

ISÔMEROS DE ÁCIDOS CLOROGÊNICOS EM GRÃOS DE CAFÉ ORIGINADOS DE DIFERENTES ARRANJOS DE PLANTIO¹

Maria Brígida dos Santos Scholz²; Cintia Sorane Good Kitzberger³; Noel Durand⁴; Miroslava Rakocevic⁵

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento do Café – Consórcio Pesquisa Café, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Agropolis Fondation - França

²Pesquisadora, PhD, IAPAR, Londrina-PR, mbscholz@iapar.br

³Agente de Ciência e Tecnologia, DSc, IAPAR, Londrina-PR, cintia_kitzberger@iapar.br

⁴Pesquisador, DSc, CIRAD, Montpellier, França, noel.durand@cirad.fr

⁵Pesquisadora visitante, DSc, IAPAR, Londrina-PR, miroslava@iapar.br

RESUMO: Vários compostos do fruto do café contribuem para a formação dos atributos sensoriais da bebida do café e entre estes estão os isômeros dos ácidos clorogênicos (ACG). O objetivo deste estudo foi avaliar a formação de isômeros de ACG em grãos originados nos diferentes estratos de perfil vertical de plantas da cultivar IAPAR 59. As plantas foram cultivadas em duas altas densidades (6000 e 10000 plantas ha⁻¹) com a distribuição retangular (6AR e 10AR) e quadrangular (6AQ e 10AQ). Grãos foram coletados na safra de 2011 de três estratos de 40 cm em cada densidade e arranjo. Os principais isômeros dos ácidos clorogênicos (ACQ, AFQ e diACQ) foram determinados por cromatografia líquida de ultra desempenho (UFLC). Os tratamentos de menor densidade (6AQ e 6AR) apresentaram menor índice de área foliar, o que sugere menor autossombreamento do que em 10AQ e 10 AR. Em 6AQ e 6AR foram observadas maior concentração de ACG, dos seus isômeros e menor relação entre ACQ/diACQ, indicando menor grau de maturação para estes frutos. Com o uso de ANOVA identificou-se grande variabilidade na concentração dos diversos isômeros nos estratos de todos os tratamentos estudados. A análise de componentes principais mostrou que os grãos de estrato inferior dos tratamentos 10AQ e 10AR apresentam baixos níveis de 5-ACQ e situação inversa foi observada nos seus estratos superiores. Os estratos dos tratamentos 6AQ e 6AR foram associados a elevados níveis de todos os isômeros de ACG. Neste estudo foi possível observar a influência de ambientes microclimáticos na concentração de ACG. A densidade de plantas influenciou a variabilidade na concentração de isômeros de ACG nos estratos de cada tipo de arranjo. Nos estratos inferiores (auto-sombreados) de cafeeiros, de ambas altas densidades estudadas, encontraram-se menores concentrações de ACG comparadas com os estratos superiores, o que mostra o impacto de radiação incidente na qualidade de frutos verdes.

PALAVRAS-CHAVE: *Coffea arabica*, 5-ACQ, densidade de plantas, UFLC.

ISOMERS OF CHLOROGENIC ACIDS IN COFFEE BEANS ORIGINATED ON DIFFERENT ARRANGEMENTS OF PLANTATION

ABSTRACT: Various compounds found in green coffee grains contribute to the formation of the sensory attributes of the coffee beverage; among them are the isomers of chlorogenic acids (CGA). The aim of this study was to evaluate the formation of isomers of CGA in coffee beans originated on different strata of the vertical plant profile of the cultivar IAPAR 59. The plants were grown in two high plant densities (6000 and 10000 plants ha⁻¹) under rectangular (6AR and 10AR) and quadrant (6AQ and 10AQ) space distributions. Coffee beans were collected in 2011 from three strata of 40 cm in all studied plant densities and arrangements. The main isomers of chlorogenic acid (CQA, FQA and diCQA) were determined by ultra performance liquid chromatography. The plant cultivated under lower plant density (6AQ and 6AR) formed lower leaf area index, suggesting lower self-shading that when grown under 10AQ e 10 AR. In lower plant density (6AQ e 6AR) were recorded the higher concentrations of CGA, their isomers and lower CQA/diCQA ratio, which indicates the reduced degree of bean maturation. The use of ANOVA identified the great variability in concentration of diverse isomers in strata of all studied treatments. The principal component analysis showed that coffee beans originated from the inferior stratum of 10AQ and 10AR treatments had the lowest concentrations of 5-CQA, while the inverse situation occurred in their upper strata. The strata of 6AQ and 6AR treatments were associated to high levels of all CGA isomers. This study showed the impact of microenvironment on CQA concentration. Plant density influenced the concentration variability of CQA isomers in all plant strata of each type of arrangement. In the lower and self-shading coffee layers, of both high plant densities, the decreased concentrations of ACG were found when compared to the upper strata, which shows the impact of the incident radiation on the quality of green fruits.

KEY-WORDS: *Coffea arabica*, 5-CQA, plant density.

INTRODUÇÃO

O café é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo, devido principalmente ao seu efeito estimulante conferido pela cafeína. Porém, atributos sensoriais de aroma e sabor esta bebida são requisitos imprescindível para aumentar e manter o consumo. Durante a torrefação são formados inúmeros compostos voláteis, que em conjunto, são os responsáveis pelos atributos sensoriais da bebida (Moon & Shibamoto, 2009; Bertrand et al., 2012). A caracterização destes compostos voláteis é tarefa de difícil execução, sendo normalmente buscada a correlação entre compostos do grão verde e a presença dos atributos na bebida. Os ácidos clorogênicos (ACG) estão entre os vários precursores dos atributos sensoriais. Estes ácidos são os principais compostos fenólicos e se acumulam durante as diversas fases de desenvolvimento do grão do café. Eles são formados, principalmente, pela esterificação do ácido quínico com o ácido cafeico, ferúlico ou p-cumárico e são encontrados na forma de uma série de ésteres. Os principais grupos de ácidos clorogênicos são os cafeoilquínicos (ACQ), os feruloilquínicos (AFQ) e os dicafeoilquínicos (diACQ). Na espécie café arábica (*Coffea arabica*), os ACG compreendem cerca de 8% do fruto maduro e seco. Fatores como espécie de cafeeiro (Koshiro et al., 2007), cultivar (Farah et al., 2006; Malta et al., 2009), estágio de maturação (Koshiro et al., 2007) e processos de pós colheita (Duarte et al., 2010; Joët et al., 2010b) têm forte influência na concentração dos ácidos clorogênicos no grão de café. Mostrou-se que os fatores ambientais, tais como temperatura, podem influenciar a concentração de ácidos clorogênicos. Encontrou-se relação positiva e significativa entre a concentração de ácidos clorogênicos e a altitudes sem, no entanto descrever, se esta relação se deve as condições de solo e clima ou a gradiente de temperatura (Bertrand et al., 2006). Estudos de Joët et al. (2010a) mostraram que as condições climáticas predominantes de cultivo atuam diretamente nas vias de biossíntese dos isômeros. Foi ainda encontrada correlação positiva e significativa entre a temperatura e a formação dos isômeros 3-cafeoilquínico (3-ACQ) e o 4-cafeoilquínico (4-ACQ), enquanto o isômero 5-cafeoilquínico (5-ACQ), o qual corresponde a 70-80% do total de ACG no café, apresentou comportamento inverso. A relação entre a concentração de ACQ e diACQ é indicador de grão de maturação e da qualidade do café, independente da cultivar de café (Joët et al., 2010; Koshiro et al., 2007). Os ACG estão relacionados às características sensoriais de bebida café, principalmente de adstringente, ácido e amargo da bebida. Os isômeros 3,4-dicafeoilquínico (3,4-diACQ) e 3,5-dicafeoilquínico (3,5-diACQ) estão associados a menor qualidade da bebida do café (Moreira et al., 2001). A hipótese deste trabalho foi de que as condições ambientais tais como variações de radiação dentro de dossel de cafeeiros, podem influenciar a modificações de conteúdo de ACG. A formação e distribuição de área foliar, além da distribuição da interceptação de luz dentro de dossel, podem variar com a densidade e arranjo de plantio de cafeeiros arábica (Rakocevic & Androcioli-Filho, 2010). Baseado nisso, o objetivo deste estudo foi avaliar a formação de ACG em grãos originados nos diferentes estratos de perfil vertical de plantas da cultivar IAPAR 59, plantadas em arranjos retangulares e quadrangulares em duas altas densidades de plantas.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento com cultivar IAPAR 59 foi plantado em 1995, nos campos experimentais do IAPAR, Londrina - PR. As plantas foram cultivadas em duas densidades (6000 e 10000 plantas ha⁻¹) com a distribuição retangular (6AR e 10AR) e quadrangular (6AQ e 10AQ). Cada tratamento possuía três repetições (parcelas) e as plantas apresentaram no máximo, três estratos de 40 cm em cada dossel. As avaliações do índice de área foliar (LAI) e de área foliar por uma planta (AF) foram calculadas a partir de fotografias hemisféricas tomadas no dossel de cafeeiros, com o uso de LI-COR 2000. Adaptou-se um procedimento de seqüência de dez fotografias para cada avaliação de LAI. O procedimento foi o seguinte: primeira fotografia em cima do dossel, a segunda fotografia no Norte – em baixo da copa em 10 cm do tronco, a terceira no Norte – em baixo da copa em 50 cm do tronco, a quarta no Sul – em baixo da copa em 10 cm de tronco e assim por diante até a décima fotografia – em cima do dossel. Nesta observação foram avaliadas nove plantas por cada tratamento. Medições com LICOR 2000 foram aplicadas com sucesso em cultura de cafeeiros, aceitando que a sub e superestimação podem ser maior do que 10% (Angelocci et al., 2008). Foram coletados todos os frutos que se encontravam maduros em duas colheitas, ocorrendo uma no início de maio e outra em junho de 2011. A quantidade amostrada foi variável, dependendo da produção de cada parcela. Nas amostras colhidas foram separados os grãos verdes que, ocasionalmente, foram colhidos juntos com os maduros. Após a separação, as amostras foram colocadas em caixas teladas e levadas ao sol durante o período necessário para atingir 12% de umidade. As amostras foram beneficiadas para remoção da casca e pergaminho. Para as determinações dos isômeros, os grãos verdes foram congelados com nitrogênio líquido e foram moídos em moinho discos Perten 3100. Após a moagem as amostras foram mantidas congeladas em -18°C e foram descongeladas imediatamente antes das análises químicas.

Determinação dos isômeros de ácidos clorogênicos

Os diversos isômeros dos ácidos clorogênicos foram separados e identificados por UPLC e quantificados por detector UV. Inicialmente cerca de 1 g de café verde, adicionada de 80 mL de metanol 70% e 0,5 mL de ácido acético glacial foi agitada durante 16h ao abrigo da luz. Após este período a solução foi diluída e filtrada através de membrana hidrofílica. A determinação dos isômeros foi realizada por cromatografia líquida de ultra desempenho (UFLC), da marca Shimadzu, acoplado ao auto amostrador SIL 20A, bomba LC 20AB e detector SPD - UV-VIS em 327 nm. Foi empregada pressão

de 257 bar e a vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/minuto. A separação dos isômeros foi feita em uma coluna de fase reversa Lichrospher Merck (USA), de 25 cm de comprimento, diâmetro interno de 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm com temperatura de 30 °C. Foram empregada a fases móvel de metanol 70%(p/p) e ácido ortofosfórico 4 mM, com gradiente descrito na Tabela 1. A quantificação do ácido 5-ACQ foi feita através da comparação da área do pico da solução padrão, preparada com padrão de isômeros do ácido clorogênico dissolvido em metanol 70%. Os demais isômeros foram calculados pela comparação da sua área com a área do 5-ACQ.

Tabela 1. Gradiente de fase móvel para a separação de ácidos orgânicos.

Tempo da corrida (min)	0	35	40	45	50	55
Metanol 70%	5	75	100	100	5	5
Ácido ortofosfórico (4mM)	95	25	0	0	95	95

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O LAI estimado antes de colheita de frutos mostra grande diferença entre os dois arranjos com altas densidades de plantio (Fig. 1), apresentando valor significativamente maior para 10000 comparado com 6000 plantas ha⁻¹. Entretanto, a AF média por uma planta não se diferenciou entre os tratamentos (Fig. 1), o que mostra que o cultivo ainda não atingiu a grande competição pelos recursos. Também, pode se deduzir que a radiação solar que atinge as camadas médias e inferiores de plantas com 6000 plantas ha⁻¹ terá menos de obstáculos foliares no caminho e poderá apresentar valores maiores do que na densidade de 10000 plantas ha⁻¹.

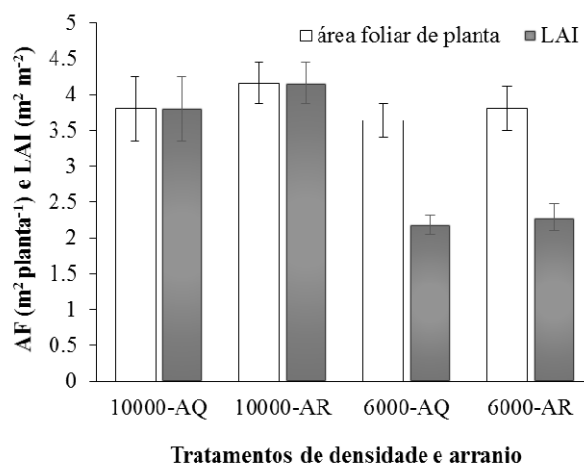


Fig. 1. Área foliar (AF) e índice de área foliar (LAI) estimadas para os cafeeiros adensados (10000 e 6000 plantas ha⁻¹) em arranjos quadrado (AQ) e retangular (AR).

Inicialmente, os resultados dos três estratos foram reunidos e as somas dos isômeros para os diferentes tratamentos estão apresentados na Tabela 2. Entre os tratamentos estudados, notou-se que aqueles com menor número de plantas e com menor área foliar (6AQ e 6AR) apresentaram maior concentração de ACG (8,50 e 8,27% respectivamente) e de ACQ (6,73 e 6,58%, respectivamente). Os isômeros feruloilquínicos (AFQ) foram encontrados em menores concentrações no arranjo 6AR. Os isômeros diACQ apresentaram comportamento similar dos isômeros de ACQ (Tabela 2). As maiores concentrações foram encontradas nos arranjos de menor densidade (6AQ e 6AR). A relação entre ACQ/diACQ é indicadora de grau de maturação de café: quanto maior o valor, mais maduros são os frutos. Nota-se então, que os frutos dos arranjos mais densos estão mais maduros que os frutos do outro arranjo.

Tabela 2. Soma dos ácidos clorogênicos e dos isômeros nos diferentes arranjos e densidades.

	SOMA DOS ISÔMEROS (%)				
	ACG	ACQ	AFQ	diACQ	ACQ/diACQ
10AQ	8,08b	6,47b	0,41ab	1,19c	5,41a
10AR	8,10b	6,46b	0,39bc	1,25bc	5,20ab
6AQ	8,50a	6,73a	0,42a	1,35a	5,05b
6AR	8,27a	6,58a	0,38c	1,32ab	5,01b

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p>0,05).

ACG: ácidos clorogênicos; ACQ: cafeoilquínicos; AFQ: feruloilquínicos; diACQ: dicafeoilquínicos.

Na Tabela 3 encontram-se os valores médios dos principais isômeros nos tratamentos. Nesta análise observou-se que a densidade de planta influenciou significativamente na concentração dos isômeros 3-ACQ e 4,5-ADCQ. Os tratamentos com menor densidade (6AQ e 6AR) apresentaram maiores valores (Tabela 3) destes isômeros comparados com alta densidade de plantio (10AQ e 10AR).

Tabela 3. Valores médios dos isômeros nos tratamentos.

	Isômeros de Ácidos clorogênicos (%)					
	3-ACQ	5-ACQ	4-ACQ	5-AFQ	3,4-diACQ	4,5-diACQ
10AQ	0,48b	5,29ab	0,70c	0,41 ab	0,79b	0,40b
10AR	0,51b	5,22b	0,73bc	0,39bc	0,82ab	0,42b
6AQ	0,55a	5,40a	0,78a	0,42a	0,88a	0,47a
6AR	0,54a	5,26ab	0,77ab	0,38c	0,85ab	0,46a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p > 0,05$).

3-ACQ: 3-cafeoilquínico; 5-ACQ: 5-cafeoilquínico; 4-ACQ: 4-cafeoilquínico; 5-AFQ: 5-feruloilquínico; 3,4-diACQ: 3,5-dicafeoilquínico; 4,5-diACQ: 4,5-dicafeoilquínico.

A concentração dos demais isômeros foi influenciada tanto pelo número de plantas como pelo tipo de arranjo. Os tratamentos 6AQ e 10AR diferiram significativamente na concentração de 5-ACQ e 3-ACQ, apresentando respectivamente 5,22 e 5,40% para o isômero 5-ACQ e 0,51 e 0,55% para o isômero 3-ACQ (Tabela 3). Nos tratamentos com menor número de plantas (6AQ e 6AR) observaram-se menores concentrações de 4-ACQ e 4,5-ADCQ. Na sequência foi avaliada a evolução da concentração dos isômeros nos diferentes estratos da planta (Tabela 4), onde a análise de variância mostrou grande variabilidade de comportamento dos isômeros nos estratos dos tratamentos, não sendo possível identificar um comportamento definido para a formação dos isômeros em cada um dos estratos.

Tabela 4. Valores médios dos isômeros nos estratos (1 - inferior, mais perto do solo, 2 - mediano, 3 - superior) de cada tratamento (10000 e 6000 plantas ha⁻¹ em arranjos quadrado - Q e retangular - R).

Tratamento e estrato	Isômeros de Ácidos clorogênicos (%)					
	3-ACQ	5-ACQ	4-ACQ	5-AFQ	3,4diACQ	4,5-diACQ
10AQ-1	0,49cd	5,21abc	0,72c	0,43a	0,86ab	0,43cd
10AQ-2	0,47d	5,18abc	0,70c	0,40ab	0,80ab	0,41cd
10AQ-3	0,46d	5,48ab	0,70c	0,40ab	0,72b	0,37d
10AR-1	0,51bcd	5,14bc	0,74bc	0,39ab	0,86ab	0,42cd
10AR-2	0,50bcd	5,15acbc	0,72bc	0,38ab	0,84ab	0,42cd
10AR-3	0,51bcd	5,38ab	0,74abc	0,39ab	0,78ab	0,42cd
6AQ-1	0,53abc	5,38ab	0,76abc	0,43a	0,86ab	0,46abc
6AQ-2	0,56ab	5,49a	0,79abc	0,43a	0,91a	0,50ab
6AQ-3	0,55bc	5,35ab	0,78abc	0,40ab	0,85ab	0,47abc
6AR-1	0,52bcd	4,90c	0,73bc	0,37b	0,87a	0,44bcd
6AR-2	0,59a	5,44ab	0,82a	0,42ab	0,89a	0,52ab
6AR-3	0,52bcd	5,44ab	0,75abc	0,35ab	0,79ab	0,44abcd

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($p > 0,05$).

3-ACQ: 3-cafeoilquínico; 5-ACQ: 5-cafeoilquínico; 4-ACQ: 4-cafeoilquínico; 5-AFQ: 5-feruloilquínico; 3,4-diACQ: 3,5-dicafeoilquínico; 4,5-diACQ: 4,5-dicafeoilquínico.

A separação tratamentos (Fig. 2) em função dos isômeros do ACG mostrou que a maioria das amostras dos arranjos com plantas em densidade menor estão localizados a direita do biplot e estão associados a altos valores de todos os isômeros. Os tratamentos com maior número de plantas (10AQ e 10AR) estão à esquerda e apresenta menores valores de concentração dos isômeros.

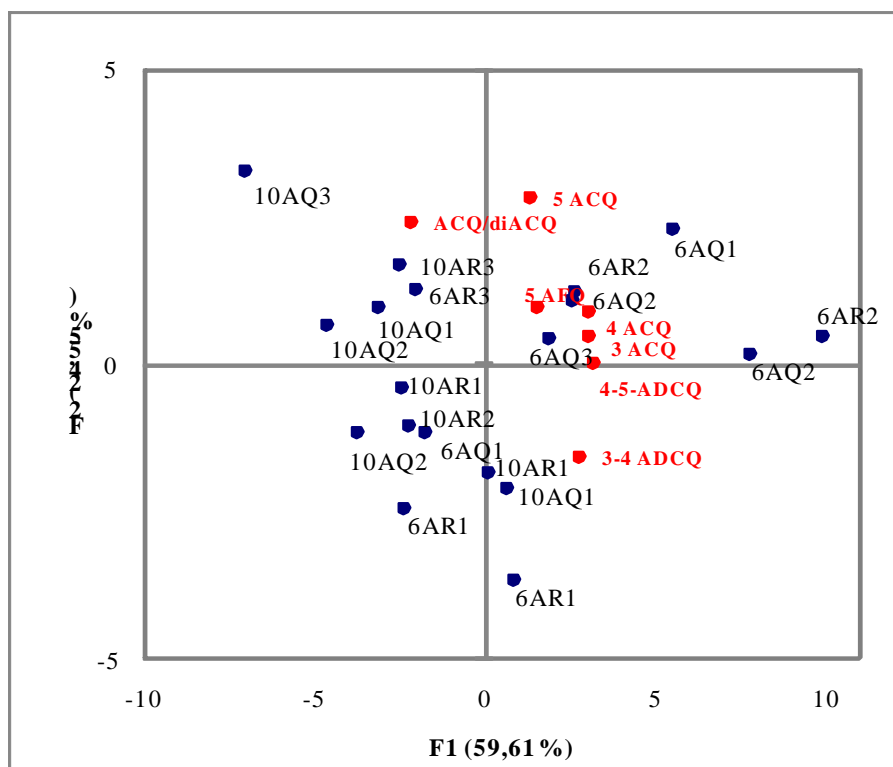


Fig. 2. Biplot dos tratamentos e isômeros de ácidos clorogênicos

Os frutos situados à esquerda da Fig. 2 (10AQ, 10AR, 6AR1 e 6AQ1) apresentaram menor concentração de todos os isômeros. Porém, as repetições do 10AR1 e do 10AQ1 apresentaram valores mais elevados de todos os isômeros indicando menor uniformidade de composição nesta densidade de plantas. Os estratos que produziram frutos de composição compatível com boa qualidade de bebida são aqueles posicionados na parte inferior da Fig. 2. Estes frutos apresentam baixos níveis de 5-ACQ e de diACQ, sugerindo que estes frutos são maduros devido ao baixo teor de destes compostos. Ao contrário, os frutos dos estratos superiores dos 10AQ e 10AR apresentaram teores elevados destes isômeros. Nos tratamentos 6AQ e 6AR, além do elevado nível de 5-ACQ, observa-se também uma elevação de todos os isômeros. No café verde os teores de 5-ACQ, 5-AFQ e o 3,5-diACQ estão correlacionados positivamente com a menor qualidade da bebida, enquanto que os valores do 3,4-diACQ se correlacionam positivamente com café de melhor qualidade (Farah et al., 2006). É importante identificar este comportamento diferenciado dos isômeros porque cada um, mesmo em pequena quantidade, tem efeito significativo sobre a qualidade da bebida. Portanto, pode-se observar que mistura de frutos de estratos diferentes durante a colheita terá impacto na qualidade da bebida.

CONCLUSÕES

- O ambiente microclimático proporcionado em função da densidade e arranjo do cultivo afetou o conteúdo dos isômeros de ACG em grãos verdes de café arábica.
- A densidade de plantas influenciou a variabilidade de isômeros de ACG nos estratos de cada tipo de arranjo.
- Nos estratos inferiores e auto-sombreados de cafeeiros, de ambas as altas densidades estudadas, encontraram-se menores concentrações de ACG comparadas com os estratos superiores, o que mostra o impacto de radiação incidente na qualidade de frutos verdes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELOCCI, L. R.; MARIN, F.R.; PILAU, F.G., RIGHI, E.Z.; FAVARIN, J.L. Radiation balance of coffee hedge rows. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 12, n. 3, p. 274-281, 2008.
- BERTRAND, B.; BOULANGER, R.; DUSSERT, S.; RIBEYRE, F.; BERTHIOT, L.; DESCROIX, F.; JOËT, T. Climatic factors directly impact the volatile organic compound fingerprint in green Arabica coffee bean as well as coffee beverage quality. *Food Chemistry*, v. 135, n. 4, p.2575-2583, 2012.
- DUARTE, G.S.; ANTÔNIO A.; PEREIRA, A. A.; FARAH, A. Chlorogenic acids and other relevant compounds in Brazilian coffees processed by semi-dry and wet post-harvesting methods. *Food Chemistry*, v. 118, n. 3, p. 851-855, 2010.

- FARAH, A.; PAULIS, T.; MOREIRA, D.P.; TRUGO, L.C., MARTIN, P.R. Chlorogenic acids and lactones in regular and water-decaffeinated arabica coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, n. 2, p.374-381, 2006.
- FARAH, A.; PAULIS, T.; TRUGO, L. C.; MARTIN, P. R. Effect of f roasting on the formation of chlorogenic acids lactones in roasted coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.3 p.1505–1513, 2005.
- JÖET, T.; SALMONA, J.; LAFFARGUE,A.; DESCROIX, F.; DUSSERT,S. Use of the growing environment as a source of variation to identify the quantitative trait transcripts and modules of co-expressed genes that determine chlorogenic acid accumulation. *Plant, Cell and Environment*, v.33, n. 7, p. 1220-1233, 2010a.
- JÖET, T.; LAFFARGE, A.; DESCROIX, F.; DOULBEAU, S.; BERTRAND, B.; KOCHKO, A.; DUSSERT, S. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green coffee beans. *Food Chemistry*, v.118, n.3, p.693-701, 2010b.
- KOSHIRO, Y.; JACKSON, M.C.; KATAHIRA,R.; WANG,M.L.; NAGAI,C.; ASHIHARA,H. Biosynthesis of chlorogenic acids in growing and ripening fruits of *Coffea arabica* and *Coffea canephora* plants. *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C. A. Journal of Biosciences*, v.62, n. 9-10, p.731-742, 2007.
- MOON, J.K.; SHIBAMOTO, T. Role of roasting conditions in the profile of volatile flavor chemicals formed from coffee beans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 13, p. 5823–5831, 2009.
- MALTA, M.R.; CHAGAS, S.J.R. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. *Acta Scientiarum.Agronomy*, v. 31, n. 1, p. 57-61, 2009.
- MOREIRA, R.F.; TRUGO, L.C.; DE MARIA, C.A; MATOS, A.G.; SANTOS, S. M.; LEITE J. M. Discrimination of Brazilian arabica green coffee samples by chlorogenic acid composition. *Archives of Latinoamerican Nutrition*, v. 51. n. 1, p.95-99, 2001.
- RAKOCEVIC, M.; ANDROCIOLI-FILHO, A. Morphophysiological characteristics of *Coffea arabica* L. in different arrangements: lessons from a 3d virtual plant approach. *Coffee Science*, v. 5, n. 2, p. 147-166, 2010.