes de correlação

Apresentam-se neste item só aqueles coeficientes de correlação que atingiram níveis de significância, indicando-se com sinal (-) a correlação inversa. Apresentam-se também o número de - graus de liberdade e os valores de t calculados em cada caso, para o teste de significância de r, (tabela 11).

Tabela 10. Valôres de F para tratamentos, C.V. e D.M.S. para comparação das médias pelo teste de Tukey, com $n=7$ e $n'=24$. Para ribose $n=6$ e $n=15$.

Açúcar	F (tratamentos)	C.V.	D.M.S. pelo teste de Tukey	
			1%	5%
frutose	3,48	15,86	3,10	2,54
glucose	14,96	12,47	2,30	1,89
ribose	79,50	9,27	0,75	0,61

F (tratamentos)	1% = 3,67	F (para ribose)	1% = 4,22
	2% = 2,51		2% = 2,78

Tabela 11. Coeficientes de correlação(r), graus de liberdade (G.L.) e valores de "t" para o teste de significância de "r".

Deficiência X	Composto orgânico Y	G.L.	r	t
nitrogênio	asparagina	13	0,737	4,03
nitrogênio	serina	13	-0,438	1,78 ⁺
nitrogênio	prolina	13	0,860	6,16
nitrogênio	N amínico e amídico	13	0,562	2,47
nitrogênio	% de treonina	13	-0,597	2,73
potássio	% ácido glutâmico	13	0,703	3,62
potássio	% de glicina	13	0,655	3,19
potássio	% de glutamina	13	0,667	3,24
zinco	asparagina	8	-0,766	3,39
boro	asparagina	8	-0,787	3,60
boro	% de glutamina	8	0,832	4,20
boro	% de alanina	8	0,770	3,41
nitrogênio	ácido málico	13	0,513	2,18
nitrogênio	ácido isocítrico	13	-0,668	3,28
nitrogênio	ácido cítrico	13	-0,706	3,64
potássio	ácido succínico	13	-0,623	2,90
zinco	ácido pirúvico	8	-0,787	3,61
zinco	ácido cítrico	8	-0,648	2,40
boro	ácido succínico	8	-0,793	3,68
boro	ácido málico	8	0,744	3,16
boro	ácido isocítrico	8	-0,724	2,97
boro	ácido cítrico	8	-0,709	2,85
nitrogênio	glicose	13	0,781	4,60
potássio	frutose	13	-0,612	2,82
potássio	ribose	10	-0,544	2,04 ⁺
boro	glicose	8	-0,667	2,52

⁺ significativo ao nível de 10% de probabilidade

t (13 G.L.)	1% = 3,01	t (8 G.L.)	1% = 3,36
	5% = 2,16		5% = 2,31

5. DISCUSSÃO

5.1. Análise química dos teores totais

Da observação da tabela 1 apresentada entre os resultados, pode-se verificar que as análises químicas dos teores totais confirmaram a amostragem feita na base da sintomatologia visual de deficiências minerais para os diversos tratamentos estudados e que na amostra de fôlhas normais (testemunha), os teores dos elementos cáem entre os teores considerados por diversos autores como normais para Coffea arabica (veja-se MALAVOLTA, 1965a). Só no caso da amostra com sintomas de deficiência de boro o teor de zinco foi muito baixo também.

Verifica-se além disso a elevação dos teores de cálcio e magnésio nas amostras correspondentes aos tratamentos de deficiência de potássio, o que não é surpreendente, já que corresponde a um fato consagrado na literatura de nutrição de plantas.

Na amostra de fôlhas deficientes em zinco aparece um teor alto de magnésio e um teor baixo de potássio e cálcio. Na amostra correspondente à deficiência de boro os teores de cálcio e magnésio manifestam-se baixos. Nota-se nesta mesma amostra o teor baixo na porcentagem de umidade, o que era de se esperar, já que a deficiência de boro aparece mais severa na época da sêca, pela estreita relação entre o conteúdo de água no solo e a absorção de boro como é mostrado por VALENCIA (1964), época em que ocorre um balanço hídrico negativo para a planta.

5.2. Aminoácidos livres na fôlha de café

Na tabela 3, pode-se apreciar de modo geral que a prolina, a asparagina, o ácido glutâmico, a glicina, a alanina e a treonina são os aminoácidos e amidas presentes em quantidade maior nas fôlhas de café analisadas e que segundo os dados da tabela 5, os três primeiros representam entre 47% e 75% do total do nitrogênio determinado em cada cromatograma, nos tratamentos de deficiência de nitrogênio e de deficiência avançada de potássio respectivamente.

Para CARVAJAL & MACHICADO (1964) a maior porcentagem de nitrogênio solúvel na fôlha de café é devida à asparagina, ácido -

glutâmico e alanina; segundo Fargas, por êles citado, a maior concentração é a correspondente ao ácido glutâmico.

No teste de significância de "F" para tratamentos, só foram encontradas diferenças significativas para asparagina, prolina, glutamina e cisteína:

Asparagina: diminue com a deficiência inicial de nitrogênio e atinge uma diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade, em relação com a testemunha, na deficiência avançada, O coeficiente de correlação encontrado para nitrogênio-asparagina - (tabela 11) foi $r = 0,74$, significativo a 1%. Este resultado do efeito do nitrogênio concorda com MALAVOLTA et al. (1958), que encontraram aumento no teor de asparagina e de ácido glutâmico em fôlhas de café pulverizadas com uréia.

Seu conteúdo aumenta ao acentuar-se a deficiência de potássio, apresentando diferenças altamente significativas com a testemunha. As deficiências de zinco e de boro provocam uma acumulação deste composto, sendo que seus teores comparados com as da testemunha dão diferenças significativas a 1% e 5% de probabilidade - respectivamente, tendo-se encontrado valores de "r" negativos e significativos a 1% nos dois casos.

É possível que na diferença no conteúdo de asparagina devida a deficiência de zinco, tenha influência o teor baixo de potássio nêsse tratamento, o que não é observado no tratamento de deficiência de boro, pelo que parece possível atribuir ao boro um efeito similar ao do potássio nêste caso.

Prolina: o conteúdo de prolina aumenta por efeito da diminuição do teor de potássio na fôlha, assim como com a deficiência de boro. Pelo contrário, diminui ao acentuar-se a deficiência de nitrogênio, com um coeficiente de correlação "r" para nitrogênio-prolina, significativo a 1%. No comportamento da prolina, o efeito do boro e do potássio são muito similares,

Cisteína: A sua diferença com a testemunha foi altamente significativa no tratamento de deficiência avançada de nitrogênio, onde se encontrou uma acumulação.

Citrulina: É interessante observar o caso da citrulina que somente foi possível de determinar quantitativamente no tratamento

correspondente a deficiência de boro.

Histidina: neste caso, como no da citrulina, não foi feita análise estatística dos resultados; a concentração de histidina parece mostrar uma tendência a aumentar ao acentuar-se a deficiência de potássio.

Como é mostrado na tabela 4, na análise estatística do conteúdo de aminoácidos, existem valores muito elevados para os coeficientes de variação (C.V.); por isso, foi decidido expressar os aminoácidos como porcentagem do total de nitrogênio em cada cromatograma. Ao fazer a análise da variância para ditos compostos assim expressos, obtiveram-se diferenças significativas pelo teste de "F" para tratamentos, para o nitrogênio amínico e amídico total, ácido glutâmico, serina, glicina, treonina, alanina, asparagina, prolina e glutamina. Os coeficientes de variação assim encontrados (tabela 6) foram menores o que permite uma maior segurança na avaliação das diferenças atribuíveis aos tratamentos; por isso se considera que, neste tipo de estudos, é esta a maneira mais adequada na apresentação e avaliação dos dados obtidos, tendo-se em conta que cada cromatograma pode-se considerar como tendo condições particulares, pela dificuldade no controle rigoroso de todas as condições.

Nitrogênio amínico e amídico total: mostrou-se uma acumulação altamente significativa com a deficiência avançada de potássio e uma diminuição também significativa nos tratamentos de deficiência inicial e avançada de nitrogênio, com um valor de "r" significativo ao 5% para o caso do nitrogênio.

% de ácido glutâmico: foi significativamente menor ao nível 5% de probabilidade no tratamento correspondente à deficiência de boro e ao nível de 1% na deficiência avançada de potássio. A correlação "r" para potássio-% de ácido glutâmico foi significativa a 1%.

% de serina: aumenta significativamente seu conteúdo na deficiência avançada de nitrogênio.

% de glicina: mostrou ser menor e significativamente diferente da testemunha no tratamento correspondente à deficiência a-

vançada de potássio, com uma correlação significativa ao nível de 1%.

% de treonina: teve um coeficiente de correlação inversa (-r) com o nitrogênio foliar, significativo ao nível 5 %.

% de alanina: diminui ao acentuar-se a deficiência de potássio, diferindo significativamente ao nível 5% com a testemunha. Mostrou também uma correlação com o teor de boro na fôlha, significativa ao nível 1%.

% de asparagina: Não obstante aumentar significativamente com a diminuição do teor foliar de potássio e de zinco, não houve correlação significativa com os níveis desses elementos.

% de prolina: apresenta uma porcentagem maior e significativamente diferente da testemunha, no caso da deficiência de boro; a sua correlação não foi, porém, significativa.

% de glutamina: apresenta diferenças altamente significativas com a testemunha nos tratamentos de deficiência de potássio, de boro e de deficiência inicial de nitrogênio. A correlação (r) com o teor de potássio e com o teor de boro nas fôlhas foi significativa ao nível 1%.

5.3. Ácidos orgânicos não voláteis na fôlha de café

Nos dados apresentados na ^{3 3}tabela 7, vê-se que houve diferenças significativas devidas ao efeito de tratamentos para os ácidos succínico, málico e isocítrico.

Ácido succínico: todos os tratamentos mostraram uma quantidade maior do que na testemunha. Pelo teste de "t" para a significância dos coeficientes de correlação r (tabela 11), só foi encontrada significância para boro-ácido succínico ao nível de 1% e para potássio-ácido succínico ao nível de 5%.

Ácido pirúvico: suas quantidades não foram afetadas pelos tratamentos; com a deficiência de zinco ocorre um aumento no teor do ácido, com um coeficiente de correlação (-r) significativo ao nível 1%.

Ácido málico: diminui sua concentração ao diminuir o teor foliar de boro, com um valor de "r" significativo ao nível de

5%. Também diminuiu a sua quantidade com a diminuição do teor de nitrogênio na fôlha; o valor de "r" encontrado neste caso foi significativo ao nível de 5%.

Ácido isocítrico: encontrou-se correlação inversa (-r) entre os teores foliares de nitrogênio e de boro com este composto, sendo que no primeiro caso foi significativo a 1% e no segundo caso significativo a 5%.

Ácido cítrico: não se mostrou afetada a sua concentração nos diversos tratamentos de deficiência; encontrou-se um coeficiente de correlação inversa (-r) significativo a 1% com o teor de nitrogênio na fôlha; teve igualmente uma correlação inversa com o teor de boro e com o teor de zinco, significativo a 5% nestes dois casos.

5.4. Açúcares na fôlha de café

Entre os açúcares analisados, só no caso da glicose foram encontradas diferenças por efeito de tratamentos.

Glicose: encontrou-se que na deficiência de nitrogênio ocorre uma diminuição na concentração do açúcar, com um coeficiente de correlação significativo ao nível de 1%. Com o teor de boro, a glicose mostrou uma correlação inversa significativa ao nível 5%.

Frutose: foi encontrada uma correlação negativa e significativa a 5% entre os teores de potássio e de frutose nas fôlhas analisadas.

Ribose: a quantidade deste açúcar com o teor de potássio na fôlha, apresentou uma correlação inversa e significativa só a 10%.

5.5. Efeito dos tratamentos de deficiências minerais

Um dos métodos no estudo do papel de um elemento é a determinação da consequência da sua deficiência, o que às vezes dá informação suficiente para sugerir efeitos metabólicos; sendo assim, pode-se apresentar os efeitos significativos dos tratamentos de deficiências minerais nas amostras estudadas, no conteúdo

do de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares, da maneira seguinte.

5.5.1. Efeito das deficiências minerais no conteúdo de aminoácidos.

Deficiência de nitrogênio: provoca uma diminuição no teor de nitrogênio amínico e amídico total, no teor de asparagina, da prolina e da glutamina. Por outro lado, aumenta o conteúdo de cisteína, serina e treonina.

No caso da diminuição do teor de alguns compostos pela deficiência de nitrogênio, os resultados concordam com a maioria dos referidos na literatura e não é novidade, já que o nitrogênio é um constituinte dos aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, nucleotídeos e coenzimas entre outros compostos. Fargas, citado por CARVAJAL & MACHICADO(1964), fez um estudo com café da variedade caturra, em solução nutritiva e encontrou que a deficiência de nitrogênio causa uma diminuição dos teores de asparagina e da prolina; além disso, causa diminuição nas concentrações de ácido aspártico, ácido glutâmico, glutamina, ácido piperídico e uma queda altamente significativa na quantidade de nitrogênio total.

TSO et al.(1960,b) num trabalho com fumo em solução nutritiva encontrou o menor conteúdo de aminoácidos livres nas plantas com deficiência de nitrogênio. MALAVOLTA et al.(1958) também encontraram aumento no teor de asparagina em fôlhas de café pulverizadas com uréia. GIBBS(1966) refere que a síntese de glutamina é a resposta mais usual dos vegetais ao fornecimento de amônia.

O fato de ter-se encontrado aumento no teor de alguns aminoácidos, quando expressos como porcentagem do total do nitrogênio detectado em cada cromatograma, pode ser consequência da diminuição dêsse total, o que lógicamente faz aparecer certos compostos em quantidades relativamente maiores. Por outro lado, considerando os equilíbrios parciais proteína, aminoácido, WEBSTER (1959) diz existir evidência de que a ótima utilização de aminoácidos para a síntese de proteína exige a disponibilidade de todos os aminoácidos mais ou menos no mesmo tempo, já que a omissão de um ou mais dêles resulta em diminuição da formação de pro

teinas.

Por tanto, ante uma diminuição de certos aminoácidos, a síntese de proteínas deve diminuir e conseqüentemente podem aparecer quantidades relativas maiores de outros aminoácidos, pelo fato de que a incorporação dos aminoácidos da célula na fração proteica é limitada.

Deficiência de potássio: é causa de uma diminuição do ácido glutâmico, da glicina, da alanina e glutamina; provoca um aumento no teor de asparagina, de nitrogênio amínico e amídico total.

A diminuição de algumas frações, como ácido glutâmico e glutamina podem indicar uma transferência do nitrogênio para a utilização e síntese de outros aminoácidos, depois de convertidos a componentes do ciclo de Krebs. Segundo BEEVERS et al.(1966), o ácido glutâmico parece ser um ativo intermediário através do qual o nitrogênio pode ser distribuído a outros compostos nitrogenados da planta.

Gohlke, citado por TEEL(1962), encontrou uma estreita relação entre o conteúdo de potássio e alanina e diz que em vista da facilidade com a que a alanina se forma do piruvato, este aminoácido poderia acumular-se quando o trânsito de fosfoenolpiruvato a piruvato é normal, reação que exige a presença de K^+ .

Ora, a acumulação de umas frações pode ser conseqüência da diminuição de outras por reações de transaminação, desaminação ou descarboxilação como já foi referido; EVANS & SORGER(1966) entre os efeitos de deficiência de potássio, mencionam uma acumulação de aminoácidos e/o amidas em girassol, cana-de-açúcar, cevada, fumo, tomate e uma acumulação de nitrogênio orgânico solúvel em abacaxí.

Merece especial atenção a acumulação de asparagina como uma resposta à deficiência de potássio: TEEL(1962) considera a acumulação de asparagina como sendo um estado crítico da planta que se corrige com adições de potássio. Por sua vez, MACHICADO & BOYNTON(1961) trabalhando com cacau em solução nutritiva encontraram que a deficiência de potássio simples ou combinada provocava um notável aumento do nitrogênio total. Fargas, no seu es-

tudo já citado, refere ter encontrado alterações na concentração de alguns aminoácidos por efeito da deficiência de potássio, sem afetar, porém, o nitrogênio total.

Embora não concordem todos os resultados dos estudos referidos, podemos aceitar de acordo com EVANS & SORGER(1966), que o potássio possa atuar em diversos processos metabólicos, já que - se necessita em múltiplos sistemas enzimáticos envolvidos na síntese de vitaminas, cofatores, coenzimas que atuam na síntese de proteínas e que não é de surpreender, portanto, a acumulação de aminoácidos em órgãos deficientes em potássio.

WEBSTER(1959) confirma esta sugestão quando refere que Richards & Templeman em 1936 e Gregory & Sen em 1937 obtiveram - em deficiência de potássio, menor teor de proteína e consequentemente aumento dos teores de aminoácidos livres e amidas.

Deficiência de boro: de uma maneira geral, nota-se que as frações afetadas pela deficiência de boro o foram também pela deficiência de potássio. No tratamento de deficiência de boro, aumentaram os teores de asparagina, prolina e o total de nitrogênio amínico e amídico, embora só o aumento no teor de prolina fôsse significativo. Provocou também o aparecimento da citrulina em quantidades que permitiram a sua determinação quantitativa. Pela sua parte, diminuíram as concentrações de ácido glutâmico e glutamina.

Com relação à deficiência de boro, na literatura só foi - encontrado o trabalho já referido de TSO et al.(1960,a) em fumo; aí se refere uma acumulação de aminoácidos livres nas plantas - com deficiência de boro; entretanto, encontraram um alto teor de ácido glutâmico nas mesmas plantas, o que não coincide com os resultados aqui obtidos.

WEBSTER(1959) relata que deficiências de fosfato, ferro, enxôfre, boro e manganês provocam uma diminuição no teor de proteína e aumento no nível de aminoácidos em diversas plantas.

Embora o papel do boro na fisiologia das plantas não seja bem conhecido, sem se ter em conta o baixo teor de zinco na amostra estudada, parece com que o elemento desempenha um papel em parte semelhante ao do potássio, isto é, parece estar envolvido-

em diversos processos metabólicos.

Deficiência de zinco: só causou uma acumulação altamente - significativa de asparagina e um notável aumento no teor de nitrogênio amínico e amídico total.

Com relação ao zinco, o trabalho de RAMAIAH et al.(1964)- em cafeeiro, foi o único encontrado na literatura e nêle o autor-apresenta um aumento da maioria dos aminoácidos como consequência da deficiência de zinco em plantas adultas de café.

Como já foi dito, a amostra com sintomas de deficiência de boro tinha um nível muito baixo de zinco, sendo, portanto, bem possível que algum dos efeitos atribuídos a deficiência de boro sejam na realidade devidos à deficiência de zinco, elemento que é bom lembrar, é um constituinte essencial de diversas enzimas, veja-se EVANS & SORGER(1966). Tem-se demonstrado que, a enzima desidrogenase glutâmica, amplamente distribuída na natureza, contém zinco (CONN & STUMPF,1965).

5.5.2. Efeito das deficiências minerais no conteúdo de ácidos orgânicos.

Deficiência de nitrogênio: provoca um aumento no teor de ácido succínico.

Deficiência de potássio: induz um aumento no teor de ácido succínico e de ácido málico.

Deficiência de boro: leva a uma acumulação de ácido isocítrico.

Deficiência de zinco: provoca uma acumulação de ácido succínico e de ácido isocítrico.

Num estado feito com cafeeiro, CROCOMO(1959) encontrou uma elevação do teor dos ácidos detectados no cromatograma após a aplicação de uréia- C^{14} . No estudo já referido, de TSO et al.(1960, a), em relação aos ácidos orgânicos, entre os quais incluiu-se o ácido glutâmico e o ácido aspártico, verificou-se que: o ácido málico e o ácido glutâmico aumentam sua concentração quando há deficiência de boro; o teor de ácido cítrico diminui na deficiência de boro e na deficiência de potássio; a concentração total de ácidos orgânicos foi em ordem decrescente assim: deficiên-

cia de boro, deficiência de potássio, deficiência de nitrogênio. Esses autores não estudaram a deficiência de zinco.

Como se observa, os dados existentes não são adequados para permitir uma completa interpretação. BEEVERS et al. (1966) considera possível pensar que a acumulação de ácidos é o resultado de uma superprodução em diversos lugares ou que os ácidos foram produzidos e não utilizados. No entanto, estas sugestões devem ser consideradas de uma maneira muito geral, já que grandes quantidades de ácidos das plantas aumenta e desaparece durante as 24 horas do dia, acompanhando as variações de luz.

TELL (1962) em referência de Beevers et al., diz que o nível de ácidos orgânicos pode ser aumentado por desaminação oxidativa ou transaminação de aminoácidos e que a gênese de aminoácidos poderia reduzir o nível de ácidos orgânicos.

Do até aqui exposto, pode-se deduzir que os ácidos orgânicos são compostos menos sensíveis do que os aminoácidos na manifestação de alterações provocadas por deficiências minerais na planta.

5.5.3. Efeito das deficiências minerais no conteúdo de açúcares.

Deficiência de nitrogênio: provoca uma diminuição da concentração de glicose.

Deficiência de potássio: a deficiência inicial de potássio causa uma diminuição da glicose, a qual aumenta no tratamento de deficiência avançada de potássio.

Deficiência de boro: provoca um aumento do teor de glicose.

Deficiência de zinco: não altera os teores dos açúcares nas amostras estudadas.

Em relação com os açúcares, CROCOMO (1959) encontrou que nas folhas de plantas de café deficientes em nitrogênio não era detectada a presença de glicose, nem mesmo após a aplicação de uréia. EVANS & SORGER (1966), como já foi mencionado, referem entre os sintomas de deficiência de potássio, uma acumulação de açúcares redutores em tomate, cana-de-açúcar, girassol, trigo e borra-

cha e TSO et al.(1962,a) em fumo, encontraram a maior concentração de açúcares na testemunha e quantidades menores na deficiência de potássio, na deficiência de boro e na deficiência de nitrogênio.

Fazendo uma consideração geral das alterações provocadas pelas deficiências minerais estudadas e tendo como base o esquema da página 34, tirado de FOWDEN(1965) no qual representam-se as relações entre o metabolismo dos ácidos tricarbóxicos, a síntese e a interconversão de aminoácidos e amidas, tem-se:

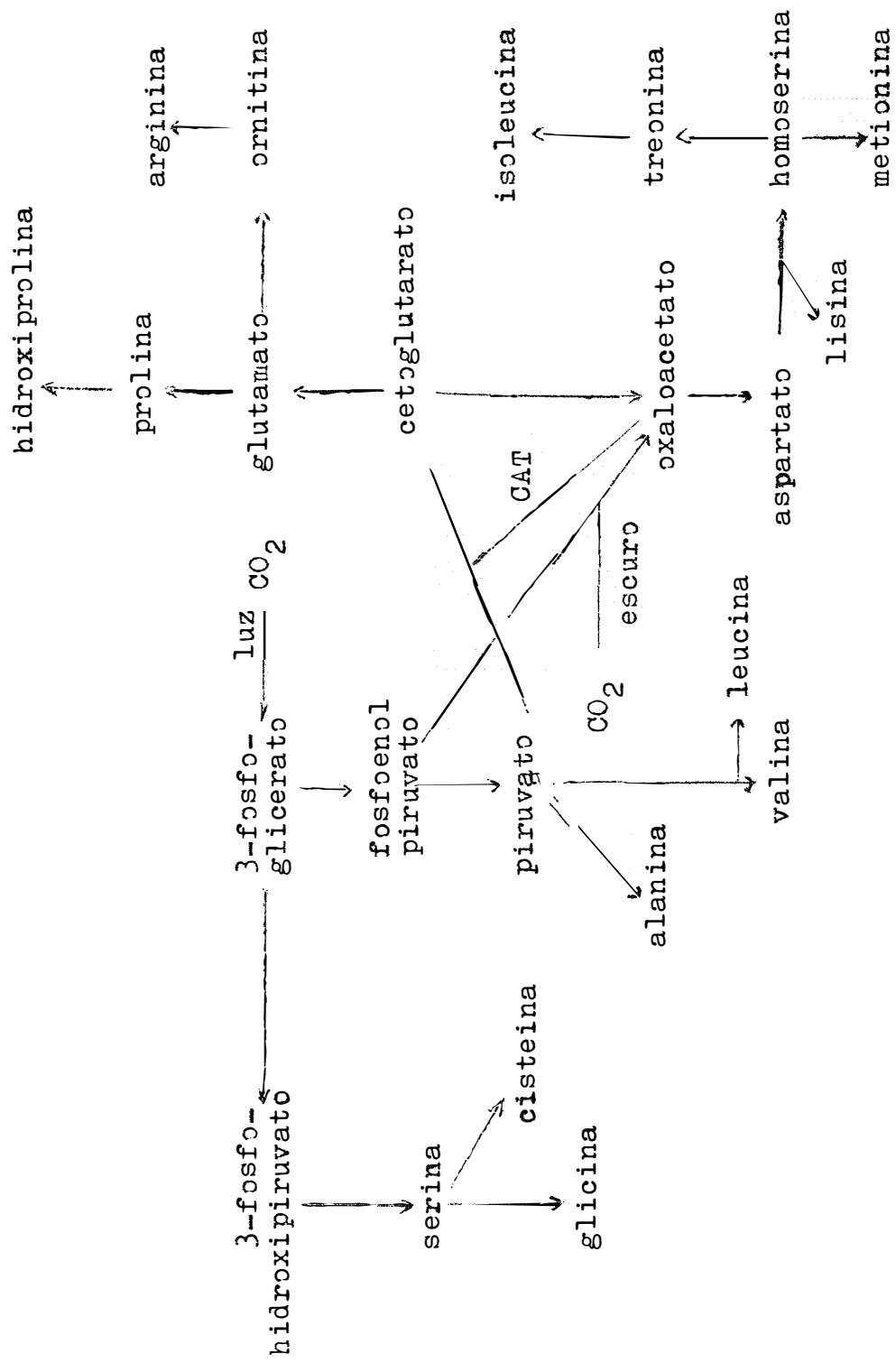
A acumulação de glicose e de frutose nos casos das deficiências de potássio e a acumulação de glucose na deficiência de boro, indicam claramente uma alteração no processo da glicólise; efetivamente, EVANS & SORGER(1966) referem que o potássio é requerido pela aldolase na conversão da frutose-1-6-difosfato a dihidroxiacetona-fosfato + gliceraldeido-3-fosfato em Saccharomyces cerivisie. É também possível que o boro tenha um papel parecido com o do potássio numa das reações da glicólise.

A diminuição do teor de glicose observada na deficiência de nitrogênio não é de surpreender, já que o nitrogênio forma parte de nucleotídeos, além de que a sua deficiência provoca alterações na forma, tamanho, cor e número dos cloroplastos, como foi observado por ACCORSI & HAAG(1959) em cafeeiro, e uma clorose ou amarelamento^x nas folhas, o que naturalmente tem que afetar o processo fotossintético e a produção de açúcares na planta.

As deficiências minerais nas amostras estudadas, só afetaram significativamente a concentração de alguns dos ácidos do ciclo de Krebs.

A deficiência de nitrogênio e a de zinco provocaram aumento significativo no teor dos ácidos succínico e isocítrico; na deficiência de potássio aumentaram os teores dos ácidos succínico e málico e na deficiência de boro aumentou o do ácido isocítrico. Aqui é interessante fazer salientar que nenhum dos tratamentos provocou diminuição significativa no teor dos ácidos analisados. De acôrdo com citação que de Bonner fazem BEEVERS et al.(1966), a acumulação de um ácido A do ciclo num tecido vege--

^x leia-se: amarelecimento



Relação entre metabolismo de ácidos carboxílicos e biossíntese de amino-ácidos e amidas. Tirado de FOWDEN(1965).

tal, significa que uma das reações do ciclo foi lenta ou bloqueada, e se o ciclo continuava operando simultaneamente com a acumulação do ácido A, deve-se tratar de uma reação linear independente entre o precursor e A, e tangencial ao ciclo.

No que diz respeito aos efeitos dos tratamentos sobre os aminoácidos, foi assinalada em 5.5.1. a notável influência da deficiência de nitrogênio na diminuição de importantes frações orgânicas nitrogenadas; a necessidade do potássio em reações de transaminação e em diversos sistemas enzimáticos envolvidos na síntese de proteínas; a influência do teor de boro na alteração da concentração normal de alguns aminoácidos, reações nas quais o zinco pode ter um importante papel, como constituinte que é de diversas enzimas.

Analisando a tabela dos coeficientes de correlação encontrados significativos neste trabalho, pode-se ver que os valores mais elevados de "r" corresponderam às seguintes relações:

nitrogênio com asparagina, prolina, ácido cítrico, glicose;
potássio com % de ácido glutâmico;
boro com asparagina, % de glutamina, ácido succínico;
zinco com ácido pirúvico.

Estas elevadas correlações poderão servir de base no planejamento de estudos sistemáticos para definir que tipos de compostos podem ter maior valor como critério para a utilização na diagnose precoce de deficiências pela análise foliar.

Com os dados obtidos, não é possível atribuir um papel metabólico definido aos elementos estudados, principalmente ao boro e ao zinco; o importante efeito deles na planta fica indicado claramente e a evidência final será possível de se conseguir em experimentos traçadores.

6. CONCLUSÕES

De conformidade com o até aqui exposto, é possível tirar as seguintes conclusões para as amostras estudadas:

a) Este estudo pode-se considerar como uma contribuição - que amplia o conhecimento sobre a composição da fôlha de café, além de ser mais uma utilização da análise foliar.

b) Sendo esta uma investigação básica, espera-se que os resultados e técnicas adotadas possam contribuir de alguma maneira para estudos posteriores com café e outras culturas tropicais, tendo aplicação em outras ciências agrônômicas.

c) Por meio da cromatografia é possível, de maneira simples, estudar a composição orgânica do vegetal e detectar pequenas alterações no metabolismo normal de uma planta.

d) Os compostos do metabolismo intermediário da planta, - tais como aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e açúcares são muito sensíveis a alterações da nutrição mineral normal, no que é preciso salientar o comportamento de alguns compostos, especialmente aminoácidos e amidas, como a asparagina, prolina, glutamina e ácido glutâmico.

e) A deficiência de nitrogênio provoca uma diminuição no teor de nitrogênio amínico e amídico total, no teor de asparagina, da prolina, da glutamina e da glicose e aumenta o conteúdo de cisteína, serina, treonina e ácido succínico nas fôlhas.

f) A deficiência de potássio é causa de uma diminuição no teor de ácido glutâmico, glicina, alanina e glutamina; provoca - um aumento no teor de asparagina, do nitrogênio amínico e amídico total, do ácido succínico e do ácido málico. Na deficiência inicial ocorre uma diminuição de glicose, a qual se acumula na deficiência avançada de potássio.

g) A deficiência de boro acusou um aumento especialmente da prolina, ácido isocítrico e glicose. A citrulina, que não havia sido possível de determinar quantitativamente nos outros tratamentos, apareceu neste caso em quantidades apreciáveis. Por ou

tro lado, diminuíram as concentrações de ácido glutâmico e de glutamina.

h) A deficiência de zinco causou aumentos na concentração de asparagina, de ácido succínico e de ácido isocítrico.

i) Foi demonstrada a notável influência que os elementos-nitrogênio, potássio, boro e zinco têm no metabolismo normal do cafeeiro.

j) Pelas altas correlações que apresentaram alguns dos compostos orgânicos com os elementos nutritivos estudados, vê-se a grande importância que podem ter ditos compostos em estudos sistemáticos de diagnose precoce de deficiências minerais.

7. RESUMO

O presente trabalho foi planejado com o fim de conhecer a composição mineral e orgânica da fôlha de café e as suas variações em relação com alterações na nutrição mineral e como uma aplicação adicional de diagnose pela análise foliar. Pela cromatografia em papel de filtro se estudaram os efeitos das deficiências de nitrogênio, de potássio, de boro e de zinco, selecionados pela sintomatologia visual apresentada, no conteúdo de aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares.

Os tratamentos foram:

fôlhas com sintomas de deficiência de zinco

fôlhas com sintomas de deficiência de boro

fôlhas com sintomas de deficiência inicial de nitrogênio

fôlhas com sintomas de deficiência avançada de nitrogênio

fôlhas com sintomas de deficiência inicial de potássio

fôlhas com sintomas de deficiência avançada de potássio

fôlhas normais (testemunha)

Nas repetições, em total de cinco, foram feitas as análises seguintes: análise química dos teores totais; análise cromatográfica qualitativa e quantitativa para aminoácidos, ácidos orgânicos e açúcares, com as correspondentes análises da variância; teste de Tukey para comparação das médias e análise de correlação.

Do extrato alcoólico obtido tratando as amostras com etanol 80% e moidas manualmente, foram separados os aminoácidos dos açúcares e ácidos orgânicos mediante passagem do extrato por uma coluna de 1,3 x 5,0 centímetros de resina AG-50W-X8 forma H⁺, que retém os aminoácidos e amidas, e da qual foram êles retirados mediante o uso de NH₄OH 3 N.

Na separação cromatográfica de aminoácidos mediante cromatografia bidirecional usou-se fenol:água (80:20 v:v) como primeiro solvente e n-butanol:ácido acético:água (4:1:1 v:v:v) como segundo solvente. Os cromatogramas após sêcos foram pulverizados com ninhidrina 0,5% em etanol 95%. Após a identificação, as manchas de cada aminoácido e os padrões de asparagina e leucina fo-

ram cortadas para eluição por uma noite com tampão de fosfato pH 7,0 para leitura da absorbância no colorímetro fotoelétrico. Na determinação da prolina, usou-se a reação com isatina em cromatogramas monodirecionais corridos com n-butanol:ácido acético:água (4:1:1 v:v:v). Os aminoácidos detectados foram: ácido aspártico, ácido glutâmico, serina, glicina, treonina, alanina, tirosina, ácido gamma aminobutírico, fenilalanina, metionina, valina, leucina, isoleucina, ácido piperídico, cisteína, cistina, lisina, histidina, arginina, citrulina, ou aminoácido prolina e as amidas glutamina e asparagina.

Na separação cromatográfica dos ácidos orgânicos, mediante cromatografia monodirecional descendente em n-butanol:ácido acético:água (4:1:5 v:v:v), usou-se a fração contendo os açúcares e ácidos orgânicos. Pelo método da linha guia cortada e revelada por separado e volta a sua posição original, na luz ultravioleta foram localizadas as posições dos ácidos nos outros extratos, com ajuda das substâncias fluorescentes intercaladas entre os ácidos. As áreas assim assinaladas foram cortas e eluidas com água a 60°C, descarbonatada, para titulação posterior com NaOH aproximadamente 0,002N e com fenol vermelho como indicador. Foram identificados os ácidos pirúvico, succínico, málico, isocítrico e cítrico e foram detectadas mais três manchas de reação ácida com o indicador as quais não foi possível identificar.

Na separação cromatográfica dos açúcares usou-se o sistema unidirecional descendente com n-butanol:ácido acético:água (4:1:0,5 v:v:v); para a identificação dos açúcares, os cromatogramas foram tratados com anilina-difenilamina-ácido fosfórico, o que permitiu constatar a presença de rafinose, sacarose, frutose, glicose, ribose e um outro açúcar que não foi possível identificar.

Para a determinação quantitativa dos açúcares foi usada a reação com o cloreto de trifeniltetrazolium, o qual é reduzido pelos açúcares a trifenilformazan. As manchas côr-de-rosa intenso dos açúcares e dos padrões, foram cortadas para eluição por dez minutos em metanol:ácido acético (10:1,5 v:v) e leitura da absorbância no colorímetro fotoelétrico. A sacarose e a rafinose não-

reagem com o composto usado, pelo que não foram analisados quantitativamente.

Os compostos orgânicos assim estudados, mostraram grande sensibilidade às alterações da nutrição mineral normal e foram encontrados coeficientes de correlação altamente significativos entre algumas das variáveis. Os efeitos dos tratamentos nas amostras analisadas podem ser resumidos da maneira seguinte:

A deficiência de nitrogênio provoca uma diminuição do teor de nitrogênio amínico e amídico total, do teor de asparagina, da prolina, da glutamina e da glicose, e um aumento do conteúdo de cisteína, serina, treonina e ácido succínico.

A deficiência de potássio, causa uma diminuição no teor de ácido glutâmico, da glicina, da alanina e provoca um aumento de asparagina e do nitrogênio amínico e amídico total, do ácido succínico e do ácido málico. Inicialmente ocorre uma diminuição do teor de glicose a qual se acumula na deficiência avançada de potássio.

A deficiência de boro acusa um aumento de prolina, citrulina, ácido isocítrico e glicose.

A deficiência de zinco ocasiona um aumento na concentração de asparagina, ácido succínico e ácido málico.

8. RESUMEN

El presente trabajo fué planeado con el fin de conocer la composición mineral y orgánica de la hoja de café y sus variaciones en relación con cambios en la nutrición mineral y como una aplicación adicional de diagnóstico por análisis foliar. Por cromatografía en papel de filtro se estudiaron los efectos de las deficiencias de nitrógeno, de potasio, de boro y de zinc, seleccionadas por la sintomatología visual presentada, en el contenido de aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares.

Los tratamientos fueron:

hojas con síntomas de deficiencia de zinc,
hojas con síntomas de deficiencia de boro,
hojas con síntomas de deficiencia inicial de nitrógeno,
hojas con síntomas de deficiencia avanzada de nitrógeno,
hojas con síntomas de deficiencia inicial de potasio,
hojas con síntomas de deficiencia avanzada de potasio,
hojas normales (testigo).

En las repeticiones en total de cinco, se hicieron los análisis siguientes: análisis de los tenores totales; análisis cromatográfica cualitativa y cuantitativa para aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares, con los correspondientes análisis de variación, prueba de Tukey para comparación de las medias y análisis de correlación.

Del extracto alcohólico obtenido tratando las muestras con etanol 80% después de molidas manualmente, se separaron los aminoácidos de los azúcares y ácidos orgánicos, pasando el extracto por una columna de 1,3 x 5,0 centímetros de resina AG-50W-X8 forma H⁺, la cual retiene los aminoácidos y amidas, e de la cual estos fueron retirados mediante el uso de NH₄OH 3 N.

En la separación cromatográfica de aminoácidos mediante cromatografía bidimensional usando fenol:agua (80:20 v:v) como primer solvente y n-butanol:ácido acético:agua (4:1:1 v:v:v) como segundo solvente. Los cromatogramas después de secos fueron asperjados con ninhidrina 0,5% en etanol 95%. Después de la identi-

ficación, las manchas de cada aminoácido y de los patrones de asparagina y leucina fueron cortadas para elución por una noche con tampón de fosfato pH 7,0 para leer la absorvancia en el colorímetro fotoeléctrico. En la determinación de la prolina, se usó la reacción con isatina en cromatogramas monodimensionales corridos con n-butanol:ácido acético:agua (4:1:1 v:v:v). Los aminoácidos detectados fueron: ácido aspártico, ácido glutámico, serina, glicina, treonina, alanina, tirosina, ácido gamma-aminobutírico, fenilalanina, metionina, valina, leucina, isoleucina, ácido piperídico, cisteína, cistina, lisina, histidina, arginina, citrulina, el aminoácido prolina y las amidas glutamina y asparagina.

En la separación cromatográfica de los ácidos orgánicos, mediante cromatografía monodimensional descendente con n-butanol:ácido acético:agua (4:1:5 v:v:v), se usó la fracción que contenía los azúcares y los ácidos orgánicos. Por el método de la línea guía cortada y revelada por separado e vuelta a su posición original, en la luz ultravioleta fueron localizadas las posiciones de los ácidos en los otros extractos, con la ayuda de las sustancias fluorescentes intercaladas entre los ácidos. Las áreas así señaladas fueron cortadas y eluidas con agua a 60°C, descarbonatada, para titulación posterior con NaOH aproximadamente 0,002N y con fenol rojo como indicador. Fueron identificados los ácidos pirúvico, succínico, málico, isocítrico y cítrico y fueron detectadas otras tres manchas de reacción ácida con el indicador, las que no fué posible identificar.

En la separación cromatográfica de los azúcares, se usó el sistema monodimensional descendente con n-butanol:ácido acético:agua (4:1:0,5 v:v:v); para la identificación de los azúcares, los cromatogramas fueron tratados con anilina-difenilamina-ácido fosfórico, lo que permitió identificar a presencia de rafinosa, sacarosa, fructosa, glucosa, ribosa y otro azúcar que no fué posible identificar.

Para la determinación cuantitativa de los azúcares fué usada la reacción con el cloruro de trifeniltetrazolium, el cual es reducido por los azúcares a trifenilformazan. Las manchas de color rosado intenso de los azúcares y de los patrones, fueron-

cortadas para eluir por diez minutos en metanol:ácido acético - (10:1,5 v:v) y lectura de la absorbancia en el colorímetro fotoelétrico. La sacarosa y la rafinosa no reaccionan con el compuesto usado, por lo cual no fueron analizados cuantitativamente.

Los compuestos orgánicos así estudiados, mostraron grande sensibilidad a los cambios en la nutrición mineral normal y fueron encontrados coeficientes de correlación altamente significativos entre algunas variables. Los efectos de los tratamientos en las muestras estudiadas pueden resumirse de la manera siguiente:

La deficiencia de nitrógeno provoca una disminución del tenor de nitrógeno amínico y amídico total, del tenor de asparagina, de la prolina, de la glutamina y de la glucosa y un aumento del contenido de cisteína, serina, treonina y ácido succínico.

La deficiencia de potasio, causa una disminución en el tenor de ácido glutámico, de la glicina, de la alanina y provoca un aumento de asparagina e de nitrógeno amínico y amídico total, del ácido succínico y del ácido málico. Inicialmente ocurre una disminución de la glucosa, la cual se acumula en la deficiencia avanzada de potasio.

La deficiencia de boro acusa un aumento de prolina, citrulina, ácido isocítrico y glucosa.

La deficiencia de zinc ocasiona un aumento en la concentración de asparagina, ácido succínico y ácido málico.

9. SUMMARY

The present work was carried out in order to study the organic composition of coffee leaves and their variation in relation to the mineral nutrition.

The effects of the deficiencies of nitrogen, potassium, boron and zinc on the contents of free aminoacids, organic acids and sugars was ascertained with the aid of paper chromatography.

The chemical analysis of the leaf material was carried out by conventional methods and it was observed that the chemical composition of the normal leaves (control) was approximately the same which was found by other research workers. It was observed that the treatment presenting weak and severe symptoms showed lower levels and significant differences when compared with the control one. In the treatments with boron and zinc deficiencies their concentrations were also lower than in the control.

The sample was ground by hand and from the alcoholic extract the aminoacids were separated from carbohydrates and organic acids by passing said extract through a resin column AG-50W-X8 (H^+ form) from which aminoacids and amides were removed with NH_4OH 3N.

For the chromatographic separation of aminoacids, phenol: water (80:20, v:v) as first solvent and n-butanol:acetic acid: water (4:1:1, v:v:v) as second solvent were used. The chromatograms were revealed with 0.5% ninhidrin in 95% ethanol. For the quantitative determination of proline the reaction with isatine was used. The amount of each compound was found by comparison with standards using the photoelectric colorimeter. The following aminoacids were found: aspartic acid, glutamic acid, serine, glycine, threonine, alanine, asparagine, proline, glutamine, tyrosine, gamma amino butiric acid, phenylalanine, methionine, valine, leucine, isoleucine, pipercolic acid, cysteine, lysine, histidine, arginine, citrulline.

For the chromatographic separation of organic acids the following mixture was used: n-butanol:acetic acid:water (4:1:5, v:v:v). By the method of strip guide cut out and revealed separately the position of organic acids was located in order to do the quantitative determination by titrating with NaOH 0,002 N - in the presence of phenol red as indicator. For qualitative analysis, the chromatograms were revealed by using a mixture of - bromocresol purple (40 mg), boric acid (100 mg), methanol(100ml) borax solution 1% (7.5 ml). Pyruvic acid, succinic acid, malic acid, isocitric acid and citric acid were identified.

N-butanol:acetic acid:water (4:1:0.5, v:v:v) was used - for the chromatographic separation of carbohydrates for the identification with aniline-diphenylamine-phosphoric acid. For the quantitative determination the reaction with triphenyltetrazolium chloride was used. Raffinose, sucrose, glucose, fructose and ribose were found.

The organic compounds showed a great variation in amounts found with the different mineral nutrition; significant correlations among some variables were observed.

The nitrogen deficient leaves showed in comparison with the control lower concentration of asparagine, proline, glutamine, glucose and of total amino and amide nitrogen. On the other hand, nitrogen deficient leaves presented more cysteine, threonine, serine and succinic acid than the normal leaves.

Potassium deficiency caused a decrease in glutamic acid, glycine, alanine and an increase in asparagine, total amino and amide nitrogen, succinic acid and malic acid. At the first step of the potassium deficiency it was found a decrease of the glucose level but when the symptoms were severe, deficient leaves showed higher concentration than the normal ones.

Boron deficiency increased the levels of proline, citrulline, isocitric acid and glucose.

Zinc deficiency increased the contents of asparagine, succinic acid and isocitric acid.

10. BIBLIOGRAFIA

- ACCORSI, W.R. & H.P. HAAG. 1959. Alterações morfológicas e citológicas do cafeeiro (Coffea arabica L., var. Bourbon (B. Rodr.) Choussy) cultivado em solução nutritiva decorrentes das deficiências e excessos dos macronutrientes - - Anais da ESALQ, XVI:17-36.
- AMORIM, H.V. de et al. 1965. Estudos sobre a alimentação mineral do cafeeiro. XVII. Efeito da adubação NPK na composição química do solo, do fruto e na qualidade da bebida (Nota preliminar). Anais da ESALQ, XXII:140-151.
- ARZOLLA, J.D.P. 1966a. Práticas de química orgânica e biológica - E.S.A. "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 120 págs. mimeografado.
- ARZOLLA, J.D.P. 1966b. Determinação cromatográfica quantitativa de aminoácidos. Em Práticas de Bioquímica Animal. ESALQ, USP, Piracicaba, S. Paulo, Brasil.
- ARZOLLA, J.D.P. & H. FONSECA. 1966. Cromatografia de aminoácidos. Boletim Didático nº 14, ESALQ, USP, Piracicaba, S. Paulo, Brasil, 54 págs.
- ARZOLLA, J.D.P. & A.G. VALENCIA. 1967. Análise cromatográfica - - quantitativa de ácidos orgânicos. Boletim Didático, - - ESALQ, USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil, Mimeografado, 8 págs.
- BEEVERS, H., M.L. STILLER & V.S. BUTT. 1966. Metabolism of the organic acids. In Plant Physiology, volume IVB:119-262. Ed. - by F.C. Steward. Academic Press. N. York, London. 599 p.
- BLOCK, R.J., E.L. DURRUM & G. ZWEIG. 1958. Paper Chromatography and Paper Electrophoresis. Second Edition. Academic Press, - New York and London, 710 p.
- BUCH, M.L., R. MONTGOMERY & W.L. PORTER. 1952. Identification of organic acids on paper chromatogram. An. Chem. 24:489-491.
- CAIN, J.C. 1956. Absorption and metabolism of urea by leaves of coffee, cacao and banana. Proc. Am. Soc. Hort. Sci. 67:279-286.
- CARVAJAL, J.F. & M. MACHICADO. 1964. El metabolismo del nitrógeno en las hojas del café durante la floración. Separado de Fitotecnia Latinoamericana 1(2):59-70.
- CONN, E.E. & P.K. STUMPF. 1965. Bioquímica Fundamental. Traducido por Anguera, O.A. y Yañez, R. Ed. Limusa-Wiley S.A. México. - 398 págs.

- CROCOMO, O.J. 1959. Estudo sôbre o metabolismo de uréia- C^{14} aplicada às fôlhas de cafeeiro (*Coffea arabica* L., var. Bourbon (B. Rodr.) Choussy) normal e deficiente em nitrogênio. - Tese, Piracicaba, 83 págs.
- EVANS, H.J. & G.J. SORGER. 1966. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations 47-76. In Ann. Rev. Plant Physiol. 17:525 págs.
- FONSECA, H. & J.D.P. ARZOLLA. 1965. Cromatografia de açúcares. Boletim Didático nº 7. ESALQ, USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. 19 págs.
- FOWDEN, L. 1965. Origins of the amino acids. Chap. 16:361-390. In Plant Biochemistry. Ed. by Bonner & Varner. Academic Press, New York and London. 1054 págs.
- GARDNER, K.J. 1955. Use of acid-base indicator for quantitative paper chromatography of sugars. Nature 176:929-930.
- GIBBS, M. 1966. Carbohydrates: Their Role in Plant Metabolism and Nutrition. Chap. five 3-115. In Plant Physiology. - volume IVB. Ed. by F.C. Steward. Academic Press. 599 págs.
- GLÓRIA, N.A. da, R.A. CATANI & T. MATUO. 1965. Determinação de cálcio e magnésio em plantas, pelo método do EDTA. Anais da ESALQ, USP, XXII:154-171.
- HATHWAY, D.E. 1956. Amino-acids, Fruit acids and Polyols of Myrobalans. Biochem. J. 63:380-387.
- JOHANSON, R. 1953. New Specific reagent for ceto-sugars. Nature-172(4386):172-173.
- MACHICADO, M. & D. BOYNTON. 1961. El Efecto de las Deficiencias de potasio, calcio y magnesio sobre los constituyentes intermediarios de nitrógeno en las hojas de cacao. Turrialba 11(4):133-137.
- MALAVOLTA, E. et al. 1958. Nota sôbre aplicação de uréia em pulverização no cafeeiro. Rev. Agric. 32(4):223-226.
- MALAVOLTA, E. et al. 1962. On the Mineral Nutrition of some Tropical Crops. Ed. by International Potash Institute, Bern (Switzerland). 155 págs.
- MALAVOLTA, E. 1965a. Nutrição do Cafeeiro. Cap. VII:159-206. Em - Cultura e Adubação do Cafeeiro. 2a. Ed., Instituto Brasileiro de Potassa. São Paulo, Brasil. 277 págs.
- MALAVOLTA, E. 1965b. Deficiências Mineraias (V). Curso de Fitopatologia para Graduados. INTA. Castelar. Buenos Aires. Argentina, 51 págs.

- MERCK, E. AG. (s.d.) Chromatography. Second Ed., E. Merck, AG. Darmstadt. 185 págs.
- OLIVEIRA, J. dos SANTOS. 1962. Subsídios para o Estudo do Metabolismo Azotado. Estudos Agronômicos 3(1):39-51.
- OWENS, R. G. & H. N. SPECHT. 1966. Biochemical Alterations Induced by Host Tissues by Root-knot nematodes. Contrib. Boyce - Thompson Inst. 23(5):181-198.
- PIMENTEL GOMES, F. et al. 1965. Estudos sôbre a alimentação do cafeeiro, XIV. Efeitos da Adubação Mineral e Orgânica na produção e na composição das fôlhas. Anais da ESALQ, USP, XXII:118-129.
- PIMENTEL GOMES, F. 1966. Curso de Estatística Experimental, 3ª Ed. (ampliada). ESALQ, USP, Piracicaba, São Paulo, Brasil. 404 - págs. 15 tabelas.
- PORTER, A. C., D. MORGOLIS & P. SHARP. 1957. Quantitative determination of aminoacids by paper chromatography. Contrib. Boyce Thompson Inst. 18:465-476.
- PRIDHAM, J. B. 1956. Determination of sugars on paper chromatograms with p-anisidina hydrochlorida. Anal. Chem. 28(12): - 1967-1968.
- RAMAIAH, P. K., M. V. K. RAO & N. G. CHOKKANNA. 1964. Zinc deficiency - and the aminoacids of coffee leaves (Coffea arabica L.) Turrialba 14(3):136-139.
- RODRIGUEZ, M. E. 1962. Análisis cromatográfico de ácidos orgánicos en hojas de Taraxacum koksaghyz (Rod.). Boletín del Instituto Nac. de Invest. Agron. Madrid. XXII(46).123-131.
- ROMBERGER, J. A. 1960. A Suggested Method for fractionation of - Plant Extracts. Pacific Southwest Forest and Range exp. - Stat. Berkeley. California U.S. Dep. of Agric. Forest Service. 16 págs.
- SELMAN, I. W., et al. 1961. Changes in the Free Amino Acids and Amides in Tomato Plants Inoculated with Tomato Spotted with Virus. The Ann. Appl. Biol. 49(4):601-615.
- SMITH, I. 1958. Chromatographic Techniques. William Heinemann. Medical Books Ltd. London. Interscience Publishers, Inc. New York. 309 págs.
- TEEL, M. R. 1962. Nitrogen-potassium relationships and biochemical intermediates in Grass Herbage. Soil Sci. 93(1):50-55.

