
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

OTÁVIO VINÍCIUS CARRIEL PEREIRA

**O ÁCIDO HEXANOICO PODE ALTERAR A
FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA E INDUZIR O
ACÚMULO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO
CAFEIEIRO?**



**Rio Claro
2018**

OTÁVIO VINÍCIUS CARRIEL PEREIRA

O ÁCIDO HEXANOICO PODE ALTERAR A FLUORESCÊNCIA DA
CLOROFILA E INDUZIR O ACÚMULO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NO
CAFEEIRO?

Orientador: Prof. Dr. DOUGLAS SILVA DOMINGUES

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio
Claro, para obtenção do grau de Bacharel e
Licenciado em Ciências Biológicas

Rio Claro
2018

581.1 Pereira, Otávio Vinícius Carriel
P436a O ácido hexanóico pode alterar a fluorescência da
clorofila e induzir o acúmulo de compostos fenólicos no
cafeeiro? / Otávio Vinícius Carriel Pereira. - Rio Claro, 2018
9 f. : il., figs., gráfs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro

Orientador: Douglas Silva Domingues

1. Fisiologia vegetal. 2. Coffea. 3. Rubiaceae. 4. Elicidor.
5. Indução da resistência. 6. Fotossíntese. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e imensamente, de coração, aos meus pais, Luiz e Maria, por poderem proporcionar essa experiência de vida muito enriquecedora, além de apoiarem e incentivarem a escolha do curso, que foi muito além do conhecimento científico e acadêmico da Biologia.

Aos “amigos do Sandro”, verdadeiras amizades que cultivo há tanto tempo e que sempre estiveram ali, para os melhores e os piores momentos.

Aos meus colegas de turma, Sheeva, Jú, Diqua, Sarah, Lú, Thiago, Enxuto, Samuli e Padawan. Pessoas maravilhosas que conheci ao longo desses anos e que compartilharam grandes alegrias e tristezas comigo, mas que com certeza tornaram essa jornada mais leve e prazerosa, vou levar vocês para todo o sempre.

Aos meus companheiros de primeira república, Primo e Todo, que me acolheram quando vim para a cidade e me ensinaram tanto sobre a vida, botânica, música e tantas outras experiências que compartilhamos, muito obrigado! Além de Hudson Txai e Leãozinho, amigos muito queridos que compartilharam do mesmo teto que eu durante a metade da faculdade, firmeza total!!

Ao grupo Ciclone Slackline de Rio Claro, uma família que tive o enorme prazer de fazer parte e que também me abriram diversas portas e apresentaram pessoas muito especiais, vocês com certeza marcaram, e muito essa história.

Ao meu último companheiro de república, Marconi, um grande irmão que não tinha nada a ver com a faculdade, mas que, apesar de todas as desavenças e conflitos, foi uma das pessoas que mais me envolvi e compartilhei as melhores e piores experiências nesses últimos tempos de UNESP. Também foi um grande professor de vida, e me ensinou muito sobre esse mundão que tem lá fora. Muito obrigado por todo apoio, incentivo e presença nos momentos mais delicados dessa caminhada, te levarei para sempre.

E por último, mas não menos importante, ao grupo GETTRANSPLANT que me acolheu de braços abertos e torceram tanto durante o fim dessa jornada. À professora Alessandra Ike Coan, que contribuiu muito para a conclusão desse trabalho. Ao meu professor e orientador, Douglas, pela paciência, orientação e todos os ensinamentos acadêmicos durante esse último capítulo de graduação, muito obrigado!!!

Agradeço ainda, a todas as situações que levaram a criação do projeto “Racha Coco”, que surgiu em meio a esse rebuliço universitário e me reinseriu na música novamente, obrigado mundão!

RESUMO

O Brasil é o maior produtor e exportador de café no mundo; com isso, este produto tem uma importância significativa para a economia nacional. Uma estratégia em práticas agronômicas que pode resultar em um menor uso de defensivos agrícolas consiste na indução da resistência (IR) em plantas. A IR consiste na ativação de mecanismos de defesa latentes da planta por meio de tratamento prévio com eliciadores, substâncias que podem induzir a produção de metabólitos secundários, como compostos fenólicos. Os compostos fenólicos abrangem um extenso grupo de substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas, podendo ter efeito inibitório na germinação de esporos e no crescimento micelial, que estão envolvidos em respostas bioquímicas e estruturais de resistência em plantas. O ácido hexanoico (Hx) é um exemplo de substância que pode ser um eliciador indutor da resistência, com ação em diversas espécies vegetais e interações com patógenos. Estudos mais recentes identificaram metabólitos induzidos pela aplicação de ácido hexanoico em tomateiros e citros, sugerindo que ele seja capaz de reprogramar o metabolismo primário e secundário. No presente projeto, foi avaliado se a ação da aplicação de 0,6 mM de Hx por 48h alteraria os padrões de fluorescência da clorofila e a induziria a formação de idioblastos contendo compostos fenólicos em plantas de *Coffea arabica*. A hipótese foi testada em plantas mantidas em solução nutritiva, nas quais foi medida a eficiência quântica do fotossistema II e foi contabilizado o número de idioblastos contendo compostos fenólicos em secções anatômicas transversais da nervura da região mediana da lâmina foliar em cotilédones e eofilos. Não foram identificadas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo de tratamento com Hx, tanto para a eficiência quântica do fotossistema II quanto para a indução de compostos fenólicos. Com isso, conclui-se que o uso deste indutor em cafeeiro na concentração utilizada não provoca impactos no rendimento de fotossíntese nem no acúmulo de compostos secundários em termos qualitativos.

Palavras-chave: Fisiologia vegetal, Rubiaceae, *Coffea*, eliciador, indução da resistência, fotossíntese

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. OBJETIVOS	9
3. MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 Material vegetal e tratamento.....	10
3.2 Análise anatômica.....	11
3.3 Análise da fluorescência da clorofila.....	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
4.1 Fluorescência da clorofila.....	12
4.2 Compostos fenólicos: análises anatômicas.....	13
5. CONCLUSÃO	14
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15

1. INTRODUÇÃO

O café brasileiro é reconhecido mundialmente e segundo dados de 2017 da Cecafé, o Brasil é o maior produtor e exportador da *commodity*. Além disso, o café não torrado, não descafeinado, em grão, foi o 6º produto mais exportado pelo país em 2016 (SEBRAE, 2016).

São descritas 124 espécies no gênero *Coffea* (Rubiaceae), que são nativas da África e da Ásia (DAVIS et al., 2011). O centro de diversidade de *C. arabica* é o sudoeste da Etiópia, onde ainda crescem indivíduos selvagens (CLARINDO, 2008; CARVALHO, 2013). Sabe-se que a base genética das cultivares é bastante estreita (Lashermes et al., 1996; Ferrão et al., 2015), pois, além de *C. arabica* ser uma espécie predominantemente autógama, a enorme maioria das cultivares são derivadas de duas populações-base do século XVIII: Typica e Bourbon (ANTHONY et al., 2002; VIDAL et al., 2010).

Mais de 70% do material genético das cultivares brasileiras é relacionado às cultivares Mundo Novo e Catuaí, que nada mais são que cruzamentos das duas populações base (SETOTAW et al., 2013). Contudo, desde a década de 1990, a partir de processos de melhoramento genético e hibridação com germoplasma de outras procedências, tem sido introduzido no parque cafeeiro nacional cultivares com maior resistência a doenças, especialmente a ferrugem.

Uma estratégia muito utilizada em práticas agrônômicas é a indução de resistência (IR) em plantas. Ela é um método de ativação dos mecanismos de defesa latentes da planta através de tratamentos prévio envolvendo agentes químicos – os eliciadores. Estas substâncias podem induzir a produção de compostos secundários, como compostos fenólicos, que são interessantes para indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos (SILVA et al., 2015). Dessa forma, eliciadores fazem com que as plantas ativem seus próprios mecanismos de defesa e quando expostas novamente a um fator de estresse (biótico ou abiótico), as plantas respondem de forma mais rápida e efetiva ao estímulo (ALAMINO, 2013).

Um exemplo de eliciador utilizado em plantas é o ácido hexanoico, um ácido carboxílico utilizado como ácido graxo na indústria de cosméticos para a fabricação de condicionadores e cremes, derivado do hexano e tem seis carbonos. Também é conhecido como ácido capróico, por ser considerado o composto que produz o cheiro característico de caprinos (http://gestis-en.itrust.de/nxt/gateway.dll/gestis_en/028160.xml).

Alguns trabalhos indicavam a atividade antimicrobiana decorrente da aplicação de ácidos graxos em plantas, como de Vicedo et al. (2006) e Levya et al. (2008). Os estudos

pioneiros constavam em observar que o ácido hexanoico tinha ação na interação entre o fungo necrótico *Botrytis cinerea* (mofo cinzento) e o tomateiro, também exposto por Levy et al. (2008). Relatou-se que o ácido hexanoico foi capaz de promover uma resposta preventiva (ou indução da resistência) e os índices de necrose foram menores após a aplicação do ácido hexanoico por *spray* foliar, ou radicular em solução nutritiva, antes da infecção pelo fungo. Estudos *in vitro* demonstraram que a substância também tem ação fúngica, inibindo a germinação de esporos, como demonstrado por Levy et al. (2008). Grosso modo, postulou-se que a aplicação de baixas concentrações (faixa de 1 a 5 mM) de ácido hexanoico teria um efeito indutor da resistência, e que concentrações mais altas (de 6 a 20 mM) teria um efeito bactericida e fungicida, mas sem efeitos de toxicidade em plantas (ARANEGA-BOU et al., 2014).

Elicidores como o ácido hexanoico podem induzir a produção de metabólitos secundários, como compostos fenólicos. Estes são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. A atividade antioxidante desses compostos deve-se, principalmente, às suas propriedades redutoras e estrutura química (SILVA, 2015), com isso, os compostos fenólicos desempenham papel importante na proteção celular, pois são capazes de sequestrar ou inibir as diversas espécies de oxigênio reativo, transferir elétrons para radicais livres, ativar enzimas antioxidantes e inibir enzimas oxidases (RUBIO, 2017). O nível máximo de compostos fenólicos em cafeeiro geralmente é encontrado em folhas jovens (eofilos ou cotilédones) (AERTS et al., 1994; MONDOLOT et al., 2006).

Dois recentes trabalhos identificaram metabólitos induzidos pela aplicação do ácido hexanoico (CAMANES et al., 2015; LLORENS et al., 2016) em tomateiros e citros. Foi observado que a aplicação do ácido hexanoico diminui a produção de metabólitos da via do aspartato e aminoácidos de cadeia ramificada, mas induz a produção de frutose, oxilipinas e fosfolípídeos (CAMANES et al., 2015). É importante ressaltar ainda que estes trabalhos têm grande ênfase nas relações planta/patógeno, com pouco aprofundamento no efeito *per se* da aplicação do ácido hexanoico no metabolismo vegetal. Em síntese, observa-se que o ácido hexanoico é capaz de reprogramar o metaboloma primário e secundário.

A fotossíntese ocupa uma posição central na assimilação de carbono em plantas fornecendo uma ligação entre o metabolismo vegetal e o ambiente externo (ZANANDREA et al., 2014). É um processo essencial ao metabolismo e sua taxa de atividade pode dar indícios a respeito da homeostasia do organismo vegetal. Condições de estresse podem levar a “fotoinibição”, fenômeno no qual resulta em danos por inatividade do fotossistema II

(MURCHIE; LAWSON, 2013). Esta condição pode ser detectada através de alterações na assimilação de CO₂ ou na emissão da fluorescência da clorofila *a*, devido a reduções na capacidade fotossintética decorrente de alterações nas atividades do fotossistema II (PSII) (LAGE-PINTO et al., 2012).

A energia luminosa absorvida pelas moléculas de clorofila pode ter três destinos: conduzir a fotossíntese (fotoquímica), ser dissipada como calor (energia excessiva) ou pode ser reemitida como luz - fluorescência da clorofila (estado de excitação que se encontra o Fotossistema II – PSII) (HONORATO JÚNIOR et al., 2015). Estes processos ocorrem competitivamente entre si, e o aumento na eficiência de um destes reflete em uma queda de rendimento nos demais (BAKER, 2008).

Visto que as medições são rápidas, não requerem equipamentos custosos ou técnicas avançadas de laboratório e oferecerem uma avaliação quantitativa do nível de estresse, a análise de fluorescência é uma importante forma de análise de respostas a estresses ambientais, já que qualquer estresse que retarde o crescimento resulta em menor eficiência do processamento da luz. Este é um método não-invasivo, não-destrutivo e altamente sensível para análise de doenças foliares na fotossíntese (HONORATO JÚNIOR et al., 2015).

Sabe-se que a fluorescência é a re-emissão da luz absorvida em longos comprimentos de ondas (baixa energia); sendo assim o cloroplasto absorve a luz nas regiões azul e vermelha do espectro visível e a re-emite sob a forma de luz vermelha distante. A fluorescência da clorofila é uma medida arbitrária sem unidade, devido às peculiaridades de cada instrumento de fluorescência (intensidade lâmpada e ângulo de incidência) ou de cada folha (como a espessura e teor de clorofila), sendo assim, esta análise é apenas significativa quando normalizada contra uma segunda medição da mesma amostra com o mesmo instrumento. Com isso, as duas medidas utilizadas são “Fo” e “Fmax”, sendo que a diferença entre estes dois valores pode ser denominada como fluorescência variável (Fv) (CESSNA et al., 2010).

A aplicação de um pulso saturante induz o máximo valor de fluorescência por meio do fechamento dos centros de reação (MURCHIE; LAWSON, 2013), assim, a fluorescência da clorofila atinge sua capacidade máxima em alguns milésimos de segundo, devido à redução total do fotossistema II, incapacitando o sistema de receber qualquer outro elétron; com isso, qualquer fóton excedente será dissipado sob a forma de calor ou re-emitido como fluorescência, ao invés de ser utilizado para a fotoquímica. Com esse método, é possível estimar o valor da diferença entre a fluorescência mínima (Fo) e a fluorescência máxima (Fm), obtendo-se a fluorescência variável (Fv). “Fo” é denominado como o nível basal de fluorescência, o qual ocorre no escuro, quando a intensidade de fluorescência é relativamente

baixa, devido à abertura dos fotossistemas e grande parte da energia absorvida estar sendo direcionada aos sistemas fotoquímicos. “F_{max}” é indicada como o nível máximo de fluorescência e é medida logo após o flash luminoso de alta intensidade. A proporção de F_v para F_m (F_v/F_m) é uma medida de eficiência de processamento de luz e está positivamente correlacionada com taxas fotossintéticas máximas, crescimento do vegetal e produtividade, e inversamente correlacionada com dissipação térmica da luz absorvida (CESSNA et al., 2010). Para folhas sem estresse, essa razão tem valor aproximado de 0,83 (MURCHIE et al., 2013). Qualquer tipo de estresse resulta na inativação danosa do fotossistema II e consequentemente em valores mais baixos para F_v/F_m. Dessa maneira, como medidas de F_v/F_m podem fornecer a fração de energia luminosa direcionada à fotossíntese relativo ao valor total da luz absorvida pela folha, têm sido uma das técnicas mais utilizadas para medições de estresse foliar (CESSNA et al., 2010; MURCHIE, et al., 2013).

2. OBJETIVOS

O presente estudo avaliou se a aplicação de ácido hexanoico em solução nutritiva era capaz de promover a queda na eficiência quântica máxima do fotossistema II em folhas de *Coffea arabica* e se também era possível observar o acúmulo de compostos fenólicos em folhas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

A figura 1 ilustra a estratégia do presente trabalho, a ser detalhada nas etapas posteriores:

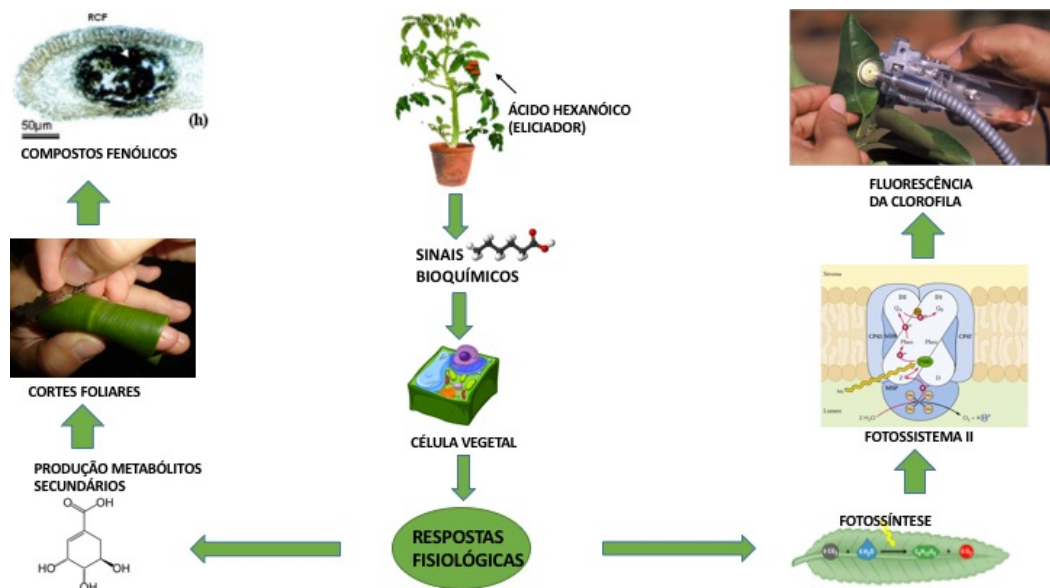


Figura 1. Estratégia de desenvolvimento do trabalho

3.1 Material vegetal e tratamento

Foram utilizadas plantas de *Coffea arabica* cultivar Obatã IAC 669-20. As mudas, plantadas em sacos de polietileno perfurado, foram adquiridas de viveiro certificado.

Plantas de tamanho uniforme com 3 a 4 pares de folhas foram mantidas em telado sombreado, sob condições naturais de temperatura e fotoperíodo, sem restrições de nutrição e irrigação, com plantas dispostas de maneira a receber a mesma incidência de luz até a execução dos experimentos. Para a execução dos experimentos, as plantas foram removidas dos sacos de polietileno e lavadas com água corrente e água deionizada para a remoção da terra do sistema radicular.

As plantas foram então transferidas para vasos com 3,0 L de solução nutritiva aerada, adaptada de Clark (1975) por Carvalho et al. (2013), onde foram cultivadas em um conjunto de três plantas por vaso. O experimento foi executado em sala de crescimento, com temperatura controlada a 23°C e regime de luz com ciclo de 12h/12h. O fornecimento contínuo de oxigênio atmosférico à solução nutritiva foi feito por meio de compressores de ar.

A iluminação artificial foi fornecida por painéis de LED cuja densidade de fótons média foi entre 400 e 600 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$. O pH da solução nutritiva foi medido diariamente (pHmetro AKSO – modelo AK59) e ajustado para 5,5 – 5,6 com hidróxido de sódio ou ácido clorídrico, quando necessário. As plantas foram mantidas em aclimação por no mínimo três dias. Após a aclimação, a solução nutritiva era substituída para a imposição de um dos tratamentos: controle sem ácido hexanoico ou tratamento com ácido hexanoico na concentração final de 0,6 mM (2,3 mL de ácido hexanoico ultrapuro da marca Merck, código 2915 90 70, em 3L de solução nutritiva). Os tratamentos foram mantidos por 48 horas.

Cada tratamento foi repetido por ao menos duas vezes, com o cultivo de, no mínimo, três vasos com três plantas cada. A medição de fluorescência de fotossíntese seguiu procedimentos similares ao já utilizados em experimentos realizados para o gênero *Coffea* (KONRAD et al., 2005). As medições foram realizadas imediatamente antes da imposição dos tratamentos, 24 horas e 48 horas após os tratamentos. Todas as medições foram realizadas entre 8h e 9h da manhã, cerca de 2 a 3 horas após a retomada do ciclo de luz na sala de crescimento.

3.2 Análise da fluorescência da clorofila

A fluorescência da clorofila *a* foi avaliada utilizando-se o fluorômetro portátil de luz modulada JUNIOR-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). Foram realizadas de três a cinco determinações de fluorescência de clorofila de folhas maduras do terço médio da planta. Cada medição foi realizada em indivíduos escolhidos de maneira aleatória.

As folhas utilizadas para as medidas fotossintéticas foram adaptadas ao escuro (recobertos com papel alumínio e sacos de polietileno) por no mínimo 30 minutos. Após adaptação ao escuro, eram medidos os valores de fluorescência inicial (F_o) e a fluorescência máxima (F_m), por meio de um pulso saturante emitido pelo fluorômetro nas folhas pré-adaptadas. Assim, pôde ser efetuada a curva de indução da fotossíntese e obtida a fluorescência variável (F_v), através da relação $F_v = F_m - F_o$ (KONRAD et al., 2005; NETTO et al., 2005). A partir destes valores foi calculada a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m).

Os valores de F_v/F_m foram comparados entre tratamentos em cada período (0h, 24h e 48h). Os dados foram analisados estatisticamente pelo Test t de Student, no programa Paleontological Statistics (Past) versão 3.19 (HAMMER et al., 2001) para um número amostral de 10 para o grupo controle e 6 para o grupo de tratamento. As diferenças seriam consideradas significativas ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

3.3 Análise anatômica

Para a análise do conteúdo fenólico, foram realizadas secções anatômicas transversais de amostras do terço mediano da lâmina foliar, na região da nervura principal, tanto de folhas cotiledonares como de eofilos. Para isso, o material fresco de plantas na condição controle e de plantas tratadas foi coletado e armazenado em álcool etílico 70%. Experimentos preliminares permitiram verificar que este procedimento de fixação não interferiu no conteúdo fenólico dos idioblastos, porém facilitou a contagem dos idioblastos devido à clarificação do parênquima clorofiliano. As secções anatômicas foram obtidas à mão livre, com auxílio de lâminas de barbear, e, em seguida, submetidas ao teste histoquímico para compostos fenólicos (Reeve, 1951). As secções foram submetidas à reação com uma gota de nitrato de sódio 10% (v/v), uma gota de ácido acético 10% e uma gota de uréia 20%, em vidro de relógio, por 3 minutos, em seguida adicionadas duas gotas de Hidróxido de Sódio 2N. As lâminas

histológicas foram montadas com água destilada e imediatamente observadas e analisadas ao microscópio de luz.

A interpretação dos resultados foi feita a partir da contagem visual da quantidade de idioblastos fenólicos em cada seção foliar, num campo de aproximadamente 10000 μm^2 . Para cada amostra (cotilédone controle, cotilédone tratamento, eofilo controle e eofilo tratamento – Figura 4 A-D) foram feitas seis leituras, correspondentes a seis cortes obtidos aleatoriamente de ao menos dois indivíduos. O resultado das contagens foi comparado pelo teste Test t de Student, no programa Paleontological Statistics (Past) versão 3.19 (HAMMER et al., 2001), para determinação da significância dos resultados. As diferenças seriam consideradas significativas ao intervalo de confiança de 95% ($p < 0,05$).

A documentação das imagens foi realizada em fotomicroscópio Leica, modelo DMLB, com câmera digital DFC 295 acoplada e projeção da escala micrométrica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fluorescência da clorofila

A eficiência quântica do fotossistema II variou entre 0,4 e 0,6. Mas não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratamento com ácido hexanoico para a relação Fv/Fm. A figura 2 ilustra esta comparação.

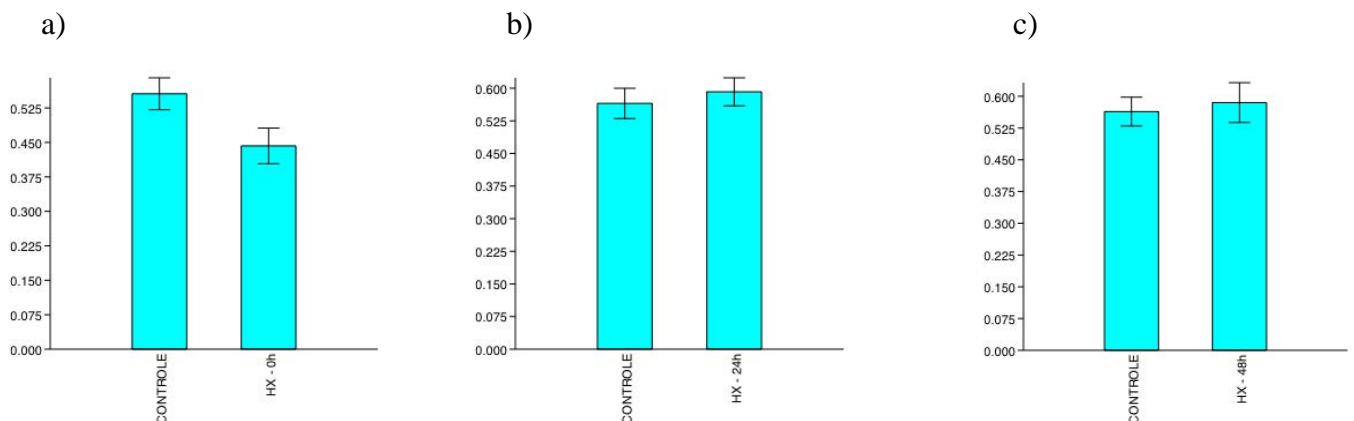


Figura 2. Eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm) em tratamento com ácido hexanoico 0,6 mM (Hx), em a) 0h de adição de Hx, b) 24h de adição de Hx e c) 48h de adição de Hx.

Ainda não é certo na literatura quais são os processos que causam o aumento da fluorescência de Fo para Fm, a fluorescência variável (Fv), mas assume-se que Fv é determinado pelo estado reduzido da primeira quinona aceptora do fotossistema II (PSII).

Qualquer tipo de estresse resulta na inativação do PSII, resultando em valores mais baixos para a relação Fv/Fm, e consequentemente menor eficiência quântica do fotossistema II (KALAJI et al., 2014; MURCHIE & LAWSON, 2013).

Considerando-se que a aplicação de eliciadores podem ocasionar alterações em rotas sinalizadoras como o fluxo de íons, ativação de reação em cascata e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (DELAUNOIS et al., 2014), era esperado que os tratamentos de ácido hexanoico (Hx) causassem algum tipo de alteração metabólica a ponto de atingir o fotossistema II, como no trabalho de Scalschi et al. (2013) em que foi relatado alterações em parâmetros fisiológicos após aplicação de Hx, como aumento nas taxas fotossintéticas, transpiração e abertura estomatal.

Apesar disso, as comparações feitas indicam que não houve diferença significativa para as taxas de Fv/Fm entre o grupo controle e tratamento com ácido hexanoico para a concentração de Hx aplicada. Esta concentração foi determinada por meio de experimentos-piloto, nos quais o objetivo foi encontrar uma concentração na qual o eliciador não causasse toxicidade às plantas. É importante também ressaltar que o tempo de aplicação do Hx pode causar alguma resposta em tempos superiores a 48h de exposição.

4.2. Compostos fenólicos: análises anatômicas

O número de idioblastos fenólicos observados foi de 35 a 40 em cotilédones e de 80 a 90 em eofilos. Não houve diferença significativa entre o número de idioblastos fenólicos nos grupos comparados (Figura 3).

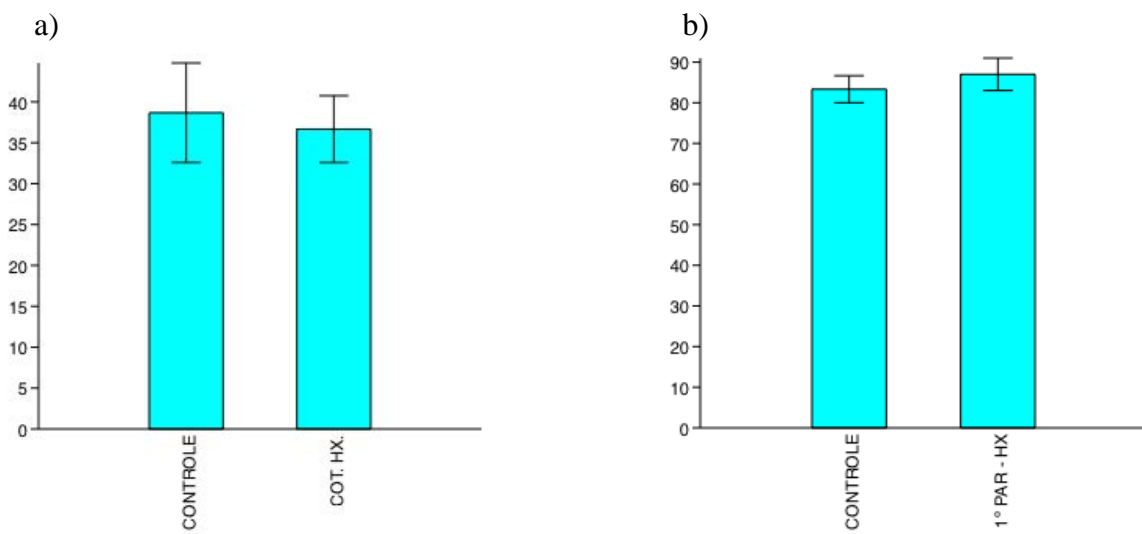


Figura 3. Médias obtidas para cada grupo. a) Comparação entre folhas de cotilédones (COT), grupo controle e tratamento de Hx. b) Comparação entre eofilos, grupo controle e tratamento.

Compostos fenólicos são compostos secundários sintetizados a partir de intermediários do metabólito primário, através de rotas como a de fenilpropanóides. As substâncias então produzidas fazem parte do arsenal defensivo da planta, e sua ação não está restrita a um composto em particular (MENA et al., 2015).

O teste histoquímico aplicado permitiu que os idioblastos fenólicos fossem corados e assim contabilizados para comparação. Todos os materiais avaliados apresentaram idioblastos com compostos fenólicos, porém sem diferença significativa em seu padrão. A Figura 4 ilustra o padrão encontrado em cotilédones e eófilos; ambos os órgãos não apresentaram diferença significativa. Os idioblastos fenólicos distribuem-se por todo o mesofilo, tanto de folhas cotiledonares como de eófilos.

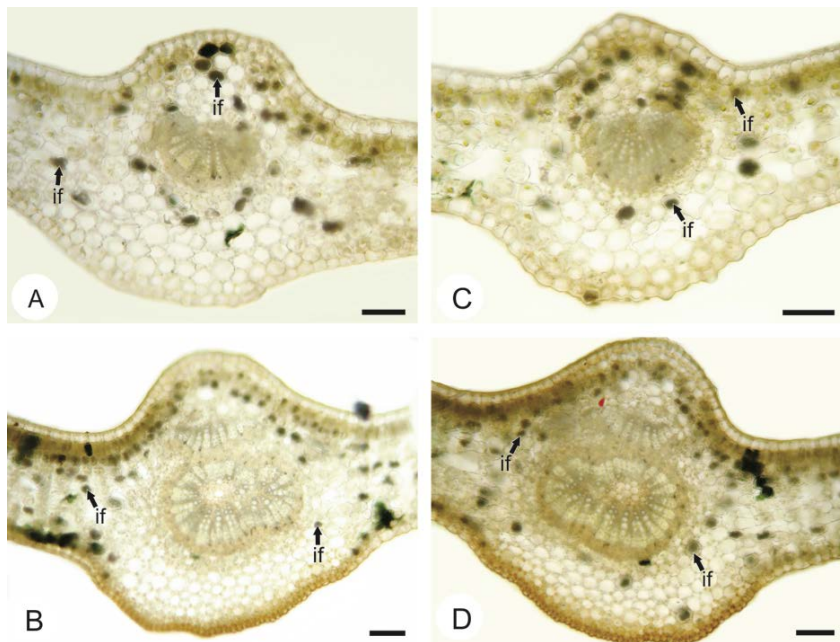


Figura 4. Teste histoquímico em amostras de cotilédones e eófilos de *Coffea*. A. Cotilédone, controle. B. Eófilo, controle. C. Cotilédone, tratamento. D. Eófilo, tratamento. Abreviatura: if = idioblasto fenólico. Barras de escalas: A–D = 10 μ m.

Este resultado é concordante com o obtido para os valores de fluorescência variável, mostrando que em um segundo aspecto metabólico (produção de fenólicos), o Hx não foi capaz de induzir ou diminuir a produção de compostos fenólicos.

5. CONCLUSÃO

A concentração e tempo de ação do ácido hexanoico testados não causaram alterações na eficiência quântica do fotossistema II e não influenciaram no número de idioblastos com

compostos fenólicos em cotilédones e eofilos de cafeeiro. Estes resultados indicam que o eliciador teve baixo impacto no metabolismo de fenólicos e na fotossíntese. Até o momento, o eliciador teria potencial uso prático agrônômico, já que este propõe uma alternativa aos pesticidas convencionais, e não causa toxicidade nem altera o metabolismo primário do organismo quando aplicado na concentração e tempo avaliados. Em tomate, essa concentração foi capaz de aumentar a tolerância a patógenos (SCALSCHI et al., 2013).

Duas vertentes de pesquisa decorrentes do presente estudo são: I) outras concentrações e tempo de ação poderiam ter impacto na fluorescência da clorofila? II) Esta concentração e tempo são capazes de diminuir a progressão de patógenos no cafeeiro? Futuros trabalhos podem assim responder a estas questões.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, R. J.; BAUMANN, T. W. **Distribution and utilization of chlorogenic acid in Coffea seedlings**. Journal of Experimental Botany, v. 45, n. 4, p. 497-503, 1994

ALAMINO, D. A. et al. **Indução de resistência à podridão-amarga em maçãs pelo uso de eliciadores em pós-colheita**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 48, n. 3, p. 249-254, 2013.

ANTHONY, F. et al. **The origin of cultivated Coffea arabica L. varieties revealed by AFLP and SSR markers**. TAG Theoretical and Applied Genetics, v. 104, n. 5, p. 894-900, 2002.

ARANEGA-BOU, P. et al. **Priming of plant resistance by natural compounds. Hexanoic acid as a model**. Frontiers in plant science, v. 5, 2014.

BAKER, N. R. **Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo**. Annu. Rev. Plant Biol., v. 59, p. 89-113, 2008.

CAMAÑES, G. et al. **An untargeted global metabolomic analysis reveals the biochemical changes underlying basal resistance and priming in Solanum lycopersicum, and identifies 1-methyltryptophan as a metabolite involved in plant responses to Botrytis cinerea and Pseudomonas syringae**. The Plant Journal, v. 84, n. 1, p. 125-139, 2015.

CARVALHO, K. et al. **Nitrogen starvation, salt and heat stress in coffee (Coffea arabica L.): identification and validation of new genes for qPCR normalization**. Molecular biotechnology, v. 53, n. 3, p. 315-325, 2013.

CECAFÉ– Conselho dos Exportadores de Café do Brasil. **Estatísticas mensais de exportação**, Março de 2017 [relatório na internet]. São Paulo; 2017. Disponível em: <<http://www.cecafe.com.br/dados-estatisticos/exportacoes-mundiais/>>. Acesso 01 jun 2017.

CESSNA, S., et al. **Exploring photosynthesis and plant stress using inexpensive chlorophyll fluorometers**. Journal of Natural Resources & Life Sciences Education, v. 39, n. 1, p. 22-30, 2010.

COSTA, A. S.; SILVA, D. M. A. **Mancha aureolada do cafeeiro**. Bragantia, Campinas, v.19, p. 92-98, 1960.

CLARINDO, W. R.; CARVALHO, C. R. **First Coffea arabica karyogram showing that this species is a true allotetraploid**. Plant Systematics and Evolution, v. 274, n. 3-4, p. 237-241, 2008.

DA SILVA, R. A. et al. **Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos**. Embrapa Agrobiologia-Documentos (INFOTECA-E), 2008.

DAVIS, A. P. et al. **Growing coffee: Psilanthus (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of Coffea**. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 167, n. 4, p. 357-377, 2011.

DELAUNOIS, B. et al. **Elicitors as alternative strategy to pesticides in grapevine? Current knowledge on their mode of action from controlled conditions to vineyard**. Environmental Science and Pollution Research, v. 21, n. 7, p. 4837-4846, 2014.

FERRÃO, R. G. et al. **EMCAPA 8141-Robustao capixaba, variedade clonal de cafe conilon tolerante a seca, desenvolvida para o estado do Espírito Santo**. Revista Ceres (Brasil), v. 47, n. 273, p. 555-559, 2000.

FIORANI F., et al. **Imaging plant dynamics in heterogeneous environments**. Current opinion biotechnology, v. 23, n. 2, p. 227-235, 2012.

GORNI, P. H., et al. **Increased biomass and salicylic acid elicitor activity in fennel (Foeniculum vulgare Miller)**. Brazilian Journal of Food Technology, p. 20, 2017.

HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., RYAN, P.D. **PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis**. Palaeontologia Electronica 4(1): 9pp, 2001. Disponível em <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>. Acesso em 10 mar 2018.

HONORATO JÚNIOR, J. et al. **Effects of Epoxiconazole and Pyraclostrobin Fungicides in the Infection Process of Hemileia vastatrix on Coffee Leaves as Determined by Chlorophyll a Fluorescence Imaging**. Journal of Phytopathology, v. 163, n. 11-12, p. 968-977, 2015.

KALAJI, H. M. et al. **Frequently asked questions about in vivo chlorophyll fluorescence: practical issues**. Photosynthesis research, v. 122, n. 2, p. 121-158, 2014.

KONRAD, M. L. F. et al. **Trocas gasosas e fluorescência da clorofila em seis cultivares de cafeeiro sob estresse de alumínio**. Bragantia, v. 64, n. 3, p. 339-347, 2005.

KRAVCHUK, Zhana et al. **Priming for JA-dependent defenses using hexanoic acid is an effective mechanism to protect Arabidopsis against B. cinerea.** Journal of plant physiology, v. 168, n. 4, p. 359-366, 2011.

LAGE-PINTO, F. et al., **Photosynthetic analyses of two native Atlantic Forest species in regenerative understory of eucalyptus plantation.** Brazilian Journal of Plant Physiology, v. 24, n. 2, p. 95-106, 2012.

LASHERMES, P. et al. **Genome rearrangements derived from homoeologous recombination following allopolyploidy speciation in coffee.** The Plant Journal, v. 78, n. 4, p. 674-685, 2014.

LEYVA, M. O. et al. **Preventive and post-infection control of Botrytis cinerea in tomato plants by hexanoic acid.** Plant pathology, v. 57, n. 6, p. 1038-1046, 2008.

LICHETENTHALER, H. K., & MIEHÉ, J. A. **Fluorescence imaging as a diagnostic tool for plant stress.** Trends in plant science, v. 2, n. 8, p. 316-320, 1997.

LIMA, A. L. S. et al. **Photochemical responses and oxidative stress in two clones of Coffea canephora under water deficit conditions.** Environmental and Experimental Botany, v. 47, n. 3, p. 239-247, 2002.

LLORENS, E. et al. **Hexanoic acid provides long-lasting protection in 'Fortune' mandarin against Alternaria alternata.** Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 91, p. 38-45, 2015a.

LLORENS, E. et al. **Induced resistance in sweet orange against Xanthomonas citri subsp. citri by hexanoic acid.** Crop Protection, v. 74, p. 77-84, 2015b.

LLORENS, E. et al. **Priming by Hexanoic Acid Induce Activation of Mevalonic and Linolenic Pathways and Promotes the Emission of Plant Volatiles.** Frontiers in Plant Science, v. 7, p. 495, 2016.

MAHLEIN, A.-K. et al. **Recent advances in sensing plant diseases for precision crop protection.** European Journal of Plant Pathology, v. 133, n. 1, p. 197-209, 2012.

MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. **Chlorophyll fluorescence—a practical guide.** Journal of experimental botany, v. 51, n. 345, p. 659-668, 2000.

MENA, E. et al. **Respuesta histoquímica de plantas de banano cv. Grande naine inoculadas con Mycosphaerella fijiensis y filtrado de cultivo de Bacillus pumilus CCIBP-C5.** Biotecnología Vegetal, v. 15, n. 2, 2015.

MONDOLOT, L. et al. **Evolution in caffeoylquinic acid content and histolocalization during Coffea canephora leaf development.** Annals of Botany, v. 98, n. 1, p. 33-40, 2006.

MURCHIE, E. H., & LAWSON, T. **Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications.** Journal of experimental botany, v. 64, n. 13, p. 3983-3998, 2013.

NETTO, A. T. et al. **Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves.** Scientia Horticulturae, v. 104, n. 2, p. 199-209, 2005.

PIETERSE, C. M. et al. **Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression.** The Plant Cell, v. 8, n. 8, p. 1225-1237, 1996.

POMPELLI, M. F. et al. **Photosynthesis and photoprotection in coffee leaves is affected by nitrogen and light availabilities in winter conditions.** Journal of plant physiology, v. 167, n. 13, p. 1052-1060, 2010.

RASUL, S. et al. **Nitric oxide production mediates oligogalacturonide-triggered immunity and resistance to Botrytis cinerea in Arabidopsis thaliana.** Plant, cell & environment, v. 35, n. 8, p. 1483-1499, 2012.

REEVE, R. M. **Histochemical tests for polyphenols in plant tissues.** Stain Technology v. 34, p. 209-211, 1951.

ROLFE, S. A.; SCHOLLES, J. D. **Chlorophyll fluorescence imaging of plant-pathogen interactions.** Protoplasma, v. 247, n. 3-4, p. 163-175, 2010.

RUBIO, F. T. V. **Biossorção de compostos fenólicos de bagaços de uva em Saccharomyces cerevisiae: mecanismos do processo e bioacessibilidade.** 94f. (Mestrado em Tecnologia de alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

SILVA, J. A. G. D. **Quantificação de metabólitos secundários relacionados à resposta de defesa do cafeeiro contra Pseudomonas syringae pv. garcae.** 111f. (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

SCALSCHI, L., et al. **Hexanoic acid is a resistance inducer that protects tomato plants against Pseudomonas syringae by priming the jasmonic acid and salicylic acid pathways.** Molecular plant pathology, v. 14, n. 4, p. 342-355, 2013.

SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. **Continuous recording of photochemical and non-photochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer.** Photosynthesis research, v. 10, n. 1-2, p. 51-62, 1986.

SEBRAE – Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Boletim de Comércio Exterior, período de 2012 a 2016** [relatório na internet]. São Paulo; 2017. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/RN/Anexos/Boletim_rev_Anual_d_e_Comercio_Exterior_2016_.pdf>. Acesso em 01 jun. 2017.

SETOTAW, T. A. et al. **Coefficient of Parentage in Coffea arabica L. Cultivars Grown in Brazil.** Crop Science, v. 53, n. 4, p. 1237-1247, 2013.

SILVA, V. A. et al. **Uso de características fisiológicas na identificação de genótipos de café arábica tolerantes ao Meloidogyne paranaenses.** Coffee Science, Lavras, v. 10, n. 2, p. 242 – 250, 2015.

VICEDO, B. et al. **Control of the phytopathogen *Botrytis cinerea* using adipic acid monoethyl ester.** Archives of microbiology, v. 184, n. 5, p. 316-326, 2006.

VIDAL, R. O. et al. **A high-throughput data mining of single nucleotide polymorphisms in *Coffea* species expressed sequence tags suggests differential homeologous gene expression in the allotetraploid *Coffea arabica*.** Plant physiology, v. 154, n. 3, p. 1053-1066, 2010.

WANG, Y.; LOAKE, G. J.; CHU, C. **Cross-talk of nitric oxide and reactive oxygen species in plant programmed cell death.** Frontiers in Plant Science, v. 4, 2013.

ZANANDREA, I., et al. **Efeito da salinidade sob parâmetros de fluorescência em *Phaseolus vulgaris*.** Current Agricultural Science and Technology, v. 12, p. 2, 2014.

Otávio Vinícius Carriel Pereira

Douglas Silva Domingues