



JOYCE ALVES GOULART DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS RELACIONADOS À RESPOSTA
DE DEFESA DO CAFEIEIRO CONTRA
Pseudomonas syringae pv. *garcae***

**LAVRAS - MG
2015**

JOYCE ALVES GOULART DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
RELACIONADOS À RESPOSTA DE DEFESA DO CAFEIEIRO CONTRA
Pseudomonas syringae pv. *garcae***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende

**LAVRAS - MG
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio (a) autor (a).

Silva, Joyce Alves Goulart da.

Quantificação de metabólitos secundários relacionados à
resposta de defesa do cafeeiro contra *Pseudomonas syringae* pv.
garcae / Joyce Alves Goulart da Silva. – Lavras: UFLA, 2015.
111 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador (a): Mário Lúcio Vilela de Resende.

Bibliografia.

1. Metabolismo. 2. Coffea arábica. 3. Resistência. 4.
Inoculação. 5. Compostos fenólicos. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

JOYCE ALVES GOULART DA SILVA

**QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS
RELACIONADOS À RESPOSTA DE DEFESA DO CAFEIEIRO CONTRA
Pseudomonas syringae pv. *garcae***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área da concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2015.

Dra. Maria das Graças Cardoso UFLA

Dr. Ricardo Magela de Souza UFLA

Dr. Luíz Roberto Marques Albuquerque UFLA

Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS – MG
2015**

DEDICO

À minha mãe Salomé, que esteve comigo em todos os momentos e foi e sempre
será meu alicerce e minha força pra persistir.

E mesmo diante de tantas dificuldades, como a perda precoce do meu pai Ailton,
se mantém firme como meu porto seguro.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde e força para realizar mais esta etapa em minha vida.

A Nossa Senhora, minha protetora, que sempre intercede a Deus por mim.

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao programa de Pós-Graduação em Fitopatologia pela oportunidade de realização do mestrado, a FAPEMIG pela concessão de bolsa de estudos e ao INCT-Café por financiar a realização deste trabalho.

Ao professor Mário Lúcio Vilela de Resende, pela orientação, amizade e confiança.

Aos pós-doutorandos Luíz, Adriene e Ingridy, peças fundamentais na realização deste trabalho.

À minha mãe e minha irmã, sempre um porto.

Aos membros da banca, por aceitarem o convite de participar e pelas valiosas sugestões.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, pelos ensinamentos.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela agradável convivência.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: Deila, Ana Cristina, Stefanny, Bruno, Manoel, Sandra, Kátia, Paula, Ingridy, Dário, Moízes, Ariana, Camila Lage, Camila Carvalho, Vitor, Alexandre, Lucas, Roberto, Rossiane, Alexandre Vidal e Túlio pela convivência e auxílio nos ensaios. Meu agradecimento especial ao Pedro, pelas orientações, ensinamentos e paciência no tempo que ainda estava conosco, à Stefanny e Camila pela ajuda com o experimento de casa de vegetação, à Deila por sua fundamental contribuição com a estatística e à Ingridy pela colaboração com as correções.

Meu agradecimento especial a todas as pessoas cujos nomes não foram citados, mas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

A mancha aureolada do cafeeiro, causada pela bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, é uma doença emergente na cafeicultura, para a qual tem se buscado selecionar cultivares resistentes e estudar seus respectivos mecanismos de defesa. Neste trabalho teve-se como objetivo estudar a composição química das folhas das cultivares IAPAR-59 e Mundo Novo 376/4 parcialmente resistente e suscetível, respectivamente, à mancha aureolada do cafeeiro. Para isso foram produzidos extratos aquosos das folhas de cafeeiro e investigada a composição química e atividade biológica destes. Foram quantificados os sólidos solúveis totais, teor de fenólicos e flavonoides totais e perfil de fenólicos, além da atividade antioxidante pelos métodos do DPPH e FRAP. A atividade antibacteriana e a bioautografia foram realizadas, para se verificar a eficácia dos extratos sobre a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* e o fungo revelador *Cladosporium* sp, respectivamente. Foi possível verificar que folhas da cultivar IAPAR-59 apresentaram maior teor de compostos fenólicos, flavonoides e sólidos solúveis que folhas da cultivar Mundo Novo 376/4. Com relação à atividade antioxidante, IAPAR-59 apresentou maior potencial de sequestro de radicais livres pelo método do DPPH. Os extratos das duas cultivares não apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* contra *P. syringae* pv. *garcae* e ambos apresentaram compostos capazes de inibir o crescimento do fungo *Cladosporium* sp. Outros experimentos foram realizados objetivando avaliar extratos, preparados com diferentes solventes, provenientes de folhas de IAPAR-59, com e sem inoculação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Foi possível verificar que as folhas de cafeeiro da cultivar IAPAR-59 sadias apresentaram maior teor de compostos fenólicos e açúcares redutores. Para a atividade antioxidante, no método do DPPH a fração água apresentou a maior atividade, independente da inoculação. Pelo método do FRAP, a fração água das plantas sadias apresentou maior atividade. No teste fungitóxico, ambas apresentaram compostos capazes de inibir o crescimento do fungo *Cladosporium* sp. Foi possível quantificar na composição química das plantas sem inoculação os ácidos gálico, cafeico e clorogênico, além da vanilina. A cultivar IAPAR-59 inoculada apresentou maior concentração desses compostos e foi detectada ainda a presença de um fenilpropanoide, o ácido trans-cinâmico. A síntese desses compostos pode ter ocorrido em resposta ao ataque do patógeno.

Palavras-chave: Metabolismo. *Coffea arábica*. Resistência. Inoculação. Compostos fenólicos. Antioxidante.

ABSTRACT

The bacterial blight of coffee, caused by the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, is an emerging disease in coffee, to which has been sought select resistant cultivars and study their defense mechanisms. In this work had as objective to study the chemical composition of leaves from IAPAR-59 and *Mundo Novo* 376/4 cultivars, partially resistant and susceptible, respectively, to bacterial blight of coffee. To this aqueous extracts were produced from coffee leaves and investigated the chemical composition and biological activity of these. The total soluble solids were quantified phenolic content and total flavonoids and phenolic profile, in addition to the antioxidant activity by DPPH and FRAP methods. The antibacterial activity and bioautographic were performed in order to verify the effectiveness of extracts on the bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* and the developer fungus *Cladosporium* sp, respectively. It was possible to verify that leaves of cultivar IAPAR-59 had higher content of phenolic compounds, flavonoids and soluble solids that the leaves from *Mundo Novo* 376/4. Regarding the antioxidant activity, IAPAR-59 showed greater potential to scavenging free radicals by DPPH method. The extracts of both cultivars showed no antibacterial activity *in vitro* against *P. syringae* pv. *garcae* and both had compounds capable of inhibiting fungal growth *Cladosporium* sp. Further experiments were performed to evaluate extracts prepared with different solvents, from leaves IAPAR-59, with and without inoculation of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. It was possible to verify that coffee leaves from IAPAR-59 healthy had higher content of phenolic compounds and reducing sugars. For the antioxidant activity in DPPH method the water fraction showed the highest activity, regardless inoculation. By the FRAP method, the water fraction of healthy plants showed a greater activity. In the fungitoxic test, both showed compounds capable to inhibit the growth of fungus *Cladosporium* sp. It was possible to quantify in the chemical composition of non-inoculated plants the gallic acid, chlorogenic and caffeic, besides vanillin. The IAPAR-59 inoculated showed a higher concentration of these compounds and was also detected the presence of a phenylpropanoid, the acid trans- cinnamic. The synthesis of these compounds may have occurred in response to pathogen attack.

Keywords: Metabolism. *Coffea Arabica*. Resistance. Inoculation.
Phenolic compounds. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I		
Figura 1	Estrutura química dos principais compostos fenólicos do café.....	23
CAPÍTULO II		
Figura 1	Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin Ciocalteu.....	40
Figura 2	Reação química entre a quercetina e o cloreto de alumínio, na determinação do teor de flavonoides.....	41
Figura 3	Reação química entre o radical DPPH e o BHT.....	44
Figura 4	Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil) 1,3,5-triazina com Fe ³⁺	45
Figura 5	Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR-59 (I) e Mundo Novo 376/4 (MN).....	49
Figura 6	Estrutura química dos compostos identificados por CLAE.....	50
CAPÍTULO III		
Figura 1	Estrutura química dos flavonoides.....	67
Figura 2	Reação de oxidação da carbonila pelo reagente DNS.....	71
Figura 3	Estrutura química da vanilina.....	77
Figura 4	Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR 59 não inoculadas e inoculadas.....	78
Figura 5	Atividade fungitóxica dos extratos utilizando cromatografia em camada delgada.....	91
Figura 6	Cromatogramas obtidos por CLAE das frações (F1, F2, F3 e F4) provenientes do extrato etéreo das folhas de cafeeiro IAPAR-59 não inoculadas.....	94
Figura 7	Cromatogramas obtidos por CLAE das frações (F1, F2 e F3) provenientes do extrato etéreo das folhas de cafeeiro IAPAR-59 inoculadas.....	96

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Tabela 1	Gradiente de eluição utilizado no CLAE para análise dos compostos fenólicos.....	43
Tabela 2	Teor de sólidos solúveis % (°Brix) dos extratos aquosos de folhas de cafeeiro.....	46
Tabela 3	Teor de Fenólicos totais (mg AG/g extrato) e Flavonoides (mg Q/g extrato) dos extratos aquosos de folhas de cafeeiro...	47
Tabela 4	Teores dos compostos obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR-59 e Mundo Novo 376/4, em $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$	49
Tabela 5	Atividade antioxidante das cultivares e dos padrões (ácido ascórbico e BHT) pelos métodos DPPH• Cl_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) e FRAP ($\text{mM Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$).....	51

CAPÍTULO III

Tabela 1	Gradiente de eluição utilizado no CLAE para análise dos compostos fenólicos.....	73
Tabela 2	Teores dos compostos obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR-59 não inoculadas e inoculado em $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$	78
Tabela 3	Teor de fenólicos totais (mg AG/g extrato) dos extratos de folhas de cafeeiro IAPAR-59.....	80
Tabela 4	Teor de flavonoides totais (mg quercetina/g extrato) de extratos de folhas de cafeeiro IAPAR-59.....	83
Tabela 5	Teor de açúcares redutores (mg glicose/g extrato).....	85
Tabela 6	Atividade antioxidante DPPH• EC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$).....	87
Tabela 7	Atividade antioxidante pelo método do Poder de Redução de Ferro (FRAP).....	88
Tabela 8	Coefficiente de correlação entre o teor de compostos fenólicos, flavonoides e açúcares redutores e os métodos de AA.....	90
Tabela 9	Teores dos compostos obtidos por CLAE das frações (F1, F2, F3 e F4) provenientes do extrato etéreo das folhas de cafeeiro IAPAR-59 não inoculadas, em $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$	95
Tabela 10	Teores dos compostos obtidos por CLAE das frações (F1, F2, F3 e F4) provenientes do extrato etéreo das folhas de cafeeiro IAPAR-59 inoculadas, em $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$	97

LISTA SIGLAS

AA	Atividade antioxidante
AA	Ácido Ascórbico
AG	Ácido gálico
BHT	Butilhidroxitolueno
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CIFC	Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DPPH	Atividade sequestrante do radical livre
EEII	Extrato etéreo IAPAR inoculada
EEINI	Extrato etéreo IAPAR não inoculada
EPAMIG	Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Poder de redução do ferro
HR	Reação de hipersensibilidade
IAC	Instituto Agrônomo de Campinas
M	Concentração molar
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
N ₂	Nitrôgenio
PSG	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>
Q	Quercetina
R _f	Fator de Retenção
SEAB	Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
UR	Umidade relativa
UV	Ultravioleta
5-ACQ	Ácido clorogênico

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	14
QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS RELACIONADOS À RESPOSTA DE DEFESA DO CAFEIEIRO CONTRA <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	14
1 INTRODUÇÃO	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Acultura do cafeeiro	18
2.2 Mancha aureolada do cafeeiro	18
2.3 Respostas bioquímicas de defesa	20
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2	34
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE EXTRATOS DE FOLHAS DE CAFEIEIRO DAS CULTIVARES IAPAR-59 E MUNDO NOVO 376/4 COM RELAÇÃO À COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 MATERIAL E MÉTODOS	39
2.1 Preparo das mudas de cafeeiro	39
2.2 Preparo dos extratos aquosos de folhas de cafeeiro	39
2.3 Determinação do teor de sólidos solúveis	39
2.3.1 Determinação do teor de fenólicos totais	40
2.3.2 Determinação do teor de flavonoides	39
2.3.3 Determinação do perfil de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência	39
2.4 Preparação das amostras e padrões	40
2.5 Equipamento e Condições CLAE	40
2.6 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH) e o EC50	43
2.7 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)	44
2.8 Análise estatística	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 Determinação do teor de sólidos solúveis	46
3.2 Determinação do teor de fenólicos totais e flavonoides	46
3.3 Determinação do perfil de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência	49
3.4 Atividade antioxidante	51
3.5 Cultivares de café IAPAR-59 x Mundo Novo 376/4	53
4 CONCLUSÃO	55

REFERÊNCIAS	53
CAPÍTULO 3	63
EFEITO DA INTERAÇÃO PLANTA X PATÓGENO NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM FOLHAS DE CAFEIEIRO DA CULTIVAR IAPAR-59	63
1 INTRODUÇÃO	65
2 MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1 Preparo das mudas de cafeeiro	68
2.2 Obtenção do inóculo de <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>garcae</i>	68
2.3 Experimento	69
2.4 Preparo dos extratos	69
2.5 Determinação do teor de compostos fenólicos totais	70
2.5.1 Determinação do teor de flavonoides	70
2.5.2 Determinação do teor de açúcares redutores	71
2.5.3 Determinação do perfil de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência	71
2.6 Preparação das amostras e padrões	73
2.7 Equipamento e Condições CLAE	73
2.8 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH) e o EC50	73
2.9 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)	73
2.10 Avaliação da atividade fungitóxica dos extratos utilizando cromatografia em camada delgada	74
2.11 Fracionamento dos extratos provenientes das folhas de cafeeiro IAPAR-59	75
2.12 Análise estatística	76
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
3.1 Análise do perfil de fenóis de folhas de cafeeiro IAPAR-59	77
3.2 Análise do teor de compostos fenólicos totais	79
3.3 Determinação do teor de flavonoides	83
3.4 Determinação do teor de açúcares redutores	85
3.5 Determinação da atividade antioxidante pelo método da atividade sequestrante do radical livre DPPH*EC50	86
3.6 Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder de redução do ferro (FRAP)	88
3.7 Avaliação da atividade fungitóxica dos extratos utilizando bioautografia	91
3.8 Fracionamento dos extratos etéreos das folhas de cafeeiro IAPAR- 59	92
4 CONCLUSÃO	101
REFERÊNCIAS	102

CAPÍTULO 1

QUANTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS RELACIONADOS À RESPOSTA DE DEFESA DO CAFEIEIRO CONTRA *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro (*Coffeasp.*) é amplamente cultivado em países tropicais, sendo uma das culturas de maior importância econômica do mundo. O Brasil ocupa posição de destaque no mercado internacional, sendo considerado o principal produtor e exportador dessa *commodity*, apresentando área cultivada de aproximadamente 2,2 milhões de hectares. No Brasil, o cultivo do cafeeiro ocorre principalmente na região Sudeste, onde Minas Gerais se encontra como o principal Estado produtor, com 54,2% da produção nacional, seguido pelo Espírito Santo e São Paulo (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

Diversos fatores têm limitado a produtividade e o rendimento da cultura do cafeeiro e entre esses fatores, as doenças estão entre os mais importantes. A mancha aureolada do cafeeiro, A mancha aureolada do cafeeiro, cujo agente etiológico é a bactéria *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, causa perdas de até 70% em viveiros e campos localizados em regiões sujeitas a ventos fortes, temperaturas amenas, chuvas frequentes e bem distribuídas (ZOCCOLI et al., 2011).

Essa doença ocorre no Brasil e na África, destacando-se o Quênia e é observada principalmente em lavouras novas, com até quatro anos de idade, como também em mudas (JANSEN, 2005). No Brasil, foi relatada nos estados de São Paulo na década de 50 (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956), na década de 70 em Minas Gerais (KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976) e Paraná

(KIMURA; ROBBS; FERRARI, 1976; MOHAN, 1976). Os sintomas podem ocorrer nos ramos, folhas, flores e frutos novos. As lesões caracterizam-se como pardo-escuras, envolvidas por anel amarelado, contorno irregular e tamanho variável. Evoluem tornando-se necrosadas e quebradiças. Nas folhas novas as lesões apresentam formato circular e são circundadas por halo amarelo (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956; ZAMBOLIM et al., 1999; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

As plantas, ao serem submetidas a algum tipo de estresse, como a exposição a microrganismos patogênicos podem produzir novos metabólitos secundários relacionados à defesa, além de aumentar a produção dos pré-existentes. Alguns desses compostos podem agir na defesa de plantas, fazendo com que a colonização desses patógenos seja retardada ou até mesmo impedida. Dentre esses compostos, as fitoalexinas, estão entre os mais importantes. Estas são definidas como compostos antimicrobianos, não proteicos, de baixo peso molecular, biossintetizadas pelas plantas, sendo acumuladas nas células vegetais em resposta às infecções decorrentes a agentes patogênicos e estresses abióticos (HAHN, 1996; KUC, 1995; SMITH, 1996; WULFF; PASCHOLATI, 1998, 1999).

As fitoalexinas têm sido muito estudadas em diversas espécies de plantas (DIXON, 2001; GRAYER; HARBORNE, 1994; KEMP; BURDEN, 1986), e a participação como um dos principais componentes do sistema de defesa em cafeeiro foi sugerida por Rodrigues Júnior, Medeiros e Lewis (1975), que verificaram os genes de resistência *SH1* e *SH2* estavam relacionados à presença de compostos antifúngicos quando as plantas de cafeeiro eram desafiadas com uma raça incompatível de *Hemileia vastatrix*. Alguns estudos têm sido realizados no sentido de correlacionar os metabólitos produzidos pelas folhas de cafeeiro com a resistência natural da planta a fitopatógenos, porém, até o presente momento um número reduzido de metabólitos foi caracterizado

(CLARKE; MACRAE, 1989, KUSHALAPA; ESKES, 1989; OLIVEIRA; ROMEIRO, 1990; OLIVEIRA; ROMEIRO; MUCHOVEJ, 1991). Em experimentos conduzidos sobre condições controladas muitos compostos foram capazes de induzir a resistência de plantas a patógenos fúngicos (ASLAM et al., 2009), no entanto, não há na literatura relatos sobre essa indução em condições de campo, tanto para patossistemas fúngicos, quanto para bacterianos.

Diversos estudos realizados em plantas modelos, tais como *Arabidopsis thaliana* e tomateiros (*Solanum lycopersicum*) indicaram que a indução de resistência envolve o acúmulo de fitoalexinas, fortalecimento da parede celular e síntese de proteínas relacionadas à patogênese (HAMMERSCHMIDT, 2009; VAN LOON; PIETERSE, 2006). Mert-Turk et al. (1998) demonstraram que a acumulação de uma fitoalexina, denominada camalexina, ocorre durante a interação compatível e incompatível em *Arabidopsis* infectada com *Peronospora parasitica*.

Entender os mecanismos de defesa associados à resistência do cafeeiro a patógenos é fundamental para o desenvolvimento de produtos/compostos possíveis de induzir a expressão desses mecanismos para a proteção das plantas. A utilização desses produtos/compostos denominados indutores de resistência torna-se uma forma mais sustentável de controle de doenças do cafeeiro, uma vez que a maneira mais utilizada tem sido a aplicação de fungicidas. Ademais, há poucos relatos na literatura sobre o estudo de cultivares resistentes à mancha aureolada. Em geral, cultivares resistentes e suscetíveis diferem na capacidade de ativar as respostas de defesa de forma rápida e eficaz, dependendo do tempo de reconhecimento pela planta da invasão dos patógenos nos tecidos (DEL POZO; PEDLEY; MARTIN, 2004; PEDLEY; MARTIN, 2004). Por consequência, a defesa das plantas aos fitopatógenos é um processo dinâmico e coordenado, cuja manifestação e efetividade dependem da existência de mecanismos constitutivos e/ou fatores responsáveis pela indução de sistemas de

defesa pós-formados no instante e locais adequados, após o reconhecimento do patógeno pelo hospedeiro (MONTESINOS et al., 2002; PASCHOLATI;LEITE, 2011).

Devido à importância da mancha aureolada no cenário do café, foi realizada uma análise preliminar, cujos dados ainda não foram publicados, com o objetivo de verificar possíveis diferenças na composição química de plantas não inoculadas e inoculadas com *P. syringae* pv. *garcae*. O experimento foi realizado utilizando-se mudas de cafeeiro cultivar Mundo Novo 376/4 com três pares de folhas. Para esse ensaio foram utilizadas 450 mudas, no qual 300 foram inoculadas e 150 não receberam o inóculo. De acordo com os resultados obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência, constatou-se que as plantas submetidas à inoculação apresentaram níveis mais altos de compostos bioativos, entre eles, compostos fenólicos, em comparação às plantas não inoculadas.

Frente ao resultado deste estudo preliminar, o objetivo geral nesta dissertação foi identificar os metabólitos biossintetizados em resposta à interação cafeeiro x (PSG) e avaliar seu potencial biológico.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A cultura do cafeeiro

O cafeeiro é pertencente à família Rubiaceae e é uma das culturas mais tradicionais no Brasil, o qual se destaca como o maior produtor mundial de café. Entre as *Coffea arábica* L. e *Coffea canéfora* Pierre ex. A. Froehner são as mais importantes economicamente (ABRAHAO, 2010). A estimativa para a produção nacional de café beneficiado, na safra de 2014, segundo dados da Conab (2014), foi de 45,14 milhões de sacas de 60 quilos. Houve uma redução de 8,16% quando comparado com a produção obtida na safra anterior. Essa diminuição é resultante da forte estiagem verificada nos primeiros meses de 2014, a realização de podas nos cafezais de alguns produtores e à inversão da bienalidade em certas regiões produtoras.

Diversos fatores como condições climáticas adversas, deficiências nutricionais, pragas e doenças podem afetar a produtividade do cafeeiro causando perdas consideráveis (OESTREICH-JANZEN, 2010). Entre as doenças do cafeeiro, destacam-se a ferrugem alaranjada, causada por *H. vastatrix* Berk. & Br.; cercosporiose, causada por *Cercospora coffeicola* Berk & Cooke; antracnose dos frutos e ramos; *Meloidogyne* spp.; mancha de Phoma, causada por *Phoma tarda* (Stewart) Boerema & Bollen, a mancha aureolada, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*, entre outras (PATRÍCIO et al., 2008; ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005).

2.2 Mancha aureolada do cafeeiro

A mancha aureolada do cafeeiro, cujo agente etiológico é a bactéria (PSG) (AMARAL; TEIXEIRA; PINHEIRO, 1956; YOUNG et al., 1978), foi descrita pela primeira vez no fim de 1955, em um cafezal localizado no município de Garça, estado de São Paulo. Porém, a doença não era

significativamente importante em termos econômicos (COSTA; SILVA, 1960) e, por um período de aproximadamente 17 anos após seu surgimento, meramente casos isolados da doença foram observados (MOHAN, 1976). No entanto, nos anos de 1973 e 1975, foram verificadas altas incidências da doença em viveiro de mudas do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), e em lavouras que se recuperavam da ocorrência de geadas no estado do Paraná (KIMURA; HASHIMOTO, 1973; MOHAN, 1976). Nos últimos anos, a mancha aureolada tornou-se fator restritivo para o cultivo do café em regiões frias e submetidas ao vento, em lavouras em formação ou recém-podadas, e em viveiros, sobretudo nas regiões produtoras dos estados do Paraná, São Paulo e em Minas Gerais, especialmente no sul, Triângulo Mineiro, Alto do Paranaíba e Cerrado (MOHAN, 1976; PATRÍCIO et al., 2010; SERA; ALTEIA; PETEK, 2002, SERA et al., 2004; ZOCCOLI; TAKATSU; UESUGI, 2011).

A doença atinge folhas, rosetas, frutos novos e ramos do cafeeiro, afeta mudas no viveiro e plantas no campo. Nas folhas, a bactéria gera sintomas necróticos do tipo mancha, de coloração pardo-escura, com 0,5-2,0 cm de diâmetro e centro necrótico, envolta por um halo amarelado. As lesões avançam por toda a superfície foliar, ocorrendo com mais frequência nas bordas das folhas, por onde a bactéria penetra com maior facilidade, por meio de ferimentos causados por danos mecânicos. A mancha é formada de tecido seco e quebradiço, que constantemente se dilacera e cai, ficando uma perfuração no seu lugar, que proporciona um contorno irregular à folha. Com a aderência dos halos amarelados, formam-se de grandes áreas necrosadas, que resultam na queda prematura das folhas. A doença incide também nos ramos, causando requeima, e sobre frutos novos na fase de chumbinho, causando necrose (ZAMBOLIM; VALE; ZAMBOLIM, 2005). Lavouras novas, com até 3-4 anos de idade, são mais afetadas, ocorrendo queda das folhas, seca de ponteiros, superbrotamento e retardamento no desenvolvimento das plantas. Em viveiros, as mudas atingidas

sofrem queda das folhas e o ponteiro morre, levando a morte das plantas (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997). A bactéria pode causar perdas na produção, principalmente em condições de alta pluviosidade, temperaturas amenas, ou em áreas de altitudes elevadas, submetidas a ventos frios (GODOY; BERGAMIN FILHO; SALGADO, 1997; JANSEN, 2005; ZAMBOLIM et al., 1997). De acordo com Oliveira e Romeiro (1990) a doença incide mais em folhas e brotações novas do cafeeiro do que em folhas adultas devido à severidade da doença estar relacionada com a idade fisiológica das plantas, em que o tecido mais tenro das folhas novas facilita a penetração do patógeno.

Segundo Patrício (2011), o manejo da mancha aureolada deve começar com a utilização de mudas sadias. Por essa razão deve ser feita uma seleção rigorosa das mudas a serem levadas ao campo, cessando o plantio de mudas com sintomas da doença. Esses autores salientaram que poucos estudos avaliaram a resistência de cultivares de cafeeiro a PSG. As cultivares do grupo Mundo Novo demonstram bastante suscetibilidade, enquanto que as do grupo Catuaí são moderadamente suscetíveis. Algumas cultivares do grupo Icatu apresentam resistência parcial, já a variedade Geisha e os materiais portadores do gene SH1 (resistência à ferrugem) são tidos resistentes.

2.3 Respostas bioquímicas de defesa

Os mecanismos de defesa induzidos caracterizam-se como localizados ou sistêmicos e se embasam na capacidade do hospedeiro em reconhecer o patógeno, o que acarreta a transdução de sinais dentro da célula e a expressão de vários genes de defesa. A resistência induzida em plantas pode dar-se por meio do tratamento com agentes bióticos, como extratos vegetais, microrganismos ou parte desses ou, ainda, abióticos (substâncias químicas) (CAVALCANTI et al.,

2005; RESENDE et al., 2004). O processo de sinalização desempenhado pelas células vegetais para reconhecer e perceber os estímulos intrínsecos e/ou extrínsecos podem ser divididos em três etapas: reconhecimento ou percepção do sinal, feito por receptores específicos ou inespecíficos de padrões, neste caso moléculas de origem do patógeno, conhecidas como eliciadores gerais, atualmente, denominados de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou a micróbios (MAMPs); transdução do sinal, que pode ser realizado por mensageiros secundários, modificações nas fosforilações de proteínas e por meio de proteínas-G e; tradução do sinal, que baseia-se na ativação de genes que induzem a síntese de proteínas associadas à patogênese (proteínas PR) e de determinadas enzimas regulatórias envolvidas com a produção de metabólitos secundários de defesa tais como as fitoalexinas (CAMPOS et al., 2011).

Vários mecanismos de defesa são ativados no momento em que a célula vegetal está sob invasão, entre os quais ressaltam a reação de hipersensibilidade, produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) tais como a molécula do oxigênio diatômico (O_2), radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (OH), síntese de proteínas associadas à patogênese (proteínas PR), enzimas que se copilam para a produção de fitoalexinas, lignificação de tecidos, calose e outros reforços da parede celular e, posteriormente, “imunidade” sistêmica, por meio da resistência sistêmica adquirida (SAR) ou resistência sistêmica induzida (ISR) (GRANT; LAMB, 2006).

Embora vários estudos tenham sido feitos para elucidar as vias de sinalização de defesa em plantas que levam à resistência e que são induzidos após o reconhecimento de um agente patogênico ou tratamento com eliciadores de respostas de defesa, somente um número reduzido de metabólitos envolvidos na resistência induzida foi identificado (GANESH et al., 2006; MEDEIROS et al., 2009).

Alterações metabólicas constituem-se de uma característica importante na modificação genética na interação das plantas com patógenos, pragas e condições ambientais (ALLWOOD; ELLIS; GOODACRE, 2008). A realização do estudo do perfil metabólico em células vegetais é complexa devido à grande variedade de metabólitos existentes. Segundo Sumner, Mendes e Dixon (2003) para se fazer um amplo perfil metabólico da célula vegetal deve-se incluir a existência de carboidratos, aminoácidos, ácidos orgânicos, lipídeos, vitaminas, compostos fenólicos, terpenoides e alcaloides que mudam de acordo com a espécie em estudo (SUMNER; MENDES; DIXON, 2003).

O cafeeiro é rico em vários compostos fenólicos que agem na defesa pré-formada, tais como o ácido clorogênico (5-ACQ), ácido cafeico e hidroxihidroquinonas, os quais colaboram para reduzir o nível de espécies reativas de oxigênio (BUTT; SULTAN, 2011). O ácido clorogênico desempenha um importante papel nas respostas de defesa de plantas infectadas por patógenos fúngicos (NICHOLSON, 1995; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992). Em estudos preliminares, resultados conseguidos com mudas de cafeeiro inoculadas com *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* mostraram um aumento na concentração de ácido clorogênico bem como de outros compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas. Esses resultados corroboram com os encontrados por Rodrigues et al. (2011), que verificaram um aumento na concentração de ácido clorogênico em plantas de café suprimidas com silício e inoculadas com *H.vastatrix*. Monteiro e Farah (2012) verificaram em diferentes anos de colheita um aumento na concentração de ácido clorogênico em quatro cultivares de café, o que colaborou para o aumento da resistência da planta a patógenos. Esse tipo de resposta na qual há aumento de certos compostos pré-formados após a infecção é chamada de resistência semiconstitutiva ou parcialmente induzida (INGHAM, 1973; RESENDE, 1996; RESENDE et al., 2014).

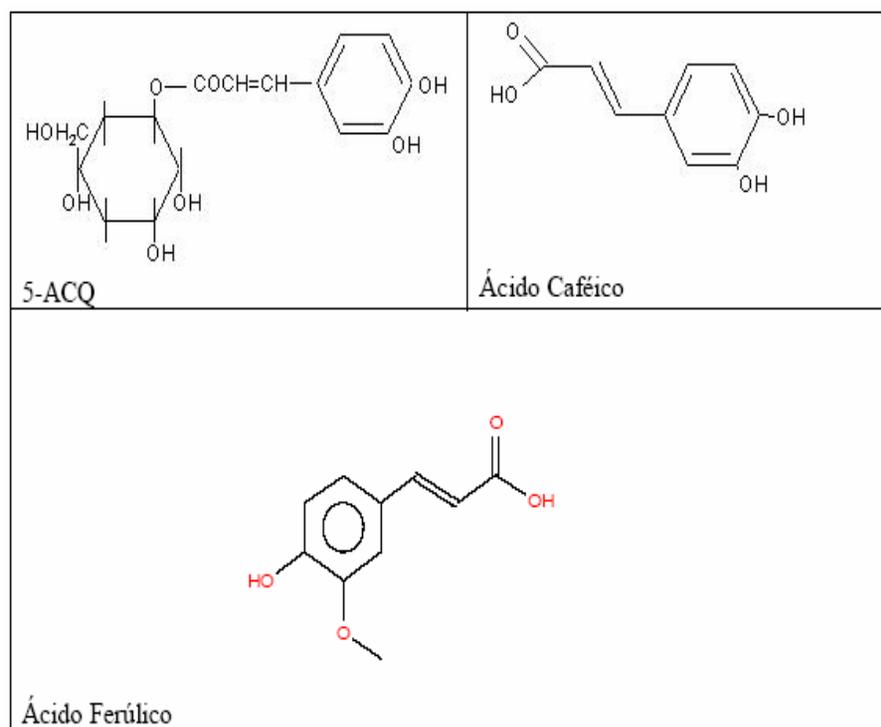


Figura 1 Estrutura química dos principais compostos fenólicos do café
 Fonte: Vignoli (2009)

As plantas têm importância nutricional para um grande número de organismos na natureza e para se protegerem do ataque desses organismos, elas necessitam reconhecer diversas moléculas eliciadoras relacionadas a eles, e assim ativar os mecanismos de defesa. As fitoalexinas representam um dos principais mecanismos de defesa bioquímico pós-infeccional (RESENDE et al., 2014). Vários estresses abióticos, como ozônio, intensidade luminosa (luz ultravioleta - UV), além de ferimentos, são capazes de induzir a formação dessas substâncias (WHARTON; NICHOLSON, 2000). Em videiras as respostas de defesa têm como resultado o aumento da atividade das proteínas PR com atividade hidrolítica (quitinases e glucanases), assim como a formação de compostos antimicrobianos de baixo peso molecular (fitoalexinas), como

também deposição de lignina, de fenóis e de calose no local da infecção (KORTERKAMP, 2006; LEGAY et al., 2011; TROTEL-AZIZ et al., 2006). A irradiação UV em videiras promoveu a produção de resveratrol, fitoalexina do grupo dos estilbenos, na epiderme dos frutos, ampliando a resistência ao oídio e ao mofo cinzento (SHIRAISHI et al., 2010).

As fitoalexinas têm sido largamente estudadas em muitas espécies de plantas desde que foi proposta a sua participação na interação patógeno-hospedeiro por Müller e Borger (1940), os quais observaram que tubérculos de batata inoculados com uma raça incompatível de *Phytophthora infestans* produziam uma reação de hipersensibilidade (HR) e acúmulo de fitoalexinas, dificultando o crescimento da raça compatível, subseqüentemente inoculada nos tecidos. Em 1956, essa fitoalexina foi identificada por Tomiyama e denominada de rishitina. As fitoalexinas são um grupo heterogêneo, relacionadas a diferentes classes químicas, sendo a maior parte compostos fenólicos, tais como os flavonoides, isoflavonoides, flavonas, antocianinas, dentre outros. Outra classe são os terpenoides, que englobam os esteroides, os derivados de ácidos graxos como os poliacetilenos e furanoacetilenos. Quimicamente, a fitoalexina mais simples é o ácido benzoico, um composto fenólico precursor do ácido salicílico, o qual foi produzido em plantas de macieira em resposta à infecção por *Nectria galligena* (PASCHOLATI; LEITE, 2011).

Entre os métodos físico-químicos utilizados para detectar fitoalexinas destacam-se as cromatografias líquida e em camada delgada, nas quais ocorre a migração diferencial dos componentes da amostra, devido a diferentes interações entre duas fases imiscíveis, sendo uma fase fixa denominada fase estacionária, e a outra uma fase móvel (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998; LANÇAS, 1993). Há também a espectrometria de massa que é uma técnica que permite a identificação e quantificação de compostos em uma amostra complexa. Essa

técnica é muito utilizada acoplada à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) (DE MARIA; MOREIRA, 2004).

Para o patossistema em estudo (cafeeiro x PSG) não foram encontrados trabalhos aprofundados na literatura envolvendo métodos de identificação e quantificação de fitoalexinas. Entretanto, em outras culturas, esses compostos foram identificados. Martinet al. (1989) detectaram por CLAE a presença de duas fitoalexinas pertencentes à classe dos flavonoides, betagarina e betavulgarina, em folhas de beterraba inoculadas com *Cercospora beticola*. Mercier e Kuc (1997) observaram que folhas de cenouras inoculadas com *Cercospora carotae* produziam uma fitoalexina, denominada de 6-metoximeleina, que estaria envolvida com a resistência da planta.

A participação das fitoalexinas como um dos principais componentes do sistema de resistência induzida em cafeeiros foi sugerida por Rodrigues Junior, Medeiros e Lewis (1975), que verificaram que os genes envolvidos com a resistência *SH1* e *SH2* estavam associados à presença de compostos antifúngicos quando as plantas de cafeeiro eram inoculadas com uma raça incompatível de *H. vastatrix*. Também, Souza, Romeiro e Muchovej (1991) verificaram que folhas de cafeeiros inoculadas com a bactéria incompatível *Pseudomonas marginalis*, produziam uma fitoalexina como fator pós-infeccional, porém, esta substância não foi caracterizada. Posteriormente, Guedes et al. (1994) detectaram por cromatografia em camada delgada três compostos tóxicos: teobromina (3,7-dimetilxantina), cafeína (1,3,7-trimetilxantina) e um triterpeno não identificado, em folhas de cafeeiros inoculadas com *H. vastatrix*.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.

ALLWOOD, J. W.; ELLIS, D. I.; GOODACRE, R. Metabolomic technologies and their application to the study of plants and plant–host interactions. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 132, p. 117–135, 2008.

AMARAL, J.F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E.D. A bacterium causing halo blight of coffee. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 23, p. 151-155, 1956.

ASLAM, M. et al. Development and evaluation of a new high yielding and better fibre quality mutant NIAB-824 of cotton through pollen irradiation. **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, Berlin, n. 6, p.715, Dec. 2009.

BUTT, M. S.; SULTAN, M. T. Coffee and its consumption: benefits and risks. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 51, p. 363-373, 2011.

CAMPOS, M. A.; RESENDE, M. L. V.; SILVA, M. S. Interações moleculares planta-patógeno. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. DE; REIS JÚNIOR, F. B. (Ed.). **Biotecnologia aplicada à agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. p. 355-377.

CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas contra patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 263 p.

CLARKE, R.J.; MACRAE, R. **Coffee**. 2nd ed. London: Elsevier, 1989. 306p.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café**: Terceiro levantamento. Brasília, 2014. 58 p.

COSTA, A. S.; SILVA, D. M. Estudos sobre a mancha aureolada do cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v.19, n. 1, p. 62-68, 1960.

DE MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análise de ácido clorogênico. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 4, p. 586-592, 2004.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, São Paulo, n. 7, p. 21-25, 1998.

DEL POZO, O.; PEDLEY, K. F.; MARTIN, G. B. MAPKKK alpha is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. **Embo Journal**, Oxford, v. 23, p. 3072-3082, 2004.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance, **Nature**, London, v. 411, p. 843-847, 2001.

GANESH, D. et al. Monitoring of the early molecular resistance responses of coffee (*Coffea arabica* L.) to the rust fungus (*Hemileia vastatrix*) using real-time quantitative RT-PCR. **Plant Science**, Shannon, v. 170, n. 6, p. 1045-1051, 2006.

GODOY, C. V.; BERGAMIN FILHO, A.; SALGADO, C. L. **Doenças do cafeeiro**. In: MANUAL de fitopatologia, doenças das plantas cultivadas. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 414-420, 2006.

GRAYER, R. J.; HARBORNE, J. F. A survey of antifungal compounds from higher plants, 1982-1993. **Phytochemistry**, New York, v. 37, n. 1, p. 19-42, 1994.

GUEDES, M. E. M. et al. Total phenols and phytoalexins accumulation in coffee leaves infected with *Hemileia vastatrix* Berk et Br. and *Pseudomonas syringae*. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 381, p. 561-564, 1994.
HAHN, M.G. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, n. 34, p. 387-412, 1996.

HAMMERSCHMIDT, R. Systemic acquired resistance. In: VAN LOON, L. C (Ed.). **Advances in Botanical Research**, London, v. 51, p. 173-222, 2009.

INGHAM, J. L. Disease resistance in higher plants. The concept of pre-infectious and post-infectious resistance. **Journal of Phytopathology**. Berlin, v. 78, n. 1, p. 314-335, 1973.

JANSEN, A. Plant protection in coffee. **Recommendations for the common code for the coffee community initiative**. 2005. Disponível em: <<http://www.sustainable-coffee.net/download/2006/4c-pesticidereport.pdf>>. Acesso em: 5 set. 2014.

KEMP, M. S.; BURDEN, R. S. Phytoalexins and stress metabolites in the sapwood of trees. **Phytochemistry**, New York, v. 5, n. 6, p. 1261-1269, 1986.

KIMURA, O.; ROBBS, C. F.; FERRARI, J. A. R. Algumas observações relacionadas com as bacterioses do cafeeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1976. p. 104.

KIMURA, S.; HASHIMOTO, K. Purification of the toxin in a zoanthid *Palythoa tuberculosa*. Publ. **Seto Marine Biological Laboratory**, Wakayama, v. 20, p. 713-718, 1973.

KORTEKAMP, A. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 44, p. 58-67, 2006.

KUC, J. Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 33, p. 275-297, 1995.

KUSHALAPA, A.C.; ESKES, A. B. **Coffee rust: epidemiology, resistance and management**. Boca Raton: CRC, 1989. 345p.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa**. São Carlos: Acta, 1993. 254 p.

LEGAY, G. et al. Identification of genes expressed during the compatible interaction of grapevine with *Plasmopara viticola* through suppression subtractive hybridization (SSH). **European Journal Plant Pathology**, London, v. 129, p. 281-301, 2011.

MARTIN, E. et al. **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmittel-untersuchung un Hygiene**, Bern, v. 79, n. 4, p. 406-412, 1989.

MEDEIROS, F. C. L. et al. Defense gene expression n induced by a coffee-leaf extract formulation in tomato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, n. 1, p. 175-183, 2009.

MERCIER, J.; KUC, J. Elicitation of 6-Methoxymellein in carrot leaves by *Cercospora carotae*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 73, n. 1, p. 60-62, 1997.

MERT-TÜRK, F. et al. Biotic and abiotic elicitation of camalexin in *Arabidopsis thaliana*. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT PATHOLOGY, 7., 1998, Edinburgh. **Proceedings...** Edinburgh: [s. n.], 1998.1 CD ROM.

MOHAN, S. K. Investigações sobre *Pseudomonas garcae* em cafeeiros. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 4., 1976, Caxambu. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1976. p. 56.

MONTEIRO, M. C.; FARAH, A. Chlorogenic acids in Brazilian *Coffea arabica* cultivars from various consecutive crops. **Food Chemistry**, London, v. 134, p. 611-614, 2012.

MONTESINOS, E. et al. Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. **International Microbiology**, Barcelona, v. 5, n. 4, p. 169-175, 2002.

MÜLLER, K. O.; BÖRGER, H. Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora*-resistenz den Kartoffel. **Arbeiten aus der Biologischen Bundesanstalt für Land- und Fortswirtschaft**, Berlin, v. 23, p. 189-231, 1940.

NICHOLSON, R. L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 21, p. 95-99, 1995.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, 1992.

OESTREICH-JANZEN. Chemistry of coffee. In: MANDER, L. N.; LIU, H. W. (Ed.). **Comprehensive natural products II: chemistry and biology**. 2010. Disponível em: <<http://www2.illy.com/wps/wcm/connect/us/illy/>>. Acesso em: 3 out. 2013.

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S. Reação de folhas novas e velhas de cafeeiro a infecção por *Pseudomonas cichorii* e *P. syringae* pv. *garcae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 15, n. 1, p. 355-356, 1990.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Como as plantas se defendem dos patógenos. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo. Agronômica Ceres, 2011. v. 1, p. 593-636.

PATRÍCIO, F.R.A. et al. Controle químico da mancha aureolada em uma região montanhosa. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, p. 119, 2010. Supl.

PATRÍCIO, F. R. A. et al. Effectiveness of acibenzolar-S-methyl, fungicides and antibiotics for the control of brown eye spot, bacterial blight, brown leaf spot and coffee rust in coffee. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 152, n. 1, p. 29-39, 2008.

PATRÍCIO, F.R. A. et al. **Mancha aureolada volta a preocupar cafeicultor**. 2011. (Comunicado Técnico, 148). Disponível em: <www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=148>. Acesso em: 3 out. 2013.

PEDLEY, K. F.; MARTIN, G. B. Identification of MAPK Kinase activators involved in the Pto-mediated defense response of tomato. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 23, p. 49229-49235, 2004.

RESENDE, M. L. V. et al. Induction of resistance against *Phoma costarricensis* on coffee leaves by extracts from citrus pulp and coffee leaves and husks. In: THE INTERNATIONAL JOINT WORKSHOP ON PR-PROTEINS AND INDUCED RESISTANCE, 1., 2004, Helsingor. **Proceedings...**Helsingor: Danish, 2004. p. 79.

RESENDE, M. L. V. et al. Mecanismos de defesa de plantas a patógenos. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; RODRIGUES, F. A. (Org.). **O essencial da fitopatologia: epidemiologia de doenças de plantas**. São Carlos: Suprema, 2014. v. 1, p. 187-210.

RESENDE, M. L. V. Mecanismos de resistência de plantas a doenças fúngicas vasculares. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 4, p. 329-351, 1996.

RODRIGUES, F. Á. et al. Chlorogenic acid levels in leaves of coffee plants supplied with silicon and infected by *Hemileia vastatrix*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 404-408, 2011.

RODRIGUES JÚNIOR, C. S.; MEDEIROS, E. F.; LEWIS, B. G. Relationship between a phytoalexin-like response in coffee leaves (*Coffea arabica*) and compatibility with *Hemileia vastatrix* Berk e Br. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 6, p. 35-39, 1975.

SERA, G. H. et al. Associação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* com algumas características agronômicas em cafeeiros F2 segregantes para o gene *erec1*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 974-977, 2004.

SERA, T.; ALTEIA, M. Z.; PETEK, M. R. Melhoria do cafeeiro: variedades melhoradas no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). In: ZAMBOLIM, L. (Ed.). **O estado da arte de tecnologias na produção de café**. Viçosa, MG: UFV, 2002. p. 217-251.

SHIRAIISHI, M. et al. Resveratrol production potential of grape flowers and green berries to screen genotypes for gray mold and powdery mildew resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 176, p. 371-381, 2010.

SMITH, C.J. Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. **New Phytologist**, Cambridge, v. 132, n. 1, p. 1-45, 1996.

SOUZA, R. M.; ROMEIRO, R. S.; MUCHOVEJ, J. S. Elicitation, detection, and uv-spectrophotometry of a phytoalexin-like compound in coffee leaves by *Pseudomonas marginalis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 12-15, 1991.

SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in functional genomics era. **Phytochemistry**, New York, v. 62, p. 817-836, 2003.

TROTEL-AZIZ, P. et al. Chitosan stimulates defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. **European Journal of Plant Pathology**, London, v. 114, p. 405-413, 2006.

VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 135-162, 2006.

VIGNOLI, J. A. **Efeito da matéria-prima e do processamento nos compostos bioativos e na atividade antioxidante do café.** 2009. 130 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, 2009.

WHARTON, P.; NICHOLSON, R. Temporal synthesis and radiolabelling of the sorghum 3-deoxyanthocyanidin phytoalexins and the anthocyanin, cyanidin 3-dimalonyl glucoside. **New Phytologist**, Cambridge, v. 145, n. 3, p. 457- 469, 2000.

WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Caracterização parcial de elicitores de fitoalexinas em sorgo isolados de *Saccharomyces cerevisiae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n.3, p. 428-435, 1999.

WULFF, N.A.; PASCHOLATI, S.F. Preparações de *Saccharomyces cerevisiae* elicitoras de fitoalexinas em mesocótilos de sorgo. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 55, n. 1, p. 138-143, 1998.

ZAMBOLIM, L. et al. Café. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas.** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1997. p. 83–180.

ZAMBOLIM, L. et al. Manejo integrado das doenças do cafeeiro. In: ZAMBOLIM, L. ENCONTRO SOBRE PRODUÇÃO DE CAFÉ COM QUALIDADE, 1., 1999, Viçosa, MG. **Palestras...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 134- 215.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, E. M. Doenças do cafeeiro. In: KIMATI, A. et al. **Manual de fitopatologia.** 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, p. 165-180.

ZOCCOLI, D. M.; TAKATSU, A.; UESUGI, C. H. Ocorrência de mancha aureolada em cafeeiros na Região do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 4, p. 843-849, 2011.

YOUNG, M. et al. A proposed nomenclature and classification for plant pathogenic bacteria. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 21, p. 153-177, 1978.

CAPÍTULO 2

ESTUDO COMPARATIVO ENTRE EXTRATOS DE FOLHAS DE CAFEIEIRO DAS CULTIVARES IAPAR-59 E MUNDO NOVO 376/4 COM RELAÇÃO À COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

RESUMO

A diferença na base genética de cultivares de café pode estar condicionada a um maior teor de compostos do metabolismo secundário, e estes estão intimamente associados às estratégias de defesa nas plantas. Neste trabalho teve-se como objetivo estudar a composição química das folhas das cultivares IAPAR-59 e Mundo Novo 376/4, parcialmente resistente e suscetível respectivamente, à mancha aureolada do cafeeiro. Para isso foram produzidos extratos aquosos das folhas de cafeeiro e investigada a composição química e atividade antioxidante destes. Foram quantificados os sólidos solúveis totais, teor de fenólicos e flavonoides totais e perfil de fenólicos, além da atividade antioxidante pelos métodos da atividade sequestrante do radical livre DPPH e pelo poder antioxidante de redução do ferro (FRAP). Foi possível verificar que folhas da cultivar IAPAR-59 apresentaram maior teor de compostos fenólicos, flavonoides e sólidos solúveis que folhas da cultivar Mundo Novo 376/4. Com relação à atividade antioxidante, IAPAR-59 apresentou maior potencial de sequestro de radicais livres pelo método do DPPH. Em ambas cultivares foi possível identificar a presença de ácido gálico, clorogênico e cafeico, porém os maiores teores foram quantificados na cultivar IAPAR -59. Uma possível explicação para o destaque dessa cultivar pode estar na sua origem genotípica, proveniente de *Coffea canephora*.

Palavras-chave: Resistência. Metabolismo secundário das plantas.
Coffea Arabica. *Coffea canephora*.

ABSTRACT

The difference in the genetic basis of coffee cultivars may be conditioned to a higher content of compounds of secondary metabolism, and these are closely associated with defense strategies in plants. In this work had as objective to study the chemical composition of leaves from IAPAR-59 and *Mundo Novo* 376/4 cultivars, partially resistant and susceptible, respectively, to bacterial blight of coffee. To this aqueous extracts were produced from coffee leaves and investigated the chemical composition and antioxidant activity of these. The total soluble solids were quantified phenolic content and total flavonoids and phenolic profile, in addition to the antioxidant activity by the methods of free radical scavenging activity DPPH and by the iron-reducing antioxidant power (FRAP). It was possible to verify that leaves of cultivar IAPAR-59 had higher content of phenolic compounds, flavonoids and soluble solids that the leaves from *Mundo Novo* 376/4. Regarding the antioxidant activity, IAPAR-59 showed greater potential to scavenging free radicals by DPPH method. In both cultivars were possible to identify the presence of gallic acid, chlorogenic and caffeic, but the highest content was quantified in IAPAR -59. A possible explanation for the highlight of this cultivar may be in its genotypic origin, from *Coffea canephora*.

Keywords: Resistance. Secondary metabolism of plants. *Coffea Arabica*.
Coffea canephora.

1 INTRODUÇÃO

O café, no Brasil, veio como a nova fonte de riqueza, destacando-se econômica e socialmente (ECCARDI; SANDALJ, 2003). Frente sua ligeira adaptação ao solo e clima, o café conseguiu importância no mercado, tornando-se um dos principais produtos de exportação, desde o Império até a atualidade. Inicialmente restrita aos estados do Pará e do Maranhão, a produção de café se desenvolveu e, atualmente, são 15 Estados produtores, com relevância para Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Paraná e Rondônia (BRASIL, 2013). Em torno 70% da produção são oriundos de cultivares da espécie *C. arabica*, que fornece um produto de boa qualidade e maior aceitação no mercado consumidor, todavia apresenta menor rusticidade (FONSECA, 1999; MATIELLO, 1998).

É acreditável que o centro de origem e diversidade de *C. arabica* é a Etiópia, de onde possivelmente foi disseminado pelo mundo, chegando ao Brasil em 1727. As primeiras mudas introduzidas no Brasil foram originadas da cultivar Típica, também denominada como Arábica. Certamente, em 1859, foi introduzida a cultivar Bourbon Vermelho (ANTHONY et al., 2000), bastante cultivada devido à sua produtividade. 'Sumatra', introduzida em 1896, contudo pouco cultivada, originou, por meio de hibridação natural com o 'Bourbon Vermelho' a cultivar Mundo Novo, selecionada a partir de 1943 (CARVALHO et al., 1952). Embora exista uma base genética estreita entre as cultivares comercializadas (BERTHAUD; CHARRIER, 1988), observa-se grande variabilidade morfológica entre as comerciais, em consequência de mutações e cruzamentos naturais, como relataram Krug, Mendes e Carvalho (1939).

As primeiras plantas matrizes da cultivar Mundo Novo, denominada como Sumatra de Mundo Novo, foram selecionadas no município paulista de Urupês, em 1943. Nessa circunstância, dezoito dessas plantas receberam os prefixos P 374 a P 391. Sua origem é decorrente do cruzamento natural entre as

cultivares Sumatra e Bourbon Vermelho de café Arábica, (CARVALHO et al., 1952). Nos anos 1943 a 1952, foram realizadas várias seleções de plantas matrizes e, subsequentemente, novas seleções entre as progênies e dentro delas em várias estações experimentais paulistas, obtendo-se linhagens vigorosas, produtivas, de bom rendimento e adaptadas às diversas regiões ecológicas do Brasil, como as de prefixos LCP 388-17; LCP 379-19; LCMP 376-4; LCP 382-14 e LCMP 388-6. A cultivar Mundo Novo é definida por possuir porte alto, ótimo vigor vegetativo, elevada produção, sistema radicular bem desenvolvido, ampla capacidade de adaptação, maturação média dos frutos, folhas novas verdes ou cor de bronze. Apresenta suscetibilidade ao agente da ferrugem e excelente qualidade de bebida (FAZUOLI, 1986).

Moraes et al. (1974) identificaram que o fator genético SH1, encontrado nos cafeeiros Harar, Dilla e Alghe, S12 Kaffa e Geisha, procedentes da Etiópia e que proporcionam resistência específica a determinadas raças de *Hemileia vastatrix* em *Coffea arabica*, confere também resistência à *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Outras fontes de resistência foram descobertas em cafeeiros não portadores do gene SH1 (MOHAN; CARDOSO; PAVAN, 1977; PETEK et al., 2001, 2006), mostrando a presença de outros genes que imprimem resistências do tipo qualitativa e quantitativa. Muitos cafeeiros apresentam resistência completa para a maior parte das raças de ferrugem, como as cultivares IAPAR-59, Obatã IAC 1669-20, Oeiras, Tupi IAC 1669-33 e outras, a maior parte derivada dos germoplasmas Catimor e Sarchimor.

A cultivar IAPAR-59 é proveniente do cruzamento entre o Vila Sarchi (971/10) e o “Híbrido de Timor” (832/2), executado no CIFC - Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, em Portugal, onde recebeu a designação H-361. A geração F2 foi reconhecida pelo IAC em Campinas tendo como identificação LC-1669. A F3 foi introduzida no IAPAR em 1975 e a progênie 75163-22 recebeu o nome de IAPAR-59. Essa cultivar apresenta resistência à

ferrugem alaranjada do cafeeiro e sua produtividade inicial é 20% superior a outras cultivares como Catuaí, no mesmo espaçamento, (SERA et al., 1994). Possui porte baixo, maturação medianamente precoce e os frutos apresentam coloração vermelha, tendo os brotos cor predominantemente bronze (SERA et al., 1994), sendo o IAPAR-59 preferivelmente sugerido para regiões mais frias e chuvosa, para solos mais férteis e para plantios adensados (PARANÁ, 2014).

A composição química do café pode variar de acordo com diversos fatores, tanto bióticos, como o ataque de patógenos, quanto abióticos, como a temperatura, o clima, a umidade e radiação solar (SALGADO et al., 2008). Entre os compostos presentes no café, ressaltam-se os compostos fenólicos que são resultantes do metabolismo secundário, sendo essenciais para o crescimento e reprodução e, ademais, formam-se em condições de estresse como, infecções, ferimentos e radiações UV (NACZK; SHAHIDI, 2004). São determinados como substâncias que apresentam anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, contendo seus grupos funcionais. A atividade antioxidante desses compostos deve-se, essencialmente, às suas propriedades redutoras e estrutura química. Esses atributos realizam um papel fundamental na neutralização de radicais livres e quelação de metais de transição, atuando na fase de iniciação assim como na propagação do processo oxidativo (SOUZA et al., 2007). Grande parte dos estudos referentes à composição química do café é relacionada ao grão e pouco se sabe sobre os compostos relacionados à defesa do cafeeiro, presentes em suas folhas.

Sendo assim, o objetivo neste trabalho foi determinar a diferença no teor de metabólitos secundários relacionados à defesa das cultivares de cafeeiro susceptível (Mundo Novo 376/4) e parcialmente resistente (IAPAR-59) à mancha aureolada e verificar a atividade antioxidante desses metabólitos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das mudas de cafeeiro

As sementes de cafeeiro das cultivares IAPAR-59 e Mundo Novo 376/4 foram adquiridas no Sítio Fonseca, localizado no município de Lavras, MG e pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, EPAMIG, respectivamente. Posteriormente foram semeadas em bandejas de plástico contendo areia lavada e, no estádio “orelha de onça”, foram transplantadas para sacos de polietileno de 0,5L contendo substrato apropriado para a formação de mudas de café. As mudas foram mantidas em fitotron (câmara de crescimento com temperatura em torno de 23°C, UR de 80% e 12 horas de fotoperíodo) onde foram realizados todos os experimentos. As mesmas foram irrigadas periodicamente e adubadas conforme a recomendação de Ribeiro, Guimarães e Alvarez (1999).

2.2 Preparo dos extratos aquosos de folhas de cafeeiro

Para o preparo dos extratos aquosos foram utilizados o segundo par de folhas de cafeeiro. As folhas foram secas em estufa a 50 °C até total perda de peso e depois moídas até obtenção de um pó fino. A extração foi feita de acordo com Moreira et al. (2012), com adaptações. Para cada 10 g de folha, foram adicionados 100 mL de água e a extração foi feita sob aquecimento, até a temperatura de ebulição. Em seguida, os extratos foram filtrados em papel de filtro e submetidos à liofilização.

2.3 Determinação do teor de sólidos solúveis

O teor de sólidos solúveis foi determinado nos extratos aquosos por meio de refratômetro portátil, marca Hanna, modelo HI 96801. Foram feitas três medições do °BRIX para cada cultivar testada para a obtenção da média e o desvio padrão.

2.3.1 Determinação do teor de fenólicos totais

Para a indicação do teor de compostos fenólicos totais, utilizou-se o método de Folin-Ciocalteu, cuja reação química está demonstrada na Figura 1. Uma alíquota de cada um dos extratos (125 μL) foi misturada com 625 μL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada 1:10) e 500 μL de carbonato de sódio 4% (m/v) em água destilada. Posteriormente 2 h de incubação no escuro e à temperatura ambiente, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, marca BECKMAN, modelo DU 640B a 750 nm. Os resultados do teor de compostos fenólicos totais foram apresentados como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados por meio de uma curva elaborada com concentrações que modalizaram de 5 a 100 $\mu\text{g/mL}$ (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Os limites de detecção e quantificação usados para esse método foram de 3,45 mg/g e 10,45 mg/g respectivamente.

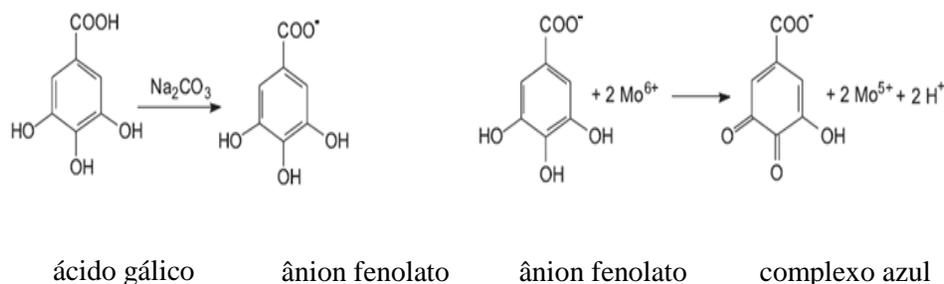


Figura 1 Reação do ácido gálico com o molibdênio, componente do reagente de Folin Ciocalteu

2.3.2 Determinação do teor de flavonoides

Uma alíquota de 125 μL dos extratos foi misturada com 375 μL de etanol, 25 μL de cloreto de alumínio 10% (m/v), 25 μL de acetato de potássio 1 M e 700 μL de água destilada, totalizando 1250 μL de reação. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, marca BECKMAN, modelo DU 640B a 425 nm.

A curva analítica para flavonoides totais foi feita usando como padrão solução de quercetina. O total de flavonoides foi expresso como equivalente de quercetina (mg Q/g extrato), e os valores foram apresentados como média das análises em triplicata (KALIA et al., 2008). Os limites de detecção e quantificação usados para esse método foram de 3,59 mg/g e 10,89 mg/g respectivamente.

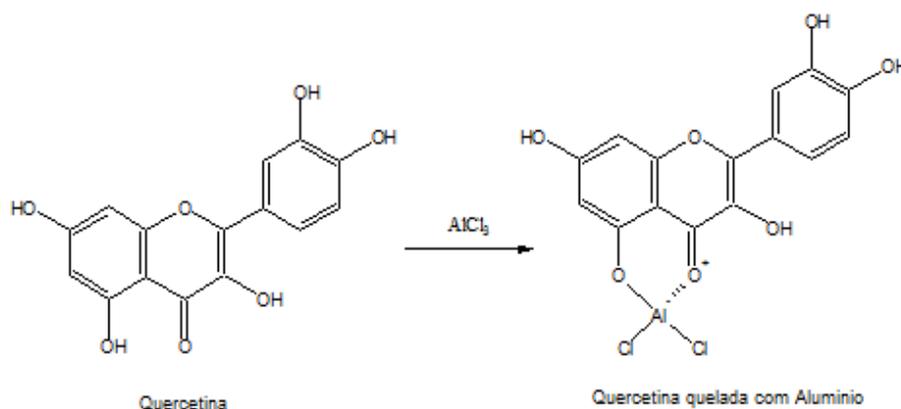


Figura 2 Reação química entre a quercetina e o cloreto de alumínio, na determinação do teor de flavonoides.

2.3.3 Determinação do perfil de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência

Foram utilizados como compostos padrões para análise; o ácido gálico, catequina, ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico), ácido cafeico, vanilina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido m-cumárico, cumarina, ácido o-cumárico, ácido rosmarínico, quercetina e ácido trans-cinâmico, todos adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados para cromatografia, metanol (Merck) e ácido acético (J.T. Baker), foram de grau analítico para CLAE (espectroscópico) e água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q.

2.4 Preparação das amostras e padrões

A quantificação nos extratos das amostras foi elaborada por padronização externa. As curvas analíticas foram montadas pela injeção em triplicata das soluções-padrão, obtidas por diluições da solução-estoque contendo 4×10^{-5} mol/L de cada padrão diluído em solução de etanol. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear considerando o coeficiente de correlação mínimo de 0,995.

Após a filtração das amostras e dos padrões em um filtro de membrana de *nylon* de $0.45 \mu\text{m}$, as mesmas foram injetadas diretamente no cromatógrafo (AQUINO et al., 2006b). A identificação dos analitos inclusos nos extratos foi afirmada pelo tempo de retenção e pelos picos da amostra confrontados aos dos padrões.

2.5 Equipamento e Condições CLAE

Utilizou-se o equipamento UFLC Shimadzu, equipado com uma bomba de alta pressão modelo LC-20AT, um detector com UV-VIS modelo SPD-20A HT, injetor automático com autoamostrador modelo SIL-M20A, forno modelo CTO-20A. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna empacotada SUPELCOSIL C-18 (250 mm x 4,6 mm-Sigma), com partículas esféricas de $5 \mu\text{m}$ conectada a uma pré-coluna SUPELCOSIL C-18 (5,0 cm x 4,6 mm, $5 \mu\text{m}$ -Sigma).

Os solventes de eluição utilizados na fase móvel foram: solução de ácido acético 2% em água (fase A) e 70% metanol em solução de ácido acético 2% em água (fase B). O comprimento de onda utilizado foi de 271 nm, o fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 μL e tempo de corrida de 60 min, realizada à temperatura de 35°C . As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente representado na Tabela 1.

Tabela 1 Gradiente de eluição utilizado no CLAE para análise dos compostos fenólicos

Tempo (min)	Solvente A (%v/v)	Solvente B (%v/v)
2,00	85	15
5,00	70	30
15,00	65	35
25,00	60	40
43,00	55	45
50,00	20	80
55,00	100	0
60,00	100	0

2.6 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH) e o EC50

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) é fundamentado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, gerando um decréscimo da absorvância a 515nm. Os extratos foram preparados em microtubos com quatro diluições diferentes em triplicata. Em ambiente protegido da luz foi transferida uma alíquota de 25µL de cada diluição do extrato para microtubos com 975 µL da solução de DPPH 0,06 mM, e homogeneizada. Para o controle foi utilizado 25µL da solução de álcool metílico, acetona e água e homogeneizada com 975 µL da solução de DPPH 0,06 mM. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro marca BECKMAN, modelo DU 640B.

Os valores do EC50 foram mensurados por regressão linear dos gráficos em que o eixo das abscissas representa a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas, a atividade antioxidante.

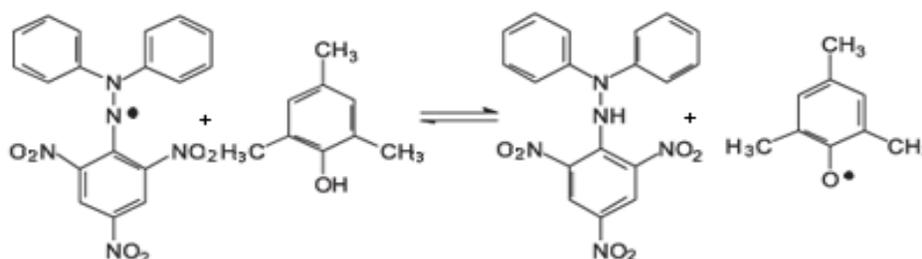


Figura 3 Reação química entre o radical DPPH e o BHT

2.7 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

Os antioxidantes presentes nos extratos foram analisados como redutores do Fe^{+3} a Fe^{+2} , e quelados por 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ (cor azul) com absorção máxima em $\lambda=593$ nm, método desenvolvido por Benzie e Strain (1996). O poder antioxidante de redução do ferro é uma opção para a determinação da redução do ferro. O reagente de FRAP foi determinado misturando-se (a) tampão acetato de sódio 300 mM a pH 3,6; (b) solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10mM em HCl 40 mM; (c) solução de cloreto férrico 20mM. Para formar o reativo FRAP os reativos a, b e c foram misturados na proporção de 10:1:1 no momento da análise. Como padrão foi usado o sulfato ferroso heptahidratado. Em um tubo de ensaio foram adicionados 30 μL de cada diluição do extrato, 90 μL de água destilada e misturados com 900 μL do reagente FRAP e incubados durante 30 minutos a 37°C. A leitura da absorbância foi feita no aparelho marca BECKMAN, modelo DU 640B em 593 nm e o reagente do FRAP foi usado como branco. O padrão de sulfato ferroso heptahidratado foi utilizado para a construção de uma curva com várias concentrações que variaram de 100 a 2000 M. Os resultados da atividade antioxidante foram apresentados em μM sulfato ferroso/g de resíduo vegetal (atividade antioxidante equivalente ao sulfato ferroso heptahidratado). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

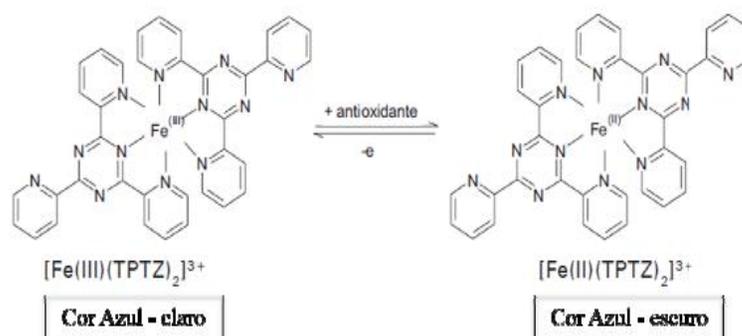


Figura 4 Redução do complexo TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina com Fe^{3+}

2.8 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado no experimento para comparação das atividades antioxidantes das cultivares IAPAR e Mundo Novo e dos tratamentos padrões Ácido Ascórbico (AA) e BHT (Butilhidroxitolueno) pelos métodos de DPPH e FRAP foi em blocos casualizados com quatro tratamentos e três repetições. Utilizou-se o teste de Dunnett a 5% de significância, visando comparar os tratamentos entre si. Como os tratamentos testados diferiram dos tratamentos padrões utilizou-se o teste de Tukeyao nível de 5 % de probabilidade visando verificar diferença entre eles.

O experimento visando verificar a diferença na composição química das cultivares IAPAR e Mundo Novo foi instalado em delineamento experimental em blocos casualizados com três repetições. Os dados originais dos teores de fenólicos totais, flavonoides, açúcares redutores e sólidos solúveis foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis em estudo foram analisadas por meio do programa de análises estatísticas Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação do teor de sólidos solúveis

De acordo com os dados da Tabela 2, foi possível observar que a cultivar IAPAR apresentou maior teor de sólidos solúveis. Isso indica que, com o método de extração utilizado, o extrato aquoso de folhas da cultivar IAPAR-59 mostrou-se mais concentrado.

Tabela 2 Teor de sólidos solúveis % (°Brix) dos extratos aquosos de folhas de cafeeiro

Cultivar	°BRIX
IAPAR 59	3,53 ± 0,05 ^a
Mundo Novo 376/4	2,96 ± 0,05 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes são estatisticamente diferentes (Tukey p<0,05).

Não foram encontrados na literatura dados sobre o teor de sólidos solúveis em folhas de café. Diversos materiais derivados do processamento do café tiveram o teor de sólidos solúveis analisados pelo grau Brix, como mucilagem da água residuária do café (MELO et al., 2011); extrato de café conilon tipo cereja (ZEFERINO et al., 2010), extrato de café da cultivar Topázio (NOBRE et al., 2011) e diferentes tipos de cafés solúveis (KOBAYASHI; BENASSI, 2012).

3.2 Determinação do teor de fenólicos totais e flavonoides

Foi possível observar pelos dados da Tabela 3 que o teor de fenólicos da cultivar IAPAR-59 (597,84 mg AG/g extrato) apresentou diferença estatisticamente significativa com relação ao teor da cultivar Mundo Novo 376/4 (394,54 mg AG/g extrato). O mesmo padrão foi encontrado para o teor de flavonoides, sendo o teor da cultivar IAPAR-59 de 31,87 mg Q/g de extrato e da Mundo Novo 376/4 de 17,11 mg Q/g de extrato).

Tabela 3 Teor de Fenólicos totais (mg AG/g extrato) e Flavonoides (mg Q/g extrato) dos extratos aquosos de folhas de cafeeiro

Cultivar	Fenólicos	Flavonoides
IAPAR 59	597,84 ± 3,4 ^a	31,87 ± 3,2 ^a
Mundo Novo 376/4	394,54 ± 7,1 ^b	17,11 ± 2,6 ^b

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes nas colunas são estatisticamente diferentes (Tukey p<0,05).

Os compostos fenólicos estão envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos (READ et al, 2009), principalmente devido as suas propriedades antioxidantes (GALLEGO - GIRALDO et al., 2011; SHAHIDI et al., 2010). Dessa forma, eles podem desempenhar um papel na adaptação às alterações ambientais (BOUDET, 2007) e em coevolução com pragas e doenças (EYLES et al., 2010).

A cultivar IAPAR-59 possui resistência constitutiva, a qual pode ser responsável pela resistência múltipla contra várias doenças. Resultados preliminares têm indicado que essa resistência pode estar ligada a maior produção de fenólicos pela planta, especificamente os flavonoides.

Melo, Shimizu e Mazzafera (2006) determinaram o teor de compostos fenólicos de folhas de 15 genótipos de café e encontraram valores entre 92,9 (*C. racemosa*) e 235,5 mg/g (*C. liberica*). Ramiro, Guerreiro Filho e Mazzafera (2006) encontraram valores de compostos fenólicos, em média, de 52,9 e 23,0 mg/g para *C. arabica* e *C. racemosa*, respectivamente. Como pôde ser observado, existem poucos trabalhos na literatura que avaliaram o teor de fenólicos em folhas de café e esses resultados foram menores que os encontrados para as cultivares IAPAR-59 e Mundo Novo 376/4. Isso pode ser explicado pelo tipo de extração de fenólicos realizada, pela divergência existente entre os métodos de determinação dessa classe de compostos, bem como a idade das folhas coletadas para a análise. Diversos trabalhos, independente da espécie

vegetal estudada, relataram que folhas jovens apresentaram maior teor de compostos fenólicos que folhas maduras (FREITAS et al., 2007; NOJOSA et al., 2003; SALGADO et al., 2008). Nutrientes e principalmente carboidratos, precursores dos compostos fenólicos, são acumulados nos frutos e folhas para o seu desenvolvimento. O mesmo acontece para os metabólitos secundários, os quais são também utilizados para proteger esses órgãos imaturos. Nas folhas jovens, esse comportamento pode ser explicado pela sua morfologia, pois são mais sensíveis a fatores externos devido à sua baixa lignificação, que aumenta com a idade do tecido (SALGADO et al., 2008). Esse acúmulo de metabólitos secundários em folhas jovens já foi observado. Em folhas de *Coffea canephora*, a concentração mais elevada de ácidos clorogênicos foi em folhas jovens (46,9%) em relação às folhas maduras (25,8%) (MONDOLOT et al., 2006).

Neste trabalho foi coletado o segundo par de folhas, de ambas as cultivares, IAPAR-59 e Mundo Novo 376/4, sendo consideradas folhas jovens. Isso pode explicar o alto teor de fenólicos encontrado em comparação aos outros trabalhos. Não foram encontrados na literatura dados sobre o teor de flavonoides em folhas de café.

Com relação aos flavonoides, é interessante ressaltar que o método colorimétrico para a sua determinação não é um método de alta exatidão, pois o efeito batocrômico da absorção originado pelo complexo com alumínio não é uniforme para todos os flavonoides. Isso ocorre porque a formação de quelatos entre o alumínio e os flavonoides ocorre de forma diferente, dependendo do flavonoide. O aumento do grau de hidroxilação do núcleo resulta em uma elevação do efeito batocrômico e, sendo assim, os espectros movem-se no sentido dos maiores comprimentos de onda (CABRAL et al., 2012; JURD; GEISSMAN, 1956). Dessa forma, dependendo da composição de flavonoides os resultados podem ser sub ou superestimados.

3.3 Determinação do perfil de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência

Com os padrões utilizados, foi possível identificar e quantificar na composição química de ambas cultivares os ácidos gálico, cafeico e clorogênico (Figuras 5 e 6). A cultivar IAPAR-59 apresentou maior concentração desses compostos, com destaque para o ácido cafeico, seu pico majoritário. Além desses compostos, outros picos não identificados foram detectados em ambos os extratos, sendo em maior número na cultivar IAPAR-59.

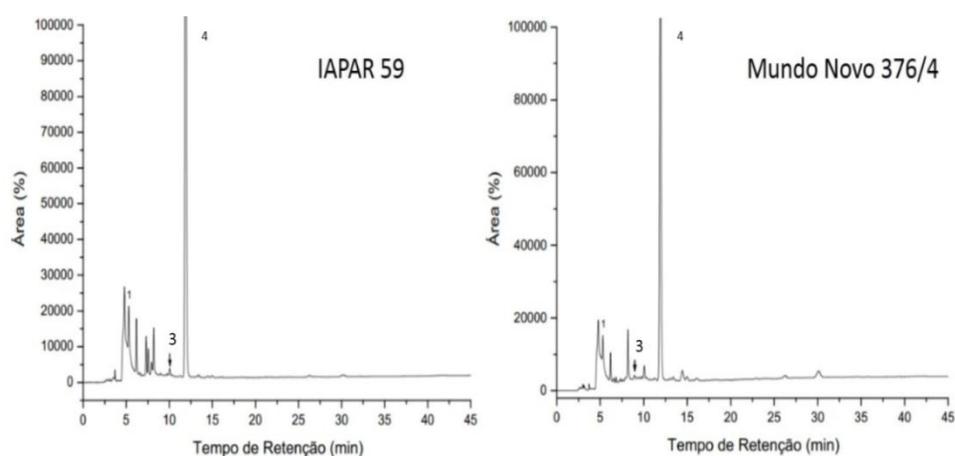


Figura 5 Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR-59 (I) e Mundo Novo 376/4 (MN).

1 - Ácido Gálico; 3 - Ácido Clorogênico; 4 - Ácido Cafeico

Tabela 4 Teores dos compostos obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR-59 e Mundo Novo 376/4, em $\mu\text{g}/100\mu\text{g}$

Compostos	IAPAR-59	Mundo Novo 376/4
1 - Ácido Gálico	47,24	27,14
3 - Ácido Clorogênico	19,35	15,19
4 - Ácido Cafeico	1487,42	975,11

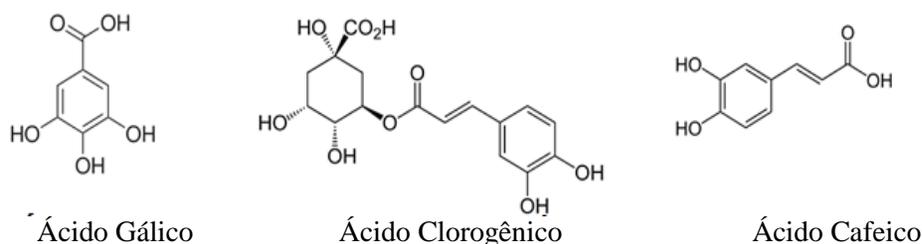


Figura 6 Estrutura química dos compostos identificados por CLAE

Compostos fenólicos, que são produzidos em um curto período de tempo e se acumulam após a infecção, principalmente em variedades resistentes, são tóxicos aos patógenos. Os ácidos clorogênico, cafeico e gálico são exemplos de alguns desses compostos. Algumas formas de fenóis podem ser transformadas em derivados com radicais de oxigênio, altamente reativos, tornando-se muito tóxicos (BARROS et al., 2010; HARTLEB; HEITEFUSS; HOPPE, 1997). É o caso do catecol, que se oxida espontaneamente para formar quinonas intensamente tóxicas e espécies reativas de oxigênio (EROs) (BENNDORF; LOFFHAGEN; BABEL, 2001).

No trabalho de Rodrigues (2011), o extrato de folhas de café Conilon apresentou teor de ácido clorogênico expresso em % de $2,17 \pm 0,17$ enquanto que o café Arábica teve como média $1,109 \pm 0,02$. Trabalhos realizados por Fernandes et al. (2009) foram observados teores de ácido clorogênico nas folhas de café Arábica em média de 0,82%. Já para os grãos de café Arábica torrados foram observados valores de ácido clorogênico entre 4,13 a 5%, (FERNANDES et al., 2009). Alves et al. (2011) ao estudarem plantas de café infestadas por *Coccus viridis* concluíram que estas acumularam maiores teores de ácido cafeico, cafeína e clorogênico em relação às plantas não infestadas por um período de 45 dias após a infestação.

Compostos fenólicos, incluindo os ácidos clorogênicos e cafeico, foram conhecidos por sua atuação papel na defesa das plantas (BENNETT;

WALLSGROVE, 1994). Os ácidos clorogênico, cafeico e os alcaloides, como a cafeína, são considerados compostos pesticidas. Leiss et al. (2009), indicaram o ácido clorogênico como fator de resistência de tripes em crisântemo, e anteriormente no trabalho de Kim e Sano (2008), os autores sugeriram que a cafeína estimula os sistemas de defesa endógenos das plantas por meio da ativação direta ou indireta da expressão gênica.

3.4 Atividade antioxidante

Foi possível observar que para o sequestro de radicais livres DPPH o extrato aquoso de folhas da cultivar IAPAR-59 apresentou maior efetividade que o extrato aquoso de folhas da cultivar Mundo Novo 376/4. Ambas apresentaram menor atividade, estatisticamente, que os padrões ácido ascórbico e BHT, porém, por se tratar de extratos brutos, de composição química complexa, o potencial antioxidante obtido pelas folhas dessas cultivares foi considerado relevante.

No poder antioxidante de redução do ferro (FRAP), as duas cultivares não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si e apresentaram baixa atividade, ao serem comparadas com os padrões utilizados (Tabela 5).

Tabela 5 Atividade antioxidante das cultivares e dos padrões (ácido ascórbico e BHT) pelos métodos DPPH•CI₅₀ (ug/mL) e FRAP (mM Fe₂SO₄/g)

Amostras	DPPH	FRAP
Ácido Ascórbico	4,91 ± 0,22 ^a	501,20 ± 21,09 ^a
BHT	5,07 ± 0,09 ^a	389,20 ± 16,52 ^b
IAPAR 59	52,70 ± 0,92 ^b	26,31 ± 0,53 ^c
MN 376/4	104,36 ± 7,12 ^c	14,15 ± 0,24 ^c

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes nas colunas são estatisticamente diferentes (Tukey p<0,05).

O radical DPPH reage em curto período de tempo com alguns fenóis, mas acontecem reações secundárias que atuam concomitantemente, ocorrendo de forma lenta gerando um progressivo decréscimo na absorvância, podendo

levar algumas horas para estabilizar a reação. Deste modo, uma preferível interpretação dos resultados do método do DPPH é por meio do EC50, o qual é determinado como a concentração de substrato que reduz em 50% o radical DPPH (cor) inicial da reação. Esse parâmetro foi aparentemente introduzido por Brand-Williams e colaboradores (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997; BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) e indica que quanto maior a atividade antioxidante, mais baixo e o valor de EC50.

O método FRAP a princípio foi elaborado para mensurar o poder redutor no plasma, porém tem sido adaptado e usado para ensaios de antioxidantes em plantas. A reação tem como base medir a redução férrica de 2,4,6- tripiridil-s triazina (TPTZ) para um produto colorido (BENZIE; STRAIN, 1996). A reação identifica compostos com potencial redox $<0,7V$ (o potencial redox do Fe^{+3} -TPTZ). O método FRAP só é capaz de medir os mecanismos de transferência de elétrons que em conjunto com outros métodos pode ser usado para separar mecanismos dominantes com diferentes antioxidantes (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005).

Conforme descrito anteriormente, ambas as cultivares apresentaram em sua composição química alto teor de compostos fenólicos. Muitos fatores apresentam influência na atividade antioxidante dos compostos de natureza fenólica, especialmente a posição de substituição e o número de grupos hidroxila (OH), as propriedades de outros grupos substituintes e a tendência de formação de ligações de hidrogênio. Compostos com dois (mais frequente) ou três grupos hidroxilas substituintes no anel benzênico apresentam maior atividade antioxidante comparado aos monohidroxilados (CHENG et al., 2003). Conforme detectado por CLAE (Figura 5), os extratos das folhas contêm em sua composição química os ácidos cafeico e clorogênico, que possuem duas hidroxilas no anel benzênico, além do ácido gálico, que possui três hidroxilas (Figura 6). Isso pode explicar a expressiva atividade antioxidante apresentada no método DPPH (Tabela 5). A maior atividade antioxidante apresentada pelas

folhas da cultivar IAPAR-59 pode ser correlacionada ao maior teor de fenóis totais (Tabela 3) e ácidos fenólicos (Tabela 4), quando comparada aos teores obtidos nas folhas da cultivar Mundo Novo 376/4.

No trabalho de Abrahão et al. (2010), foi avaliada a atividade antioxidante das bebidas de café, utilizando o radical livre DPPH. O composto usado como padrão foi o butil-hidroxi-tolueno (BHT), o qual apresentou atividade na concentração de 200 ppm, de 76,8%. Lima et al. (2010), verificaram que o processo de torração tem influência na atividade antioxidante das bebidas de café, nas quais as bebidas de café torrado demonstraram uma maior possibilidade de doar hidrogênio, pois manifestaram as maiores porcentagens sequestrante de DPPH, obtendo 70,2% com a amostra integral. Naidu et al. (2008) constataram valores de atividade sequestrante de radicais livres de aproximadamente 80% em cafés verdes da espécie arábica. Comparando café Arábica e conilon, notou-se que o café conilon tem poder antioxidante relativamente maior. Em relação à torra moderadamente clara no tempo de reação de 10 minutos, o café conilon apresentou atividade antioxidante de 97%, enquanto que o café arábica foi de aproximadamente 18% (NASCIMENTO, 2006). Não foram encontrados na literatura dados sobre a atividade antioxidante de folhas de café.

3.5 Cultivares de café IAPAR-59 x Mundo Novo 376/4

Foi possível observar por meio dos resultados deste trabalho o destaque em termos de composição química e atividade antioxidante das folhas da cultivar IAPAR-59 em comparação a cultivar Mundo Novo 376/4.

A cultivar IAPAR-59 é derivada do cruzamento entre *Coffea arabica* cv. Villa Sarchi 971/10 e o “Híbrido de Timor 832/2”, conseguido no Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC), em Portugal. O “Híbrido de

Timor” é um híbrido intraespecífico derivado do cruzamento espontâneo entre *Coffea arabica* e *Coffea canephora* (LASHERMES et al., 2000).

A espécie *Coffea canephora*, também conhecida como “café robusta”, possui algumas características que se sobressaem à espécie *Coffea arabica*, tais como: menos sensível ao déficit hídrico, maior rusticidade, sistema radicular mais vigoroso, possui folhas e flores maiores, maiores teores de sólidos solúveis, cafeína e ácido clorogênico, além da maior tolerância à Ferrugem, Bicho Mineiro e resistência a Nematoides (SOUZA et al., 2004).

De acordo com Lashermes et al. (2000), acessos de “Híbrido de Timor” ou somente *Coffea canephora* correspondem importantes fontes de resistência para o melhoramento genético. Portanto, uma possível explicação para os resultados encontrados para as folhas da cultivar IAPAR-5 pode estar correlacionada à sua origem genotípica, em *Coffea canephora*.

4 CONCLUSÃO

Para a composição química dos extratos aquosos de folhas de café, das cultivares IAPAR-59 e Mundo Novo 376/4, foi possível concluir que a cultivar IAPAR-59 apresentou maior teor de compostos fenólicos, flavonoides e sólidos solúveis. Para a atividade antioxidante, no método do DPPH a cultivar IAPAR-59 apresentou maior potencial de sequestro de radicais livres. Em ambas as cultivares foi possível identificar a presença de ácido gálico, clorogênico e cafeico, porém os maiores teores foram quantificados na cultivar IAPAR -59. Uma possível explicação para o destaque dessa cultivar pode estar na sua origem genotípica, proveniente de *Coffea canephora*.

REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.) **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, 2010.

ALVES, F. M. et al. Indução de resistência do cafeeiro à *Coccus viridis*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais...Araxá**: [s. n.], 2011. 1 CD ROM.

ANTHONY, F. et al. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. **Euphytica**, Wageningen, v. 118, p. 1-13, 2000.

AQUINO, F.W. B. et al. Simultaneous determination of agind markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 98, p. 569-574, 2006.

BARROS, F. C. et al. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 2, p. 231-239, mar./abr. 2010.

BENNDORF, D.; LOFFHAGEN, N.; BABEL, W. Protein synthesis patterns in *Acinetobacter calcoaceticus* induced by phenol and catechol show specificities of responses to chemostress. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 25, n. 2, p.247-252, 2001.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, Cambridge, v. 127, p. 617-633, 1994.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v.239, p. 70-76, 1996.

BERTHAUD, J.; CHARRIER, A. Genetic resources of *Coffea*. In: CLARKE, R. J.; MACRAE, R. (Ed.). **Coffee**. London: Elsevier Applied Science, 1988. v. 4, p. 1-42.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, Zurich, v. 28, p. 609–615, 1997.

BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, New York, v.68, p. 2722–2735, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v.28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2013. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cafe/saiba-mais>>. Acesso em: 24 nov. 2014.

CABRAL, I.S. R. et al. The correlation between the phenolic composition and biological activities of two varieties of Brazilian propolis (G6 and G12). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 48, p. 557–564, 2012.

CARVALHO, A. et al. **Melhoramento do cafeeiro**: café Mundo Novo. **Bragantia**, Campinas, v.12, n. 4/6, p.97-129, 1952.

CHENG, Z. et al. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds. **Bioorganic Chemistry**, New York, v. 31, n. 2, p.149-162, 2003.

ECCARDI, F.; SANDALJ, V. **O café**: ambientes e diversidade. Rio de Janeiro: Casa da Palavra, 2003. p. 237.

EYLES, A. et al. Induced resistance to pests and pathogens in trees. **New Phytologist**, Cambridge, v. 185, p. 893–908, 2010.

- FAZUOLI, L. C. Genética e melhoramento do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. **Cultura do cafeeiro**. Piracicaba: Potafós, 1986. p. 87-113.
- FERNANDES, F. L. et al. **Constituintes químicos em frutos e folhas em diferentes cultivares de café e relação com insetos**. Goiânia: Centro Científico Conhecer, 2009. v. 7.
- FERREIRA, D.F. **SISVAR**: sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010.
- FONSECA, A.F.A. **Análises biométricas em café conillon (*Coffea canephora* Pierre)**. 1999. 121f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1999.
- FREITAS, M. S. M. et al. Flavonóides e composição mineral de folhas de maracujazeiro amarelo em função da posição da folha no ramo. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 6, p. 1634-1639, nov./dez. 2007.
- GALLEGO-GIRALDO, L. et al. Selective lignin down regulation leads to constitutive defense response expression in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 190, p. 627–639, 2011.
- HARTLEB, H.; HEITFUSS, R.; HOPPE, H. **Resistance of crop plants against fungi**. Stuttgart: G. Fischer 1997. 544 p.
- JURD, L.; GEISSMAN, T. A. Absorption spectra of metal complexes of flavonoid compounds. **Journal of Organic Chemistry**, Washington, v. 21, n. 12, p. 1395-1401, 1956.
- KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 10129-10134, 2008.

KIM, Y.S.; SANO, H. Pathogen resistance in transgenic tobacco plants producing caffeine: a potential new strategy for insect pest control.

Phytochemistry, New York, v. 69, p. 882-888, 2008.

KOBAYASHI, M. L.; SEMINA, M. T. B. Caracterização sensorial de cafés solúveis comerciais por Perfil Flash1. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, p. 3081-3092, 2012. Supl. 2.

KRUG, C. A.; MENDES, J. E. T.; CARVALHO, A. **Taxonomia de *Coffea arabica* L. descrição das variedades e formas encontradas no Estado de São Paulo**. Campinas: Instituto Agrônômico, 1939. 57 p. (Boletim Técnico, 62).

LASHERMES, P. et al. Molecular analysis of introgressive breeding in coffee (*Coffea arabica* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, n. 100, p. 139-146, 2000.

LEISS, K. A. et al. NMR metabolomics of thrips (*Frankliniella occidentalis*) resistance in *Senecio hybrids*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 35, p. 219-229, 2009.

LIMA, A. R. et al. Compostos bioativos do café: atividade antioxidante in vitro do café verde e torrado antes e após a descafeinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n.1, p. 20-24, 2010.

MATIELLO, J. B. **Café Conillon**. Rio de Janeiro: Procafé, 1998. 162 p.

MELO, A. C. P. et al. Utilização de água residuária do processo pós colheita do café na produção de mudas de cafeeiro. **Brazilian Journal of Irrigation and Drainage**, Botucatu, v.16, n.4, p. 413-423, 2011.

MELO, G. A.; SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry** New York, v. 67, p. 277-285, 2006.

MOHAN, S. K.; CARDOSO, R. M. L.; PAVAN, M. A. Fontes de resistência à *Pseudomonas garcae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1977. p. 24.

MONDOLOT, L. et al. Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during *Coffea canephora* leaf development. **Annals of Botany**, London, v. 98, p. 33-40, 2006.

MORAES, S. A. et al. Resistência de cafeeiros à *Pseudomonas garcae*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 2., 1974, Poços de Caldas. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC, 1974. p. 183.

MOREIRA, M. E. C. et al. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of roasted and green *Coffea arabica* L. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 466, 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, 2004.

NAIDU, M.M. et al. Studies on extraction and antioxidant potential of green coffee. **Food Chemistry**, London, v. 107, p. 377-384, 2008.

NASCIMENTO, P. M. **Estudo da composição química, atividade antioxidante e potencial odorífico de um café conilon, em diferentes graus de torrefação e análise comparativa com café arábica**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Uberlândia, 2006.

NOBRE, G. W. et al. Composição química de frutos imaturos de café arábica (*Coffea arabica* L.) processados por via seca e via úmida. **Coffee Science**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 107-113, maio/ago. 2011.

NOJOSA, G.B.A. et al. Componentes fenólicos e enzimas oxidativas em clones de *Theobroma cacao* resistentes e suscetíveis a *Crinipellis pernicioso*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 148-154, 2003.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/>>. Acesso em: 12 out. 2014.

PETEK, M. R. et al. Resistência à bacteriose (*Pseudomonas syringae* pv. *garcae*) derivado do cruzamento entre 'Iapar-59' e *Coffea arabica* SH1 x 'Catuai'. In: SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA A AMÉRICA LATINA E CARIBE, 3., 2001, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 674-676.

PETEK, M. R. et al. Selection of progenies of *Coffea arabica* with simultaneous resistance to bacterial blight and leaf rust. **Bragantia**, Campinas, v. 65, n. 1, p. 65-73, 2006.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, May 2005.

RAMIRO, D. A.; GUERREIRO FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Phenol contentes, oxidase activities, and the resistance of Coffee to the leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 32, p. 1977-1988, 2006.

READ, J. et al. Correlations between leaf toughness and phenolics among species in contrasting environments of Australia and New Caledonia. **Annals of Botany**, London, v. 103, p. 757-767, 2009.

RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ, V.H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 25-32.

RODRIGUES, F. A. et al. Chlorogenic acid levels in leaves of coffee plants supplied with silicon and infected by *Hemileia vastatrix*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 404-408, 2011.

SALGADO, P. R. et al. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 65, n. 4, p. 354-359, July/Aug. 2008.

SERA, T. et al. IAPAR 59: cultivar de café para plantio adensado. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAFÉ ADENSADO, 1., 1994, Londrina. **Resumos...** Londrina: IAPAR, 1994. p.38.

SHAHIDI, F.; CHANDRASEKARA, A. Hydroxy cinnamates and their *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities. **Phytochemistry**, New York, v. 9, p. 147-170, 2010.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, jul. 2007.

SOUZA, F. F. et al. **Características das principais variedades de café cultivadas em Rondônia**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004.

ZEFERINO, L. B. et al. Efeito da concentração de sólidos solúveis do extrato de café conilon no índice de refração, na densidade e na viscosidade do extrato. **Enciclopédia biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 11, p. 1, 2010.

CAPÍTULO 3

EFEITO DA INTERAÇÃO PLANTA X PATÓGENO NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM FOLHAS DE CAFEIEIRO DA CULTIVAR IAPAR-59

RESUMO

Na fitopatologia, diversas pesquisas se concentram na relação da especificidade entre o patógeno e o hospedeiro, no fenômeno de reconhecimento, do papel das fitotoxinas e enzimas microbianas extracelulares na patogênese e dos fatores bioquímicos de resistência, como compostos fenólicos, fitoalexinas e proteínas relacionadas à patogênese. Neste trabalho teve-se como objetivo avaliar diferentes extratos, provenientes de folhas de café IAPAR-59, com e sem inoculação de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. As análises realizadas nesses extratos foram o teor de fenólicos totais e flavonoides, açúcares redutores, atividade antioxidante pelos testes de DPPH, FRAP, além da atividade fungitóxica. Foi possível verificar que as folhas de cafeeiro da cultivar IAPAR-59 sadias apresentaram maior teor de compostos fenólicos e açúcares redutores. Para a atividade antioxidante, no método do DPPH a fração água apresentou a maior atividade, independente da inoculação. Pelo método do FRAP, a fração água das plantas sadias apresentou maior atividade. No teste fungitóxico, ambas apresentaram compostos capazes de inibir o crescimento do fungo *Cladosporium* sp. Foi possível quantificar na composição química das plantas sem inoculação os ácidos gálico, cafeico e clorogênico, além da vanilina. A cultivar IAPAR-59 inoculada apresentou maior concentração desses compostos e foi detectada ainda a presença de um fenilpropanoide, o ácido trans-cinâmico. A síntese desses compostos pode ter ocorrido em resposta ao ataque do patógeno.

Palavras-chave: Estratégias de defesa. *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*. Metabolismo secundário das plantas. *Coffea arabica*. Inoculação.

ABSTRACT

In phytopathology, several researches focuses on the relation of specificity between the pathogen and the host, in the recognition phenomenon, the role of phytotoxins and extracellular microbial enzymes in the pathogenesis and biochemical factors of resistance, such as phenolic compounds, phytoalexins and proteins related to pathogenesis. In this work had as objective to evaluate the different extracts from coffee leaves IAPAR-59 with and without inoculation of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*. Analyzes carried out in these extracts were total phenolic and flavonoid, reducing sugars, antioxidant activity by DPPH and FRAP test, beyond fungitoxic activity. It was possible to verify that coffee leaves from IAPAR-59 healthy had higher content of phenolic compounds and reducing sugars. For the antioxidant activity in DPPH method the water fraction showed the highest activity, regardless inoculation. By the FRAP method, the water fraction of healthy plants showed a greater activity. In the fungitoxic test, both showed compounds capable to inhibit the growth of fungus *Cladosporium* sp. It was possible to quantify in the chemical composition of no-inoculated plants the gallic acid, chlorogenic and caffeic, besides vanillin. The IAPAR-59 inoculated showed a higher concentration of these compounds and was also detected the presence of a phenylpropanoid, the acid trans- cinnamic. The synthesis of these compounds may have occurred in response to pathogen attack.

Keywords: Defense strategies. *Pseudomonas syringae* pv. *Garcae*.
Secondary metabolism of plants. *Coffea arábica*. Inoculation.

1 INTRODUÇÃO

As doenças causadas por fungos, bactérias, vírus ou nematoides são um dos principais fatores que limitam a produtividade de uma lavoura. Entre esses patógenos que ocorrem sobre as espécies de plantas de importância econômica na agricultura brasileira, as bactérias têm ganhado uma crescente expressão, seja pela gravidade das enfermidades ocasionadas nas culturas, pela capacidade com que se disseminam ou pela problemática encontrada no manejo das enfermidades por elas ocasionadas (ROMEIRO, 2005; SILVA, 2007).

A indução de resistência em plantas pode ser determinada como uma resistência dinâmica, que se apoia na produção de barreiras físicas e/ou químicas incitadas pela aplicação de uma substância indutora. É um evento sistêmico ou localizado, eficaz contra uma ampla gama de patógenos, como bactérias, fungos ou vírus (BONALDO et al., 2005; SILVA, 2007). Os ativadores de resistência ou agentes indutores podem ser extratos de plantas, agentes químicos, metabólitos microbianos, patógenos de plantas, entre outros (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005; LIU; KLOPPER; TUZUN, 1995; SBALCHEIRO, 2006).

Na planta, os mecanismos de defesa podem ser estruturais e bioquímicos, pré e/ou pós-formados relacionados à tentativa de entrada do patógeno no hospedeiro. Os mecanismos estruturais são compostos por barreiras físicas à penetração e/ou colonização do patógeno. Nos mecanismos bioquímicos estão incluídas substâncias com capacidade de impedir o desenvolvimento do patógeno ou produzir exigências contrárias à sobrevivência nos tecidos do hospedeiro, carecendo estar presentes em concentração oportuna nos tecidos invadidos e de modo disponível ao patógeno, de maneira que alterações na concentração da(s) substância(s) resultem em modificação na expressão da doença (RESENDE et al., 2014; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

Nos mecanismos bioquímicos pré-formados, anteriormente a entrada o patógeno os tecidos sadios apresentam altas concentrações de substâncias podendo ser convertidas em substâncias com alta toxicidade com o início da infecção. Em contrapartida, nos mecanismos pós-formados, as substâncias são presentes em baixos níveis ou se encontram inexistentes antes da infecção, sendo ativadas em decorrência à entrada do patógeno ou geradas por meio de um precursor remoto (GARCION; LAMOTTE; MÉTRAUX, 2007).

As plantas produzem uma grande quantidade de compostos orgânicos que diversas vezes parecem não estar relacionados diretamente em seu crescimento e no seu desenvolvimento. Essas substâncias chamadas de metabólitos secundários ou produtos secundários, não expressando ação direta em processos como respiração, fotossíntese, transporte de solutos, na síntese de carboidratos, lipídios e proteínas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Nos dias atuais, são conhecidos cerca de 170 mil metabólitos secundários, tendo sua produção influenciada por ataque de herbívoros ou patógenos, ou sendo sintetizados constitutivamente em órgãos ou em estádios específicos de desenvolvimento (GERSHENZON; Mc CONKEY; CROTEAU, 2000).

Os terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados são as principais classes de metabólitos secundários gerados nas plantas, usado como defesa contra estresses bióticos e abióticos (TAIZ; ZEIGER, 2004). Nas plantas, os compostos fenólicos que são produzidos possuem efeitos protetores contra a exposição aos altos níveis de radiação solar, infecção por bactérias ou fungos. Somado a isso, os compostos fenólicos também são fundamentais para a sinalização, estrutura celular e pigmentação (SHETTY et al., 2008).

Os compostos fenólicos produzidos pelos vegetais podem ser divididos em dois grupos: os flavonoides e os não flavonoides, ambos são denominados metabólitos secundários encontrados em frutas e vegetais. Os flavonoides apresentam a estrutura química especificada por C6-C3-C6 (figura 1). Já os não

flavonoides são identificados como resultante das estruturas químicas C6-C1 descritas como ácidos hidroxibenzoico, gálico e elágico; os resultantes das estruturas químicas C6-C3 características dos ácidos cafeico e p-cumárico, hidroxicinamatos e os resultantes das estruturas químicas C6-C2-C6 característica do trans-resveratrol, cis-resveratrol e trans-resveratrol-glucosídeo (DEGÁSPARI, 2004).

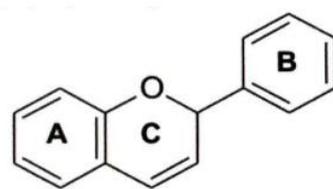


Figura1 Estrutura química dos flavonoides

Fonte: Ângelo e Jorge (2007)

Compostos fenólicos, que são produzidos em um curto período de tempo e são acumulados após a infecção, principalmente em variedades resistentes, sendo tóxicos aos patógenos. Os ácidos clorogênico, ferúlico e cafeico são exemplos de alguns desses compostos. Determinadas formas de fenóis podem ser transformadas em derivados com radicais de oxigênio, como o ânion fenóxido, extremamente reativos, tornando-se muito tóxicos (HARTLEB; HEITEFUSS; HOPPE, 1997).

A tentativa de reduzir o uso de fungicidas com objetivo de minimizar o impacto ambiental e evitar selecionar populações resistentes do patógeno tem motivado a procura de princípios ativos provenientes de extratos vegetais e óleos essenciais. Diante disso, o objetivo neste trabalho foi quantificar e avaliar o potencial biológico de metabólitos secundários sintetizados em resposta à interação cafeeiro x *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo das mudas de cafeeiro

As sementes de cafeeiro da cultivar IAPAR-59 foram adquiridas no sítio Fonseca, localizado no município de Lavras -MG. Posteriormente foram semeadas em bandejas de plástico contendo areia lavada e, no estádio “orelha de onça”, foram transplantadas para sacos de polietileno de 0,5L contendo substrato apropriado para a formação de mudas de café. As mudas foram mantidas em fitotron (câmara de crescimento com temperatura em torno de 23°C, UR de 80% e 12 horas de fotoperíodo) onde foram realizados todos os experimentos. As mesmas foram irrigadas periodicamente e adubadas conforme a recomendação de Ribeiro, Guimarães e Alvarez (1999).

2.2 Obtenção do inóculo de *Pseudomonas syringae* pv. *garcae*

O isolado de *P. syringae* pv. *garcae* foi obtido da coleção de microrganismos do Laboratório de Bacteriologia Vegetal da UFLA - Universidade Federal de Lavras, denominado Lg, proveniente de Patos de Minas, empresa Farroupilha. A bactéria foi preservada em água mineral e em tubos contendo meio 523 de Kadoe Heskett (1970) (MB1). Para a inoculação, a bactéria foi repicada em placas de Petri contendo meio MB1 e incubada a 25 °C. Após 48 horas de crescimento, foi preparada a suspensão bacteriana, removendo-se as colônias com uma alça de Drigalski, calibradas para OD_{600nm}= 0,8 e pulverizadas nas mudas até o ponto de escorrimento. Foi realizada câmara úmida cobrindo-se com um saco plástico, 24 horas antes e depois da inoculação. Ressalta-se que essa metodologia utiliza alta concentração de inóculo, permitindo assim a inoculação sem o uso de ferimentos.

2.3 Experimento

Foi utilizada a cultivar de café IAPAR-59 que apresenta resistência à ferrugem e resistência parcial à bactéria em estudo. O intuito nesse ensaio foi comparar e identificar a produção de metabólitos secundários dessa cultivar, com e sem inoculação.

No experimento foram utilizadas 300 mudas, sendo que 150 foram inoculadas com *P. syringae* pv. *garcae* e outras 150 não foram inoculadas. A coleta das amostras foliares foi realizada cinco dias após a inoculação e a análise dos metabólitos secundários foi realizada conforme metodologia descrita a seguir.

2.4 Preparo dos extratos

Foram coletadas amostras de folhas novas (aproximadamente dois pares de folha/planta) de plantas infectadas e não infectadas com *P. syringae* pv. *garcae*. As amostras foram armazenadas individualmente em papel alumínio, rapidamente congeladas em nitrogênio (N₂) líquido e, em seguida, armazenadas em ultrafreezer a -80° C para posterior análise.

Para obtenção dos extratos foi utilizado o método de extração por Soxhlet durante 24 horas. Amostras de cerca de 140 g de tecido foliar fresco foram maceradas em N₂ líquido em almofariz até a obtenção de um pó fino. Esse pó foi colocado em um reservatório de pano (forma cilíndrica) dentro do extrator Soxhlet. Foram utilizados solventes em ordem crescente de polaridade: éter etílico, metanol e água. A primeira extração foi feita com éter etílico P.A, sob aquecimento de até aproximadamente 40° C, em um balão de fundo redondo. Após vários ciclos, o balão foi retirado e o solvente evaporado em evaporador rotativo, à pressão reduzida. Esse extrato sofreu uma partição líquido/líquido com água fornecendo o extrato água/éter, que foi posteriormente liofilizado. Após a liofilização, o extrato seco foi armazenado em vidro âmbar, à temperatura de -80° C para posterior análise. A segunda extração foi realizada

logo em seguida, utilizando-se temperatura de aproximadamente 60°C por um período de 24 horas, seguindo o mesmo procedimento da primeira extração. O material vegetal submetido às duas etapas de extração anteriores foi retirado do Soxlet e transferido para um béquer, no qual foi realizada a extração com água sob aquecimento descrita por Vitorino et al. (2001), com pequenas modificações. Cerca de 100 g de cada amostra foram submetidos à extração com 1000 mL de água em ebulição por 5min com agitador magnético. A mistura foi filtrada em papel de filtro e armazenada ao abrigo da luz, à temperatura de -80°C, para posterior liofilização.

2.5 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Para determinar do teor de compostos fenólicos totais, uma alíquota de cada um dos extratos (125 µL), foi adicionada a 625µL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído em água destilada 1:10) e 500 µL de carbonato de sódio 4% (m/v) em água destilada. Após 2 h de incubação protegida da luz e à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro, marca BECKMAN, modelo DU 640B a 750 nm. O teor de compostos fenólicos totais foram apresentados como equivalentes de ácido gálico (mg AG/g), calculados a partir de uma curva formada por concentrações que variaram de 5 a 100 µg/mL (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

2.5.1 Determinação do teor de flavonoides

Uma alíquota de 125 µL dos extratos foi adicionada a 375 µL de etanol, 25 µL de cloreto de alumínio 10% (m/v), 25 µL de acetato de potássio 1M e 700 µL de água destilada. Após 30 minutos, a absorbância foi medida em espectrofotômetro, marca BECKMAN, modelo DU 640B a 425 nm. A curva analítica para flavonoides totais foi feita usando como padrão solução de quercetina. O total de flavonoides foi apresentado como equivalentes de

quercetina (mg Q/g extrato) e os valores foram expressos como média das análises em triplicata (KALIA et al., 2008).

2.5.2 Determinação do teor de açúcares redutores

Para determinação do teor de açúcares redutores as análises foram feitas segundo Miller (1959), na qual para cada alíquota de 1,0 mL de extrato foi acrescido 1,0 mL do reagente DNS. A mistura foi aquecida a 100°C/15 minutos e resfriada em banho de gelo, após isso o volume foi completado com 13 mL de água destilada agitando até a homogeneização da solução. Os açúcares redutores foram quantificados em espectrofotômetro, marca BECKMAN, modelo DU 640B em comprimento de onda de 540 nm, utilizando curva analítica de glicose cuja concentração variou entre 0,09g a 1,8g.

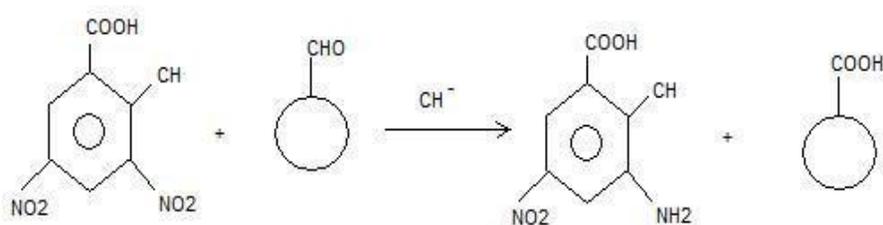


Figura 2 Reação de oxidação da carbonila pelo reagente DNS
Fonte: Miller (1959)

2.5.3 Determinação do perfil de fenóis por cromatografia líquida de alta eficiência

Foram utilizados com compostos padrões para análise: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico), ácido cafeico, vanilina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido m-cumárico, cumarina, ácido o-cumárico, ácido rosmarínico, quercetina e ácido trans-cinâmico, todos adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados para cromatografia,

metanol (Merck) e ácido acético (J.T. Baker), foram de grau analítico para CLAE (espectroscópico) e água ultrapura obtida de um sistema Milli-Q.

2.6 Preparação das amostras e padrões

A quantificação das amostras foi realizada por padronização externa. As curvas analíticas foram produzidas pela injeção em triplicata das soluções-padrão, obtidas por diluições da solução-estoque contendo 4×10^{-5} mol/L de cada padrão diluído em solução de etanol. As curvas analíticas foram obtidas por regressão linear considerando o coeficiente de correlação mínimo de 0.995.

Após a filtração das amostras e dos padrões em um filtro de membrana de *nylon* de $0.45 \mu\text{m}$, as mesmas foram injetadas diretamente no cromatógrafo (AQUINO et al., 2006). A identidade dos analitos contidos nos extratos foi confirmada pelo tempo de retenção e pelos picos da amostra comparados aos dos padrões.

2.7 Equipamento e Condições CLAE

Utilizou-se o equipamento UFLC Shimadzu, equipado com uma bomba de alta pressão modelo LC-20AT, um detector com UV-VIS modelo SPD-20A HT, injetor automático com autoamostrador modelo SIL-M20A, forno modelo CTO-20A. As separações foram realizadas empregando-se uma coluna empacotada SUPELCOSIL C-18 (250 mm x 4,6 mm - Sigma), com partículas esféricas de $5 \mu\text{m}$ conectada a uma pré-coluna SUPELCOSIL C-18 (5,0 cm x 4,6 mm, $5 \mu\text{m}$ -Sigma).

Os solventes de eluição utilizados na fase móvel foram: solução de ácido acético 2% em água (fase A) e 70% metanol em solução de ácido acético 2% em água (fase B). O comprimento de onda utilizado foi de 271nm, o fluxo de 1,0mL/min, volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e tempo de corrida de 60 min, realizada à uma temperatura de 35°C . As amostras foram eluídas de acordo com o gradiente representado na Tabela 1.

Tabela 1 Gradiente de eluição utilizado no CLAE para análise dos compostos fenólicos

Tempo (min)	Solvente A (%v/v)	Solvente B (%v/v)
2,00	85	15
5,00	70	30
15,00	65	35
25,00	60	40
43,00	55	45
50,00	20	80
55,00	100	0
60,00	100	0

2.8 Atividade sequestrante do radical livre (DPPH) e o EC50

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995) se apoia na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, causando uma diminuição da absorbância a 515 nm. Os extratos foram preparados em microtubos com quatro diluições diferentes em triplicata. Em ambiente escuro foi transferida uma alíquota de 25 µL de cada diluição do extrato para microtubos com 975 µL da solução de DPPH 0,06 mM, e homogeneizada. Para o controle foi utilizado 25 µL da solução de álcool metílico, acetona e água e homogeneizada com 975 µL da solução de DPPH 0,06 mM. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro marca BECKMAN, modelo DU 640B.

Os valores do EC50 foram determinados por regressão linear dos gráficos em que o eixo das abscissas corresponde à concentração dos extratos e o eixo das ordenadas à atividade antioxidante (%).

2.9 Poder antioxidante de redução do ferro (FRAP)

Os antioxidantes existentes nos extratos foram analisados como redutores do Fe^{+3} a Fe^{+2} , tornando quelados por 2,4,6-Tri(2-Piridil)-s-Triazina

(TPTZ), para formar o complexo Fe^{+2} -TPTZ (cor azul) com absorção máxima em 593 nm (BENZIE; STRAIN, 1996). O reagente de FRAP foi obtido por meio de uma mistura de (a) tampão acetato de sódio 300 mM a pH 3,6; (b) solução de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) 10mM em HCl 40 mM; (c) solução de cloreto férrico 20mM. Para conseguir o reativo FRAP, os reativos a, b e c foram combinados na proporção de 10:1:1 no momento da análise. Como padrão foi usado o sulfato ferroso heptahidratado. Em tubo de ensaio foram adicionados 30 μL de cada diluição do extrato, 90 μL de água destilada, misturados com 900 μL do reagente FRAP e incubados durante 30 minutos a 37°C. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro marca BECKMAN, modelo DU 640B, a 593 nm e o reagente do FRAP foi usado como branco. O padrão de sulfato ferroso heptahidratado foi utilizado para a construção da curva com diferentes concentrações, que modalizarm de 100 a 2000 M. Os resultados da atividade antioxidante foram apresentados em μM sulfato ferroso/g de amostra (atividade antioxidante equivalente ao sulfato ferroso heptahidratado). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.10 Avaliação da atividade fungitóxica dos extratos utilizando cromatografia em camada delgada

A atividade fungitóxica dos extratos foi avaliada por meio de bioautografia, utilizando o fungo *Cladosporium* sp. Foram utilizadas placas preparadas com sílica gel 60 GF 254 (20 cm x 20 cm) (Merck). As placas foram submetidas à uma pré-corrída utilizando como fase móvel uma mistura de solventes, composta de hexano, éter etílico e metanol, na proporção de 5:6:4 para a remoção de possíveis impurezas presentes na área de corrida cromatográfica. Amostras de 5 μL dos extratos foram solubilizadas com os mesmos solventes utilizados na extração e foram aplicadas em pontos espaçados de 1 cm e a uma distância de 2 cm da extremidade inferior da placa.

Na corrida cromatográfica, foram utilizadas cubas de vidros 8 x 24 x 24 cm, utilizando o mesmo sistema de solventes da pré-corrida. A corrida foi realizada até percorrer 16 cm, a partir dos pontos de aplicação das amostras. Após o fim da corrida e a evaporação dos solventes retidos na placa, esta foi visualizada sob uma câmara de ultravioleta (UV) contendo lâmpadas capazes de emitir luz nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm. As manchas foram visualizadas e as distâncias de migração, denominadas de Fator de Retenção (R_f) calculadas pela razão entre o intervalo percorrido pela amostra a partir do seu ponto de aplicação até o ponto de visualização das manchas, pela distância total percorrida pelo solvente a partir do ponto de aplicação das amostras. Após 24 horas, as placas foram submetidas à bioautografia, colocadas em bandejas plásticas forradas com papel filtro umedecido. Posteriormente, foi pulverizado sobre as placas com um borrifador manual, o fungo *Cladosporium* sp. na concentração de 5×10^5 conídios/mL diluído em meio de cultura líquido contendo sais e sacarose (COOPER; WOOD, 1975; OLIVEIRA; ROMEIRO; MUCHOVEJ, 1991; SOUZA; ROMEIRO; MUCHOVEJ, 1991). As bandejas com as placas foram envolvidas com filme plástico para a formação de câmara úmida e incubadas por 48 horas a 25°C. Decorrido esse tempo foi realizada a identificação visual de zonas de inibição do crescimento fúngico (VILLAS BÔAS; GOMBERT, 2006).

2.11 Fracionamento dos extratos provenientes das folhas de cafeeiro IAPAR-59

Após a bioautografia, os extratos brutos que apresentaram fungitoxicidade foram fracionados por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), na qual foram aplicados 20 µL de cada extrato, em placas individuais, por meio de capilar de vidro. As placas foram submetidas à corrida com os mesmos eluentes usados o item 2.7, a fim de obter a separação de compostos. Posteriormente, essas frações foram analisadas por cromatografia líquida de alta

eficiência (CLAE), conforme o item 2.5.4, utilizando como padrões externos de comparação os seguintes compostos fenólicos: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico), ácido cafeico, vanilina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, ácido m-cumárico, cumarina, ácido o-cumárico, ácido rosmarínico, quercetina e ácido trans-cinâmico.

2.12 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado no experimento para comparação das atividades antioxidantes pelos métodos de DPPH e FRAP foi feito em blocos casualizados com oito tratamentos comparados com dois tratamentos padrão Ácido Ascórbico (AA) e BHT (Butilhidroxitolueno) totalizando 10 tratamentos. Utilizou-se o teste de Dunnett a 5% de significância, visando comparar os tratamentos entre si. Como os tratamentos testados diferiram dos tratamentos padrões utilizou-se o teste de Tukey ao nível de 5 % de probabilidade visando verificar diferença entre eles.

O experimento visando verificar a diferença na composição química da cultivar IAPAR-59 sobre a influência do patógeno, pelos diferentes métodos de extração foi instalado em delineamento experimental em blocos casualizados em esquema fatorial 2x4 (inoculação: plantas inoculadas e não inoculadas e quatro extratores: éter, água /éter, metanol e água). Foram utilizadas três repetições. Os dados originais dos teores de fenólicos totais, flavonoides e açúcares redutores foram submetidos à análise de variância e suas médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As variáveis estudadas foram analisadas por meio do programa de análises estatísticas Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise do perfil de fenóis de folhas de cafeeiro IAPAR-59

Mediante a utilização de alguns padrões, foi possível quantificar na composição química da cultivar IAPAR-59 os ácidos gálico, cafeico e clorogênico e vanilina (Figura 1). A cultivar IAPAR-59 inoculada com *P. syringae* pv. *garcae* apresentou maior concentração desses compostos e foi detectada a presença de vanilina, não encontrada nas plantas sem inoculação neste tipo de extrato. A vanilina é um aldeído derivado do ácido benzoico (um ácido fenólico), pertencente à família dos compostos fenólicos. Possui atividade antimicrobiana (CERRUTI; ALZAMORA; VIDALES, 1997) e antioxidante (TAI et al., 2011).

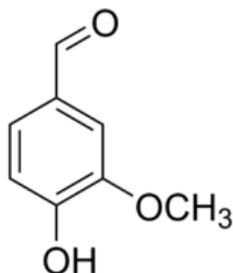


Figura 3 Estrutura química da vanilina

Além desses compostos, outros picos não identificados foram detectados, com destaque para o pico apontado pela seta no cromatograma das plantas inoculadas, que aparece em concentração significativamente maior em relação às plantas sem inoculação, na tabela 2 estão os teores dos compostos obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR-59 não inoculadas e inoculada.

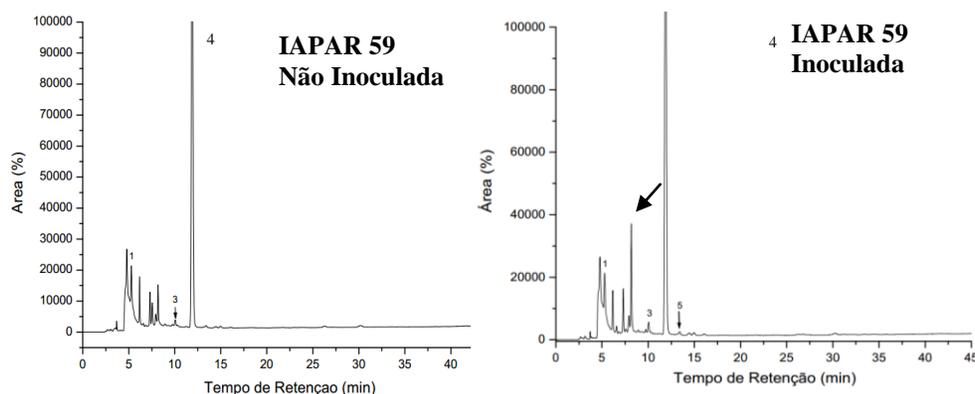


Figura 4 Cromatogramas obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR 59 não inoculadas e inoculadas.

1 - Ácido Gálico; 3 - Ácido Clorogênico; 4 - Ácido Cafeico;
5 - Vanilina.

Tabela 2 Teores dos compostos obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR-59 não inoculadas e inoculado, em $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$

Compostos	Plantas não inoculadas	Plantas inoculadas
1 - Ácido Gálico	47,24	72,99
3 - Ácido Clorogênico	19,35	30,47
4 - Ácido Cafeico	1487,42	1697,29
5 - Vanilina	Nd	20,19

Nd: composto não detectado

Mediante a utilização de alguns padrões, foi possível quantificar na composição química da cultivar IAPAR-59 os ácidos gálico, cafeico e clorogênico e vanilina (Figura 1). A cultivar IAPAR-59 inoculada com *P. syringae* pv. *garcae* apresentou maior concentração desses compostos e foi detectada a presença de vanilina, não encontrada nas plantas sem inoculação neste tipo de extrato. A vanilina é um aldeído derivado do ácido benzoico (um ácido fenólico), pertencente à família dos compostos

fenólicos. Possui atividade antimicrobiana (CERRUTI; ALZAMORA; VIDALES, 1997) e antioxidante (TAI et al., 2011).

Além desses compostos, outros picos não identificados foram detectados, com destaque para o pico apontado pela seta no cromatograma das plantas inoculadas, que aparece em concentração significativamente maior em relação às plantas sem inoculação, na tabela 2 estão os teores dos compostos obtidos por CLAE dos extratos das folhas de café IAPAR-59 não inoculadas e inoculada.

Os compostos fenólicos são fitoquímicos conhecidos encontrados em todas as plantas. Eles consistem de fenóis simples, ácido benzoico, cinâmico, cumarinas, taninos, ligninas, lignanos e flavonoides (KHODDAMI; WILKES; ROBERTS, 2013). As folhas do cafeeiro possuem vários desses compostos, os quais podem ter significativa atribuição na suscetibilidade dos cafeeiros aos insetos (KUSHALAPA; ESKES, 1989). Entre esses compostos, os que se encontram em maiores concentrações nas folhas do cafeeiro são os fenóis e os terpenoides (FERNANDES et al., 2009a).

Os resultados encontrados corroboram com os de Fernandes et al. (2009b), que analisaram folhas de cafeeiro Catuaí Vermelho. Os compostos encontrados em maior teor foram cafeína, ácido clorogênico e ácido cafeico, havendo também outros compostos presentes em baixas concentrações, cuja identificação não foi apresentada. Ramiro, Guerreiro Filho e Mazzafera (2006) verificaram menor ataque de *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) (Lepidoptera: Lyonetiidae) em plantas de *C. arabica* com altas concentrações de ácido clorogênico. De acordo com Rodrigues et al. (2011), a resposta das folhas de cafeeiro ao estresse pela infecção fúngica por *H. vastatrix* possivelmente seja o aumento na concentração de ácido clorogênico. No trabalho de Leitão (2010), o possível envolvimento dos ácidos clorogênicos na

defesa do cafeeiro contra a ferrugem alaranjada foi evidenciado pela presença do composto 5-cafeoilquínico, sendo, provavelmente, o mais abundante.

A partir das diferenças detectadas na composição química das folhas de cafeeiro da cultivar IAPAR-59, frente à inoculação, ambas as amostras (inoculada e não inoculada) foram submetidas à extração com solventes de diferentes polaridades coma finalidade de fracionar os compostos e avaliar sua bioatividade.

3.2 Análise do teor de compostos fenólicos totais

Analisando os dados da Tabela 3, foi possível observar que o extrato água/éter foi o mais eficiente em extrair compostos fenólicos das folhas de cafeeiro submetidas à inoculação, cujo teor de fenólicos foi de $489,65 \pm 9,4$ mg AG/g extrato, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação aos demais extratores. Para plantas sadias, houve distinção ao resultado anterior, no qual o extrato proveniente da água foi o que mais extraiu compostos fenólicos, com teor de $755,52 \pm 3,0$ mg AG/g extrato, diferindo-se dos demais. Com exceção do extrato etéreo, que não teve diferença estatística significativa, em todos os outros extratos testados, as plantas sadias apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos nas suas folhas, em comparação às plantas sobre a influência do patógeno.

Tabela 3 Teor de fenólicos totais (mg AG/g extrato) dos extratos de folhas de cafeeiro IAPAR-59

Solvente extrator	Inoculação	
	Plantas inoculadas	Plantas sadias
Éter	$173,32 \pm 5,6$ ^{cA}	$165,13 \pm 3,7$ ^{dA}
Água/Éter	$489,65 \pm 9,4$ ^{aB}	$536,52 \pm 9,5$ ^{bA}
Metanol	$160,11 \pm 4,5$ ^{cB}	$244,40 \pm 4,7$ ^{cA}
Água	$397,36 \pm 3,2$ ^{bB}	$755,52 \pm 3,0$ ^{aA}

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) são estatisticamente diferentes (Tukey $p < 0,05$).

De acordo com Salgado et al. (2009), os teores de fenóis totais nas folhas destinadas aos testes de resistência ao bicho-mineiro não diferiram estatisticamente entre as cultivares Catuaí e Obatã, no entanto observou-se uma maior concentração dos fenóis totais nas folhas não infestadas (testemunhas) quando comparadas com folhas infestadas pelo bicho-mineiro. Isso foi atribuído à semelhança na concentração de fenóis totais nas folhas das cultivares Catuaí e Obatã e à suscetibilidade dessas plantas ao ataque do bicho-mineiro. No momento em que há lesões decorrentes do ataque do inseto à planta, diminuiriam os teores de fenóis totais, que podem ter sido utilizados de alguma forma no complexo mecanismo de defesa da planta. Esse resultado corrobora com os encontrados no trabalho de Ramiro, Guerreiro Filho e Mazzafera (2006), que demonstraram que a síntese de compostos fenólicos por *Coffea arabica* é afetada por pragas, doenças e ervas daninhas. No trabalho de Boari et al. (2006), não houve diferença no teor de compostos fenólicos em grãos de frutos manchados e não manchados pelo vírus da mancha anular do cafeeiro. Em *Datura stramonium* L., infectada pelo Potatovirus X, houve diminuição no teor de compostos fenólicos nas folhas infectadas pelo patógeno. Na infecção sistêmica, em contrapartida, ocorreu aumento do teor de fenóis nas plantas infectadas, tal qual aconteceu com as plantas infectadas por fungos (DUARTE et al., 2008).

Kroner et al. (2012) observaram um aumento da concentração de substâncias fenólicas após o tratamento com eliciador do fungo, porém não aconteceu produção de outras substâncias, ou seja, houve somente variação quantitativa de compostos fenólicos. Essa resposta também ocorreu em plantas de milho (*Zea mays* L.) submetidas à inoculação com os fungos *Colletotrichum graminicola* (Ces.) e *Helminthosporium maydis* Nisikand Miy, havendo aumento expressivo de dois compostos fenólicos que ocorriam em baixíssimas concentrações em plantas sadias (LYONS; WOOD; NICHOLSON, 1990). Em folhas de macieira (*Malus* spp.), o fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint., causou aumento da

produção do ácido clorogênico entre 1,1 a 7,6 vezes maior que nas folhas saudáveis (PETKOVŠEK; ŠTAMPAR; VEBERIČ, 2009). Em folhas de arroz da variedade IR36 inoculadas com isolados patogênicos e não patogênicos do fungo *Helminthosporium oryzae* Breda de Haan, também houve aumento de compostos fenólicos. Entretanto, quando as folhas de arroz foram tratadas com a toxina produzida por esse fungo, a concentração de compostos fenólicos diminuiu bruscamente, provavelmente, pelo fato da toxina suprimir o mecanismo de defesa da planta exercido pelo composto fenólico (VIDHYASEKARAN; BORROMEO; MEW, 1992).

De acordo com o exposto, a resposta da planta pode variar dependendo do patógeno ou do estágio da infecção. Na infecção por fungos, ocorreu o aumento dos teores de fenóis totais nas plantas doentes, enquanto que na infecção viral houve uma diminuição. Pelos resultados encontrados neste trabalho, a infecção bacteriana também resultou na queda do teor de compostos fenólicos totais. Porém, isso não significa que a planta diminua sua produção de compostos fenólicos com a infecção. O que pode ocorrer é que, no momento do preparo dos extratos da folha e da análise do teor de fenólicos, a planta já tenha utilizado parte dos compostos no complexo mecanismo de defesa, oxidando-os a quinonas (ROSATTO et al., 2001), que geralmente são mais tóxicas aos patógenos. Como o princípio da reação do Folin-Ciocalteu é a oxidação dos fenolatos (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999), as quinonas não podem ser detectadas, levando à queda no teor de compostos fenólicos em comparação às folhas da planta saudável.

A velocidade da expressão da resistência é fator determinante na colonização do patógeno, pois, quanto mais rápida for a resposta da planta ao ataque do patógeno, mais eficiente é a resistência de um hospedeiro considerado suscetível (EL HADRAMI et al., 2010; PIETERSE et al., 2009).

3.3 Determinação do teor de flavonoides

Foi possível observar na Tabela 4 que para plantas inoculadas, o solvente mais eficiente na extração de flavonoides das folhas de café foi o metanol, diferindo estatisticamente dos demais extratores analisados, sendo seu teor de 103,53 mg quercetina/g extrato. Para as plantas sadias, o extrato proveniente da água apresentou maior teor de flavonoides, 120,19 mg quercetina/g extrato, apresentando diferença significativa dos demais extratores. Com relação à inoculação, observou-se que os extratos preparados com o solvente éter, assim como metanol, tiveram seus maiores teores de flavonoides quando as plantas foram submetidas à inoculação, ao contrário do extrato aquoso, que apresentou o maior teor em plantas não inoculadas. Para o extrato preparado com o solvente água/éter, a inoculação não interferiu no teor de flavonoides. Os extratos que foram produzidos com solventes mais polares como o metanol e a água conseguiram extrair maior quantidade de flavonoides em relação ao extrato etéreo, que tem característica mais apolar. Isso pode ser explicado pelo fato de os flavonoides possuírem característica mais polar, sendo facilmente extraídos por solventes como água, metanol, etanol e suas misturas (MARKHAM, 1982; YAO et al., 2004).

Tabela 4 Teor de flavonoides totais (mg quercetina/g extrato) de extratos de folhas de café IAPAR-59

Solvente extrator	Inoculação	
	Plantas Inoculadas	Plantas sadias
Éter	44,88 ± 7,0 ^{bA}	26,74 ± 2,0 ^{dB}
Água/Éter	53,66 ± 5,5 ^{bA}	56,39 ± 8,4 ^{cA}
Metanol	103,53 ± 16,1 ^{aA}	78,11 ± 0,9 ^{bB}
Água	52,50 ± 6,8 ^{bB}	120,19 ± 6,1 ^{aA}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) são estatisticamente diferentes (Tukey p<0,05).

Os flavonoides são compostos fenólicos com estrutura fundamentada em 2-fenil-benzopirano (C₆C₃C₆), sendo constituído por diversas classes, em conformidade com o grau de oxidação do anel central (HARBORNE, 1973). Nas folhas, as flavonas e os flavonóis são os mais facilmente encontrados (PIETTA et al., 1989). De acordo com Petkovšek, Štampar e Veberič (2009) em plantas de maçã (*Malus spp.*) infectadas pelo fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint, houve aumento da concentração de flavonóis, como a rutina (quercetina 3-O-rutinosídeo) e a quercitrina (quercetina 3-O-ramnose). O teor de flavonóis encontrado em frutos de *Vitis vinifera* L. var. Cabernet Sauvignon infectados com *Grapevineleaf-roll-associated virus-3* (GLRaV-3) foi maior em relação ao de plantas saudias, em estágios que antecedem ao amadurecimento do fruto. Entretanto, na fase de amadurecimento dos frutos de *V. vinifera*, ocorreu a redução do teor de flavonóis (VEGA et al., 2011). Dessa maneira, pode-se perceber que há variação dos metabólitos secundários em plantas infectadas comparadas com plantas saudias em diferentes estágios de maturação da planta. As antocianinas, outro grupo de flavonoides, presentes em plantas de *V. vinifera* infectadas por GLRaV-3, apresentaram menor concentração comparada com plantas saudias. Uma plausível explicação para a redução do teor total de antocianinas nas plantas infectadas de *V. vinifera* comparado com as saudias seria a redução da expressão dos mais importantes genes da via de síntese dos flavonoides (VEGA et al., 2011).

De outra maneira, o teor de flavonoides em folhas de macieira diferiu estatisticamente entre folhas resistentes e suscetíveis à sarna da macieira, sendo que as primeiras apresentaram menores quantidades (FELIPINI, 2011). Dentro da classe dos flavonoides está a fitoalexina floridizina, uma dihidrochalcona, que ao degradar em ácido florético e em ácido p-hidroxibenzóico, possui atuação direta contra a infecção de *V. inaequalis* (sarna da maçã) (MIKULIC PETKOVSEK; STAMPAR; VEBERIC, 2009).

O uso do cloreto de alumínio para a indicação do teor de flavonoides é um procedimento com algumas limitações. O método é acurado, possivelmente reproduzível, o qual fornece desvios mínimos ou ausentes entre um ensaio e outro com a mesma amostra. Contudo, ele pode apresentar pouca exatidão, ou seja, o valor fornecido pelo método pode ser diferente (em geral inferior) comparado à quantidade de flavonoides totais realmente contidos na amostra analisada. O valor mensurado e o valor real são mais próximos entre si tanto quanto mais elevada à proporção de flavonoides encontrados na amostra, e mais distantes quanto mais elevada a proporção de flavonas. Esse acontecimento decorre do comprimento de onda selecionado (425 nm) é correspondente à banda de absorção do complexo quercetina-Al. A quercetina é um flavonol, seguramente o mais comum dos flavonoides encontrado nas plantas. Os complexos dos demais flavonoides com alumínio absorvem próximos a 425 nm, mas os complexos advindos de flavonas absorvem em menores comprimentos de onda, o que gera uma subestimativa nas determinações de misturas com elevada concentração de flavonas (WOISKY, 1996).

3.4 Determinação do teor de açúcares redutores

Na Tabela 5 observou-se que, para o teor de açúcares redutores em plantas inoculadas, o solvente mais eficiente para a extração foi o água/éter, tendo seus teores quase cinco vezes maiores que o extrato produzido com éter. Já em plantas sadias o maior teor foi obtido no extrato metanólico.

Analisando os dados da Tabela 5, foi possível observar que a maioria dos extratos apresentou maior quantidade de açúcares redutores quando as plantas estavam isentas do patógeno, com exceção do extrato resultante do água/éter, que quando submetidas à inoculação, as plantas tiveram como resultado 217,53 mg glicose/g extrato em comparação às plantas sadias que apresentaram o teor de 130,15 mg glicose/g extrato.

Tabela 5 Teor de açúcares redutores (mg glicose/g extrato)

Solvente extrator	Inoculação	
	Plantas inoculadas	Plantas sadias
Éter	45,94 ± 5,1 ^{cB}	161,25 ± 17,0 ^{bA}
Água/Éter	217,53 ± 4,3 ^{aA}	130,15 ± 12,1 ^{cB}
Metanol	186,76 ± 6,1 ^{bB}	298,73 ± 13,6 ^{aA}
Água	53,86 ± 2,7 ^{cB}	89,29 ± 3,5 ^{dA}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) são estatisticamente diferentes (Tukey $p < 0,05$).

Pelo que pôde ser observado, o patógeno tem influência na redução no teor de açúcares redutores nas folhas. De acordo com Carvalho (1991), a diminuição do teor de açúcares redutores, na presença do fungo, indica um possível consumo desses açúcares. Boari e colaboradores também confirmaram essa hipótese em 2006, relatando que frutos de café quando atacados pelo vírus da mancha anular do cafeeiro apresentaram menor teor de açúcares redutores (BOARI et al., 2006). Em tomateiro, inoculado com J2 de *M. incognita*, o aumento do período de infecção nas plantas causou redução do desenvolvimento radicular, diminuição progressiva na expansão da área foliar, assim como menor conteúdo de glicose, amido e sacarose nas folhas e nas raízes (ANWAR, 1995). O trabalho realizado por Abrão e Mazzafera (2001) corrobora com os resultados encontrados nesses ensaios. Em plantas de algodoeiro inoculadas com 500 ovos de *M. incognita*, ocorreu aumento na concentração de açúcares nas folhas, porém naquelas inoculadas com 5000 ovos houve decréscimo na sua concentração.

A energia produzida por meio da respiração é utilizada pela planta em todos os tipos de trabalhos celulares, desde o acúmulo e mobilização de compostos, síntese de proteínas, ativação de enzimas, crescimento celular e divisão e, principalmente, reações de defesa. Quando as plantas são infectadas por patógenos, a taxa respiratória geralmente aumenta. Isso significa que os tecidos afetados usam suas reservas de

carboidratos mais rapidamente que os tecidos sadios (AGRIOS, 2005). A energia proveniente dessas reservas é requerida na rápida produção ou mobilização dos mecanismos de defesa celular, o que inclui a síntese de compostos fenólicos. Essa biossíntese pode acontecer por meio de três rotas metabólicas subjacentes à glicólise designadas como acetato-mevalonato, acetato-malonato e acetato-shiquimato (RESENDE et al., 2014). Sendo assim, com a infecção há o aumento da taxa respiratória. Essa resposta induz o consumo de carboidratos cujos metabólitos são utilizados na produção de compostos fenólicos, levando ao aumento do teor dos mesmos.

3.5 Determinação da atividade antioxidante pelo método da atividade sequestrante do radical livre DPPH•EC50

Analisando a Tabela 6 pode-se observar que os extratos preparados com o solvente água/éter e a água não diferenciaram em atividade antioxidante, obtendo resultados mais próximos do padrão, tanto para plantas inoculadas como para sadias. Além disso, os extratos preparados com água/éter e água também não diferiram quanto à inoculação. No caso do extrato metanólico, o maior sequestro de DPPH ocorreu em plantas sadias. Já para o extrato etéreo, as plantas submetidas à inoculação obtiveram maior atividade antioxidante.

Tabela 6 Atividade antioxidante DPPH•EC₅₀ (ug/mL)

Solvente extrator	Inoculação	
	Plantas inoculadas	Plantas sadias
Éter	209,22 ±2,32 ^{bA}	504,41 ±49,04 ^{cB}
Água/Éter	119,32 ±5,89 ^{aA}	91,98 ±1,35 ^{aA}
Metanol	343,35 ±21,73 ^{cB}	298,14 ±16,32 ^{bA}
Água	85,14 ±0,47 ^{aA}	64,23 ±3,36 ^{aA}

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) são estatisticamente diferentes (Tukey p<0,05).

Na avaliação da atividade antioxidante de um vegetal é preciso extrair o máximo de compostos bioativos, e estes apresentam diferentes polaridades. Logo, a solubilidade em um estipulado solvente é traço particular de cada fitoquímico, o que justifica a inexistência de um método de extração universal (MELO et al., 2008). Segundo Reynertson, Basile e Kennelly (2005), a intensidade da atividade antioxidante pode ser mensurada de acordo com a concentração eficiente (EC50) conseguida, usando os resultados de atividade antioxidante de diluições em série. O EC50 é a concentração de extrato necessária para reduzir 50% de radical DPPH e tanto quanto menor o valor de EC50 mais elevada é a atividade antioxidante. A atividade antioxidante pode estar diretamente correlacionada à presença de compostos fenólicos, como taninos e flavonoides, presentes na maioria das espécies estudadas (FABRI et al., 2011).

No café, a quantidade de moléculas de DPPH que são reduzidas está relacionado com o teor de fenóis, do qual ácido clorogênico é um dos integrantes. Produtos da reação de Maillard, cafeína, trigonelina e elementos voláteis, também colaboram para a redução do DPPH (NEBESNY; BUDRYN, 2003). No trabalho Del Castillo, Amese Gordon (2002) foi encontrado em café arábica uma elevação do grau de atividade antioxidante na reação com ABTS (ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico), onde os grãos verdes até a torra média apresentaram aumento e diminuição acentuada na torra escura.

Em geral, os estudos já realizados com o café referem-se ao grão de café verde ou torrado. Pouco é conhecido sobre a composição química e atividades biológicas das folhas de café.

3.6 Determinação da atividade antioxidante pelo método do poder de redução do ferro (FRAP)

Foi possível observar (Tabela 7) que em plantas inoculadas, o extrato que conseguiu reduzir maior quantidade de Fe^{3+} em Fe^{2+} foi o etéreo ($25,27 \pm 0,6$ mM

$\text{Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$) diferindo estatisticamente dos demais solventes testados. Já nas plantas saudas, o extrato que obteve maior quantidade de redução Fe^{3+} em Fe^{2+} foi o aquoso ($33,87 \pm 0,4 \text{mM Fe}_2\text{SO}_4/\text{g}$), mantendo diferença significativa das demais amostras. Com relação à inoculação, plantas saudas e doentes quando extraídas com metanol não apresentaram diferença. Plantas inoculadas apresentaram maior redução do ferro no extrato etéreo quando comparado com plantas saudas. Em se tratando dos extratos produzidos com a água e água/éter, foi observada diferença significativa na redução de maior quantidade de ferro nas plantas não inoculadas quando comparadas às plantas sobre a presença do inóculo.

Tabela 7 Atividade antioxidante pelo método do Poder de Redução de Ferro (FRAP)

Solvente extrator	Inoculação	
	Plantas inoculadas	Plantas saudas
Éter	$25,27 \pm 0,60$ ^{aA}	$10,06 \pm 0,37$ ^{dB}
Água/Éter	$17,27 \pm 0,40$ ^{bB}	$19,50 \pm 0,51$ ^{bA}
Metanol	$15,28 \pm 0,24$ ^{cA}	$14,85 \pm 0,60$ ^{cA}
Água	$15,09 \pm 0,73$ ^{cB}	$33,87 \pm 0,40$ ^{aA}

Resultados expressos como média \pm desvio padrão (n=3). Médias com letras diferentes (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) são estatisticamente diferentes (Tukey $p < 0,05$).

A variação na atividade dos extratos provavelmente ocorreu pelo mecanismo característico do FRAP na avaliação da atividade antioxidante, visto que esse método é limitado à mensurar compostos que levam a transferência de elétrons (PRIOR; XIANLI; SCHAICH, 2005).

Nos fenóis, a estrutura química é constituída pelo anel benzênico com grupos hidroxilas ligados de modo direto à estrutura cíclica. O grupo dos fenóis se reparte em flavonoides (polifenóis) e não flavonoides (fenóis simples ou ácidos) (JACKSON, 1994). Os compostos fenólicos possuem propriedades biológicas relativas à atividade antioxidante todo fenol exerce sobre certo meio.

A atividade dos antioxidantes, por sua vez, decorre da sua estrutura química, podendo ser definida pela atuação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com demais antioxidantes e potencial de quelação de metais) (MAMEDE; PASTORE, 2004).

Pulido, Bravo e Saura-Calixto (2000) verificaram que a utilização de diferentes solventes afeta o poder redutor da amostra analisada. A eficiência antioxidante estabelecida pelo método FRAP é relativo ao potencial redox dos compostos analisados, definido pela complexidade das suas moléculas. Isso pode justificar a diferença da atividade antioxidante dos extratos avaliados, por se tratar de diferentes solventes.

Não foram encontrados estudos com a determinação da atividade antioxidante pelo método FRAP em folhas de cafeeiro, o que demonstra a importância de mais estudos na área.

Após analisar os resultados do teor de fenólicos totais, flavonoides e açúcares redutores, bem como a atividade antioxidante expressa nos métodos de sequestro de radical livre DPPH e poder redutor de ferro (FRAP) foi realizada a análise da correlação de Pearson para essas variáveis.

Foi possível observar, de acordo com a Tabela 8, que para o teor de fenólicos e a atividade antioxidante apresentada pelos extratos de folhas de café IAPAR-59 houve uma correlação de moderada a forte. Porém, para o DPPH, essa correlação foi negativa e para o FRAP, positiva. Para o teor de flavonoides no método do DPPH houve uma correlação negativa de fraca a moderada, já para o FRAP a correlação foi positiva, de moderada a forte. Nos açúcares redutores, para ambos os métodos de análise de atividade antioxidante a correlação foi de fraca a moderada, sendo 0,41 para o DPPH e -0,48 para o FRAP.

Tabela 8 Coeficiente de correlação entre o teor de compostos fenólicos, flavonoides e açúcares redutores e os métodos de AA

Variáveis	Correlação
Fenólicos X DPPH	-0,79 moderadamente a forte
Fenólicos X FRAP	0,65 moderadamente a forte
Flavonoides X DPPH	-0,28 fraca a moderada
Flavonoides X FRAP	0,55 moderadamente a forte
Açúcares redutores X DPPH	0,41 fraca a moderada
Açúcares redutores X FRAP	-0,48 fraca a moderada

Esses resultados evidenciam que os teores de fenólicos e flavonoides, no caso das folhas de cafeeiro da cultivar IAPAR-59, estão diretamente relacionados à atividade antioxidante demonstrada pelo método do FRAP. Apesar do método de DPPH ser fácil, rápido e se mostrar vantajoso, pois o resultado não é afetado pela polaridade do substrato (CABRAL et al., 2009; KOLEVA et al., 2002), essa análise de correlação demonstrou a importância de se utilizar mais de um método para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de produtos naturais.

3.7 Avaliação da atividade fungitóxica dos extratos utilizando bioautografia

Ao realizar a cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) dos extratos das plantas de cafeeiro IAPAR-59 na concentração de 5mg/mL, foi possível observar halos de inibição do fungo revelador somente no extrato etéreo. As manchas com atividade inibitória dos extratos etéreos não inoculado e inoculado apresentaram características diferentes frente à CCDA (Figura 5), como o R_f, formato da mancha e cor desenvolvida perante aluz ultravioleta.

Devido à ausência de atividade fungitóxica nos outros extratos, pressupõe-se que o extrato etéreo tenha extraído todos os compostos bioativos presentes nas folhas de cafeeiro IAPAR-59, com e sem inoculação.

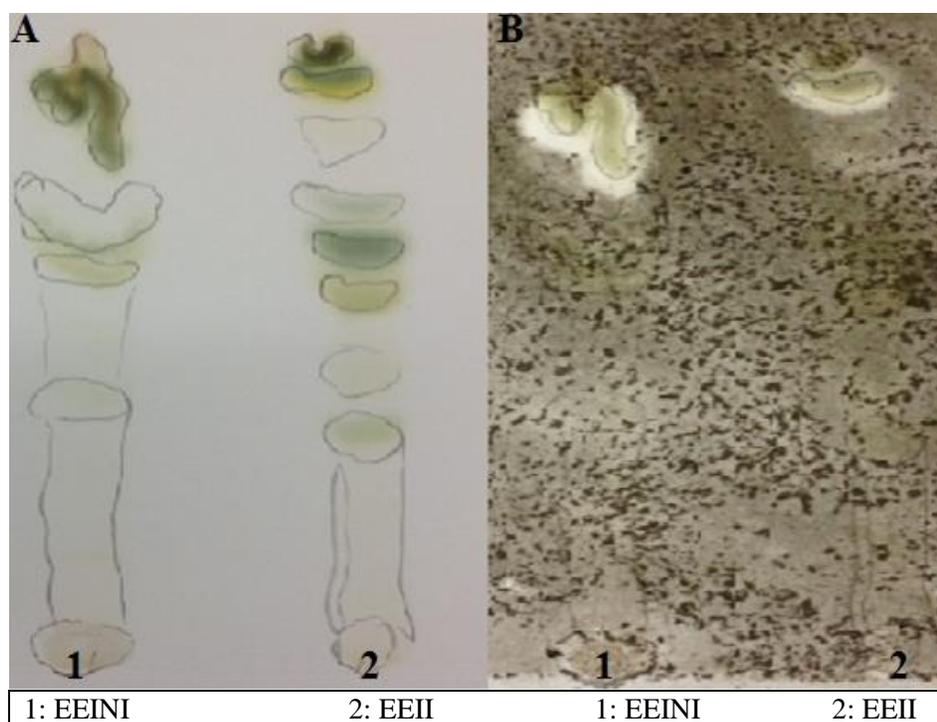


Figura 5 Atividade fungitóxica dos extratos utilizando cromatografia em camada delgada.

1: extrato etéreo IAPAR não inoculada (EEINI), 2: extrato etéreo IAPAR inoculada (EEII). A: antes e B: depois da aspersão do fungo *Cladosporium* sp.

Em pesquisas com extratos derivados de folhas, observou-se que houve inibição do crescimento de *F. oxysporum* em 61,15 e 6,75%, utilizando extratos de rizoma de açafrão (*Crocussativus*) e folha decoração de negro (*Poecilanthe parviflora* Benth) em concentração de 1%, respectivamente. Verificou-se ainda que o extrato de coração de negro estimulou crescimento de *F. solani* (AMARAL; BARA, 2005). Também foram verificadas propriedades fungitóxicas em extratos de bulbilhos de alho, folhas de hortelã, folhas de mamona e frutos de pimenta, os quais inibiram o desenvolvimento de micélio de *C. gloeosporioides*, a partir da concentração de 200 ppm (0,02%) (RIBEIRO; BEDENDO, 1999). Rozwalkare Zaksevskas (2008) verificaram o efeito

inibitório do extrato de camomila (*M. camomilla*) quando usado no controle do fungo *C. gloeosporioides* causador de antracnose em frutos da goiaba.

No trabalho de Pereira et al.(2008), foi verificada em casa de vegetação, redução da área abaixo da curva de progresso do número de lesões da cercosporiose em plantas tratadas com extrato da casca de café. Segundo Pandey et al. (2000), a casca de café contém grande quantidade de carboidratos, proteínas, taninos e muitos compostos fenólicos, localizados principalmente na polpa. Segundo Santos e Mello (1999), os taninos são responsáveis por fundamental papel na inativação de enzimas e impedem o crescimento de alguns microrganismos.

Compostos fenólicos são considerados substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas (LO; NICHOLSON, 2008). A ação inibitória de compostos fenólicos na germinação de esporos, crescimento micelial e produção/atividade de enzimas microbianas diferem entre vários grupos de fenóis. Desta maneira, os compostos fenólicos podem estar relacionados aos mecanismos bioquímicos e estruturais de resistência em plantas (NICHOLSON, 1995; NICHOLSON; HAMMERSCHMIDT, 1992).

3.8 Fracionamento dos extratos etéreos das folhas de cafeeiro IAPAR-59

Após a análise da atividade fungitóxica, os extratos etéreos (não inoculado e inoculado) foram fracionados por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e submetidos novamente à análise da atividade fungitóxica. As manchas que apresentaram atividade na bioautografia foram raspadas, reunidas de acordo com o Rf, denominadas de “frações” e analisadas por cromatografia líquida para determinar seus constituintes químicos. Foi possível obter quatro frações bioativas provenientes do extrato etéreo não inoculado e três frações bioativas do inoculado.

Apesar das técnicas colorimétricas serem importantes ferramentas de detecção *invitro* da presença de determinados compostos, é importante caracterizá-los de forma individual em uma amostra. Nesse contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência (*High Performance Liquid Chromatography* - HPLC) é a técnica geralmente utilizada. A HPLC é uma ferramenta que auxilia os mais diversos estudos, pois separa compostos presentes em uma matriz, que podem ser confrontados a padrões para identificação (ANDRADE et al., 2001; BIANCO; SAVOLAINEN, 1997; HÄKKINEN et al., 1999; KALLITHRAKA et al., 2001; PEREZ-MAGARIÑO et al., 1999; SCHIEBER; KELLER; CARLE, 2001).

Na Figura 6 estão representadas as frações do extrato etéreo não inoculado, no qual o sistema cromatográfico possibilitou a separação e detecção dos compostos ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeico na fração denominada como (F1). Já na fração dois (F2) e três (F3), além desses compostos, foram detectados a vanilina e o ácido p-cumárico. Na fração quatro (F4) foram identificados os mesmos compostos encontrados nas frações dois e três, com exceção para o ácido p-cumárico.

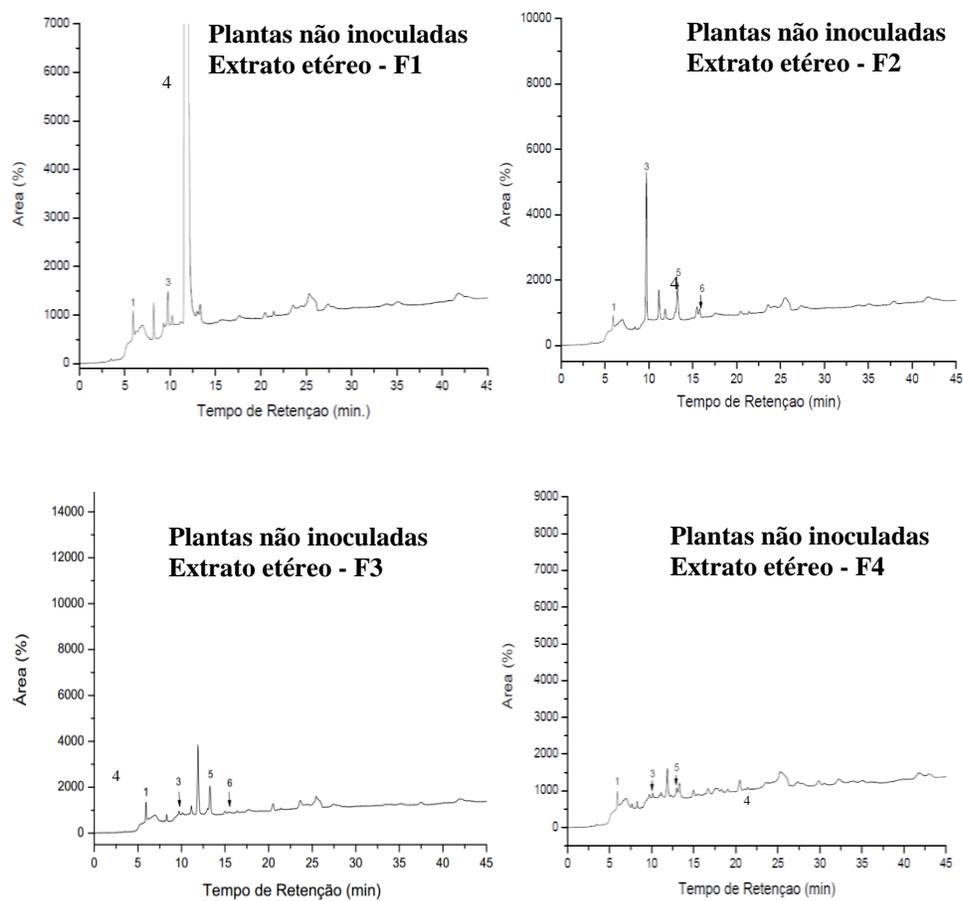


Figura 6 Cromatogramas obtidos por CLAE das frações (F1, F2, F3 e F4) provenientes do extrato etéreo das folhas de cafeiro IAPAR-59 não inoculadas.

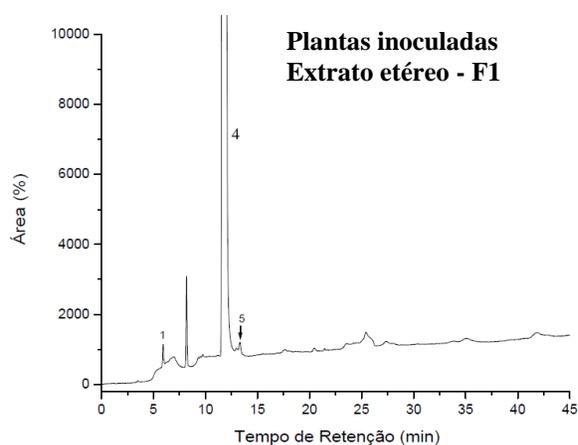
1 - Ácido Gálico; 3 - Ácido Clorogênico; 4 - Ácido Cafeico;
5 - Vanilina; 6 - Ácido p-cumárico.

Tabela 9 Teores dos compostos obtidos por CLAE das frações (F1, F2, F3 e F4) provenientes do extrato etéreo das folhas de cafeeiro IAPAR-59 não inoculadas, em µg/100 µg.

Compostos	Frações			
	F1	F2	F3	F4
1 - Ácido Gálico	29,10	42,75	29,55	14,99
3 - Ácido Clorogênico	48,74	561,25	13,55	8,30
4 - Ácido Cafeico	79056	105,61	19,40	34,32
5 - Vanilina	Nd	111,47	42,67	10,34
6 - Ácido p-cumárico	Nd	98,34	34,62	Nd

Nd: composto não detectado

Os cromatogramas demonstrados na Figura 7 são correspondentes ao extrato etéreo das folhas de cafeeiro da cultivar IAPAR-59 inoculadas com *P. syringae* pv. *garcae*. Na fração um (F1) foram detectados o ácido gálico, ácido cafeico e vanilina. Na fração dois (F2), foram identificados o ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, vanilina e trans-cinâmico, também presentes na fração três (F3), com exceção do ácido gálico e com presença do ácido p-cumárico.



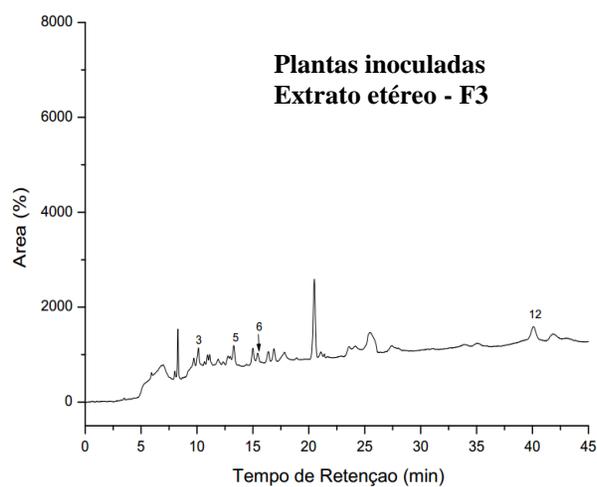
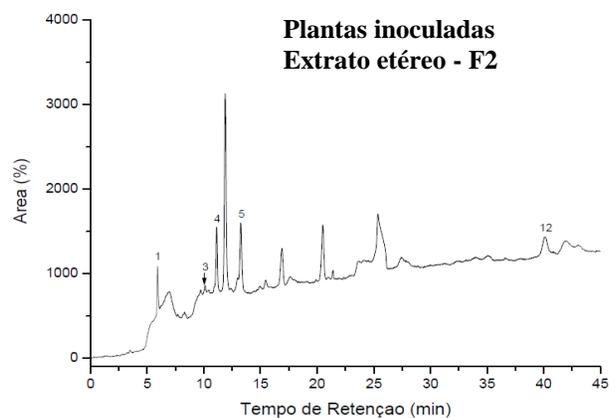


Figura 7 Cromatogramas obtidos por CLAE das frações (F1, F2 e F3) provenientes do extrato etéreo das folhas de cafeeiro IAPAR-59 inoculadas.

1 - Ácido Gálico; 3 - Ácido Clorogênico; 4 - Ácido Cafeico;
5 - Vanilina; 6 - Ácido p-cumárico; 12 - Ácido trans-cinâmico.

Tabela 10 Teores dos compostos obtidos por CLAE das frações (F1, F2, F3 e F4) provenientes do extrato etéreo das folhas de cafeeiro IAPAR-59 inoculadas, em $\mu\text{g}/100 \mu\text{g}$

Compostos	Frações		
	F1	F2	F3
1 - Ácido Gálico	30,15	41,22	Nd
3 - Ácido Clorogênico	Nd	17,60	63,09
4 - Ácido Cafeico	67920	67,17	Nd
5 - Vanilina	10,81	59,74	40,16
6 - Ácido p-cumárico	Nd	Nd	71,16
12 - Ácido trans-cinâmico	Nd	x**	0,77

x**= valor abaixo do limite de quantificação

Nd: composto não detectado.

Para o extrato etéreo de plantas não inoculadas, os ácidos gálico, clorogênico e cafeico foram detectados e quantificados em todas as frações analisadas. Para o extrato de plantas inoculadas, a vanilina foi detectada em todas as frações e o ácido p-cumárico, somente na fração três. Foi possível observar a presença do ácido trans-cinâmico somente no extrato etéreo inoculado (F2 e F3). A indução para síntese dessa fitoalexina, classificada como um fenilpropanoi de pode ter ocorrido em resposta ao ataque do patógeno.

O ácido trans-cinâmico é sintetizado pela conversão da fenilalanina, proveniente da rota do ácido chiquímico, pela enzima fenilalanina amônia liase. Essa enzima do metabolismo secundário é a mais intensivamente estudada em plantas, devido à importância nas reações do metabolismo dos compostos fenólicos, além de ser componente indireto do mecanismo de defesa das plantas.

O ácido trans-cinâmico corresponde ao primeiro fenilpropanoide-chave nas vias de síntese de lignina e ácido salicílico (SARMA; SREELAKSHMI; SHARMA, 1998). É precursor de numerosos compostos, podendo ser incorporado em vários compostos fenólicos (ácido 4-cumárico,

ácido cafeico, ácido ferúlico) encontrados na formação de ésteres, cumarinas, flavonoides e ligninas (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005). Entre as funções que essas fitoalexinas podem desempenhar destacam-se o suporte mecânico da planta proporcionado pela lignina (DIXON; PAIVA, 1995), as substâncias que atuam como protetores contra estresses abióticos como os antioxidantes e compostos que absorvem radiação UV, ou proteção contra estresses bióticos como a ação de fitopatógenos (DIXON; PAIVA, 1995).

O ácido benzoico é um composto fenólico simples e precursor da rota do ácido salicílico, considerado uma fitoalexina produzida em maçãs, resultante da infecção por *Nectria galligena* e outros patógenos (BLANCARD; LOTE; MAISONNEUVE, 2006). Assim como o ácido benzoico, o ácido trans-cinâmico, apesar de ser um composto intermediário em rotas metabólicas, também pode ser considerado uma fitoalexina, por possuir atividade antimicrobiana e antifúngica (EKMEKCIOGLU; FEYERTAG; MARKTL, 1998).

As fitoalexinas são classificadas como compostos do metabolismo secundário, sendo a taxa de produção/acúmulo próprio dos genótipos do hospedeiro e/ou patógeno (LO et al., 1996). São compostos biocidas, considerados danosos para bactérias, fungos, nematoides, plantas e animais. Mais de 300 tipos de fitoalexinas já foram identificadas entre várias classes de compostos químicos como cumarinas, diterpenos e flavonoides, entre outras, sendo caracterizadas em mais de 20 famílias de vegetais superiores. A indução para produção de fitoalexinas pode acontecer como uma resposta gerada pelo ataque do patógeno e pelo tratamento com elicitores (ou eliciadores) abióticos e bióticos, como os encontrados em plantas e fungos miceliais (STANGARLIN; KUHN; SCHWAN-ESTRADA, 2008).

Por meio do fracionamento cromatográfico foi possível obter frações semipurificadas, com mais de um composto em sua constituição química. Com as técnicas utilizadas especificamente, não foi possível o isolamento das possíveis fitoalexinas sintetizadas em resposta à interação cafeeiro x *P. syringae* pv. *garcae*. Pelos resultados obtidos por CLAE, a diferença na composição química encontrada entre as folhas inoculada e não inoculada é a presença do ácido trans-cinâmico, nas folhas submetidas à inoculação. Sugere-se para trabalhos futuros que o processo de extração inicial seja em maior escala para que se possa realizar um maior número de ensaios visando à purificação das frações bioativas.

4 CONCLUSÃO

Concluiu-se, portanto, que as folhas de cafeeiro da cultivar IAPAR-59 sadias apresentaram maior teor de compostos fenólicos e açúcares redutores. Para a atividade antioxidante, no método do DPPH a fração água apresentou a maior atividade, independente da inoculação. Pelo método do FRAP, a fração água das plantas sadias apresentou maior atividade. No teste fungitóxico, ambas apresentaram compostos capazes de inibir o crescimento do fungo *Cladosporium* sp. Foi possível identificar e quantificar na composição química das plantas sem inoculação os ácidos gálico, cafeico e clorogênico, além da vanilina. A cultivar IAPAR-59 inoculada apresentou maior concentração desses compostos e foi detectada ainda a presença de um fenilpropanoide, o ácido trans-cinâmico. A síntese desses compostos pode ter ocorrido em resposta ao ataque do patógeno.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, M. M.; MAZZAFERA, P. Efeitos do nível de inóculo de *Meloidogyne incognita* em algodoeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 19-26, 2001.

AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5th ed. Amsterdam: Elsevier, 2005. 922 p.

AMARAL, M. F. Z. J.; BARA, M. T. F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 2, n. 2, p. 5-8, 2005.

ANDRADE, P. B. et al. Preliminary study of flavonols in port wine grape varieties. **Food Chemistry**, London, v. 73, p. 397-399, 2001.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 661, n. 1, p. 232-240, 2007.

ANWAR, S. Influence of *Meloidogyne incognita*, *Paratrichodorus minor* and *Pratylenchus scribneri* on root/shoot growth and carbohydrate partitioning in tomato. **Pakistan Journal of Zoology**, Lahore, v. 27, p. 105-113, 1995.

AQUINO, F.W. B. et al. Simultaneous determination of aging markers in sugar cane spirits. **Food Chemistry**, London, v. 98, p. 569-574, 2006.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN J. J. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 239, p. 70-76, 1996.

BIANCO, M.A.; SAVOLAINEN, H. Phenolic acids as indicators of wood tannins. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 203, p. 79-82, 1997.

BLANCARD, D.; LOTE, H.; MAISONNEUVE, B. **A color atlas of diseases of lettuce and related salad crops**. New ork: Academic, 2006. p. 376.

BOARI, A. J. et al. Vírus da mancha anular do cafeeiro (Coffee ringspot virus - CoRSV): influência na qualidade da bebida e na produção de grãos de café. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 32, n. 2, p. 192-194, 2006.

BONALDO, S. M. et al. **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 11-28.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.

CABRAL, I. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1523-1527, 2009.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.). **Indução de resistência em plantas a patógenos e insetos**. Piracicaba: FEALQ, 2005. p. 81-124.

CERRUTI, P.; ALZAMORA, S.M.; VIDALES, S. L. Vanillin as antimicrobial 52 for producing shelf-stable strawberry puree. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 62, p. 608-610, 1997.

COOPER, R. M.; WOOD, R. K. S. Regulation of synthesis of cell wall degrading enzymes by *Verticillium albo-atrum* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 5, n. 2, p. 135-156, 1975.

DEGÁSPARI, C. H. **Propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos frutos da aroeira (*Schinus terebenthifolius* Raddi)**. 2004.104 p. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; GORDON, M. H. Effect of roasting on the antioxidant activity of coffee brews. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 50, n. 13, p. 3698-3703, 2002.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-induced phenyl propanoid metabolism. **Plant Cell**, Baltimore, v. 7, p. 1085-1097, 1995.

DUARTE, L. M. L. et al. Effect of Potato virus X on total phenol and alkaloid contents in *Datura stramonium* leaves. **Summa Phytopathology**, Jaguariuna, v. 34, n. 1, p. 65-67, 2008.

EKMEKCIOGLU, C.; FEYERTAG, J.; MARKTL, W. Cinnamic acid inhibits proliferation and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. **Cancer letters**, Virgínia, v. 128, p. 137-144, 1998.

EL HADRAMI, A. et al. Chitosan in plant protection. **Marine Drugs**, Basel, v. 8, n. 4, p. 968-987, 2010.

FABRI, R. L. et al. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds of Lippia species by bioautography. **Journal of Medicinal Food**. Larchmont, v. 14, n. 7/8, p. 840-846, 2011.

FELIPINI, R. B. **Avaliação de indutores de resistência para o controle da sarna da macieira (*Venturia inaequalis* cke.) e da cercosporiose da beterraba (*Cercospora beticolosa* cc.)**. 2011. 110 p. Dissertação (Mestrado Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

FERNANDES, F. L. et al. Compostos secundários de café associados a *Coccus viridis*. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6., 2009, Vitória. **Anais...** Vitória: [s. n.], 2009a.

FERNANDES, F. L. et al. Constituintes químicos em frutos e folhas em diferentes cultivares de café e relação com insetos. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 1, p. 1-8, 2009b.

FERREIRA, D.F. **SISVAR**: sistema de análise de variância. Versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J. P. Mechanisms of defense to pathogens: biochemistry and physiology. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). **Induced resistance for plant defense: a sustainable approach to crop protection**. Oxford: Blackwell, 2007. p. 109-132.

GERSHENZON, J.; Mc CONKEY, M.E.; CROTEAU, R. B. Regulation of mono terpene accumulation in leaves of peppermint. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 122, p. 205-214, 2000.

HÄKKINEN, S. et al. Screening of selected flavonoids and phenolic acids in 19 berries. **Food Research International**, Barking, v. 32, p. 345-353, 1999.

HARBORNE, J.B. Flavonoids. In: MILLER, L. P. (Ed.). **Phytochemistry**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1973.

HARTLEB, H.; HEITEFUSS, R.; HOPPE, H. **Resistance of crop plants against fungi**. Stuttgart: G. Fischer, 1997. 544 p.

JACKSON, R. Chemical constituents of grapes. In: WINE science: principles and applications. London: Academic, 1994. p. 178-219.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, p. 10129-10134, 2008.

KALLITHRAKA, S. et al. The application of an improved method for trans-resveratrol to determine the origin of Greek red wines. **Food Chemistry**, Easton, v. 75, p. 355–363, 2001.

KHODDAMI, A.; WILKES, M. A.; ROBERTS, T. H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. **Molecules**, Basel, v. 18, p. 2328-2375, 2013.

KOLEVA, I. I. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 13, n. 1, p. 8-17, Jan./Feb. 2002.

KRÖNER, A. et al. Nicotiflorin, rutin and chlorogenic acid: phenylpropanoids involved differently in quantitative resistance of potato tubers to biotrophic and necrotrophic pathogens. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 57, p. 23-31, 2012.

KUSHALAPA, A.C.; ESKES, A.B. **Coffee rust: epidemiology, resistance and management**. Boca Raton: CRC, 1989. 345 p.

LEITÃO, A. S.S. P. **Análise dos ácidos clorogénicos e avaliação do seu papel na interação *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix***. 2010. 42 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de alimentos) – Instituto Superior de Agronomia / Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2010.

LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUN, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 85, p. 1064-1068, 1995.

LO, C.S.C.; NICHOLSON, R.L. Phenolic compounds and their importance in plant disease, In: LEITE, B. et al. **Physiology, biochemistry, and molecular biology of plant-pathogen interactions**. Sao Paulo: FEALQ, 2008. p. 285-303.

LO, L. C. et al. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of a methyl ether of luteolinidin. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 49, p. 21-31, 1996.

LYONS, P. C.; WOOD, K. V.; NICHOLSON, R. L. Caffeoyl ester accumulation in corn leaves inoculated with fungal pathogens. **Phytochemistry**, New York, v. 29, p. 97-101, 1990.

MAMEDE, M. E. O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **Boletim Centro de Pesquisas em Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 22, n. 2, p. 233-252, 2004.

MARKHAM, U. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic, 1982. 113 p.

MELO, E. A. et al. Capacidade antioxidante de frutas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 44, p. 193, 2008.

MIKULIC PETKOVSEK, M.; STAMPAR, F.; VEBERIC, R. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 74, p. 60-67, 2009.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, p. 426-428, 1959.

NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convection and microwave roasting methods and content of certain compounds. **European Food Research and Technology**, Berlin, v. 217, n. 2, p. 157-163, 2003.

NICHOLSON, R. L. Events in resistance expression in maize and sorghum: Molecular and biochemical perspectives. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 21, p. 95-99, 1995.

NICHOLSON, R. L.; HAMMERSCHMIDT, R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopatology**, Palo Alto, v. 30, p. 369-389, 1992.

OLIVEIRA, J. R.; ROMEIRO, R. S.; MUCHOVEJ, J. J. Population tendencies of *Pseudomonas cichorii* and *P. syringae* pv. *garcae* in young and mature Coffee Leaves. **Journal of Phytopathology**, Berlim, v. 131, n. 3, p. 210-214, 1991.

PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 6, p. 153-162, 2000.

PEREIRA, R. B. et al. Extrato de casca de café, óleo essencial de tomilho e acibenzolar-S-metil no manejo da cercosporiose-do-cafeeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, p. 1287-1296, 2008.

PEREZ-MAGARIÑO, S. et al. Various applications of liquid chromatography–mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 847, p. 75–81, 1999.

PETKOVŠEK, M. M.; ŠTAMPAR, F.; VEBERIČ. Accumulation of phenolic compounds in apple in response to infection by the scab pathogen, *Venturia inaequalis*. **Physiological and molecular plant pathology**, London, v. 64, p. 60-67, 2009.

PIETERSE, C. M. et al. Networking by small molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, New York, v. 5, n. 5, p. 308-316, 2009.

PIETTA, P. G. et al. An improved HPLC determination of flavonoids in medicinal plant extracts. **Chromatographia**, Wiesbaden, v. 27, p. 509-512, 1989.

PRIOR, R. L.; XIANLI, W.; SCHAICH, K. Standardized methods for determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 10, p. 4290-4302, May 2005.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary polyphenolics as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 8, p. 3396-3402, 2000.

RAMIRO, D. A.; GUERREIRO FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Phenol Content, Oxidase Activities, and the Resistance of Coffee to the Leaf Miner *Leucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v.32, p. 1977-1988, 2006.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, Honolulu, v. 3, p. 25-35, 2005.

RESENDE, M. L. V. et al. Mecanismos de defesa de plantas a patógenos. In: ZAMBOLIM, L.; JESUS JÚNIOR, W. C.; RODRIGUES, F. A. (Org.). **O Essencial da fitopatologia: epidemiologia de doenças de plantas**. São Carlos: Suprema, 2014, v. 1, p. 187-210.

RIBEIRO, A.C.; GUIMARÃES, P.T.G.; ALVAREZ, V.H. (Ed.). **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5ª aproximação**. Viçosa, MG: UFV, 1999. p. 25-32.

RIBEIRO, L. F.; BEDENDO, I. P. Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*: agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 56, n. 4, p. 21-27, 1999.

RODRIGUES, F. A. et al. Chlorogenic acid levels in leaves of coffee plants supplied with silicon and infected by *Hemileia vastatrix*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 36, n. 6, p. 404-408, 2011.

ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. 417 p.

ROSATTO, S. S. et al. Amperometric biosensors for phenolic compounds determination in the environmental interest samples. **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 77–86, 2001.

ROZWALKAR, L. C.; ZAKSEVSKAS, M. L. R. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, 2008.

SALGADO, P. R. et al. Fenóis totais relacionados a resistência do cafeeiro (*Coffea arabica*) ao bicho-mineiro e a ferrugem, durante as fases de frutificação. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 6., 2009, Vitória. **Anais...** Vitória: [s. n.], 2009. 1 CD ROM.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 1999. p. 323-354.

SARMA, A. D.; SREELAKSHMI, Y.; SHARMA, R. Differential expression and properties of Phenylalanine ammonia-lyase is forms in tomato leaves. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 8, p. 2233-2243, Dec. 1998.

SBALCHEIRO, C.C. **Ação do biocontrolador com atividade de indução de resistência no controle do crestamento bacteriano comum do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 124 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo, 2006.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 910, p. 265–273, 2001.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S.F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F. et al. (Ed.). **Interação planta patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 227-248.

SHETTY, K. et al. Postharvest enhancement of phenolic phytochemicals in apples for preservation and health benefits. In: PALIYATH, G. et al. **Postharvest biology and technology of fruits, vegetables and flowers**. Ames: Wiley-Blackwell, 2008. 497 p.

SILVA, R.F. **Indução de resistência em plantas de berinjela e tomate por *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra bactérias causadoras de murcha (*Ralstonia solanacearum*) e cancro (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*)**. 2007. 109 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, New York, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOUZA, R. M.; ROMEIRO, R. S.; MUCHOVEJ, J. S. Eliciation, detection, and uv-spectrophotometry of a phytoalexin-like compound in coffee leaves by *Pseudomonas marginalis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 16, p. 12-15, 1991.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de doenças de plantas por extratos de origem vegetal. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 16, p. 265-304, 2008.

TAI, A. et al. Evaluation of antioxidant activity of vanillin by using multiple antioxidant assays. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1810, p. 170-177, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

VEGA, A. et al. Compatible GLRaV-3 viral infections affect berry ripening decreasing sugar accumulation and anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 77, p. 261-274, 2011.

VIDHYASEKARAN, P. V.; BORROMEO, E. S.; MEW, T. W.
Helminthosporium oryzae toxin suppresses phenol metabolism in rice plants and aids pathogen colonization. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 41, p. 307-315, 1992.

VILLAS-BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma.
Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, Brasília, n. 36, p. 58-69, 2006.

VITORINO, M. D. et al. Metodologias de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis. **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 26, n. 3, p. 17-24, 2001.

WOISKY, R. G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 74 p. Tese (Mestrado em Fármacos de Medicamentos) – Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo, 1996.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in Food and Their Health Benefits. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 59, p. 113–122, 2004.