

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 10/09/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E QUÍMICA ORGÂNICA

LILIAN CHERUBIN CORREIA

Estudo metabolômico de genótipos de café resistentes ou suscetíveis ao bicho-mineiro-do-cafeeiro (*Leucoptera coffeella*).

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Química

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Araraquara

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

C824e Correia, Lilian Cherubin
Estudo metabolômico de genótipos de café resistentes ou suscetíveis ao bicho-mineiro do cafeeiro (*Leucoptera coffeella*) / Lilian Cherubin Correia. – Araraquara : [s.n.], 2021
112 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Alberto José Cavalheiro

1. Bicho-mineiro do cafeeiro. 2. Café. 3. Metabólitos. 4. Alcalóides. 5. Espectrometria de massa. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: "Estudo metabolômico em folhas de café provenientes de genótipos resistentes e susceptíveis ao bicho-mineiro-do-cafeeiro (*Leucoptera coffeella*)"

AUTORA: LILIAN CHERUBIN CORREIA

ORIENTADOR: ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dra. LOURDES CAMPANER DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. PEDRO LUÍS DA COSTA AGUIAR ALVES (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Dr. LUCAS MATEUS RIVERO RODRIGUES (Participação Virtual)
Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Recursos Genéticos Vegetais / Instituto Agronômico de Campinas (IAC) - Universidade de Sorocaba



Prof.^a Dr.^a RAQUEL BRANDT GIORDANI (Participação Virtual)
Departamento de Farmácia / Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN



Araraquara, 10 de setembro de 2021

DADOS CURRICULARES

FORMAÇÃO ACADÊMICA

2016-2021

Doutorado em Química

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara/SP

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

2014-2016

Mestrado em Química

Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara/SP

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

2007-2012

Bacharelado em Química

Universidade Federal de São Carlos (Ufscar), São Carlos/SP

EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

2020-Presente

Cientista de Aplicação em Agricultura, Evonik Industries AG, Americana/SP

2018-2020

Assistente de Pesquisa Científica e Tecnológica, Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Campinas/SP

2013-2014

Analista Química Jr., Cosmoderma Ltda, Pirassununga/SP

2011-2012

Estagiária em P&D, DOW Química, São Paulo/SP

PUBLICAÇÕES

SILVA, A. C. Q.; **CORREIA, L. C.**; MARCONCINI, L. V.; CAVALHEIRO, A. J. Determination of Dihydromyricetin in *Cassia ferruginea* (Schrad.) DC. by Quantitative ¹H NMR (qHNMR). J Pharm Pharmacol. 2019; 7(5):255-264. doi:10.17265/2328-2150/2019.05.005.

MEDINA, R. P.; BIASETTO, C. R.; FELIPPE, L. G.; **CORREIA, L. C.**; VALLI, M.; MONTEIRO, A. F.; CAVALHEIRO, A. F.; ARAÚJO, A. R.; CASTRO-GAMBOA, I.; FURLAN, M.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S. In: MODOLO, I. V.; FOGGIO, M. A. (Ed.). Brazilian Medicinal Plants – Plant Species from the Atlantic Forest biome and their bioactive constituents. Boca Raton: CRC Press, 2019, Cap. 9. doi: 10.1201/b22296.

CORREIA, L. C.; MONTEIRO, V. G.; SOARES, D. M.; SANTOS, J. F.; BOLONHEZI, D.; CAVALHEIRO, A. J.; GODOY, I. J.; CARVALHO, C. R. L. Caracterização de uma fitoalexina em folhas de amendoim: Medicarpina contra a mancha-preta. In: ANAIS DO XVI ENCONTRO SOBRE A CULTURA DO AMENDOIM, Jaboticabal: Anais do XVI Encontro Sobre a Cultura do Amendoim, 2019. doi: 10.17648/amendoim-2019-107242.

COURA, M.; ARROYOS, G.; **CORREIA, L. C.**; FREM, R. Como obter nanopartículas de ouro usando suco de limão? Química Nova, 2018; 41:533-539. doi: 10.21577/0100-4042.20170202.

EVENTOS

CORREIA, L. C.; MONTEIRO, V. G.; SOARES, D. M.; SANTOS, J. F.; BOLONHEZI, D.; CAVALHEIRO, A. J.; GODOY, I. J.; CARVALHO, C. R. L. Caracterização de uma fitoalexina em folhas de amendoim: Medicarpina contra a mancha-preta. In XVI Encontro Sobre a Cultura do Amendoim, 2019, Jaboticabal. (**Premiação: Melhor apresentação oral**)

CORREIA, L. C.; LEME, G. M.; BUENO, P. C. P.; DARCOLETO, G. S.; CAVALHEIRO, A. J. Comparison of different extraction methods for the analysis of leaves from *Casearia sylvestris* by HPLC-DAD-CAD. In 46th World Chemistry Congress – IUPAC, 2017, São Paulo.

CORREIA, L. C.; LEME, G. M.; VERBI, F. M.; CAVALHEIRO, A. J. 1D-LC versus comprehensive 2D-LC using green mobile phase to analysis of *Casearia Sylvestris*. In V Congresso Iberoamericano de Productos Naturales, 2016, Bogotá, Colômbia. (**Premiação: Melhor apresentação oral**)

LEME, G. M.; **CORREIA, L. C.**; CAVALHEIRO, A. J. Online Extraction-Separation (OLE-LC): A Comprehensive Approach for Preparation and Analysis of Complex Solid Samples. In ASASS 2016 – International Symposium on Advances in Separation Science, 2016, Hobart, Austrália.

NASCIMENTO JÚNIOR, N. M.; **CORREIA, L. C.**; BUENO, P. C. P.; MONTEIRO, G. C. 1ª Escola de Modelagem Molecular da Unesp Araraquara, 2017, Araraquara (Organização de evento científico).

OUTROS

1º LUGAR no “Concurso Biota Fapesp-Empreendedorismo para alunos de pós-graduação de instituições paulistas: Estímulo a jovens criativos e empreendedores” com o projeto “Fitoquímicos de plantas para áreas degradadas”, 2016, São Paulo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Renata e Sandro.

Ao Raoni, por todo amor, compreensão e companheirismo.

À família Mauro, pelo constante apoio, carinho e dedicação.

À minha Tia Viviane Cherubin por estar sempre ao meu lado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro pela constante preocupação com meu desenvolvimento profissional e pessoal. Por me desafiar, me fazer refletir e sair da zona de conforto. Obrigada Alberto pela orientação, amizade e paciência.

Aos funcionários e alunos do Centro de Recursos Genéticos Vegetais do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) por todo apoio, flexibilidade e cordialidade durante os dois anos em que fui colaborada. Em especial gostaria de agradecer à pesquisadora Cássia R. Limonta Carvalho pela amizade, dedicação, troca de conhecimentos, pelo seu amor à Química e por me auxiliar nesse trabalho.

Ao pesquisador Dr. Oliveira Guerreiro Filho do Centro de Café Alcides Carvalho do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) por colaborar na execução desse projeto. Obrigada pela atenção e profissionalismo.

Ao pesquisador Dr. Carlos Henrique Siqueira de Carvalho pelo fornecimento das plantas utilizadas na condução dos experimentos.

Ao time global de R&D Agro na Evonik pela compreensão, suporte e torcida para a conclusão da minha Tese durante a pandemia de Covid-19, em especial gostaria de agradecer à Ana Gaiotto.

Aos professores, funcionários e colegas do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) em Araraquara, em especial à querida Dra. Alene Cortês de Queiroz.

Ao Prof. Dr. Moacir Rossi Forim e Dra. Isabel Coutinho pela participação na banca de qualificação.

Aos meus amigos queridos da Química 07/UFSCar, principalmente Priscilla, Anelise, Rafaela e Juliana.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 no período entre 2016 e 2018 em que usufrui da bolsa.

Agradeço ao Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) pela infraestrutura laboratorial e às agências de fomento à pesquisa FAPESP, CAPES e CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

O café é uma cultura de grande importância econômica no Brasil. No país, o principal problema fitossanitário de cafeeiros é a praga conhecida por bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*), que gera perdas de produtividade em alta escala. O Programa de Melhoramento Genético em Café do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), desenvolveu híbridos entre as espécies *Coffea arabica* e *Coffea racemosa* que possuem diferentes níveis de resistência contra o ataque de *L. coffeella*, porém o mecanismo de resistência nessa interação não foi elucidado. Há quase 20 anos estudos têm sido realizados nesse sentido e nenhuma correlação foi encontrada, porém sabe-se que a antibiose possui papel fundamental nessa resistência. Desvendar o mecanismo de resistência e encontrar os aleloquímicos responsáveis é de suma importância para a seleção precoce de plantas e obtenção de novos cultivares resistentes. Portanto, o objetivo desse trabalho foi utilizar diferentes abordagens metabolômicas para identificação de aleloquímicos que possam mediar a resistência em híbridos considerados resistentes. Plantas resistentes e suscetíveis, atacadas ou não pelo bicho-mineiro foram utilizadas durante o trabalho. Foram avaliados num contexto de metabolômica alvo os ciclotídeos, diterpenos (cafestol, caveol e 16-metil-cafestol), taninos hidrolisáveis ou condensados, ácido ursólico na cera cuticular e nos tecidos foliares internos, além da análise de metabolômica global por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS) e por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Foi encontrado que os teores de taninos condensados nas folhas e de ácido ursólico na cera cuticular, possuem diferença estatística durante a infestação do bicho-mineiro. Além disso, verificou-se a presença de um alcaloide piridínico, nunca antes relatado no gênero *Coffea*, detectado apenas no genótipo resistente e com aumento de teor durante o desenvolvimento da infestação pelas lagartas do bicho-mineiro. Portanto, sugere-se que a antibiose seja relacionada aos taninos condensados, ácido ursólico na cera cuticular e/ou o aleloquímico da classe dos alcaloides.

Palavras-chave: taninos; ácido ursólico; cera cuticular; resistência; metabolômica; aleloquímicos; alcaloides.

ABSTRACT

Coffee is a crop of great economic importance in Brazil. In the country, the major pest is an insect called the coffee leaf-miner (*Leucoptera coffeella*), popularly known as “bicho-mineiro”, which generates huge losses in the productivity of beans. The Coffee Breeding Program from the Agronomic Institute of Campinas (IAC) developed hybrids between *Coffea arabica* and *Coffea racemosa* species that have different levels of resistance against *L. coffeella*, but the mechanism of resistance in this interaction has not been elucidated. Studies have been carried out in this direction for almost 20 years and no correlation has been found, but it is known that antibiosis plays a fundamental role in the insect-plant resistance. Unraveling the resistance mechanism and finding the responsible allelochemicals is of great importance for the early selection of plants and obtaining new resistant cultivars. Therefore, the objective of this work was to use different metabolomic approaches to identify allelochemicals that can mediate the resistance in hybrids considered resistant. Resistant or susceptible plants, attacked or not by the coffee leaf-miner were used during the work. Cyclotides; diterpenes (cafestol, kawool and 16-methyl-cafestol); hydrolyzable or condensed tannins; ursolic acid in the cuticular wax or in the internal leaf tissues were evaluated in a context of target metabolomics and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) were also used for the untarget metabolomics analysis. It was found that the content of condensed tannins in the leaves and ursolic acid in the cuticular wax, have statistical differences during the insect infestation. Furthermore, the presence of a pyridine alkaloid never reported in the *Coffea* genus was found only in the resistant genotype and an accumulation of this compound was observed during the coffee leaf-miner infestation. Therefore, it is suggested that antibiosis may be related to the following allelochemicals: condensed tannin, ursolic acid in the cuticular wax and/or the pyridine alkaloid.

Key-words: tannin; ursolic acid; cuticular wax; resistance; metabolomics; allelochemicals; alkaloids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa mundial indicando as regiões onde a presença de <i>Leucoptera coffeella</i> já foi relatada.....	20
Figura 2 – Ciclo biológico do bicho-mineiro A) ovos, B) lagartas, C) pupa e D) adulto	21
Figura 3 - Aparência das folhas atacadas pelo bicho-mineiro. A) mudas vistas de cima, B) folha de café com minas, C) folha de café com mina descascada, evidenciando as lagartas.....	22
Figura 4 - Classificação clássica dos semioquímicos em função do tipo de interação (intra- ou inter-específica) e benefício (emissor e/ou receptor)	25
Figura 5 - Esquema das análises químicas realizadas inicialmente.....	36
Figura 6 - Criação dos insetos. A) Pupas recortadas das folhas de café para criação dos insetos, B) Gaiola com voil e C) Papel de filtro no topo da gaiola imerso em solução de sacarose 10%.....	44
Figura 7 - Representação esquemática das três abordagens utilizadas neste estudo	45
Figura 8 - Esquema geral utilizado durante a avaliação dos taninos condensados ..	46
Figura 9 - Esquema geral utilizado durante a análise do ácido ursólico (AU)	48
Figura 10 - Preparo das amostras e análises realizadas com a fração obtida durante a metabolômica global.....	49
Figura 11 - Reações envolvidas no processo de escurecimento catalisado pela enzima polifenol oxidase (PPO).....	53
Figura 12 – Aparência das folhas secas em estufa com circulação de ar	54
Figura 13 – Aparência das folhas secas utilizando-se sílica gel.....	54
Figura 14- Curva analítica do ácido clorogênico apresentando a regressão linear ...	54
Figura 15 - Diterpenos encontram-se esterificados na posição C-17 nos tecidos vegetais.....	56
Figura 16 - Exemplo de um galotanino (pentagaloil glicose) e um elagiotanino com duas unidades de hexahidroxidifenoil (casuarictina)	58
Figura 17 - Coloração observada após a reação com nitrito de sódio em meio ácido. A presença de elagitaninos é avaliada qualitativamente pelo surgimento da coloração azul.....	59

Figura 18 - Coloração observada após a reação com iodato de potássio em metanol. A presença de galotaninos é avaliada qualitativamente pelo surgimento da coloração vermelha-marrom	59
Figura 19 - Estrutura geral dos taninos condensados	60
Figura 20 - Estruturas dos triterpenos pentacíclicos ácido ursólico (AU) e ácido oleanólico (AO).....	62
Figura 21 - Fragmentos principais do ácido ursólico (AU) sililado observados na ionização de impacto eletrônico. Para o ácido oleanólico (AO), o mesmo padrão de fragmentação é observado.....	63
Figura 22 – BPC da cera de <i>Coffea racemosa</i> . A região destacada em vermelho encontra-se ampliada para evidenciar os triterpenos pentacíclicos encontrados.....	64
Figura 23 – Área do pico de AU para cada genótipo avaliado. (R) = Resistente e (S) = susceptível ao bicho mineiro.	65
Figura 24 - BPC do extrato metanólico do híbrido suscetível H14954-23. A região destacada em vermelho encontra-se ampliada para evidenciar os triterpenos pentacíclicos encontrados	66
Figura 25 - BPC do extrato diclorometânico do híbrido resistente H14954-1. A região destacada em vermelho encontra-se ampliada para evidenciar os triterpenos pentacíclicos encontrados.....	67
Figura 26 – Mapa de cores para os compostos identificados na cera cuticular dos genótipos estudados	71
Figura 27 – Mapa de calor para os compostos identificados no extrato metanólico .	75
Figura 28 - Lesões ampliadas observadas nas folhas. A) Genótipo resistente (Cl-12) e B) Genótipo suscetível (3-32).....	77
Figura 29 – Representação da formação de cianidina a partir de um dímero de protoantocianidina.....	78
Figura 30 – Curva de calibração do cloreto de cianidina (n=3)	79
Figura 31 – Gráfico de barras para o teor médio de taninos condensados dos genótipos resistente e suscetível.	80
Figura 32 – Pontos da curva de calibração do AU	83
Figura 33 – Mapa de calor para os metabólitos encontrados por GC-MS.....	90
Figura 34 – Detecção do alcaloide. A) Estrutura química, região expandida dos cromatogramas dos genótipos B) Resistente e C) Suscetível.....	91

Figura 35 – Identificação do alcaloide. A) Espectro do pico obtido durante a análise, B) Espectro da biblioteca para comparação e C) Mecanismo de fragmentação observado.....	92
Figura 36 – Mecanismo da hidrólise em meio alcalino da arecolina formando a arecaidina.....	95
Figura 37 – Biossíntese dos alcaloides provenientes do ácido nicotínico. As enzimas envolvidas em cada etapa da rota biosintética não estão demonstradas.....	95
Figura 38 – Alteração positiva (↑) ou negativa (↓) para cada metabólito identificado por GC-MS que está envolvido na biossíntese proposta.....	96
Figura 39 – Mecanismo de fragmentação proposto para a arecolina em LC-ESI-MS/MS.....	97
Figura 40 – Cromatograma ampliado do íon extraído modo positivo para m/z 156 ..	99
Figura 41 – PCA do modo negativo	100
Figura 42 – PCA do modo positivo.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação da resistência ao bicho-mineiro de diferentes espécies de café.....	23
Tabela 2 - Composição química encontrada em folhas do gênero Coffea.....	30
Tabela 3 - Escala de pontos para a classificação das plantas quanto ao nível de resistência em laboratório	44
Tabela 4 - Cronograma de coleta das folhas. Em cada coleta foram utilizadas 3 mudas de cada genótipo para as análises metabolômicas.....	45
Tabela 5 - Gradiente utilizado no método cromatográfico da fração hidrofílica.....	50
Tabela 6 - Dados experimentais da curva analítica de ácido clorogênico (n=3)	55
Tabela 7 – Teor médio da análise de FC expressos em ácido clorogênico por folhas secas (\pm desvio padrão; n=3).....	55
Tabela 8 - Dados obtidos pelo método direto HCl-butanol-acetona-ferro.....	61
Tabela 9 - Dados obtidos da extração da cera cuticular (\pm desvio padrão; n = 2) das folhas a partir de aproximadamente 7,0 g de folhas frescas	68
Tabela 10 - Compostos identificados na cera por GC-MS	68
Tabela 11 - Extração metanólica do material vegetal.....	72
Tabela 12 - Compostos identificados	72
Tabela 13 – Notas para avaliação do nível de resistência	76
Tabela 14 - Dados experimentais da curva analítica de cloreto de cianidina (n=3) ..	78
Tabela 15 - Teor médio de taninos condensados nas folhas (\pm desvio padrão; n=2)79	
Tabela 16 – Teor médio de cera cuticular encontrada em cada genótipo nos diferentes tempos de coleta (\pm desvio padrão; n=2)	82
Tabela 17 - Dados experimentais da curva analítica de ácido ursólico (AU) (n=3) ...	83
Tabela 18 – Teor médio de AU nas diferentes frações e tempos de coleta de folhas dos genótipos de café (\pm desvio padrão; n=2).....	86
Tabela 19 – Metabólitos identificados na parte hidrofílica do extrato	88
Tabela 20 – Compostos anotados por LC-HRMS/MS	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[M+H] ⁺	molécula protonada
[M-H] ⁻	molécula desprotonada
[M-Na] ⁺	molécula sodiada
5-ACQ	ácido clorogênico
ACN	acetonitrila
AO	ácido oleanólico
AU	ácido ursólico
BPC	Cromatograma do pico base (<i>Base peak chromatogram</i>)
C8	octilsilano
C18	octadecilsilano
CCE	cloreto de cianidina equivalente
<i>C. arabica</i>	<i>Coffea arabica</i>
<i>C. racemosa</i>	<i>Coffea racemosa</i>
CV	coeficiente de variação
Da	Dalton
DAD	Detector de arranjo de diodos (<i>Diode array detector</i>)
DAP	dias após postura
DCM	diclorometano
ELL	extração líquido-líquido
ESI	Ionização por electrospray (<i>Electrospray ionization</i>)
FC	Folin-Ciocalteu
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (<i>Gas chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
HILIC	Cromatografia de interação hidrofílica (<i>Hydrophilic interaction chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (<i>High performance liquid chromatography</i>)
HRMS	Espectrometria de massas de alta resolução (<i>High resolution mass spectrometry</i>)
IPA	isopropanol

IR	índice de retenção
<i>L. coffeella</i>	<i>Leucoptera coffeella</i>
LC	Cromatografia líquida (<i>Liquid chromatography</i>)
LC-DAD	Cromatografia líquida acoplada do detector de arranjo de diodos (<i>Liquid chromatography coupled to diode array detector</i>)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (<i>Liquid chromatography coupled to mass spectrometry</i>)
<i>m/z</i>	<i>massa/carga</i>
MeOH	metanol
min	minutos
MS	espectrômetro de massas (<i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	espectrometria de massas sequencial
MSTFA	N-metil-N(trimetilsilil)trifluoroacetamida
MTBE	terc-butil metil éter
nm	nanômetros
NMR	Ressonância magnética nuclear (<i>Nuclear magnetic resonance</i>)
PA	Para Análise
PCA	Análise de componentes principais (<i>Principal Component Analysis</i>)
PPO	polifenol oxidase
TIC	cromatograma de íons totais
TMS	trimetilsilano
TMSOH	trimetilsilanol
<i>t_r</i>	tempo de retenção
UPLC-DAD	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography coupled to Diode-Array Detection</i>)
UPLC-DAD-MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos e ao espectrômetro de massas (<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>

coupled to Diode-Array Detection and Mass Spectrometry)

UV

ultravioleta

var.

variedade

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Café	19
1.2 Bicho-mineiro (<i>Leucoptera coffeella</i>)	19
1.3 Resistência do café ao bicho-mineiro	23
1.4 Mecanismos de defesa	23
1.5 Melhoramento genético	25
1.6 Estudos realizados sobre a interação café- <i>L. coffeella</i>	26
1.7 Química das folhas de café	29
1.8 Metabolômica	30
1.9 Relevância da pesquisa	33
2 OBJETIVO	35
3 MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1 Parte 1: Avaliações iniciais	36
3.1.1 Métodos de secagem das folhas	37
3.1.2 Metabolômica alvo	38
3.1.2.1 Ciclotídeos	38
3.1.2.2 Cafestol, caveol, 16-metil-cafestol	39
3.1.2.3 Taninos	39
3.1.2.4 Ácido ursólico	40
3.1.2.5 Metabolômica global	41
3.1.3 Material vegetal	43
3.1.4 Criação de insetos	43
3.1.5 Avaliação do nível de resistência	44
3.1.6 Experimento de infestação	45
3.1.7 Metabolômica alvo	46
3.1.7.1 Taninos condensados	46

3.1.7.2	Ácido ursólico	46
3.1.8	Metabolômica global	48
3.1.8.1	Fração hidrofílica: GC-MS	49
3.1.8.2	Fração hidrofílica: LC-MS	50
3.1.8.3	Análise Estatística dos Dados	51
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1	Parte 1: avaliações iniciais	52
4.1.1	Avaliação dos métodos de secagem das folhas	52
4.1.2	Metabolômica alvo	56
4.1.2.1	Ciclotídeos	56
4.1.2.2	Cafestol, caveol, 16-metil-cafestol	56
4.1.2.3	Avaliação da presença de taninos	57
4.1.2.4	Ácido ursólico	62
4.1.3	Metabolômica global	67
4.1.3.1	<i>Fingerprinting</i> da cera cuticular (GC-MS)	67
4.1.3.2	<i>Fingerprinting</i> do extrato metanólico (GC-MS)	72
4.2	Parte 2: experimento com insetos	76
4.2.1	Avaliação do nível de resistência	76
4.2.2	Experimento de infestação	77
4.2.3	Metabolômica alvo	77
4.2.3.1	Taninos condensados	77
4.2.3.2	Ácido ursólico	81
4.2.4	Metabolômica global	87
4.2.4.1	Fração hidrofílica: GC-MS	88
4.2.4.2	Fração hidrofílica: LC-MS	97
5	CONCLUSÃO	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 Café

O café (gênero *Coffea*) é uma planta de extrema importância cultural e econômica, sendo o Brasil, o maior produtor e exportador mundial de grãos.

Em 2020, o café registrou safra recorde no país com a produção de 63,08 milhões de sacas, sendo exportadas 36,8 milhões de sacas, o que movimentou cerca de US\$ 5,5 bilhões (CONAB, 2021).

1.2 Bicho-mineiro (*Leucoptera coffeella*)

A planta de café é hospedeira de uma ampla gama de artrópodes, principalmente da classe dos insetos. Já foram reportados mais de 850 diferentes insetos que atacam o gênero *Coffea*, dentre eles os mais importantes ao redor do mundo são: *Hypothenemus hampei* (“broca-do-café”), *Xylotrechus quadripes* e *Leucoptera coffeella* (bicho-mineiro) (LE PELLEY; 1973).

Leucoptera coffeella pertence à ordem Lepidoptera (mariposas) e é considerado um inseto minador. Possui metamorfose completa em que as lagartas são confinadas, ou seja, se alimentam e vivem nos tecidos internos das folhas em pelo menos um dos estádios larvais (POWELL, 1980).

Leucoptera coffeella, popularmente conhecida como bicho-mineiro, é a praga mais importante da cultura do café no Brasil. Apesar de ser uma praga da folha, gera perdas na produtividade de grãos que podem chegar até 50% (GAIÁN et al., 2016; SOUZA; REIS; RIGITANO, 1998).

O bicho-mineiro é uma praga exótica, de origem africana, relatada no Brasil a partir de 1851, provavelmente introduzida através de mudas de café provenientes das Antilhas e da Ilha de Reunião (antiga Ilha Bourbon). No continente africano, outras três mariposas que atacam café são encontradas, quais sejam *Leucoptera meyricki*, *Leucoptera coma* e *Leucoptera coffeina*. Entretanto, dentre essas pragas de café, apenas *L. coffeella* é considerada estritamente monofágica, isto é, só ataca o gênero *Coffea* (DANTAS et al., 2020; TAUNAY, 1943).

A Figura 1 destaca as regiões do mundo onde *L. coffeella* se encontra, localizadas principalmente na América Central, América do Sul e continente Africano.

Figura 1 - Mapa mundial indicando as regiões onde a presença de *Leucoptera coffeella* já foi relatada



Fonte: CABI, 2021

O bicho-mineiro possui metamorfose completa, passando pelas fases de ovo, lagarta, pupa e adulto (Figura 2) com dimorfismo sexual na proporção de 1:1. Seu ciclo de vida e reprodução ocorre da seguinte maneira: primeiramente, ovos são colocados pela fêmea na superfície adaxial das folhas de café, sendo muito difíceis de enxergar a olho nu. Essa fase pode ter duração de até 20 dias quando, então, eclodem as lagartas.

Após a eclosão, as lagartas perfuram o tecido foliar pela parte inferior dos ovos, que estão em contato com a folha, não tendo interação com o ambiente externo. As lagartas perfuram a epiderme foliar e penetram no mesófilo, alimentando-se das paredes do parênquima paliádico formando túneis pela folha.

A lagarta possui 4 instares de desenvolvimento e é possível encontrar na mesma folha lagartas em diferentes estágios. A duração da fase larval varia entre 7 e 26 dias dependendo da temperatura ambiente e o tamanho da lagarta pode chegar a 3,5 mm. É durante o terceiro e quarto período de desenvolvimento que as lagartas comem mais e causam maior dano às folhas.

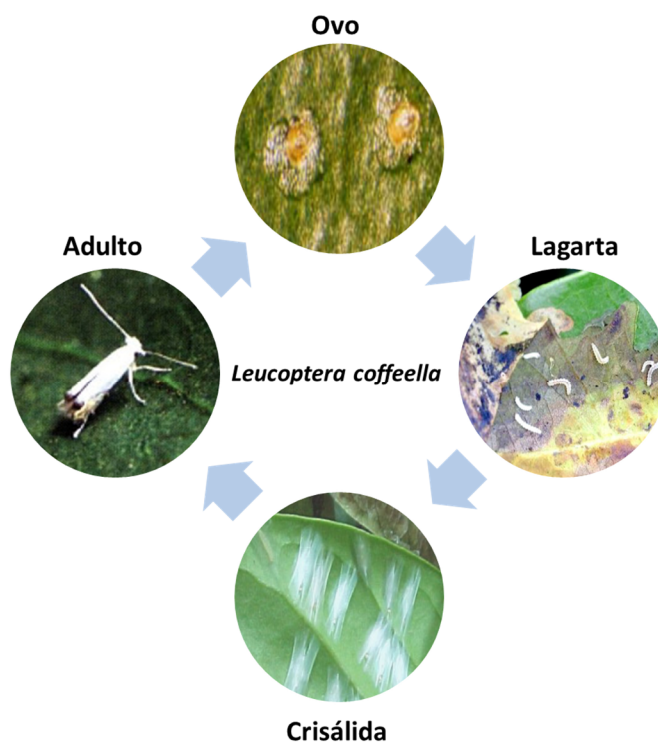
Após o período larval, as lagartas saem dos túneis e formam casulos na parte exterior abaxial das folhas. A duração do estágio de crisálida e a quantidade das pupas que viram adultos são muito dependentes da temperatura. Entre 27-30 °C as condições são mais favoráveis, nas quais 95% das pupas se tornam adultos em apenas 5 dias.

A mariposa adulta de *L. coffeella* mede aproximadamente 6,5 mm de envergadura, possui coloração prateada, hábito crepuscular noturno e se alimenta de

uma solução açucarada excretada por afídeos, chamada de “honeydew”. As fêmeas põem aproximadamente 75 ovos em 13,4 dias nas folhas de café suscetíveis, com maior parte no 4^o dia de vida. A expectativa de vida é de 13 - 14 dias se alimentadas, se não alimentadas é de 4-5 dias. Entretanto, a temperatura é muito influente nos dias de duração de cada fase (GUERREIRO-FILHO, 2006; SOUZA; REIS; RIGITANO, 1998).

É possível encontrar essa praga o ano todo no Brasil, porém os picos de infestação geralmente são nos meses de abril/maio e em setembro/outubro (SOUZA; REIS; RIGITANO, 1998).

Figura 2 – Ciclo biológico do bicho-mineiro A) ovos, B) lagartas, C) pupa e D) adulto

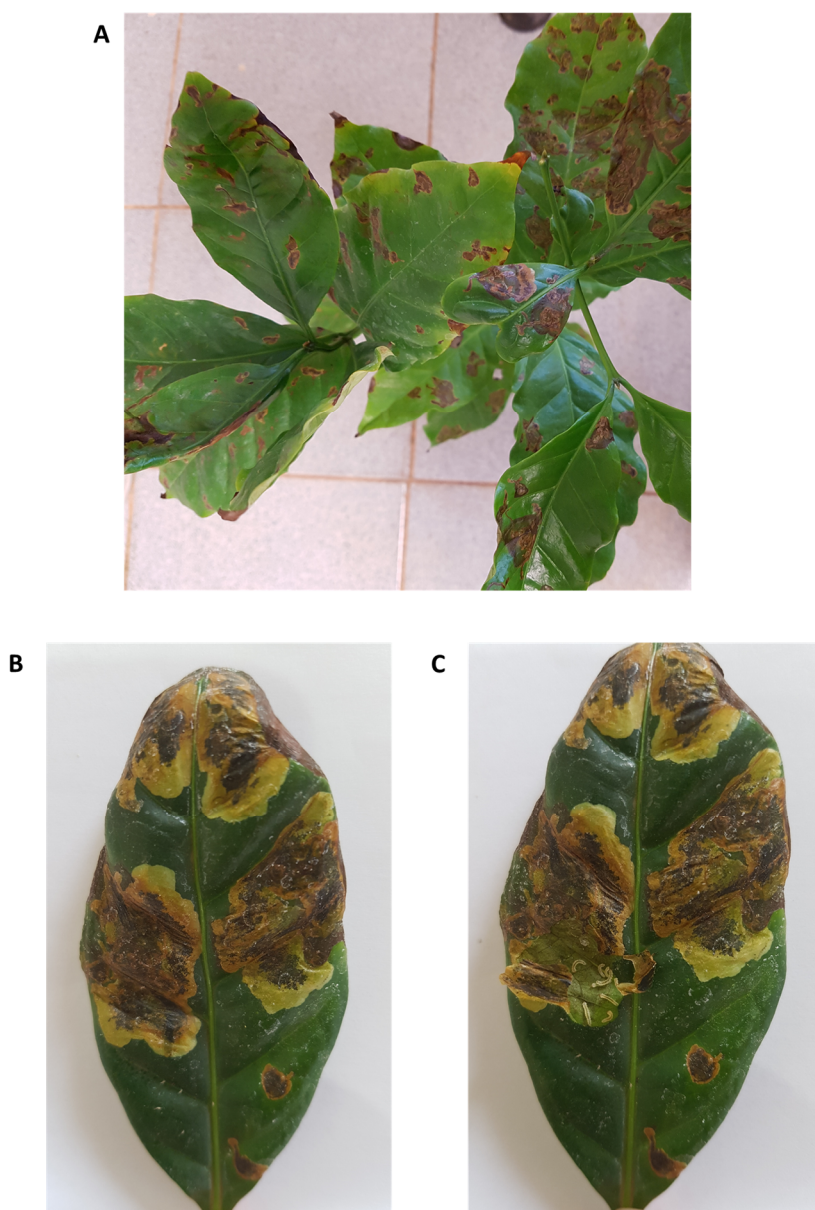


Fonte: Autor

Com o consumo das células do parênquima paliçádico da folha pela lagarta, o fluxo de água, sais minerais e matéria orgânica são dificultados para a planta. A folha necrosada diminui a capacidade de fotossíntese, que pode cair prematuramente pelo aumento no nível de etileno, causando enormes prejuízos na produtividade dos grãos. A longevidade de plantas atacadas também é comprometida pelo aumento de energia necessária para reparar a parte aérea danificada da planta (SOUZA; REIS; RIGITANO, 1998).

As folhas atacadas pelo bicho-mineiro são bastante características, mesmo depois que as pupas atingem a fase adulta, as minas formadas durante a fase larval são evidentes (Figura 3). Geralmente, as folhas jovens são mais resistentes e as velhas são mais sensíveis. As fêmeas preferem colocar os ovos em folhas verdes a amareladas e, maduras a jovens.

Figura 3 - Aparência das folhas atacadas pelo bicho-mineiro. A) mudas vistas de cima, B) folha de café com minas, C) folha de café com mina descascada, evidenciando as lagartas



Fonte: Autor

1.3 Resistência do café ao bicho-mineiro

Dentre as espécies de café conhecidas, diferentes níveis de resistência ao bicho-mineiro são descritos. Algumas espécies são consideradas altamente resistentes, enquanto outras são altamente suscetíveis, moderadamente resistentes ou moderadamente suscetíveis ao bicho-mineiro (Tabela 1). O grau de resistência é avaliado por uma escala de pontos baseada na taxa de oviposição, mortalidade das lagartas e tamanho da área lesionada (GUERREIRO-FILHO, 2006).

Das atuais 130 espécies de *Coffea* descritas (DAVIS; RAKOTONASOLO, 2021), os grãos de maior interesse comercial são provenientes das espécies *C. arabica* e *Coffea canephora*, em especial *C. arabica* que possui alto valor agregado por produzir grãos de melhor qualidade (FARAH; FERREIRA, 2015). Entretanto, ambas as espécies são suscetíveis ao bicho-mineiro (GUERREIRO-FILHO, 1994).

Tabela 1 - Classificação da resistência ao bicho-mineiro de diferentes espécies de café

Espécies	Resistência
<i>C. stenophylla</i> , <i>C. salvatrix</i> , <i>C. liberica</i> var. <i>liberica</i> , <i>C. brevipes</i> , <i>C. anthonyi</i> , <i>C. jasminoides</i> e <i>C. farafaganensis</i>	Altamente resistente
<i>C. kapakata</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. racemosa</i> , <i>C. liberica</i> var. <i>dewevrei</i> , <i>C. humilis</i> , <i>C. tetragona</i> , <i>C. tsirananae</i> , <i>C. resinosa</i> , <i>C. millotii</i> , <i>C. bertrandii</i> , <i>C. dolichophylla</i> e <i>C. bonnierii</i>	Moderadamente resistente
<i>C. congensis</i> , <i>C. sessiliflora</i> , <i>P. travancorensis</i> e <i>C. perrieri</i> e <i>C. canephora</i>	Moderadamente suscetível
<i>C. arabica</i>	Altamente Suscetível

1.4 Mecanismos de defesa

As diferenças nos graus de resistência entre os genótipos de café podem ser explicadas pelas diferentes interações entre cada genótipo e o inseto. A relação de resistência inseto-planta é classificada em três principais mecanismos de defesa: antixenose, antibiose e tolerância.

A antixenose, também conhecida como não-preferência, é descrita por características físicas ou químicas que certas plantas possuem que as tornam menos atrativas para alimentação, oviposição e colonização. Os insetos utilizam percepções olfativas, gustatórias, tácteis e visuais para realizarem a seleção do hospedeiro

(KOGAN; ORTMAN, 1978; SMITH, 2005). O método de percepção mais eficaz é o olfativo e estudos com compostos voláteis das plantas têm sido extensivamente realizados (BERNAYS; CHAPMAN, 1994).

A antibiose é o mecanismo em que as plantas produzem efeitos deletérios aos herbívoros que as escolheram para se alimentarem, causando mortalidade na fase imatura e adulta, ou viabilizando a formação defeituosa de adultos e/ou pupas, com redução do tamanho e peso dos insetos, entre outros. Esses mecanismos são variados, podendo ser mecânicos/físicos, com produção de metabólitos secundários ou de proteínas (tóxicas ou anti-nutritivas) pelas plantas ou combinações destes. Na antibiose, a resposta é induzida por certos processos de sinalização, como a alimentação do herbívoro, em que a planta possui a capacidade de reconhecer sinais de células danificadas ou mesmo de moléculas não próprias, como as enzimas salivares, e passam a produzir fito-hormônios sinalizadores de defesa (por exemplo, ácido jasmônico, ácido salicílico, ácido abscísico e etileno) (SMITH, 2005; WAR et al., 2012).

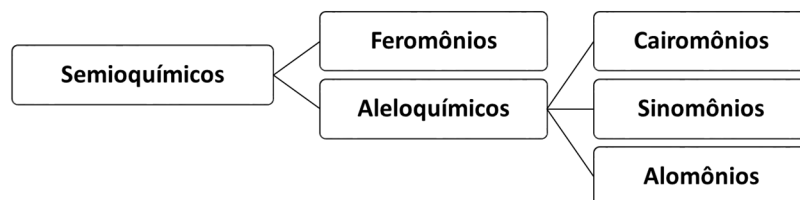
A tolerância é definida como a capacidade que uma planta possui de suportar ou recuperar-se de danos causados por herbívoros quando comparada a uma planta também danificada sem nenhuma característica de resistência, ou seja, suscetível (SMITH, 2005).

Os mecanismos utilizados na defesa planta-inseto podem ser alcançados pelas plantas por dois efeitos principais: os morfológicos, que são barreiras físicas impostas às pragas, como tricomas, tecidos e cera cuticular espessas, espinhos, entre outros ou químicos, como a presença de metabólitos secundários ou proteínas (SMITH, 2005; PAINTER, 1951).

Os metabólitos secundários envolvidos nessas interações são chamados de semioquímicos, que são classificados em relação à sua ação intraespecífica ou interespecífica, ou seja, feromônios e aleloquímicos, respectivamente.

Os aleloquímicos, geralmente, são metabólitos secundários como alcaloides, aminoácidos não proteicos, glicosídeos cianogênicos, glucosinolatos, terpenos, saponinas, policetídeos, flavonoides e fenilpropanoides. São ainda subdivididos em relação aos benefícios para o emissor e/ou para o receptor. Os kairomônios são benéficos ao receptor, os sinomônios são benéficos para ambos, emissor e receptor, e os alomônios são benéficos ao emissor (Figura 4).

Figura 4 - Classificação clássica dos semioquímicos em função do tipo de interação (intra- ou inter-específica) e benefício (emissor e/ou receptor)



Fonte: Autor

Os tipos de respostas na defesa planta-herbívoro podem ser classificados em constitutivos ou induzidos. Os constitutivos estão sempre presentes nas plantas, enquanto os induzidos são produzidos apenas em reação ao estresse ou dano causado pelos herbívoros (KARBAN; MYERS, 1989).

Os mecanismos de defesa podem ser também divididos em diretos ou indiretos. Os diretos exercem efeitos deletérios diretamente nos herbívoros, enquanto os indiretos são usados para atrair organismos predadores ou parasitas para que ataquem o herbívoro (MITHÖFER; BOLAND, 2012).

O mecanismo de resistência ao bicho-mineiro em diferentes espécies de café ainda não foi validado. Porém, a antibiose foi sugerida como mecanismo de resistência predominante (GUERREIRO-FILHO, 2006; MAGALHÃES et al., 2004; MONDEGO et al., 2005). Além disso, Magalhães et al. (2008a) correlacionaram positivamente o composto *p*-cimeno com a preferência na oviposição de mariposas adultas de *L. coffeella* e Matos et al. (2011) observaram que a oviposição é menor em genótipos resistentes e maior em genótipos suscetíveis. Ambos os trabalhos, sugerem também o mecanismo de antixenose na resistência ao bicho-mineiro.

1.5 Melhoramento genético

Atualmente, uma das maneiras mais eficientes ao combate do bicho-mineiro é a utilização de defensivos agrícolas. Porém, existem estudos mostrando que o bicho-mineiro se tornou resistente a diversas classes de inseticidas químicos, como os organofosfatos, diamidas e neonicotinoides (COSTA et al., 2016; FRAGOSO et al., 2002; LEITE et al., 2020). Portanto, o melhoramento genético para desenvolvimento de cultivares resistentes é uma maneira eficaz e sustentável a ser utilizada para a produção de café.

O Programa de Melhoramento Genético de Café do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), utilizou *C. racemosa* como doadora de genes de resistência a serem transferidos para *C. arabica* através de cruzamentos controlados. Os híbridos resistentes foram selecionados e cruzados novamente com *C. arabica*. Guerreiro-Filho et al. (1999) correlacionaram a seleção dos híbridos melhorados a dois genes complementares e dominantes, denominados Lm1 e Lm2.

Alguns híbridos resistentes foram distribuídos a programas diversos de melhoramento do cafeeiro conduzidos por outras instituições nacionais e deram origem a cultivar Siriema, registrada pelo Procafé, MG. A cultivar Siriema possui resistência múltipla, tanto ao bicho-mineiro quanto à ferrugem do cafeeiro na mesma planta.

1.6 Estudos realizados sobre a interação café-*L. coffeella*

O mecanismo de resistência envolvido na interação entre bicho-mineiro e genótipos resistentes de café ainda não foi totalmente desvendado. Muitas hipóteses já foram levantadas, investigadas e descartadas, evidenciando a complexidade do mecanismo envolvido nessa interação.

Guerreiro-Filho e Mazzafera (2000) correlacionaram o teor de cafeína em folhas de *C. racemosa*, *C. arabica* e seus híbridos interespecíficos (resistentes e suscetíveis) com a magnitude do dano causado pelo inseto e concluíram que a cafeína não é um composto tóxico às lagartas de *L. coffeella*.

Similarmente, Magalhães et al. (2010) determinaram o teor dos ácidos clorogênicos, ácido caféico e dos alcaloides cafeína, 7-metilxantina, teobromina e xantina em folhas de diversos genótipos de *C. arabica*, *C. canephora*, *C. racemosa* e híbridos com diferentes graus de resistência. A determinação foi feita antes e sete dias após a infestação. Os teores de ácido caféico e dos alcaloides citados variaram muito pouco, não sendo correlacionados com a resistência. Já os teores dos ácidos clorogênicos diminuíram até 4 vezes em alguns genótipos após a infestação.

Magalhães et al. (2008b) levantaram a hipótese de que os ácidos clorogênicos e a cafeína presentes nas folhas do cafeeiro afetam a preferência na oviposição. Os autores observaram que folhas com maior teor de cafeína são positivamente correlacionadas com a preferência das fêmeas por oviposição. Para confirmar a hipótese, os autores borrifaram uma solução de cafeína em folhas de café com baixos

níveis dessa substância e a preferência na oviposição foi aumentada, confirmando a hipótese levantada.

Melo et al. (2006) e Ramiro et al. (2006) investigaram o papel das enzimas peroxidase (PER) e polifenoloxidase (PFO) no mecanismo de defesa de diferentes genótipos. Porém, nenhuma correlação entre a atividade das enzimas e a resistência foi estabelecida.

Ramiro et al. (2003) e Ramiro; Guerreiro-Filho e Mazzafera (2006), avaliaram as características anatômicas foliares dos híbridos resistentes e suscetíveis durante o ataque do inseto e não encontraram correlação entre a espessura dos tecidos foliares e a resistência. Nesse mesmo trabalho, os autores também avaliaram a quantidade de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu (FC); o teor de fenólicos nas folhas de café não foi alterado pela presença da lagarta, pelo contrário, foi observado um decréscimo numérico na quantidade dos mesmos, ainda que não estatisticamente significativo.

Magalhães et al. (2008a) avaliaram os voláteis presentes nas folhas e a preferência por oviposição correlacionou-se com altas concentrações de p -cimeno e baixas concentrações de β -cimeno. Pelo olfatômetro foi possível confirmar que o p -cimeno é um mediador na interação da planta com o bicho-mineiro.

Mondego et al. (2005, 2011) estudaram a expressão gênica entre híbridos resistentes e suscetíveis gerados a partir do cruzamento de *C. arabica* e *C. racemosa* durante o ataque do bicho-mineiro em diferentes momentos da infestação (controle não infestado, pós-oviposição e pós-eclosão). Os resultados indicaram que em plantas não-infestadas, a resistência ao bicho-mineiro pode ser derivada de uma maior expressão basal de genes relacionados com defesa/estresse (PLD, LOX-3, GRP, VSP, LEA, LTP, PR-8) em plantas resistentes do que em plantas suscetíveis, e que plantas resistentes possuem um mecanismo de sinalização de defesa disparado pela oviposição de *L. coffeella*, podendo desencadear uma cascata de sinalização que ativa a expressão gênica. Dentre os genes diferencialmente expressos, foi caracterizado um gene denominado de CoMir ("Coffea miraculin") que codifica uma proteína do tipo miraculina. Essas proteínas são do tipo inibidoras de proteinases, importantes na defesa das plantas contra insetos e na regulação da proteólise durante o desenvolvimento da planta. O gene CoMir expressou a proteína após a oviposição do bicho-mineiro em plantas resistentes, mas não foi induzido após a eclosão da lagarta do bicho-mineiro em plantas resistentes, nem tampouco em plantas

suscetíveis. Esse resultado sugeriu que esse inibidor de proteases, possa mediar ou ser responsável pelo bloqueio do desenvolvimento da lagarta durante a infestação em plantas resistentes, porém essa hipótese ainda não foi confirmada.

Cardoso et al. (2014) compararam a expressão gênica em dois híbridos provenientes do cruzamento entre *C. arabica* e *C. racemosa*, suscetível e resistente ao bicho-mineiro, em três momentos (T0: antes, T1: durante e T2: após a infestação). Foi observado que o híbrido resistente possui perfil gênico diferente do suscetível antes mesmo do ataque. Aproximadamente 2.137 genes (1.268 *up*-regulados e 873 *down*-regulados) diferentes foram encontrados no genótipo resistente. Os genes associados à biossíntese do ácido jasmônico, regulador hormonal que atua no mecanismo de defesa vegetal e também como sinalizador de estresse, foram 10 vezes mais expressos no híbrido resistente do que no suscetível antes do ataque, evidenciando uma resposta de defesa mais rápida. Os transcritos associados à enzima fenilalanina amonioliase (PAL), enzima que catalisa a primeira etapa da biossíntese de fenilpropanóides, foram *up*-regulados apenas no T0 em plantas resistentes, diminuindo nas demais etapas com o desenvolvimento do inseto. Em plantas suscetíveis, os transcritos da PAL aumentaram no final da infestação (T2). Porém, genes da síntese de ligninas e isoflavonas, como álcool cinamílico desidrogenase e isoflavona redutase, foram *down*-regulados em plantas resistentes. Já as enzimas flavonoide 3'-hidroxilase e leuconianidina dioxigenase foram *up*-reguladas em todos os momentos no genótipo resistente, evidenciando que a biossíntese de antocianinas e taninos é favorecida em relação às flavonas, ligninas e isoflavonas com o ataque do bicho-mineiro. Entretanto, enzimas importantes relacionadas com a defesa vegetal também são *up*-reguladas como a glutathione-S-transferase e a inibidora de cisteína-protease, evidenciando a complexidade da resposta do mecanismo de defesa.

Kitagami et al. (2013) investigaram a cera epicuticular de folhas não infestadas pelo bicho-mineiro de *C. arabica*, *C. canephora*, *C. racemosa* e híbridos resistentes ou suscetíveis provenientes do cruzamento entre *C. arabica* e *C. racemosa*. Apesar de ser encontrado aproximadamente duas vezes mais cera por área foliar em *C. racemosa* do que nas outras amostras, essa característica parece não ter sido transmitida aos híbridos. As amostras foram analisadas por GC-MS e GC-FID para determinação do perfil químico, porém nenhuma correlação entre a resistência ao bicho-mineiro e a composição das ceras foi identificada.

Alves et al. (2011) verificaram o efeito do extrato metanólico seco de folhas de *C. racemosa* (espécie resistente) pulverizado sobre folhas de *C. arabica* (espécie suscetível), para o teste de oviposição com chance de escolha pelo bicho-mineiro. Os autores observaram que as plantas tratadas com o extrato seco foram menos preferidas para oviposição. A seguir, os autores realizaram o teste de efeito ovicida, no qual mudas de *C. arabica* contendo ovos do bicho-mineiro foram pulverizadas com o mesmo extrato, verificando-se redução significativa na eclosão de lagartas e, segundo análise por microscopia eletrônica de varredura, os ovos não viáveis apresentaram anomalias nas superfícies externas. Porém, o fracionamento bioguiado para isolamento das substâncias ativas responsáveis por essa atividade não foi realizado.

Santos-Júnior et al. (2018) avaliaram o efeito dos extratos metanólicos de 19 plantas, secos e pulverizados sobre folhas de *C. arabica*, em relação à taxa de oviposição do bicho-mineiro. Dentre os extratos testados, somente o proveniente da planta *Merremia tomentosa* (velame-do-campo) foi ativo na redução da oviposição. Por fracionamento bioguiado, foram isoladas duas substâncias ativas desse extrato: o ácido ursólico e o cis-tilirosídeo. Apesar de não serem compostos voláteis, os testes realizados com essas substâncias purificadas indicaram que quando o cis-tilirosídeo foi aplicado, nenhuma oviposição foi observada e quando o ácido ursólico foi aplicado, a oviposição foi reduzida em cerca de 90%.

1.7 Química das folhas de café

Embora os metabólitos secundários encontrados nos grãos de café, verde ou torrado, já tenham sido extensamente estudados, existem poucos estudos sobre a composições das folhas de café.

Dentre os compostos descritos na literatura para as folhas de café, encontram-se ácidos fenólicos, flavonoides, xantonas, terpenos, carotenoides e fitoesteroides, resumidos na Tabela 2 (CHEN, 2018; SOUARD et al, 2018; MARTINS et al., 2014).

Na busca por metabólitos secundários que pudessem agir na antibiose das folhas resistentes ao bicho-mineiro, os alcaloides, compostos fenólicos totais, ácidos clorogênicos e ácido cafeico já foram alvo de estudos, como citado anteriormente. Porém, não se obteve uma resposta concreta sobre o mecanismo de defesa das plantas resistentes em relação ao estágio larval.

Tabela 2 - Composição química encontrada em folhas do gênero *Coffea*

Alcaloides	cafeína, trigonelina, teobromina, teofilina, 7-metilxantina
Ácidos fenólicos	ácido caftárico, ácido gentísico, ácido cafeico, ácido <i>p</i> -coumárico, ácido ferúlico, ácido benzóico, ácido 3-benzóico, ácido sináptico, ácido protocatecuico, ácidos cafeoilquínicos (3-CQA, 4-CQA, 5-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA, 4,5-diCQA), ácidos feruloilquínicos (3-FQA, 4-FQA, 5-FQA)
Flavonoides	catequina, epicatequina, epigalocatequina-3-O-galato, epicatequina-3-O-galato, miricetina, fisetina, patuletina, luteolina, apigenina, quercetina, isoquercitrina, hiperosídeo, rutina, quercetina-3-glucoronídeo, kaempferol, kaempferol-3-Glc-6''-Rha, antocianinas somente em folhas jovens (delfinidina 3,5-diglucosídeo e delfinidina 3-(6''-malonil-glucosídeo)), procianidinas (B1 e C)
Xantonas	mangiferina e isomangiferina
Terpenos	diterpenóides ent-kaurânicos, 16-O-metilcafestol, cafestol, kahweol, ácido ursólico (AU), ácido oleanólico (AO) (traço)
Carotenos	α -caroteno e β -caroteno
Xantofilas	neoxantina, luteína, violaxantina, anteraxantina e zeaxantina
Fitoesteroides	Sitosterol

Fonte: Autor

1.8 Metabolômica

Uma abordagem eficiente para estudos de ecologia química é a metabolômica, que visa analisar e comparar as respostas metabólicas de seres vivos através de estímulos genéticos, ambientais ou patofisiológicos (NICHOLSON; LINDON, 2008).

O estudo metabolômico pode ser classificado em: metabolômica global (*untargeted metabolomics*), baseado na análise comparativa do maior número de metabólitos possíveis contidos em um sistema biológico, pertencentes a diversas classes químicas, gerando uma impressão digital metabólica (*metabolic fingerprinting*) e, metabolômica alvo (*targeted metabolomics*), definida como a análise quantitativa de um ou mais metabólitos pré-selecionados de determinada classe química, ou que estejam associados a rotas metabólicas específicas, gerando um perfil metabólico (*metabolic profiling*) (WOLFENDER et al., 2015).

O sucesso da abordagem de metabolômica global é determinado pelo número de metabólitos detectados, ou seja, quanto mais metabólitos detectados, maior a chance de entender as mudanças nas respostas metabólicas do ser vivo alvo do estudo. Portanto, devido à complexidade de polaridades encontradas nos metabólitos presentes em matrizes vegetais, diversas técnicas analíticas complementares para aquisição dos dados podem ser utilizadas em conjunto nessa abordagem, como GC-MS, LC-MS, NMR, entre outras. Adicionalmente, nas análises por cromatografia líquida, o uso de colunas empacotadas com fases estacionárias de diferentes seletividades como C18, C8, HILIC, entre outras, também pode auxiliar na maior obtenção do conjunto maior de dados (ZEKI et al., 2020).

Já para a metabolômica alvo, onde os metabólitos são conhecidos e pré-selecionados, a escolha da técnica analítica de análise é determinada com base nas características daquele metabólito e/ou conjunto de metabólitos.

Num contexto de metabolômica alvo, algumas classes de metabólitos presentes em café ou na família Rubiaceae chamam atenção devido ao potencial inseticida e por não haver relatos na literatura do estudo em relação à resistência ao bicho-mineiro, como por exemplo, os ciclotídeos, diterpenos, triterpenos pentacíclicos, e os taninos.

Os ciclotídeos são peptídeos de baixo peso molecular, contendo de 28 a 37 resíduos de aminoácidos. Estão presentes em algumas famílias, principalmente em Rubiaceae e Violaceae. Diversos trabalhos consideram que a principal função dos ciclotídeos nas plantas é a defesa contra o ataque de insetos. Por exemplo, a ingestão do ciclotídeo kalata B1 retarda o crescimento e aumenta bruscamente a mortalidade de lagartas da mariposa *Helicoverpa armigera* (GRUBER; CRAIK; DORNENBURG, 2007). Adicionalmente, foi observado que lagartas da mariposa *Helicoverpa punctigera* não atingiram o segundo ínstar com dieta rica nesse ciclotídeo (JENNINGS et al., 2001). Apesar do gênero *Coffea* pertencer à família Rubiaceae, não foram encontrados relatos sobre a avaliação da presença de ciclotídeos em café.

Em grãos de café, já foram detectados mais de 90 tipos de diterpenoides, principalmente os diterpenos tetracíclicos com esqueleto kaurânico, sendo detectados em grãos verdes e maduros, no espermoderma dos grãos (película prateada) e nas folhas (CHU et al., 2016; DIAS et al., 2010; KOLLING-SPEER; SPEER, 1997; PANUSA et al., 2017). O cafestol, caveol e o 16-metil-cafestol são um exemplo dessa classe de diterpenos e encontram-se esterificados no café. Henrich e Weinberger

(2005) sugerem que a principal função desses compostos para as plantas tem relação com a resistência contra insetos agindo no receptor de farnesoide, porém nenhum estudo provou essa relação ainda.

O ácido ursólico (AU) e seu isômero ácido oleanólico (AO), são triterpenos pentacíclicos extensamente conhecidos por suas ações anti-alimentares e tóxicas contra insetos herbívoros (MARQUINA et al., 2001; SHUKLA et al., 1996; VARANDA et al., 1992). O AU é encontrado em grandes quantidades nas folhas de café, aproximadamente 1,8 g/100 g de folhas secas de *C. arabica*, enquanto o AO é encontrado em concentração traço nas mesmas folhas (WALLER et al., 1991). Adicionalmente, Santos-Júnior et al. (2018) evidenciaram o potencial na redução da oviposição de ovos por *L. coffeella* quando folhas de *C. arabica* foram tratadas com AU. Portanto, esses compostos podem exercer papel na resistência ao bicho-mineiro.

Os taninos são uma classe importante de metabólitos secundários amplamente difundidos nas plantas. Formam um grupo distinto de compostos fenólicos de elevados pesos moleculares, variando de 500 a 30.000 Da, os quais segundo a estrutura química, são classificados em hidrolisáveis e condensados (LIPSA; SNOWDON; FRIEDT, 2012; MONTEIRO et al., 2005).

Por serem fenólicos, os taninos são muito reativos quimicamente, formam pontes de hidrogênio, intra e intermoleculares, com capacidade de complexar fortemente com proteínas, amido, celulose e minerais (WAR et al., 2012; SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001). Segundo Monteiro et al. (2005), um mol de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas. São considerados como uma defesa quantitativa, pois seus efeitos protetores contra predadores/parasitas dependem de sua concentração nos tecidos vegetais, que às vezes são altas, podendo chegar a 50% da massa seca (MILA; SCALBERT; EXPERT, 1996).

Diversos estudos abordam as interações entre vegetais e herbivoria, propondo como mecanismos de ação a formação de complexos estáveis do tanino com proteínas vegetais para tornar o tecido pouco atraente e difícil de digerir (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001), ou mesmo que os taninos agem como uma toxina por meio de reações altamente específicas com enzimas digestivas ou diretamente nas membranas celulares dos predadores (ZUCKER, 1983) ou ainda por se complexarem com íons metálicos, como o ferro, reduzindo assim sua biodisponibilidade para herbívoros (WAR et al., 2012; MILA; SCALBERT; EXPERT, 1996).

A indução da síntese de taninos por herbivoria já foi relatada em diversas espécies de plantas (BARBEHENN; CONSTABEL, 2011). Em folhas de café, Cardoso et al. (2014) observaram que alguns transcritos associados às enzimas envolvidas na produção de taninos são *up*-reguladas no genótipo resistente durante a infestação pelo bicho-mineiro, sugerindo que o estudo dessa classe de compostos seja importante no estudo da interação café-*L. coffeella*. Diante disto, uma vez que os taninos têm um forte efeito deletério sobre os insetos fitófagos, podem diminuir a taxa de predação por tornarem os tecidos vegetais impalatáveis, afastarem seus predadores naturais e proporcionarem resistência das plantas às pragas, as suas avaliações químicas foram conduzidas nesse trabalho.

1.9 Relevância da pesquisa

O lançamento de novos cultivares por programas de melhoramento genético de espécies perenes geralmente demoram muitos anos. Portanto, estratégias para abreviar a obtenção de cultivares resistentes e produtivas são de extrema valia.

No caso do café, o conhecimento das micro- e/ou macro-moléculas envolvidas no mecanismo de resistência ao bicho-mineiro, poderia levar a uma estratégia analítica eficaz para identificar precocemente indivíduos resistentes e, assim, acelerar o desenvolvimento de novos cultivares. A identificação precoce de plantas resistentes permite economia de tempo e de recursos, uma vez que cafeeiros suscetíveis podem ser descartados e os experimentos de campo, instalados apenas com indivíduos resistentes.

Outra importante abordagem de se conhecer quais as moléculas envolvidas nessa relação inseto-planta é a utilização desses compostos como bioinseticidas. Os bioinseticidas poderiam ser utilizados como ingredientes ativos de formulações para aplicação em genótipos suscetíveis de café. Adicionalmente, é possível pensar na eficácia desses bioinseticidas no controle de insetos de diferentes culturas.

Nesse contexto, é de extrema importância o entendimento do mecanismo de resistência entre o café e o bicho-mineiro.

HIPÓTESE

Como a antibiose já foi confirmada em trabalhos anteriores como o mecanismo de resistência ao estágio larval do bicho-mineiro em híbridos resistentes provenientes do cruzamento entre *C. arabica* e *C. racemosa*, a hipótese desta pesquisa é que os metabólitos secundários (aleloquímicos) regulam o mecanismo dessa resistência. Para confirmar ou não essa hipótese principal, duas abordagens foram utilizadas: a metabolômica alvo e a metabolômica global, sendo que hipóteses específicas para cada abordagem foram levantadas.

- Metabolômica alvo:
 1. Os ciclotídeos são encontrados nas folhas de café e podem estar envolvidos na antibiose;
 2. Os diterpenos cafestol, caveol e 16-metil-cafestol podem estar envolvidos na antibiose;
 3. Os taninos podem estar envolvidos na antibiose;
 4. O ácido ursólico na cera cuticular e/ou nos tecidos internos foliares pode estar envolvido na antibiose;

- Metabolômica global:
 1. O *fingerprinting* das folhas utilizando LC-MS e/ou GC-MS é capaz de diferenciar os genótipos resistentes e suscetíveis e evidenciar os aleloquímicos que podem estar envolvidos na antibiose;

Hipótese nula: não é possível observar diferenças utilizando as técnicas de preparo de amostras e análises utilizadas nesse trabalho, ou seja, nenhuma das hipóteses levantadas anteriormente é válida ou pôde ser validada pelos métodos utilizados.

5 CONCLUSÕES

Dentre as hipóteses levantadas no início do trabalho, algumas foram aceitas, enquanto outras foram refutadas ou não respondidas.

- Os ciclotídeos são encontrados nas folhas de café e podem estar envolvidos na antibiose: Hipótese refutada.

Os ciclotídeos não foram encontrados durante as análises da Parte 1. Portanto, concluiu-se que as folhas de café das espécies *C. racemosa*, *C. arabica* e seus híbridos interespecíficos não possuem esse tipo de peptídeos cíclicos em folhas não infestadas pelo bicho-mineiro segundo a metodologia utilizada.

- Os diterpenos cafestol, caveol e 16-metil-cafestol podem estar envolvidos na antibiose: Hipótese não respondida.

Dentre os três diterpenos avaliados na Parte 1 do trabalho, somente a presença do cafestol foi detectada para as folhas não infestadas pelo bicho-mineiro. Porém, a verificação dessa hipótese durante a Parte 2 do trabalho não foi realizada. Portanto, não se pode afirmar se esses diterpenos possuem relação na antibiose da relação planta-*L. coffeella*.

- Os taninos hidrolisáveis podem estar envolvidos na antibiose: Hipótese não respondida.

Dentre os taninos hidrolisáveis, foi observada a presença de galotaninos mas não de elagitaninos em folhas não infestadas pelo bicho-mineiro. Porém, a verificação dessa hipótese durante a Parte 2 do trabalho não foi. Portanto, não se pode afirmar se os galotaninos possuem relação na antibiose da relação planta-*L. coffeella*.

- Os taninos hcondensados podem estar envolvidos na antibiose; Hipótese aceita

Para os taninos condensados existe diferença estatística significativa entre os genótipos estudados antes mesmo do primeiro contato com *L. coffeella*. Também foi observado um aumento de taninos para o genótipo resistente em T2, de 6,40 µg taninos/g folhas secas em T0 para 7,76 µg taninos/g folhas secas em T2. Esse aumento é um indicativo de que esse grupo de metabólitos possa estar envolvido na antibiose.

- O ácido ursólico presente na cera cuticular pode estar envolvido na antibiose: Hipótese aceita.

Houve diferença estatística entre diferentes tempos de coleta no teor de ácido ursólico na cera cuticular. Portanto, esse metabólito pode estar envolvido na antibiose.

- O ácido ursólico presente nos tecidos foliares internos pode estar envolvido na antibiose: Hipótese refutada.

Não houve diferença estatística no teor de ácido ursólico nos tecidos foliares internos durante o experimento de infestação.

- O *fingerprinting* das folhas utilizando LC-MS e/ou GC-MS é capaz de diferenciar os genótipos resistentes e suscetíveis e evidenciar os aleloquímicos envolvidos na antibiose; Hipótese aceita.

Durante a análise de GC-MS foi possível identificar um alcaloide nunca relatado no gênero *Coffea* antes, a arecolina. A arecolina foi encontrada apenas no genótipo resistente e houve um aumento na produção durante a infestação quando comparado ao T0.

Quando a rota biossintética foi analisada, houve um claro aumento do alcaloide trigonelina para o genótipo suscetível, sugerindo que durante a infestação a via metabólica dos alcaloides provenientes do ácido nicotínico é destinada para a produção de trigonelina no genótipo suscetível e para arecolina no genótipo resistente. Porém, essa conclusão precisa ser validada com a quantificação da arecolina durante o experimento de infestação e avaliação se o mesmo comportamento ocorre com outras progênies resistentes provenientes da combinação entre *C. racemosa* e *C. arabica*.

REFERÊNCIAS

- ALVES, D. S. *et al.* Extrato de *Coffea racemosa* como alternativa no controle do bicho-mineiro do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 250–258, 2011. DOI: 10.1590/S1413-70542011000200004.
- APPEL, H. M. *et al.* Limitations of folin assays of foliar phenolics in ecological studies. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n.4, 2001. DOI: 10.1023/a:1010306103643
- ASHIHARA, H.; DENG, W. W.; NAGAI, C. Trigonelline biosynthesis and the pyridine nucleotide cycle in *Coffea arabica* fruits: Metabolic fate of [carboxyl-¹⁴C] nicotinic acid riboside. **Phytochemistry Letters**, v. 4, p. 235–239, 2011. DOI: 10.1016/j.phytol.2011.04.005.
- BARBEHENN, R; CONSTABEL, C. P. Tannins in plant–herbivore interactions. **Phytochemistry**, v. 72, n. 13, p. 1551-1565, 2011. DOI: 10.1016/j.phytochem.2011.01.040
- BATE-SMITH, E. C. Detection and determination of ellagitanins. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1153-1156, 1972. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88470-8.
- BATE-SMITH, E. C. Astringent tannins of *Acer* species. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1421-1426, 1977. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)88795-6.
- BERNAYS, E. A.; CHAPMAN, R. F. **Host-plant selection by phytophagous insects**. New York: Chapman and Hall, 1994. DOI: 10.1007/b102508.
- BOBEY, A. F. **Isolamento e caracterização de ciclotídeos da espécie *Noisettia orchidiflora* (Rudge) Ging**. 2016. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.
- BOURGAULT, R. *et al.* Constructing functional cuticles: analysis of relationships between cuticle lipid composition, ultrastructure and water barrier function in developing adult maize leaves. **Annals of Botany**, v. 125, n. 1, p. 79–91, 2020. DOI: 10.1093/aob/mcz143
- BUSCHHAUS, C.; HUBERT, H.; REINHARD, J. Chemical composition of the epicuticular and intracuticular wax layers on the adaxial side of *Ligustrum vulgare* leaves. **New Phytologist**, v. 176, p. 311–316, 2007. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2007.02190.x.
- CABI. *Perileucoptera coffeella*. In: INVASIVE species compendium. Wallingford: CAB International, 2021. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc>. Acesso em: 4 ago. 2021.
- CARDOSO, D.C. *et al.* Large-scale analysis of differential gene expression in coffee genotypes resistant and susceptible to leaf miner – toward the identification of candidate genes for marker assisted-selection. **BMC Genomics**, v. 15, n. 66, 2014. DOI:10.1186/1471-2164-15-66.

CHEN, X. A review on coffee leaves: Phytochemicals, bioactivities and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 6, p. 1008–1025, 2018. DOI:10408398.2018.1546667.

CHRISTELLER, J. T. *et al.* Triterpene acids from apple peel inhibit lepidopteran larval midgut lipases and larval growth. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 86, n. 3, p. 137–150, 2014. DOI: 10.1002/arch.21157

CHU, R. *et al.* Characterization of New Ent-kaurane Diterpenoids of Yunnan Arabica Coffee Beans. **Natural Products Bioprospecting**, v. 6, p. 217–223, 2016. DOI: 10.1007/s13659-016-0099-1.

CLIFFORD, M. N; RAMIREZ-MARTINEZ, J. R. Tannins in Wet-Processed Coffee Beans and Coffee Pulp. **Food Chemistry**, v. 40, p. 191-200, 1991. DOI: 10.1016/0308-8146(91)90102-T.

CONAB - Companhia Nacional De Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Café, Brasília, DF, v. 8, safra 2021, n.1, primeiro levantamento, jan. 2021. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe/boletim-da-safra-de-cafe/item/15078-1-levantamento-de-cafe-safra-2021>> Acesso em: 10 de agosto 2021.

CONSTABEL, C. P., BARBEHENN, R. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. *In*: Schaller, A. (ed.). **Induced plant resistance to herbivory**. Dordrecht: Springer, 2008. DOI: 10.1007/978-1-4020-8182-8_12.

COSTA, P. D. *et al.* Resistance to neurotoxic insecticides in populations of the coffee leafminer *Leucoptera coffeella*, *In*: Trdan, S. (ed.). **Pest Insecticides Resistance**. IntechOpen, 2016. DOI: 10.5772/61466.

CRUZ, C.D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística, versão 2009.7.0. Viçosa: UFV, 2009. 278 p.

DANTAS, J. A. *et al.* Comprehensive review of the coffee leaf miner *Leucoptera Coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), with special regard to neotropical impacts, pest management and control. **Preprints**, p. 1-25, 2020. DOI: 10.20944/preprints202010.0629.v1.

DAVIS, A. P., RAKOTONASOLO, F. Six new species of coffee (*Coffea*) from northern Madagascar. **Kew Bulletin**, 2021. DOI: 10.1007/s12225-021-09952-5.

DETZEL, A.; WINK, M. Attraction, deterrence or intoxication of bees (*Apis mellifera*) by plant allelochemicals. **Chemoecology**, v. 4, n. 1, p. 8–18, 1993. DOI: 10.1007/BF01245891.

DIAS, R. C. E. *et al.* Evaluation of Kahweol and Cafestol in Coffee Tissues and Roasted Coffee by a New High-Performance Liquid Chromatography Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, n. 1, p. 88-93, 2010. DOI: 10.1021/jf9027427.

FARAH, A.; FERREIRA, T. The coffee plant and beans: an introduction. *In*: PREDDY, V. R. (ed.). **Coffee in health and disease prevention**. New York: Elsevier, 2015. Chap. 1, p. 5-10. DOI: 10.1016/B978-0-12-409517-5.00001-2.

FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria**: conceitos, métodos e aplicações. 1 ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2015. 496 p.

FRAGOSO, D. B. *et al.* Insecticide use and organophosphate resistance in the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, n. 3, p. 203–212, 2002. DOI: 10.1079/BER2002156.

GAITÁN, A. L. *et al.* Pests. *In*: GAITÁN, A. L. *et al.* **Compendium of Coffee Diseases and Pests**. Sherman: APS Publications, 2016. Part II, p. 45-60. DOI: 10.1094/9780890544723.003.

GEROMEL, C., *et al.* Sucrose metabolism during fruit development in *Coffea racemosa*. **Annals of Applied Biology**, v. 152, n. 2, p. 179–187, 2007. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2007.00199.x.

GONZÁLEZ-COLOMA, A. *et al.* Triterpene-based plant defenses. **Phytochemistry Reviews**, v. 10, p. 245–260, 2011. DOI: 10.1007/s11101-010-9187-8.

GRABBER, J. H.; ZELLER, W. E. Direct versus Sequential Analysis of Procyanidin- and Prodelphinidin-Based Condensed Tannins by the HCl-Butanol-Acetone-Iron Assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n. 10, p. 2906-2916, 2020. DOI: 10.1021/acs.jafc.9b01307.

GREEN, P. W. C.; SIMMONDS, M. S. J.; BLANEY, W. M. Toxicity and behavioural effects of diet-borne alkaloids on larvae of the black blowfly, *Phormia regina*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 16, p.157-160, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2915.2002.00358.x.

GRUBER, C. W.; CRAIK, D. J.; DORNENBURG, H. Formation of cyclotides and variations in cyclotide expression in *Oldenlandia affinis* suspension cultures. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, p. 275-284, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-1159-6.

GUERREIRO-FILHO, O. **Identification de gènes de résistance à *Perileucoptera coffeella* en vue de l'amélioration de *Coffea arabica*: Potentiel d'espèces diploïdes du genre *Coffea*; gènes de *Bacillus thuringiensis***. 1994. Thèse (Doctorat.) - ENSAM, Montpellier, 1994.

GUERREIRO-FILHO, O. Coffee leaf miner resistance. **Brazilian J. Plant Physiol.** v. 18, p. 109–117, 2006. DOI: 10.1590/S1677-04202006000100009.

GUERREIRO-FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Caffeine does not protect coffee against the leaf miner *Perileucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 26, p. 1447–1464, 2000. DOI: 10.1023/A:1005587725704.

GUERREIRO-FILHO, O., SILVAROLLA, M. B., Eskes, A. B. Expression and mode of inheritance of resistance in coffee to leaf miner *Perileucoptera coffeella*. **Euphytica**, v. 105, p. 7–15, 1999. DOI:10.1023/A:1003427613071.

HENRICH, V.C.; WEINBERGER, C.A. **Compound that act to modulate insect growth and methods and system to identifying such compounds**. (Depositante: University of North Carolina at Greensboro). US7790377B2. 2005. Depósito: 3 mar. 2005.

JÄGER, S. *et al.* Pentacyclic triterpene distribution in various plants–rich sources for a new group of multi-potent plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2016-2031, 2009. DOI: 10.3390/molecules14062016.

JAIN, P.; SATAPATHY, T.; PANDEY, R. K. Efficacy of arecoline hydrobromide against cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **International Journal of Acarology**, v. 46, n.4, p. 268-275, 2020. DOI: 10.1080/01647954.2020.1765018.

JENNINGS, C. *et al.* Biosynthesis and insecticidal properties of plant cyclotides: the cyclic knotted proteins from *Oldenlandia affinis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2001, 98, 10614-10619. DOI: 10.1073/pnas.191366898.

KARBAN, R.; MYERS, J. H. Induced plant responses to herbivory. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, p. 331-348, 1989. DOI: 10.1146/annurev.es.20.110189.001555.

KHANBABAEE, K.; REE, T. V. Tannins: Classification and Definition. **Natural Product Reports**, v. 18, p. 641–649, 2001. DOI: 10.1039/b101061l.

KITAGAMI, J. T. *et al.* Foliar cuticular waxes of cultivated species and varieties of *Coffea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 116–119, 2013. DOI: 10.1016/j.bse.2012.09.012.

KOGAN, M.; ORTMAN, E. F. Antixenosis – a new term proposed to define Painter’s “nonpreference” modality of resistance. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v. 24, n. 2, p. 175-176, 1978. DOI: 10.1093/besa/24.2.175.

KÖLLING-SPEER, I.; SPEER, K. Diterpenes in coffee leaves. In: 17th International Colloquium on the Chemistry of Coffee. p.150-154, 1997.

LE PELLEY, R. H. Coffee insects. **Annual Review of Entomology**, v. 18, p. 121–142, 1973. DOI: 10.1146/annurev.en.18.010173.001005.

LEITE, S. A. *et al.* Area-wide survey of chlorantraniliprole resistance and control failure likelihood of the neotropical coffee leaf miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 113, n. 3, p.1399-1410, 2020. DOI: 10.1093/jee/toaa017.

LI, L. et al. Screening and identification of the metabolites in rat plasma and urine after oral administration of *Areca catechu* L. nut extract by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled with linear ion trap–orbitrap tandem mass spectrometry. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 1026, 2017. DOI: 10.3390/MOLECULES22061026.

LICHSTON, J. E. **Efeitos da aplicação de um fungicida na composição química da cera foliar de *Coffea arabica* L.** 2005. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

LICHSTON, J. E.; GODOY, S. A. P. Morfologia e teor de cera de folhas de café após aplicação de fungicida. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 6, p. 919-926, 2006. DOI: 10.1590/S0100-204X2006000600004

LIPSA, F. D.; SNOWDON, R.; FRIEDT, W. Quantitative genetic analysis of condensed tannins in oilseed rape meal. **Euphytica**, v. 184, n. 2, p. 195-205, 2012. DOI: 10.1007/s10681-011-0546-3.

LIU, Y. J. et al. The pharmacology, toxicology and potential applications of arecoline: a review, **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n.11, p. 2753-2760, 2016. DOI: 10.3109/13880209.2016.1160251.

MAGALHÃES, S. T. V et al. 2004. Interação entre bicho-mineiro e híbridos de *Coffea Arabica* x *Coffea racemosa*, em condições controladas. **Bioscience Journal**, v. 20, n. 1, p. 9–14, 2004.

MAGALHÃES, S. T. V. *et al.* Coffee leaf volatiles and egg laying by the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Crop protection**, v. 27, n. 6, p. 1038–1041, 2008a. DOI: 10.1016/j.cropro.2007.12.005.

MAGALHÃES, S.T.V. *et al.* Effect of coffee alkaloids and phenolics on egg-laying by the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Bulletin of Entomological Research**, v. 98, n. 5, p. 483–489, 2008b. DOI: 10.1017/S0007485308005804.

MAGALHÃES, S.T.V. *et al.* Leaf Alkaloids, Phenolics, and Coffee Resistance to the Leaf Miner *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 4, p. 1438–1443, 2010. DOI: 10.1603/ec09362.

MARQUINA, S. *et al.* Bioactive oleanolic acid saponins and other constituents from the roots of *Viguiera decurrens*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 93–97, 2001. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)00283-1.

MARTINS, S. C. V. *et al.* In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, e94862, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0094862.

MATOS, J. W. *et al.* Antixenosis resistance to leaf miner *Leucoptera coffeella* in *Coffea* species. **Euphytica**, v. 181, n. 2, p. 253–260, 2011. DOI: 10.1007/s10681-011-0418-x.

MATYASH, V. *et al.* Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics, **Journal of Lipid Research**, v. 49, n. 5, p. 1137–1146, 2008. DOI: 10.1194/jlr.D700041-JLR200.

MAZZAFERA, S.; ROBINSON, S. P. Characterization of polyphenol oxidase in coffee. **Phytochemistry**, v. 55, n. 4, p. 285-296, 2000. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)00332-0.

MELO, G. A.; SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Polyphenoloxidase activity in coffee leaves and its role in resistance against the coffee leaf miner and coffee leaf rust. **Phytochemistry**, v. 67, n. 3, p. 277–285, 2006. DOI: 10.1016/j.phytochem.2005.11.003.

MILA, I.; SCALBERT, A.; EXPERT, D. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. **Phytochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1551-1555, 1996. DOI: 10.1016/0031-9422(96)00174-4

MITHÖFER, A.; BOLAND, W. Plant defense against herbivores: chemical aspects. **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, p. 431-450, 2012. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042110-103854.

MONDEGO, J. M. *et al.* Isolation and characterization of Coffea genes induced during coffee leaf miner (*Leucoptera coffeella*) infestation. **Plant Science**, v. 169, n. 2, p. 351–360, 2005. DOI: 10.1016/j.plantsci.2005.03.020.

MONDEGO, J. M. *et al.* Molecular characterization of a miraculin-like gene differentially expressed during coffee development and coffee leaf miner infestation. **Planta**, v. 233, n. 1, p.123–137, 2011. DOI: 10.1007/s00425-010-1284-9.

MONTEIRO, A. *et al.* Dietary antioxidants in coffee leaves: impact of botanical origin and maturity on chlorogenic acids and xanthenes. **Antioxidants**, v. 9, n. 1, p. 6, 2019. DOI:10.3390/antiox9010006.

MONTEIRO, J. M. *et al.* Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, p. 892-896, 2005. DOI: 10.1590/S0100-40422005000500029.

MUSHTAQ, M. Y. *et al.* Extraction for Metabolomics: Access to The Metabolome. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 4, p. 291-306, 2014. DOI: 10.1002/pca.2505.

NICHOLSON, J. K.; LINDON, J. C. Systems biology: metabolomics. **Nature**, v. 455, n. 23, p. 1054-1056, 2008. DOI: 10.1038/4551054a.

PAINTER, R. H. 1951. **Insect resistance in crop plants**. New York: Macmillan. 520 p. DOI: 10.1097/00010694-195112000-00015.

PANUSA, A. *et al.* UHPLC-PDA-ESI-TOF/MS metabolic profiling and antioxidant capacity of arabica and robusta coffee silverskin: antioxidants vs phytotoxins. **Food Research International**, v. 99, p. 155–165, 2017. DOI: 10.1016/j.foodres.2017.05.017.

PARRA, J. R. P. Biologia comparada de *Perileucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville, 1842) (Lepidoptera:Lyonetiidae) visando ao seu zoneamento ecológico no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 29, n. 1, p. 45-76, 1985.

PENG, W. et al. *Areca catechu* L. (Arecaceae): a review of its traditional uses, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 164, p. 340–356, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2015.02.010.

PORTER, L. J.; HRSTICH, L. N.; CHAN, B. G. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. **Phytochemistry**, v. 25, p. 223–230, 1986. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)94533-3.

POWELL, J. A. Evolution of Larval Food Preferences in Microlepidoptera. **Annual Review of Entomology**, v. 25, p. 133-59, 1980. DOI: 10.1146/annurev.en.25.010180.001025.

RAMIREZ-CORONEL, M. A. et al. Characterization and Estimation of Proanthocyanidins and Other Phenolics in Coffee Pulp (*Coffea arabica*) by Thiolysis-High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1344-1349, 2004. DOI: 10.1021/jf035208t.

RAMIRO, D.A. **Alterações histoquímicas em genótipos resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro-do-cafeeiro**. 2003. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) - Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), Campinas, 2003.

RAMIRO, D. A.; GUERREIRO-FILHO, O.; MAZZAFERA, P. Phenol contents, oxidase activities, and the resistance of coffee to the leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 32, p. 1977–1988, 2006. DOI: 10.1007/s10886-006-9122-z.

RAMIRO, D.A. et al. Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e suscetíveis ao bicho-mineiro. **Bragantia**, v. 63, n. 3, p. 363–372, 2004. DOI: 10.1590/S0006-87052004000300006.

RATERINK, R. J. et al. Recent developments in sample-pretreatment techniques for mass spectrometry-based metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 61, p. 157–167, 2014. DOI: 10.1016/j.trac.2014.06.003.

ROMA, L. P. **Composição química e morfologia das ceras cuticulares foliares de diferentes espécies de *Simaba* Aubl. sensu stricto e *Homalolepis* Turcz. (Simaroubaceae)**. 2018. 157 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociência, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROSSI, G. D. et al. Enzimas digestivas do bicho-mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Guérin-Mèneville & Perrottet, 1842) Lepidoptera: Lyonetiidae. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, 2009. DOI: 10.1590/S1413-70542009000700029.

SALEM, M. A. et al. Protocol: a fast, comprehensive and reproducible one-step extraction method for the rapid preparation of polar and semi-polar metabolites,

lipids, proteins, starch and cell wall polymers from a single sample. **Plant Methods**, v. 12, n. 45, 2016. DOI: 10.1186/s13007-016-0146-2.

SANTOS, D. Y. A. C. *et al.* Leaf waxes of Brazilian genotypes of coffee plants (*Coffea arabica* L. – Rubiaceae). In: **21st International Symposium on Plant Lipids**, 2014, Ontario. p. 46-46, 2014.

SANTOS-JÚNIOR, H. M. *et al.* Ursolic acid and cis-tiliroside produced by *Merremia tomentosa* affect oviposition of *Leucoptera coffeella* on coffee plants. **Química Nova**, v. 40, p. 284–292, 2018. DOI: 10.21577/0100-4042.20170185.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal feed science and technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001. DOI: 10.1016/S0377-8401(01)00228-0

SCHWACHTJE, J.; BALDWIN, I. T. Why does herbivore attack reconfigure primary metabolism? **Plant Physiology**, v. 146, n. 3, p. 845-851, 2008. DOI: 10.1104/pp.107.112490.

SHAKYA, B.; SIDDIQUE, Y. H. Evaluation of the toxic potential of arecoline toward the third instar larvae of transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ) Bg9. **Toxicology Research**, v. 7, n. 3, p. 432–443, 2018. DOI: 10.1039/c7tx00305f.

SHALMASHI, A.; GOLMOHAMMAD, F. Solubility of caffeine in water, ethyl acetate, ethanol, carbon tetrachloride, methanol, chloroform, dichloromethane, and acetone between 298 and 323 K. **Latin America Applied Research**, v. 40, p. 283–285, 2010.

SHUKLA, Y. N. *et al.* Antifeedant activity of ursolic acid isolated from *Duboisia myoporoides*. **Phytotherapy Research**, v. 10, n. 4, p. 359-360, 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1573(199606)10:4<359::AID-PTR841>3.0.CO;2-C.

SILVA, J. A. *et al.* Method Validation for Cafestol and Kahweol Quantification in Coffee Brews by HPLC-DAD. **Food Analytical Methods**, v.5, p. 1404-1410, 2012. DOI: 10.1007/s12161-012-9387-5.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999. DOI: 10.1016/S0076-6879(99)99017-1.

SMITH, C. M. Plant Resistance to Arthropods: Molecular and Conventional Approaches. Dordrecht: Springer, 2005. DOI: 10.1007/1-4020-3702-3.

SOUARD, F. *et al.* Metabolomics fingerprint of coffee species determined by untargeted-profiling study using LC-HRMS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 603–612, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.10.022.

SOUZA, J. C.; REIS, P. R.; RIGITANO, R. L. O bicho-mineiro-do-cafeeiro: biologia, danos e manejo integrado. **Boletim Técnico**, n. 54, Belo Horizonte, 1998. Disponível em:

http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/boletins_tecnicos/bt_bicho_mineiro.pdf. Acesso em: 4 ago. 2021.

TAUNAY, A. E. **História do café no Brasil Imperial, 1822-1872**. Rio de Janeiro: Departamento Nacional do Café, v. 5, 1943.

VARANDA, E. M. et al. Effect of ursolic acid from epicuticular waxes of *Jacaranda decurrens* on *Schizaphis graminum*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 6, p. 800-803, 1992. DOI: 10.1021/np50084a015.

VENKATESH, D. et al. Study of salivary arecoline in areca nut chewers. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v.22, n. 3, p. 446. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP_143_18

WALLER, G. R. et al. Isolation and identification of ursolic acid from *Coffea arabica* L. (coffee) leaves. In: ASSOCIATION FOR SCIENCE AND INFORMATION ON COFFEE (ASIC) 14th CONFERENCE, São Francisco, 1991. ISBN 2-900212-13-8.

WANG, M. et al. 2016. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nature Biotechnology**, v. 34, p. 828–837, 2016. DOI: 10.1038/nbt.3597.

WANG, Y. et al. Composition and variability of epicuticular lipids of azaleas and their relationship to azalea lace bug resistance. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 124, n. 3, p. 239-244, 1999. DOI:10.21273/JASHS.124.3.239

WAR, A. R. et al. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. **Journal of Plant Signaling and Behavior**, v.7, p. 1306-1320, 2012. DOI:10.4161/psb.21663.

WARNAKULASURIYA, S. Areca nut use: an independent risk factor for oral cancer. **British Medical Journal**, v. 324, n. 7341, p. 799–800, 2002. DOI: 10.1136/bmj.324.7341.799.

WINK, M.; SCHIMMER, O. Molecular modes of action of defensive secondary metabolites. **Annual plant reviews online**, v. 39, p. 21–161, 2018. DOI: 10.1002/9781119312994.apr0418

WINK, M.; THEILE, V. Alkaloid tolerance in *Manduca sexta* and phylogenetically related sphingids (Lepidoptera: Sphingidae). **Chemoecology**, v. 12, p. 29–46, 2002. DOI: 10.1007/s00049-002-8324-2.

WOLFENDER, J. L. et al. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136–164, 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.10.091.

YIN, X. et al. Melatonin as an inducer of arecoline and their coordinated roles in anti-oxidative activity and immune responses. **Food & Function**, v. 11, p. 8788-8799, 2020. DOI: 10.1039/D0FO01841D.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 27, p. 361–422, 2003. DOI: 10.1111/j.1745-4514.2003.tb00289.x.

ZUCKER, W. V. Tannins: does structure determine function? An ecological perspective. **The American Naturalist**, v. 121, n. 3, p. 335-365, 1983. DOI: 10.1086/284065.