

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*)"

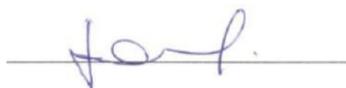
AUTORA: LILIAN CHERUBIN CORREIA

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 Agronômico 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 untargeted 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
t_r	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.

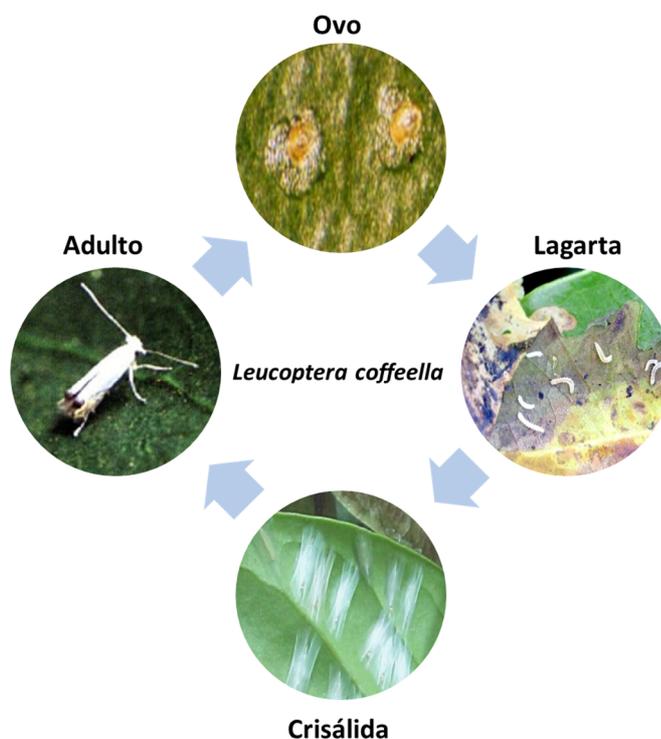
Após o período larval, as lagartas saem dos túneis e formam casulos na parte exterior abaxial das folhas. A duração do estágio de crisálida e a quantidade das pupas que viram adultos são muito dependentes da temperatura. Entre 27-30 °C as condições são mais favoráveis, nas quais 95% das pupas se tornam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

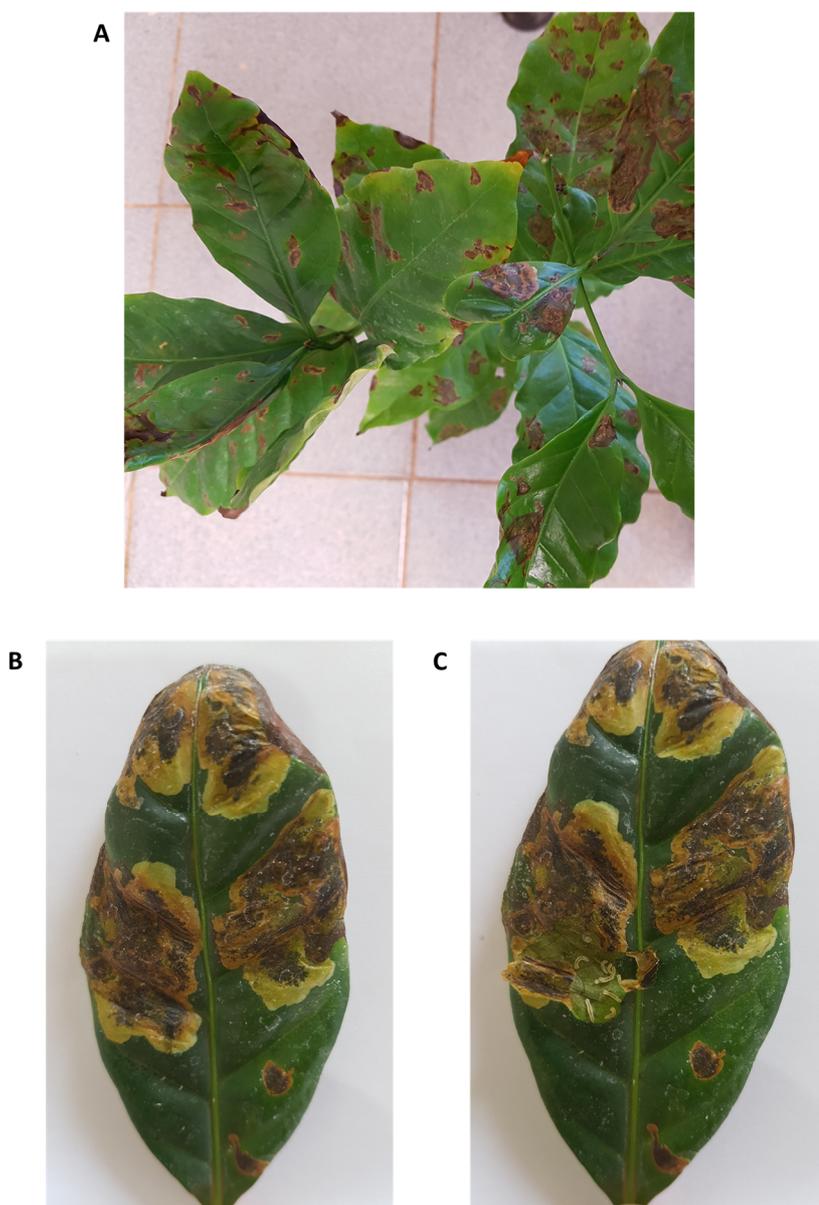


Fonte: Autor

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).

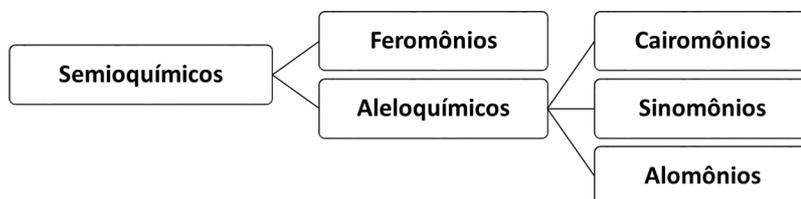
A tolerância é definida como a capacidade que uma planta possui de suportar ou recuperar-se de danos causados por herbívoros quando comparada a uma planta também danificada sem nenhuma característica de resistência, ou seja, suscetível (SMITH, 2005).

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.

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o papel de metabólitos secundários (aleloquímicos) na regulação do mecanismo de resistência do cafeeiro ao bicho-mineiro por meio de estratégias de metabolômica alvo e metabolômica global.

3 MATERIAL E MÉTODOS

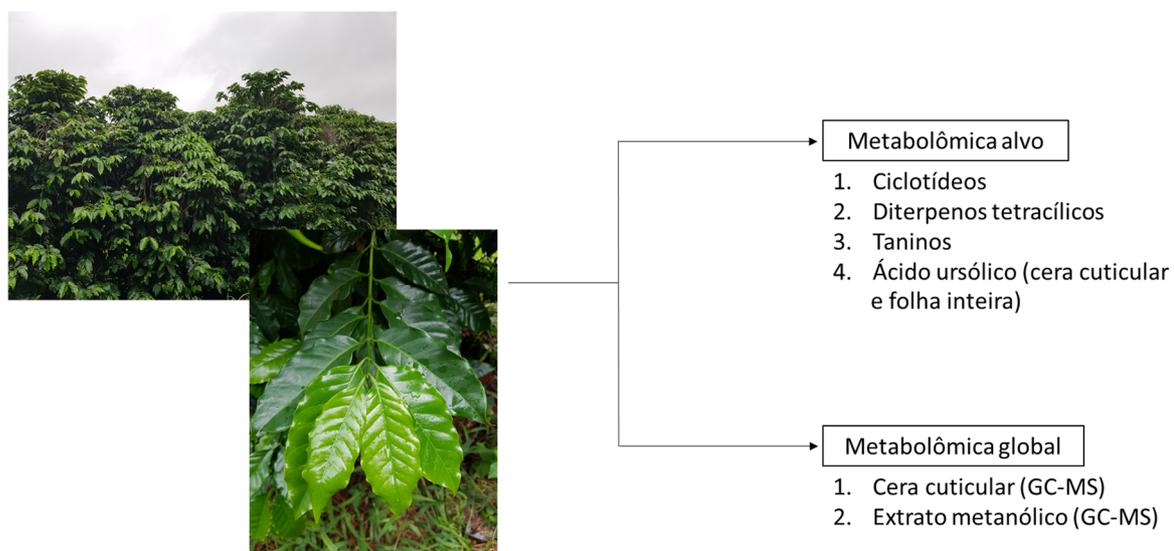
3.1 Parte 1: Avaliações iniciais

No banco de germoplasma de café do Instituto Agronômico de Campinas (IAC), foram coletadas folhas sem sinais de infestação do bicho-mineiro dos genótipos: *C. racemosa*, *C. arabica* e seus híbridos interespecíficos H14954-1 (resistente) e H14954-23 (suscetível). As folhas foram coletadas de forma aleatória do terço médio superior de cada indivíduo, escolhendo-se apenas as folhas maduras pertencentes ao 3º, 4º ou 5º par de folhas de cada ramo.

A coleta das folhas foi realizada em Janeiro/2019, levadas até o laboratório onde foram delicadamente limpas com papel toalha e separadas em duas partes. A primeira parte foi seca e a segunda parte foi utilizada *in natura*.

As folhas foram utilizadas nas análises qualitativas de ciclotídeos, diterpenos tetracíclicos, taninos e ácido ursólico para análises de metabolômica alvo e a cera cuticular e extrato metanólico para análises de metabolômica global, conforme representado na Figura 5.

Figura 5 - Esquema das análises químicas realizadas inicialmente



3.1.1 Métodos de secagem das folhas

A secagem das folhas de *C. racemosa*, *C. arabica* e seus híbridos interespecíficos H14954-1 (resistente) e H14954-23 (suscetível), foi avaliada por duas metodologias diferentes: secagem em estufa ventilada à 40 °C e secagem em sacos herméticos com sílica gel.

Para avaliação em estufa, as folhas foram acondicionadas em sacos de papel e secas em estufa de circulação de ar (Fanem Ltda, modelo 330/5), durante 5 dias à 40 °C.

Para avaliação da secagem em sílica, colocou-se as folhas em sacos de plástico herméticos contendo sílica gel, e mantidas durante 7 dias à temperatura ambiente e em ambiente escuro.

Depois de secas, as folhas foram trituradas em um moinho analítico (IKA, modelo A11 Basic) e cada metodologia de secagem foi avaliada pela determinação de compostos fenólicos totais, segundo protocolo descrito por Singleton; Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), com algumas modificações.

Adicionou-se 150 mg do material seco e moído em tubos do tipo Falcon de 15 mL e, em seguida adicionou-se 6 mL de etanol/água (1:1, v/v), a extração foi acelerada por ultrassom (LAB1000, modelo CD-4860) por 60 minutos, seguido da centrifugação dos tubos por 10 minutos (Hettich, modelo Rotina 380R). Repetiu-se esse processo por três vezes para cada amostra.

Em tubos de ensaio, adicionou-se 50 µL de extrato, 3,95 mL de água destilada, 250 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Dinâmica®), manteve-se a solução em repouso por 5 minutos e então adicionou-se 750 µL de solução Na₂CO₃ 20% e aguardou-se por 50 minutos para reação no escuro. As leituras espectrofotométricas foram feitas no comprimento de onda de 765 nm, em espectrofotômetro de absorção molecular (Hitachi, modelo U2000).

O teor de compostos fenólicos foi calculado com uma curva de calibração utilizando-se padrão de ácido clorogênico (Sigma-Aldrich, 95%). A partir de uma concentração mãe de 2,1 mg/mL, foram feitas seis diluições em triplicata para a construção da curva de calibração (16,8; 12,6; 8,4; 6,3; 4,2 e 2,1 ng/mL). Cada ponto da curva foi submetido a reação descrita acima antes da análise espectrofotométrica. Foi utilizada a solução reacional como branco para zerar o equipamento.

3.1.2 Metabolômica alvo

3.1.2.1 Ciclotídeos

A partir das folhas de café de *C. racemosa*, *C. arabica* e seus híbridos interespecíficos H14954-1 (resistente) e H14954-23 (suscetível), secas em estufa e moídas, 1 g de cada amostra foi extraído com MeOH:H₂O (60:40) v/v, por 50 minutos em ultrassom (LAB1000, modelo CD-4860), seguida de filtração por gravidade, utilizando-se papel de filtro. As soluções foram submetidas à extração líquido-líquido utilizando-se 20 mL de diclorometano (DCM) (3x). A fase DCM foi descartada e a fase hidrometanólica foi seca utilizando rotaevaporador até completa eliminação do metanol, restando apenas água. Com essa solução foi realizada uma etapa de pré-purificação utilizando-se uma coluna de SPE empacotada com sílica de fase reversa (C18, Polygoprep®, 40-63 µm, 60 Å). Utilizaram-se como fases móveis as seguintes soluções, A: 0,1 % de ácido fórmico e B: ACN 90 % em H₂O/0,08 % ácido fórmico. Primeiramente, eluiu-se o extrato com 3 mL de uma solução de 20 % de solvente B, para remoção dos compostos polares (Fração A), seguido da adição de 3 mL de solução de 80% de solvente B (Fração B). A Fração B foi coletada e seca, sendo considerada potencialmente “rica em ciclotídeos”. A análise cromatográfica foi feita utilizando-se uma coluna Luna C-18 column (Phenomenex, 250 x 4,60 mm; 5 µm) e método de eluição gradiente: 34-65 % da solução B em 62 minutos e vazão 1,0 mL/min, adaptada de Bobey (2016). As análises foram monitoradas por UV em comprimentos de onda de 220 e 280 nm e por MS.

Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu®, equipado com bomba binária LC-20AD, injetor automático (SIL-20AHT), forno com controle de temperatura (CTO-20A), detector de arranjo de fotodiodos (SPD-M20A) e controle de sistema (CBM-20A) acoplado a um espectrômetro de massas (Bruker amaZon SL ion trap) com ionização por electrospray (ESI). O espectrômetro de massas foi operado em modo positivo de ionização. Os parâmetros de operação foram: temperatura do gás de secagem a 300 °C, fluxo de 10 L/min, nitrogênio como gás nebulizador à pressão de 50 psi e voltagem do capilar de 4,5 kV. Os cromatogramas de íons totais (TIC) foram adquiridos na faixa de m/z 50-1200.

3.1.2.2 Cafestol, caveol, 16-metil-cafestol

A partir das folhas de café de *C. arabica*, genótipo H14954-1 (resistente) e genótipo H14954-23 (suscetível) secas em estufa e moídas, pesou-se 0,2 g de cada amostra e adicionou-se 2 mL de KOH 2,5 M (em etanol 95%), sendo essa mistura mantida em banho-maria à 80 °C por 1h. Em seguida, adicionou-se 5 mL de água destilada e 5 mL de *terc*-butil metil éter (MTBE) (PA, Sigma-Aldrich), sendo homogeneizados e centrifugados. A fase orgânica foi recolhida e repetiu-se o processo por mais duas vezes. Os sobrenadantes de cada extração foram combinados e 2 mL de água destilada foram adicionados ao meio. Descartou-se a fase aquosa e a fase orgânica foi seca e ressuspensa em 2 mL da fase móvel.

A análise cromatográfica foi feita utilizando-se uma coluna de fase reversa Inertsil-ODS3 (4,6mm x 250 mm, 5 µm) e método de eluição isocrático: 45% de acetonitrila e 55 % de água durante 30 minutos. Os parâmetros foram adaptados conforme protocolos descritos por Dias et al. (2010) e Silva et al. (2012). O volume de injeção foi de 20 µL, a vazão de 1,0 mL/min e a temperatura da coluna 25°C. As análises foram monitoradas em 225 e 290 nm. Os diterpenos foram identificados pela comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção com os respectivos padrões (Cayman Chemical, ≥98%).

Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity Quaternary LC), equipado com bomba quaternária (1260 Quat Pump, G1311B), injetor automático (1260 ALS, G1329B), forno com controle de temperatura (1260 TCC, G1316A), detector de arranjo de fotodiodos (1260 DAD VL+, G1315C) e um sistema de software (Agilent OpenLAB CDS, versão A.01.04) para a aquisição de dados.

3.1.2.3 Taninos

A presença dos taninos hidrolisáveis (galotaninos e elagitaninos) nas folhas de *C. arabica*, genótipo H14954-1 (resistente) e genótipo H14954-23 (suscetível) foi investigada por dois métodos diferentes.

Para detecção de galotaninos, 10 mg de folhas secas e trituradas foram extraídas com 1,0 mL de solução água/metanol (1:1, v/v) durante 30 min no ultrassom (LAB1000, modelo CD-4860). Desse extrato, 0,5 mL foi aliqotado para um tubo reacional e foi adicionado 1,5 mL de 12% KIO₃ em metanol à 15 °C. A leitura

espectrofotométrica (Hitachi, modelo U2000) em 550 nm foi feita imediatamente após a reação (BATE-SMITH, 1972).

Para detecção de elagitaninos, 10 mg de folhas secas e trituradas foram extraídas com 1,0 mL de solução água/metanol (1:1, v/v) durante 30 min no ultrassom (LAB1000, modelo CD-4860). Desse extrato, 0,5 mL foi aliqotado em tubos reacionais e foi adicionado 0,16 mL de ácido acético 6 %, com borbulhamento de nitrogênio no tubo reacional durante 15 minutos, seguida da adição de 0,16 mL de NaNO₂ 6 % e repetição do processo de borbulhagem de nitrogênio no tubo reacional por mais 15 segundos. O frasco foi selado, esperou-se 15 min para o surgimento da coloração azul e a leitura no espectrofotômetro (Hitachi, modelo U2000) em 600 nm foi feita (BATE-SMITH, 1977).

Já a presença dos taninos condensados foi investigada nas folhas de *C. racemosa*, *C. arabica* e seus híbridos interespecíficos H14954-1 (resistente) e H14954-23 (suscetível), utilizando-se o método direto proposto por Grabber e Zeller (2020). O meio reacional foi preparado adicionando-se 150 mg de NH₄Fe(SO₄)₂.12H₂O (Millipore, grau ISO), 3 mL de água destilada, 5 mL de ácido clorídrico (HCl 37%, Merck), 42 mL de n-butanol (PA, Synth) e 50 mL de acetona (PA, Merck).

Foram pesados 20 mg das folhas secas e moídas em frascos. Adicionou-se 15 mL da solução reacional e manteve-se em banho-maria sob agitação (GCA Precision PS Scientific, Dubnoff Metabolic Shaking Incubator) por 3 horas à 70 °C. Após esse período, os frascos foram centrifugados (Hettich, modelo Rotina 380R) e o sobrenadante coletado para análise espectrofotométrica. O meio reacional não reagido foi utilizado como branco para zerar o equipamento e as leituras espectrofotométricas foram feitas em 550 nm (Hitachi, modelo U2000).

3.1.2.4 Ácido ursólico

Investigou-se a presença de AU total nas folhas e somente na cera cuticular de *C. racemosa*, *C. arabica* e seus híbridos interespecíficos H14954-1 (resistente) e H14954-23 (suscetível).

A partir das folhas secas em estufa e moídas, foram preparados dois extratos, um utilizando o solvente metanol e outro utilizando DCM. Os dois extratos foram preparados da mesma forma, pesando-se 0,1 g de cada amostra em frascos, adicionando-se 10 mL de cada solvente e a extração foi acelerada em ultrassom

durante 30 minutos. Os extratos foram filtrados e secos em ambiente inerte com nitrogênio gasoso

A partir das folhas frescas, a cera cuticular foi extraída com DCM (PA, Merck) imediatamente após a retirada das folhas das plantas, em duplicata. O procedimento de extração foi realizado mergulhando-se uma folha por vez em 10 mL de DCM em um recipiente côncavo redondo durante 30 segundos e virando-se a folha para o lado oposto, repetiu-se o processo por mais 30 segundos. Esse procedimento foi realizado 3x em cada folha, os extratos foram filtrados com lã de vidro, reunidos e secos (ROMA, 2018).

Os extratos secos provenientes da extração com MeOH, DCM e da cera cuticular foram submetidos à reação de derivatização e injeção no GC-MS (Modelo Dual Stage TMP (QP 2020), Shimadzu). A sililação foi realizada dissolvendo-se cada extrato em 200 μ L de piridina (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$) e adicionando-se 200 μ L de MSTFA (N-metil-N(trimetilsilil)trifluoroacetamida) (Sigma-Aldrich, 98,5%). A reação foi mantida durante 1 hora em banho à 37 °C em frascos de 4 mL (Ethik Technology, modelo 316-5DN). Após esse período, as soluções foram filtradas em membrana 0,22 μ m e armazenadas em geladeira durante 24 horas. As amostras foram analisadas em um método exploratório. Foi utilizada uma coluna SH-Rtx-5MS (5% difenil/95% dimetil polisiloxano), 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 μ m df, com programação de temperatura de 120 °C a 320 °C em 3 °C/min com 3 min de isocrático em 120 °C e 15 min de isocrático em 320 °C, 1,0 mL/min de vazão do gás de arraste (N₂), *split* 1/20, volume de injeção: 1 μ L, *m/z* scan: 35 - 900.

Foi injetado o padrão de n-alcenos (C8 – C40) para cálculo do índice de retenção (IR) no mesmo método. A identificação de AU foi realizada por comparação do IR experimental com o teórico e pelo padrão de fragmentação, ambos disponíveis no banco de dados NIST.

3.1.2.5 Metabolômica global

As mesmas análises utilizadas para a identificação do AU na cera cuticular e nos extratos, citada na Seção 3.1.2.4, foram utilizadas para avaliação da metabolômica global. Para tanto, os picos cromatográficos que apresentaram índice de similaridade maior ou igual a 90 % com os espectros disponíveis na biblioteca NIST 14, foram confirmados com base nos índices de retenção (IR) e comparação com espectros disponíveis no banco de dados NIST e Golm Metabolome Database (Max

Planck Institute). Os mapas de calor (*heatmaps*) foram gerados com MetaboAnalyst 5.0. Nessa análise são comparadas as alterações nas intensidades relativas entre cada substância presente nas diversas amostras estudadas.

Parte 2: Experimento com insetos

3.1.3 Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos com 24 mudas clonais de matrizes resistente (CI-12) e suscetível (3-32), de uma população derivada da recombinação entre as espécies *C. arabica* e *C. racemosa*, oriundos do programa de melhoramento do cafeeiro conduzido pelo Procafé em parceria com a Embrapa Café, em Varginha, MG. As mudas foram mantidas em casa de vegetação até serem utilizadas nos experimentos.

3.1.4 Criação de insetos

Folhas de café com sinais de infestação pelo bicho-mineiro foram coletadas em uma propriedade particular em Minas Gerais no mês de Maio/2020, acondicionadas em sacos plásticos e levadas até o insetário do Centro de Café Alcides Carvalho (IAC). No insetário, foi feita uma seleção das folhas que continham pupas, que foram então recortadas utilizando-se uma tesoura para dar início à criação dos insetos (Figura 6A). As pupas recortadas foram acondicionadas em recipientes plásticos e colocadas dentro de uma gaiola quadrada (60x60 cm) mantida a uma distância de 70 cm do chão. A gaiola foi feita de madeira com as paredes laterais e superior revestidas com tecido tipo *voil* (Figura 6B).

Após alguns dias, os primeiros adultos foram observados dentro da gaiola. Estes foram alimentadas com solução de sacarose 10 % fornecida através de papel de filtro mantido na parede superior da gaiola (Figura 6C), segundo condições descritas por Parra (1985).

As condições para criação dos insetos foram: temperatura de 28 ± 5 °C, fotofase de 12 horas e umidade relativa de 55 ± 10 %.

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%



3.1.5 Avaliação do nível de resistência

O nível de resistência de cada genótipo de café em relação à fase larval do bicho-mineiro foi avaliado em condições de laboratório. Duas plantas de cada genótipo foram colocadas no interior da gaiola por uma noite para a oviposição nas folhas pelos insetos. As plantas foram acondicionadas dentro do insetário e avaliações diárias foram realizadas. A avaliação do nível de resistência foi realizada em função do tipo de lesão desenvolvida pelas lagartas, utilizando-se uma escala de pontos descrita por Guerreiro-Filho et al. (1999) e Ramiro et al. (2004) para comparação (Tabela 3).

Tabela 3 - Escala de pontos para a classificação das plantas quanto ao nível de resistência em laboratório

Pontos	Tipo de lesão	Classificação
1	Pontuais	Resistente
2	Filiformes pequenas	Moderadamente resistente
3	Grandes irregulares	Moderadamente suscetível
4	Grandes arredondadas	Suscetível

3.1.6 Experimento de infestação

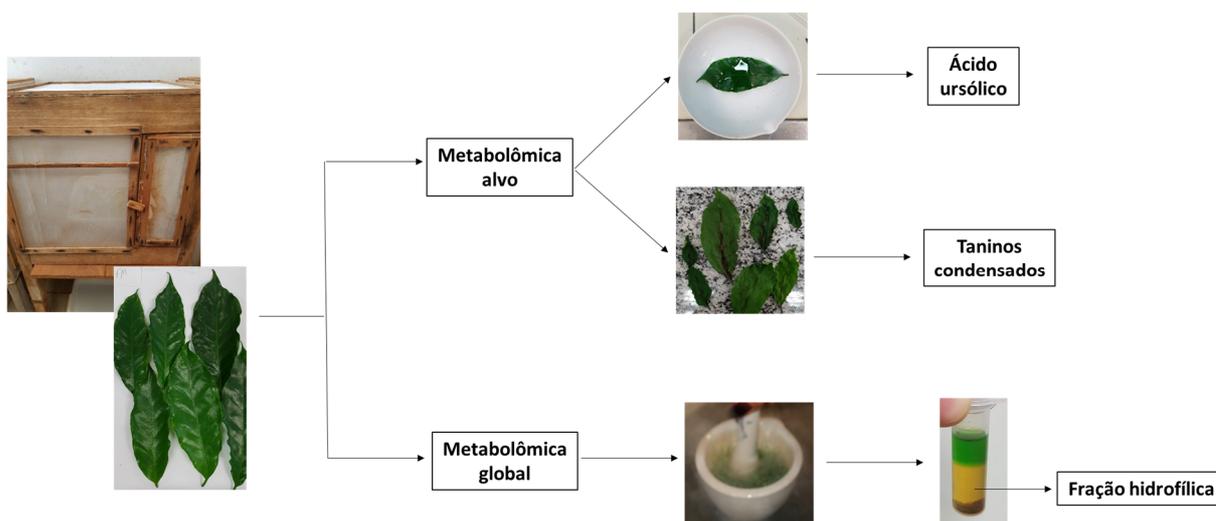
O experimento foi iniciado no dia 11/06/2020 e foram utilizadas 24 mudas no total, sendo 12 do genótipo resistente (CI-12) e 12 do genótipo suscetível (3-32). Primeiramente, foram colocadas 9 mudas de cada genótipo dentro da gaiola contendo uma grande população de insetos por uma noite.

Após exposição por uma noite no interior da gaiola, as mudas contendo os ovos foram mantidas no insetário até a data para extração das folhas. Foram feitas 4 coletas contabilizadas em dias após a postura dos ovos (DAP). Antes das mudas terem contato com os insetos (T0), 1 DAP (T1), 6 DAP (T2) e 10 DAP (T3) nas datas descritas na Tabela 4. De cada indivíduo, foram destacadas todas as folhas localizadas no terço médio das plantas, as folhas foram misturadas aleatoriamente e divididas em três partes para as análises químicas, conforme esquema mostrado na Figura 7.

Tabela 4 - Cronograma de coleta das folhas. Em cada coleta foram utilizadas 3 mudas de cada genótipo para as análises metabômicas

Tempo	Data
T0	11/06/2020
T1	12/06/2020
T2	17/06/2020
T3	21/06/2020

Figura 7 - Representação esquemática das três abordagens utilizadas neste estudo



3.1.7 Metabolômica alvo

3.1.7.1 Taninos condensados

Para quantificar os taninos condensados nas folhas dos genótipos de café, utilizou-se o método direto proposto por Grabber e Zeller (2020) já descrito na Seção 3.1.2.3.

As folhas foram secas imediatamente após a coleta, sendo embaladas em sacos de papel abertos, que foram colocados dentro da estufa com circulação de ar, durante 5 dias à 40 °C, conforme esquema demonstrado na Figura 8.

As leituras espectrofotométricas foram feitas em 550 nm (Hitachi, modelo U2000) e os teores de taninos foram determinados por meio de uma curva de calibração feita com padrão de cloreto de cianidina (Sigma-Aldrich, ≥95%).

Para a construção da curva, o padrão foi solubilizado no meio reacional, na concentração de 1,5 mg/mL e, a partir dessa solução-mãe, foram feitas seis diluições (15; 10; 5; 3; 2 e 1 ng/mL), com três replicatas de cada ponto e a média entre as leituras foi plotada em um gráfico de absorbância *versus* concentração.

A curva analítica foi gerada e os teores de taninos foram expressos como cloreto de cianidina equivalentes (mg de CCE/g de amostra).

Figura 8 - Esquema geral utilizado durante a avaliação dos taninos condensados



3.1.7.2 Ácido ursólico

A quantificação de AU foi realizada na cera cuticular e nos tecidos foliares internos, conforme esquema descrito na Figura 9.

A extração da cera foi realizada da mesma maneira citada anteriormente na Seção 3.1.2.4.

A extração dos tecidos foliares internos foi realizada com as mesmas folhas que foram submetidas à extração da cera. Após a extração das ceras, as mesmas

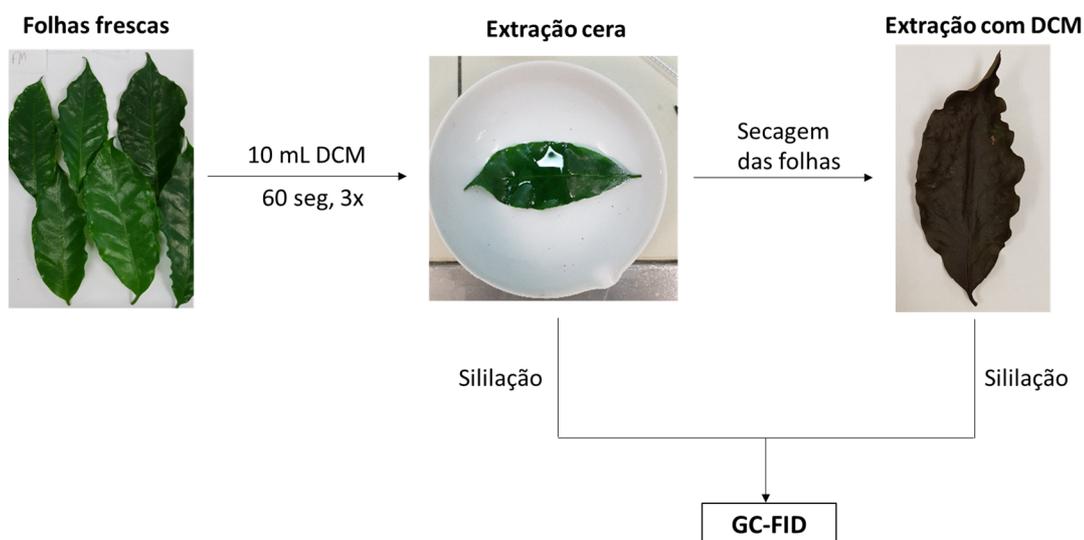
folhas foram secas em estufa com circulação de ar à 40 °C durante 5 dias, moídas utilizando-se um moinho analítico (IKA, modelo A11 Basic) e então a extração foi realizada. Foram pesados 300 mg de cada material, adicionou-se 10 mL de DCM e a extração foi acelerada por ultrassom durante 45 min (LAB1000, modelo CD-4860). O extrato foi seco em capela.

A cera e o extrato diclorometanólico foram submetidos à reação de derivatização segundo processo descrito na Seção 3.1.2.4. As amostras foram analisadas em um cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (CG-FID) (Modelo GC-2010, Shimadzu), segundo o método: coluna XTI-5 (5% difenil/95% dimetil polisiloxano, Restek), 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm df, com programação de 250 °C à 270 °C em 30 °C/min mantendo em 270 °C isocrático por 12 min, depois de 270 °C à 300 °C em 15 °C/min com 8 min de isocrático em 300 °C, depois 300 °C à 310 °C em 10 °C/min com 20 min de isocrático em 300 °C. Os parâmetros foram 1,10 mL/min de vazão do gás de arraste (N₂), gás de *make up* (N₂): 30 mL/min, ar sintético: 400 mL/min e hidrogênio: 40 mL/min, temperatura do detector de 330 °C, *split* 1/20 e volume de injeção: 1 µL.

Uma curva de calibração foi feita com padrão de AU (Supelco, ≥ 98,5%) e analisada nas mesmas condições cromatográficas. O preparo da curva se deu da seguinte forma: em um frasco foi pesado 0,5 mg do padrão e adicionou-se 1,0 mL de piridina (solução-mãe) (Sigma-Aldrich, ≥99%), dessa solução foram transferidos 10; 20; 30; 50; 100; 200 e 300 µL para outros frascos. Deixou-se na capela por algumas horas para que a piridina evaporasse e aos frascos secos adicionou-se 200 µL de piridina e 200 µL de MSTFA (Sigma-Aldrich, 98,5%) para a reação de siliilação. Os pontos da curva foram calculados de acordo com a massa transferida da solução-mãe dividindo-se pelo volume 0,4 mL, o que gerou as concentrações de 12,5; 25,0; 37,5; 62,5; 125,0; 250,0 e 375,0 µg/mL.

O rendimento da cera foliar cuticular foi dado pela relação entre a massa de cera (mg) e a área foliar (cm²). A área das folhas extraídas foi medida com o software ImageJ (U. S. National Institutes of Health, USA) levando em consideração a superfície abaxial e adaxial, e a quantidade de cera foi expressa em µg/cm². O tratamento dos dados foi efetuado no software GCsolution (Shimadzu).

Figura 9 - Esquema geral utilizado durante a análise do ácido ursólico (AU)

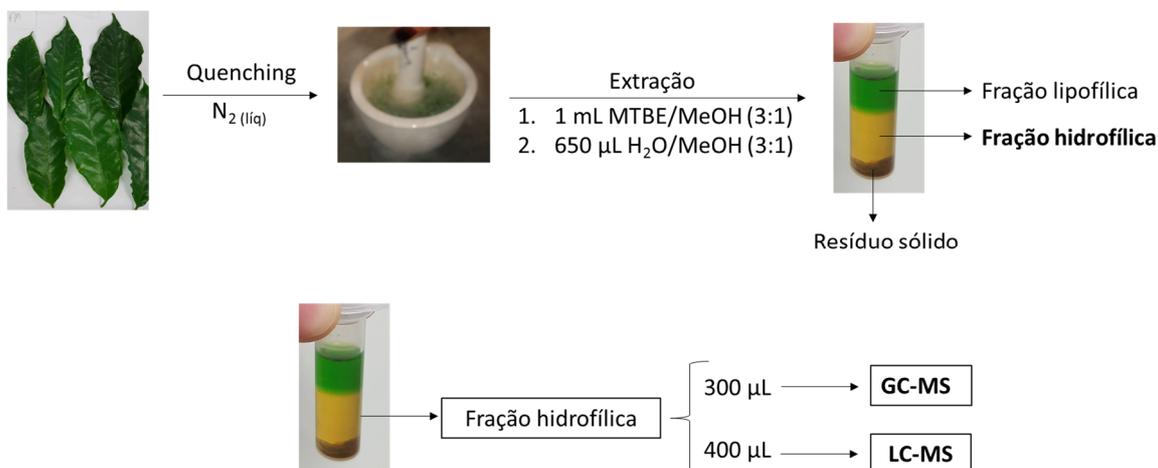


3.1.8 Metabolômica global

Foi utilizado o protocolo proposto por Salem et al. (2016) com algumas modificações. As folhas de café foram congeladas com N_2 líquido imediatamente após serem destacadas das mudas e trituradas em um almofariz utilizando um pistilo. Aproximadamente 50 mg de cada material foi pesado em frascos de 2 mL, foi adicionado 1 mL da solução MTBE/metanol (3:1, v/v) gelado, as amostras foram misturadas em um vórtex (Tecnal, TE 162) durante 10 segundos e extraídas com auxílio do ultrassom (LAB1000, modelo CD-4860) em banho de gelo e água durante 40 minutos. Após esse período, 650 μ L de uma solução de água/metanol (3:1, v/v) foram adicionados e os tubos foram agitados em vórtex novamente por 10 segundos. Na sequência, os tubos foram centrifugados durante 45 minutos a 10.000 rpm e 0 °C (Hettich, modelo Rotina 380R).

Após a separação das fases, a fase apolar foi descartada, 300 μ L da fase polar foram transferidos para análise de metabolômica global por GC-MS e 400 μ L para análise metabolômica global por LC-MS, segundo esquema demonstrado na Figura 10.

Figura 10 - Preparo das amostras e análises realizadas com a fração obtida durante a metabolômica global



3.1.8.1 Fração hidrofílica: GC-MS

As amostras foram secas com N₂ gasoso e então submetidas à reação de derivatização. As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas e ionização por impacto eletrônico (Modelo Dual Stage TMP (QP 2020), Shimadzu).

A siliilação foi realizada dissolvendo-se cada extrato seco em 200 µL de piridina ((Sigma-Aldrich, ≥99%) e adicionando-se 200 µL de MSTFA MSTFA (Sigma-Aldrich, 98,5%). A reação foi mantida durante 1 hora em banho à 37 °C. Após esse período, a solução foi filtrada em membrana 0,22 µm e armazenadas em geladeira durante 24 horas. As amostras foram analisadas em um GC-MS, segundo o método previamente utilizado (dados não mostrados). Foi utilizada uma coluna Rtx-5MS (5% difenil/95% dimetil polisiloxano), 30 m, 0,25 mm ID, 0,25 µm df, com programação de 65 °C a 280 °C em 3°C/min com 5 min de isocrático em 65 °C e mais 5 min de isocrático em 280 °C. Os parâmetros foram 1mL/min de vazão do gás de arraste (N₂), *split* 1/10, volume de injeção: 1 µL, *m/z* scan: 35 – 700, temperatura do injetor 270 °C, temperatura da interface 280 °C e energia colisão de 70 eV.

Foi injetado o padrão de n-alcenos (C8 – C40) para cálculo do índice de retenção (IR). A identificação dos picos que apresentaram índice de similaridade maior ou igual a 90 % com a biblioteca NIST14 foi confirmada pelos respectivos índices de retenção (IR) e comparados com o banco de dados NIST e Golm Metabolome Database (Max Planck Institute).

3.1.8.2 Fração hidrofílica: LC-MS

As amostras foram secas com N₂ gasoso e ressuspensas em 1 mL de água/metanol (1:1, v/v) e analisadas em um cromatógrafo de ultra-eficiência modular, constituído de uma bomba quaternária Acquity[®] H-Class, um amostrador automático Acquity[®] FTN e um detector de arranjo de diodos Acquity[®] PDA eλ, acoplado a um espectrômetro de massas Xevo[®] G2-XS QToF com ionização por electrospray (ESI), Waters, Millford, USA. O espectrômetro de massas foi operado em modo positivo e negativo de ionização. Os parâmetros de operação foram: voltagem do capilar 3,0 kV, temperatura da fonte 120 °C, voltagem do cone 40 V, temperatura de dessolvatação 500 °C, vazão do gás de dessolvatação (N₂) 800 L/h, energia de colisão 6 eV. Leucina-encefalina foi utilizada como referência de massa exata (*lockmass*). Os cromatogramas de íons totais (TIC) foram adquiridos na faixa de *m/z* 50 – 1000 tanto para MS¹ como MS². A aquisição de MS² foi realizada no modo *Fast Data Dependent Acquisition* (FastDDA). Os experimentos foram feitos variando-se a energia de colisão de 6 a 9 eV para razões *m/z* baixas e de 60-80 eV para *m/z* altas.

A separação cromatográfica foi realizada segundo método previamente utilizado (dados não mostrados). Foi utilizada uma coluna Acquity UPL HSS T3 (100 x 2,1 mm, 1,8 μm, 100Å) e a fase móvel consistiu em ácido fórmico 0,1% (A) e metanol + 0,1% ácido fórmico (B). O método de eluição gradiente foi de 5 % B durante 3 minutos, 5 – 35% B em 1 min, 35 – 45 % B em 10 minutos, lavagem com 100% B durante 3 minutos e recondicionamento em 5 min, conforme ilustrado na Tabela 5. A vazão foi 0,35 mL/min, temperatura do forno de 40 °C e volume de injeção de 0,3 μL. A aquisição e análise dos dados foram realizadas utilizando-se o software MassLynx 4.1 (Waters Corporation).

Tabela 5 - Gradiente utilizado no método cromatográfico da fração hidrofílica

Tempo (min)	%B
0	5
3	5
4	35
14	45
16	100

3.1.8.3 Análise Estatística dos Dados

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, usando o modelo de blocos inteiramente ao acaso e para as comparações de médias empregou-se o teste Tukey, ao nível de 5% de probabilidade, com auxílio do programa estatístico Genes 2009, versão 7.0. (CRUZ, 2009).

As análises multivariadas foram realizadas com MetaboAnalyst 5.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parte 1: avaliações iniciais

Com o intuito de conhecer o comportamento químico das folhas de café e otimizar os métodos analíticos para o experimento de infestação (Parte 2), foram feitas algumas análises com as folhas de *C. racemosa*, *C. arabica* e de dois híbridos resultantes do cruzamento entre as duas espécies chamados de H14954-1 e H14954-23, resistente e suscetível ao bicho-mineiro, respectivamente. Para fins de facilidade na leitura, foram adicionados os símbolos R ou S, representando resistente ou suscetível, entre parênteses na frente do nome de cada genótipo.

Para as avaliações dos perfis químicos iniciais, foram coletadas apenas folhas maduras, já que as folhas jovens são dificilmente escolhidas para oviposição pelo bicho-mineiro. Além disso, é sabido que a ontogenia da planta influencia a composição química de alcaloides e compostos fenólicos em café (MONTEIRO, 2019).

4.1.1 Avaliação dos métodos de secagem das folhas

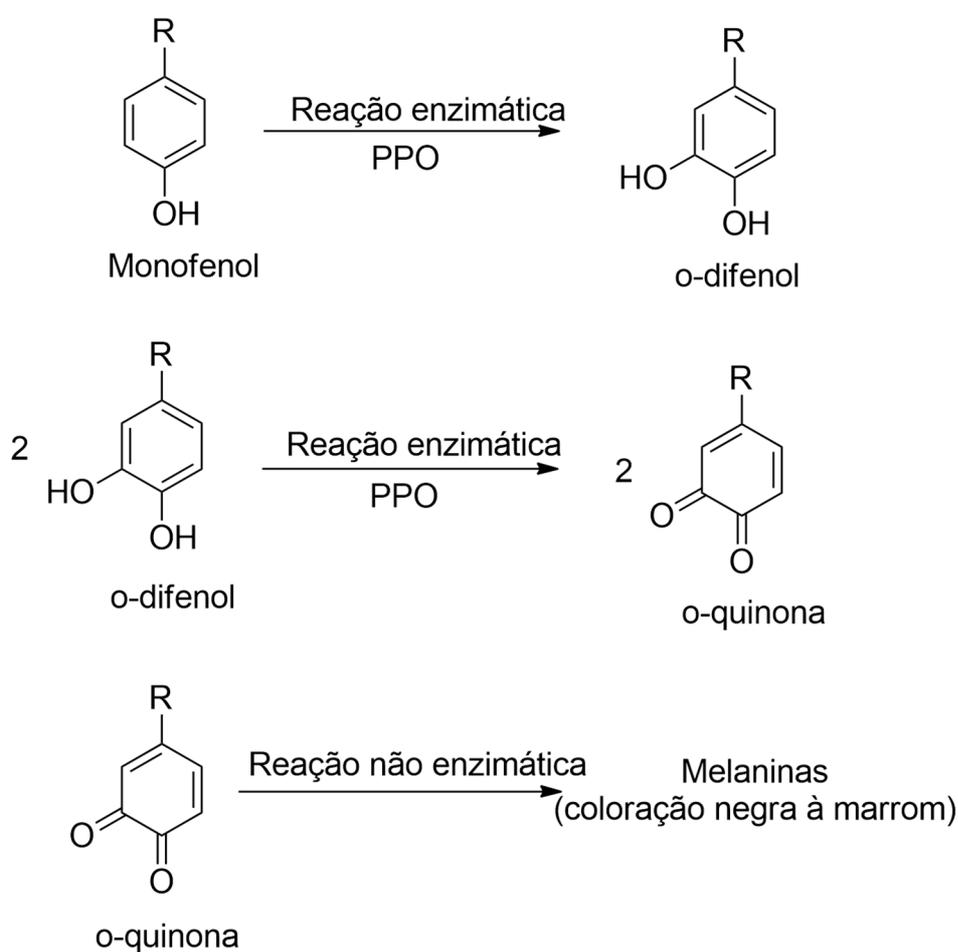
A enzima polifenol oxidase (PPO) é a responsável por catalisar a reação de escurecimento em diversos organismos. A PPO catalisa a hidroxilação de monofenóis em *o*-difenois e oxidação destes para *o*-diquinonas. As quinonas reagem entre si ou com outros substratos (aminoácidos, proteínas e fenóis, por exemplo) em reações de polimerização ou condensação não enzimáticas, formando complexos pigmentos de melanina de coloração negra à marrom, representados na Figura 11 (YORUK; MARSHALL, 2003).

A PPO é descrita como um mecanismo clássico de defesa das plantas contra insetos herbívoros, pois as ligações entre as quinonas e as proteínas da folha podem alterar a disponibilidade de aminoácidos, resultando na redução do valor nutricional das proteínas vegetais para os insetos. Além disso, as quinonas podem ser diretamente tóxicas para os herbívoros ou formarem espécies reativas de oxigênio (CONSTABEL; BARBEHENN, 2008).

A atividade da enzima PPO já foi investigada em inúmeros trabalhos como responsável pelo mecanismo de resistência nos cultivares resistentes ao bicho-mineiro. Porém, não foi observada nenhuma correlação entre a resistência e a atividade dessa enzima (RAMIRO et al, 2006; MELO et al, 2006).

Nas folhas de café ocorre o escurecimento da coloração verde para marrom devido à ação da PPO. A PPO está compartimentalizada nos plastídeos, enquanto os compostos fenólicos estão nos vacúolos e a ação da enzima ocorre quando há uma ruptura desses compartimentos após lesões nas folhas (MAZZAFERA; ROBINSON, 2000).

Figura 11 - Reações envolvidas no processo de escurecimento catalisado pela enzima polifenol oxidase (PPO)



Por isso, avaliou-se o método de secagem durante o preparo da amostra para que o metaboloma das folhas fosse minimamente alterado por essa e outras enzimas. Foram propostas duas metodologias diferentes: secagem em estufa à 40 °C e secagem em sacos herméticos com sílica gel, representadas nas Figuras 12 e 13.

A comparação entre os métodos de secagem foi feita pela quantificação dos compostos fenólicos totais expressos em ácido clorogênico. A obtenção da curva

analítica a partir de diluições seriadas da solução-mãe, permitiu a obtenção de um coeficiente de determinação satisfatório, $R^2 = 0,9943$. A Tabela 6 e as Figuras 14 apresentam os dados da curva de analítica obtida.

Figura 12 – Aparência das folhas secas em estufa com circulação de ar

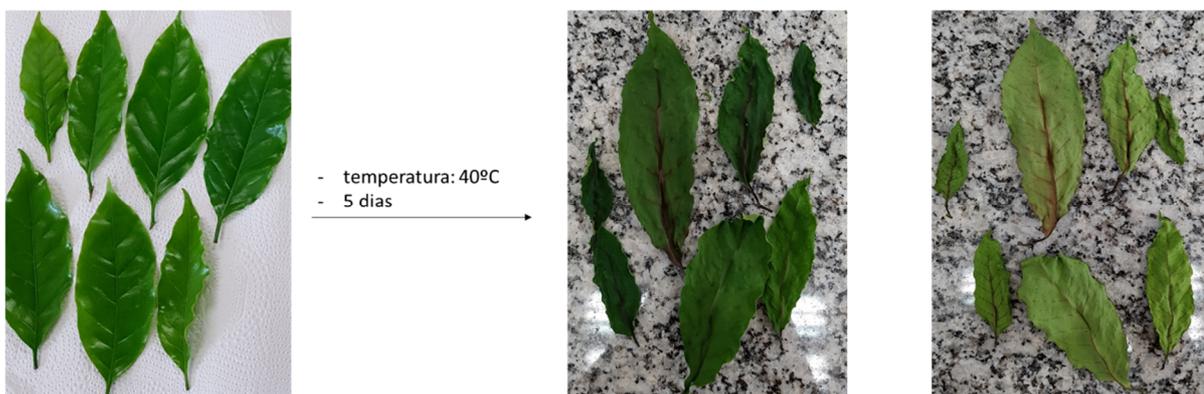


Figura 13 – Aparência das folhas secas utilizando-se sílica gel



Figura 14- Curva analítica do ácido clorogênico apresentando a regressão linear

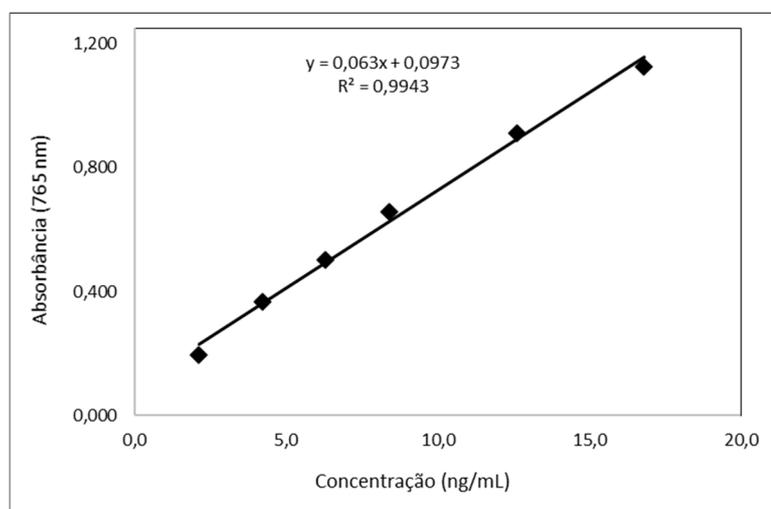


Tabela 6 - Dados experimentais da curva analítica de ácido clorogênico (n=3)

Concentração (ng/mL)	Absorbância (765 nm)	Absorbância média (765 nm)	Desvio padrão	CV (%)
16,8	1,135	1,126	0,003	0,3
	1,108			
	1,134			
12,6	0,908	0,910	0,004	0,5
	0,907			
	0,915			
8,4	0,659	0,657	0,002	0,2
	0,657			
	0,656			
6,3	0,478	0,501	0,020	3,9
	0,51			
	0,514			
4,2	0,372	0,368	0,004	1,0
	0,367			
	0,365			
2,1	0,198	0,196	0,003	1,5
	0,193			
	0,198			

A secagem em estufa e com sílica demonstrou quantidade de fenólicos totais similares para todos os genótipos investigados e não foi observada diferença estatística entre os dois tratamentos (Tabela 7). Por isso, a secagem em estufa foi escolhida pela facilidade dessa metodologia.

Portanto, todas as análises que necessitaram que o material vegetal estivesse seco, foram realizadas com a secagem em estufa a 40 °C durante 5 dias.

Tabela 7 – Teor médio da análise de compostos fenólicos para as duas metodologias de secagem expressos em ácido clorogênico por folhas secas (\pm desvio padrão; n=3)

Amostra	mg 5-ACQ/g folhas secas	
	Estufa	Sílica
<i>C. racemosa</i> (R)	91,1 \pm 7,7 b	101,9 \pm 6,1 b
<i>C. arabica</i> (S)	178,4 \pm 3,8 a	171,9 \pm 12,4 a
H14954-1 (R)	138,3 \pm 11,4 a	124,3 \pm 4,0 a
H14954-23 (S)	149,6 \pm 6,7 a	130,7 \pm 7,4 a

* Médias seguidas de uma mesma letra nas linhas indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre os tratamentos pelo Teste de Tukey

4.1.2 Metabolômica alvo

4.1.2.1 Ciclotídeos

Os ciclotídeos são peptídeos cíclicos de baixo peso molecular, contendo de 28 a 37 resíduos de aminoácidos. Estão presentes em diversas famílias de plantas, principalmente em Rubiaceae e Violaceae. Diversos trabalhos consideram que a principal função dos ciclotídeos nas plantas é a defesa contra o ataque de insetos.

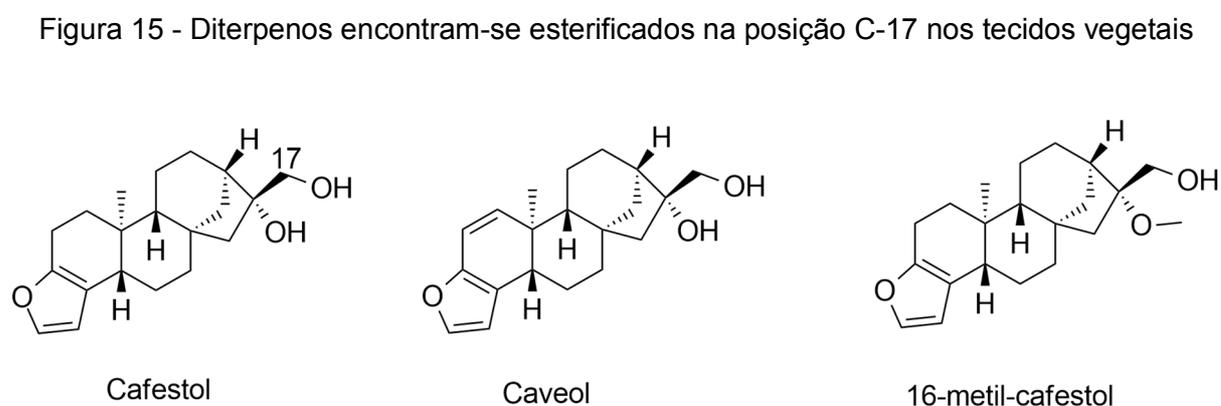
Apesar do gênero *Coffea* pertencer à família Rubiaceae, não foram encontrados relatos sobre a avaliação da presença de ciclotídeos em café. Portanto, a avaliação da presença desses compostos em folhas de café foi investigada.

Os cromatogramas obtidos pelo LC-DAD não apresentaram picos nos comprimentos de onda 220 (ligações peptídicas) nem em 280 nm (aminoácidos aromáticos), característicos da presença de ciclotídeos. Além disso, os espectros de massa não indicaram a presença de íons triplamente carregados, característicos de ciclotídeos.

4.1.2.2 Cafestol, caveol, 16-metil-cafestol

A partir dos grãos de café já foram detectados mais de 90 tipos de diterpenoides, principalmente os diterpenos tetracíclicos com esqueleto kaurânico (CHU et al., 2016; PANUSA et al., 2017).

O cafestol, o caveol e o 16-metil-cafestol (Figura 15) são exemplos dessa classe de diterpenos e encontram-se esterificados no café.



Com o objetivo de avaliar a presença e possíveis diferenças nos teores dos diterpenos citados, realizou-se a saponificação das folhas.

Após análise por HPLC-DAD, o tempo de retenção do caveol e do cafestol foi determinado utilizando-se padrões analíticos de cada composto. O padrão de caveol eluiu em 25,8 min e foi monitorado em 220 nm, já o padrão de cafestol eluiu em 27,5 min e foi monitorado em 290 nm no método cromatográfico utilizado.

Para todas as amostras analisadas somente a presença do cafestol foi detectada.

4.1.2.3 Avaliação da presença de taninos

Geralmente, os taninos estão relacionados à defesa vegetal, visto que danos e feridas por insetos podem ter um forte estímulo na produção desses metabólitos em algumas plantas, sugerindo que a síntese de taninos contribui para o mecanismo de defesa induzida. A indução da síntese e acúmulo de taninos por herbivoria já foi relatada em várias espécies vegetais, mas isso não significa que essa seja uma resposta universal em plantas (BARBEHENN; CONSTABEL, 2011). Portanto, a investigação química dessa classe de compostos se faz importante em estudos de ecologia química e foi avaliada nesse trabalho.

Devido à capacidade de alguns taninos serem hidrolisados em água quente ou pela enzima tanase, esses compostos foram classificados em duas classes principais, taninos hidrolisáveis ou taninos condensados. Embora essa definição seja antiga e atualmente se saiba que alguns taninos classificados como hidrolisáveis não sejam passíveis de hidrólise, essa classificação ainda é extensamente utilizada (KHANBABAEE; REE, 2001).

- Hidrolisáveis

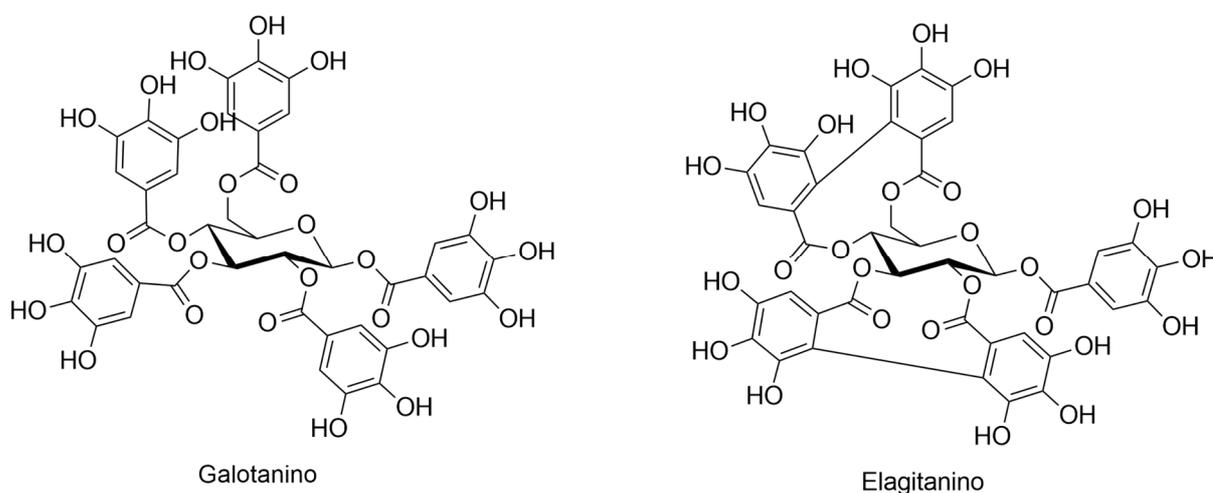
São formados por ésteres de ácido gálico ligados a substituintes como poliois (por exemplo, açúcares, ácidos orgânicos, catequinas, etc) ou triterpenóides. Devido à sua enorme diversidade estrutural, são sub-divididos em galotaninos, elagitaninos ou ainda em taninos complexos (Figura 16).

Os galotaninos são os taninos hidrolisáveis mais simples, pois a unidade galoil está diretamente ligada ao substituinte. Embora uma vasta gama de substituintes possa ser possível, a maior parte dos galotaninos encontrados em plantas é formada por poliois derivados da D-glicose, em que as hidroxilas estão totalmente ou parcialmente substituídas por unidades galoil. Nos elagiotaninos, pelo menos duas unidades galoil estão conectadas entre si por ligações do tipo carbono-carbono. Nos

taninos complexos, uma unidade de catequina está ligada glicosilicamente à um galo- ou elagio-tanino (KHANBABAEE; REE, 2001).

A diversidade de estruturas de taninos hidrolisáveis é vasta e enriquecida pela capacidade do centro anomérico dos glicosídios para formação ligações C- e / ou O-glicosídicas, éster ou acetal, na forma β ou α com uma grande variedade de blocos de construção (KHANBABAEE; REE, 2001).

Figura 16 - Exemplo de um galotanino (pentagaloiil glicose) e um elagiotanino com duas unidades de hexahidroxidifenol (casuarictina)



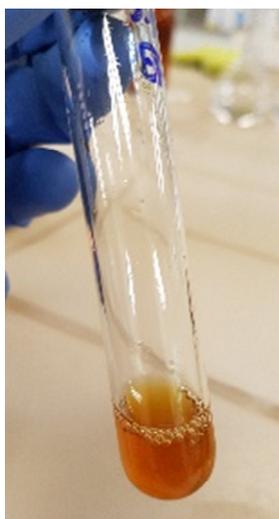
Clifford e Ramirez-Martinez (1991) investigaram a presença de taninos hidrolisáveis nos grãos e polpa de café dos genótipos *C. canephora* var. robusta; híbrido Timor (*C. arabica* x *C. canephora*); Catimor (Timor híbrido x *C. arabica* var. caturra vermelho); *C. arabica* var. Caturra Vermelho e *C. arabica* var. Bourbon Vermelho. Entretanto, não detectaram elagitaninos ou galotaninos em nenhum dos genótipos avaliados.

Não foi encontrada na literatura informações sobre a presença, tipos e quantidade de taninos em folhas de café. Por isso, o estudo qualitativo para determinar a presença ou ausência desses compostos foi realizada.

O método utilizado para detectar a presença de elagitaninos consistiu em reagir o extrato das folhas com NaNO_2 em meio de ácido fraco para aparecimento da coloração azul. A coloração azul indica qualitativamente a presença dessa classe de taninos, porém, para as amostras analisadas essa coloração não foi observada (Figura 17).

Portanto, concluiu-se que os elagitaninos não estão presentes nas folhas de café ou não puderam ser detectados pela metodologia utilizada.

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



Para a avaliação dos galotaninos, o método utilizado consistiu em reagir o extrato das folhas com KIO_3 em metanol. Para todas as amostras a coloração vermelha-marrom foi observada, concluindo-se que os galotaninos estão presentes nas folhas de café dos genótipos investigados (Figura 18).

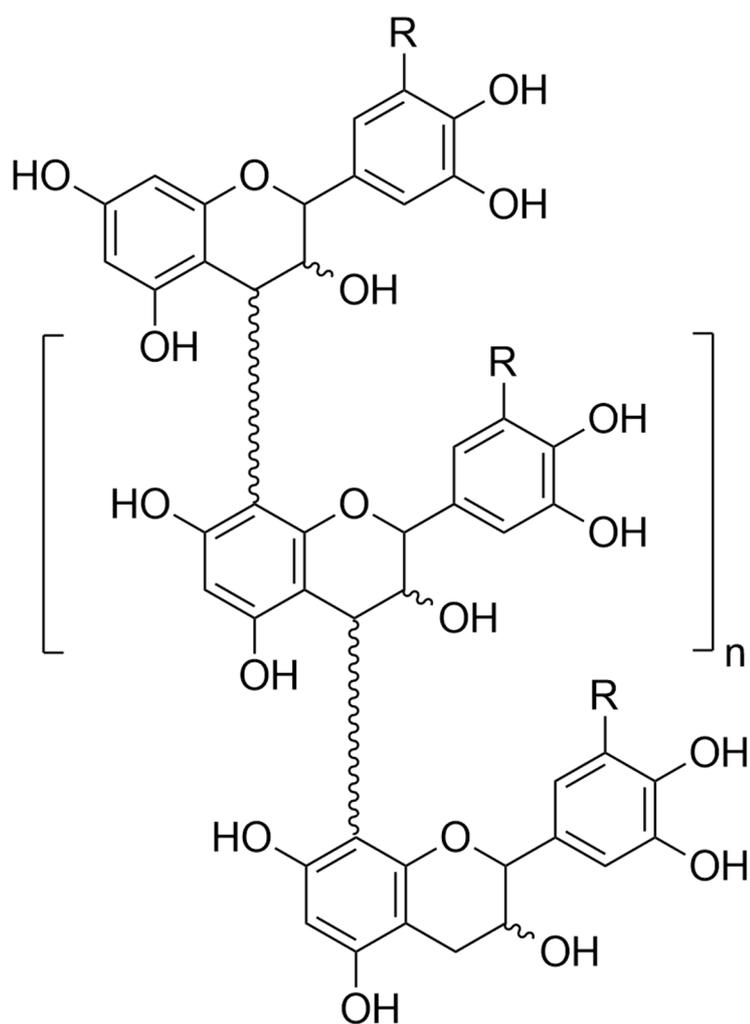
Figura 18 - Coloração observada após a reação com iodato de potássio em metanol. A presença de galotaninos é avaliada qualitativamente pelo surgimento da coloração vermelha-marrom



- Condensados

Os taninos condensados, também chamados de proantocianidinas, são oligômeros (dímeros, trímeros ou tetrâmeros) ou polímeros de flavan-3-ols conectados por ligações do tipo C-C. As subunidades de flavan-3-ols são geralmente catequinas e epicatequinas (referidos como procianidinas) ou galocatequinas e epigalocatequinas (referidos como prodelfinidinas), como representado na Figura 19 (BARBEHENN; CONSTABEL, 2011).

Figura 19 - Estrutura geral dos taninos condensados



R=H, procianidina

R=OH, prodelfinidina

No café, a presença de taninos condensados nas polpas de *C. arabica* já foi detectada e o monômero principal encontrado foi a epicatequina (CLIFFORD; RAMIREZ-MARTINEZ, 1991; RAMIREZ-CORONEL et al., 2004).

O método mais utilizado para quantificação de taninos condensados é o HCl-butanol-ferro que envolve a despolimerização do tanino e conversão dos monômeros em antocianidinas que podem ser medidas por espectrofotometria no comprimento de onda de 550 nm (PORTER; HRSTICH; CHAN, 1985). Porém, esse método falha na completa despolimerização dos taninos condensados em resíduos insolúveis, levando à resultados subestimados da concentração de taninos.

A inclusão de acetona no método proposto por Porter, Hrstich e Chan (1985), aumenta significativamente a recuperação de taninos condensados em materiais vegetais, por isso o método direto HCl-butanol-acetona-ferro foi escolhido para esse desenvolvimento (GRABBER; ZELLER, 2020).

O método proposto sugere partir de 15 mg de material vegetal, porém como as antocianidinas podem exibir um desvio negativo da Lei de Lambert-Beer em meio ácido, o método foi otimizado para que as leituras no espectrofotômetro estivessem na região linear da curva de quantificação, sendo as leituras ideais de absorbância no intervalo de 0,2 a 1,0 (GRABBER; ZELLER, 2020).

A Tabela 8 mostra os valores de absorbância encontrados partindo-se de 20 mg de folhas secas e moídas. Como os valores encontrados estão na região de linearidade das antocianidinas (0,2 - 1,0), com exceção das folhas de *C. racemosa*, escolheu-se trabalhar com essa quantidade inicial de matéria vegetal para a análise de taninos condensados no experimento de infestação (Parte 2).

Tabela 8 - Dados obtidos pelo método direto HCl-butanol-acetona-ferro

Amostra	Replicata	massa (mg)	A (550 nm)	Normalização	Média
<i>C. racemosa</i> (R)	1	20,0	1,326	1,326	1,322
	2	20,2	1,332	1,319	
<i>C. arabica</i> (S)	1	21,0	0,868	0,827	0,799
	2	22,0	0,848	0,771	
H14954-1 (R)	1	19,6	0,97	0,990	0,871
	2	20,6	0,774	0,751	
H14954-23 (S)	1	19,2	0,688	0,717	0,691
	2	20,6	0,686	0,666	

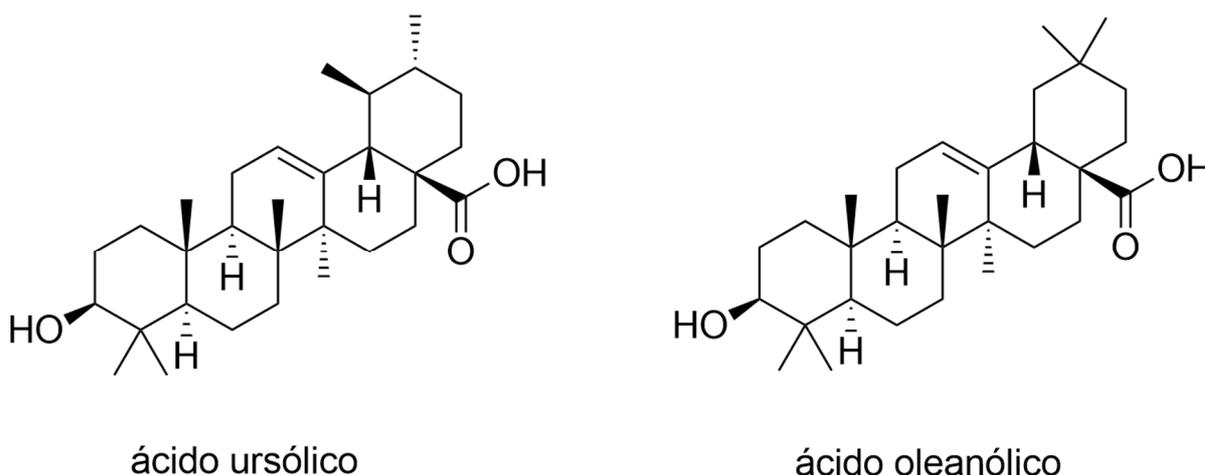
4.1.2.4 Ácido ursólico

A hipótese de que o triterpeno pentacíclico AU estivesse envolvido no mecanismo de defesa contra o bicho-mineiro foi levantada. Essa hipótese se baseou no estudo de Santos-Júnior et al. (2018) que encontraram o AU em um estudo bioguiado com a planta *Merremia tomentosa* (velame-do-campo) como sendo ativo na inibição da oviposição do bicho-mineiro. Sabendo-se pelo trabalho de Waller et al. (1991), que em *C. arabica* é encontrado um alto teor de AU (1,8 g/100 g de folhas secas) e que a produção de triterpenos pelas plantas é correlacionada com sua defesa contra patógenos e insetos, essa hipótese é justificada.

Os triterpenos pentacíclicos são bastante conhecidos por sua ação inseticida, por exemplo, ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido betulínico, ácido maslínico, β -amirina, entre outros (GONZÁLEZ-COLOMA et al., 2011; JÄGER et al., 2009; WANG et al, 1999). Os triterpenos pentacíclicos podem ser encontrados na forma livre (sapogenina), ligado com glicosídeos (saponina) ou ainda na forma esterificada nas plantas.

Avaliou-se a presença do AU e eventuais outros triterpenos pentacíclicos, tanto na cera cuticular como na folha toda (sem retirada da cera).

Figura 20 - Estruturas dos triterpenos pentacíclicos ácido ursólico (AU) e ácido oleanólico (AO)



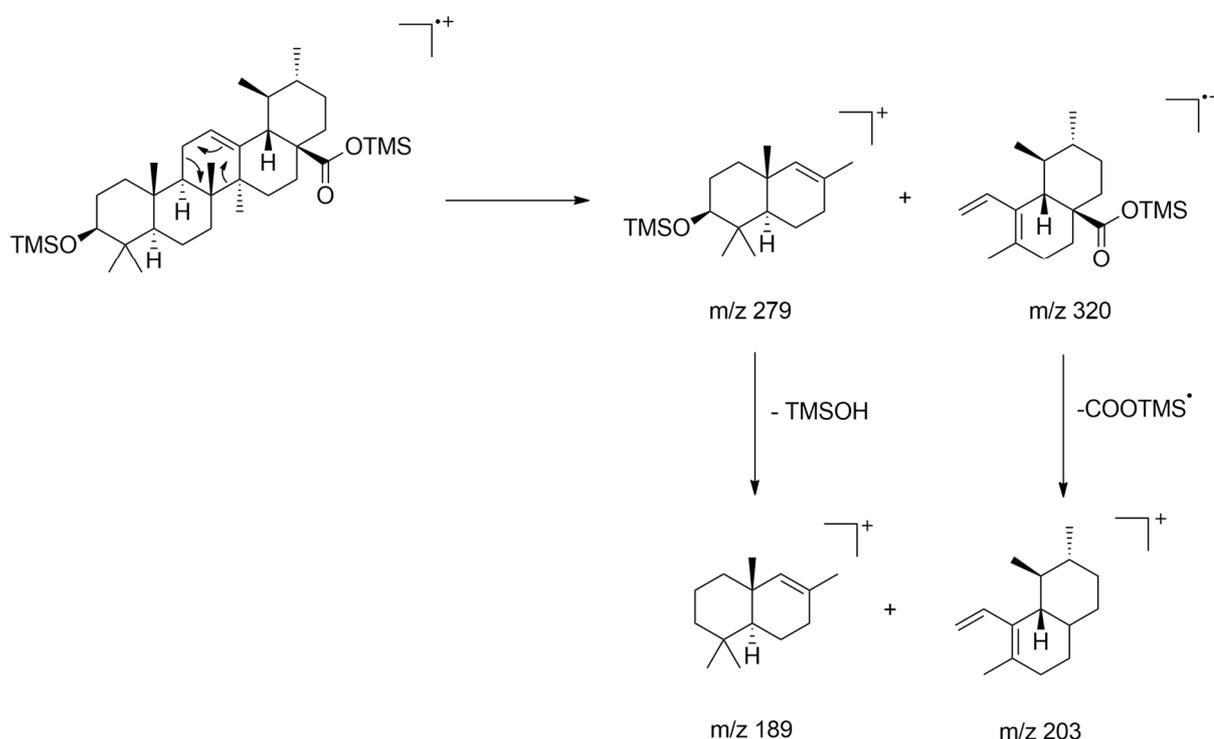
- Cera cuticular

A cera cuticular é a primeira barreira que a lagarta encontra quando eclode do ovo. Para alcançar o parênquima paliçádico das folhas de café, a lagarta deve perfurar

a superfície da folha e diante desse fato, a avaliação de AU nessa cobertura foi realizada.

Após a integração dos picos obtidos na análise por GC-MS, foi possível identificar não só o AU, mas também seu isômero AO (Figura 20). A identificação foi possível pela comparação do índice de retenção (IR) e dos fragmentos observados (Figura 21) com os dados da literatura.

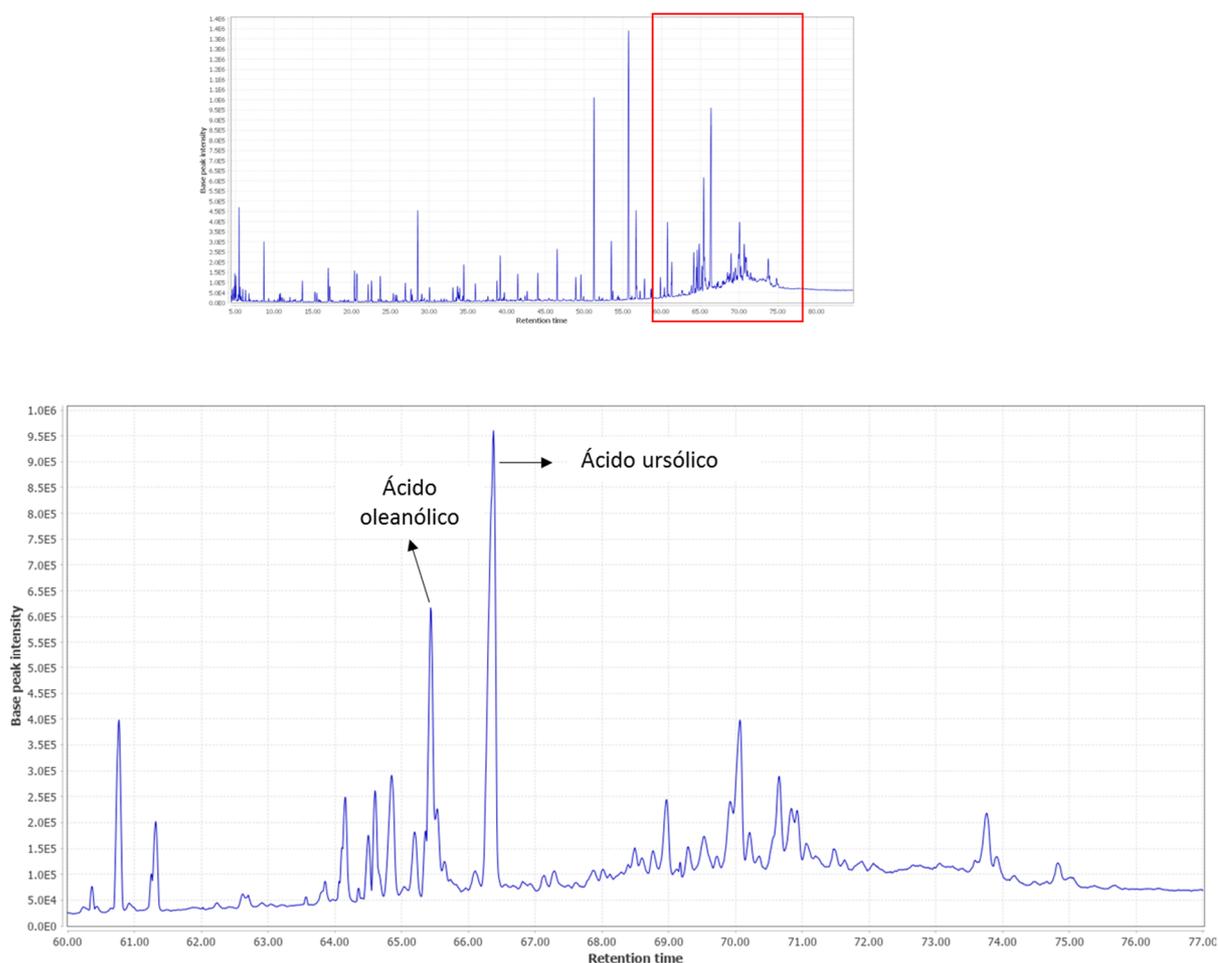
Figura 21 - Fragmentos principais do ácido ursólico (AU) sililado observados na ionização de impacto eletrônico. Para o ácido oleanólico (AO), o mesmo padrão de fragmentação é observado



Além disso, foram observados muitos picos no final dos cromatogramas que não puderam ser identificados, principalmente na região de 60 – 77 minutos (Figura 22).

Comparando-se a fragmentação do AU e do AO, apresentada na Figura 21, com o padrão de fragmentação dos picos dessa região foi observado a presença das relações m/z 189, m/z 203 e m/z 73 (TMS), características desses triterpenos. Portanto, foi possível concluir que existem outras moléculas pertencentes à classe dos triterpenos pentacíclicos que não puderam ser identificados.

Figura 22 – BPC da cera de *Coffea racemosa*. A região destacada em vermelho encontra-se ampliada para evidenciar os triterpenos pentacíclicos encontrados

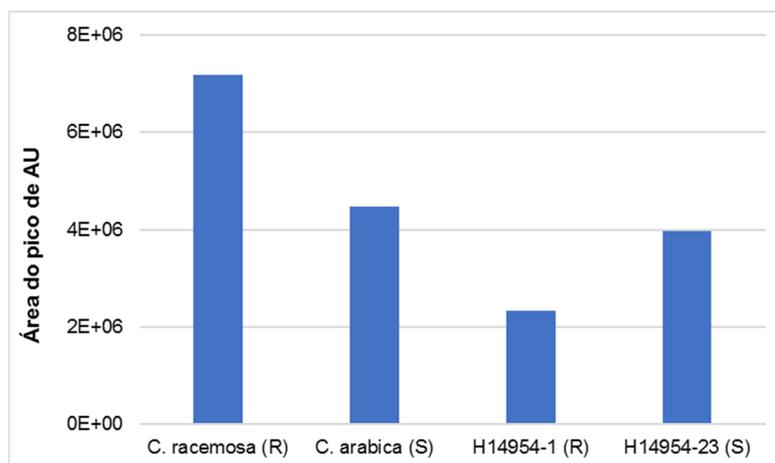


Apesar das análises terem sido realizadas com caráter qualitativo e de que a resposta do detector espectrômetro de massas não seja proporcional à quantidade do analito, mas sim com base na sua ionização, foi possível estimar a proporção relativa de cada composto pela área dos picos.

Dessa forma, foi possível observar que o AU se encontra em maior proporção para *C. racemosa* (R), seguida de *C. arabica* (S) e do híbrido H14954-23 (S) que possuem área de pico bastante similares e por último o H14954-1 (R), com a menor área de pico, conforme do gráfico de barras mostrado na Figura 23.

A metodologia utilizada para a extração da cera cuticular mostrou-se adequada, já que foi possível identificar o AU e seu isômero AO pela análise cromatográfica. Portanto, essa metodologia foi utilizada para a Parte 2 desse trabalho.

Figura 23 – Área do pico de AU para cada genótipo avaliado. (R) = Resistente e (S) = susceptível ao bicho mineiro.



- Folha inteira

Realizou-se a extração dos triterpenos nas folhas secas e moídas com dois solventes diferentes, metanol e DCM. O AU e o AO também foram observados tanto no extrato metanólico como no extrato diclorometânico das folhas como um todo.

A utilização de metanol se mostrou efetiva em extrair os triterpenos pentacíclicos, porém a região do cromatograma onde esses compostos eluíram mostraram alta quantidade de sinais detectados, dificultando a análise dos mesmos devido à coeluição (Figura 24). Esse comportamento se deve ao metanol ser um solvente não seletivo, com elevado poder de solubilização devido ao caráter lipofílico e hidrofílico, o que proporciona a extração de moléculas de diversas polaridades (MUSHTAQ et al., 2014).

Para aumentar a seletividade da extração das folhas e recuperação dos triterpenos, o diclorometano também foi testado. Observou-se uma redução de compostos coeluinto junto com o AU e AO nos cromatogramas, conforme mostrado na Figura 25.

Essa diminuição na complexidade do extrato possibilitou uma melhor resolução e confiabilidade para estudos de quantificação. Por isso, o diclorometano foi o solvente escolhido para a Parte 2 do trabalho.

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

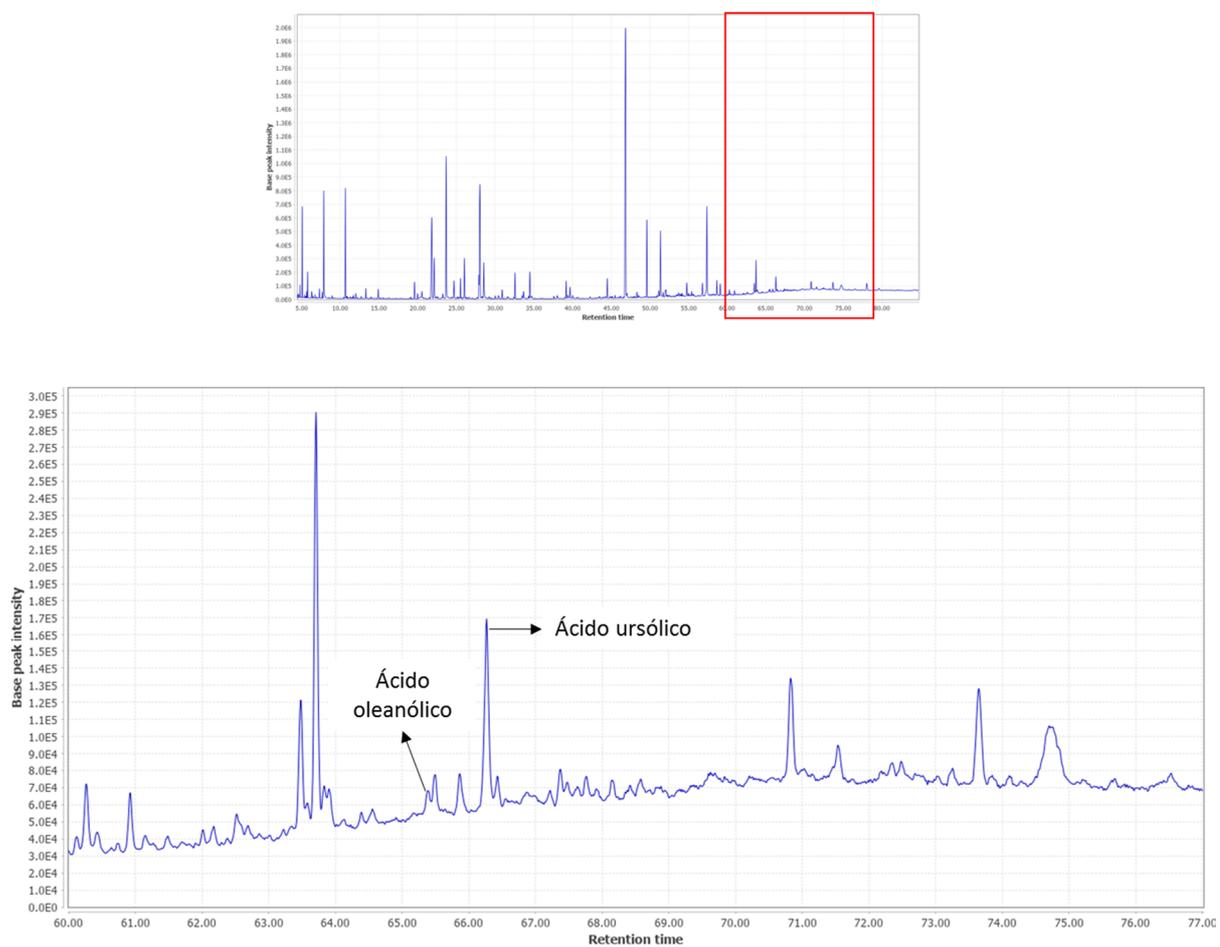
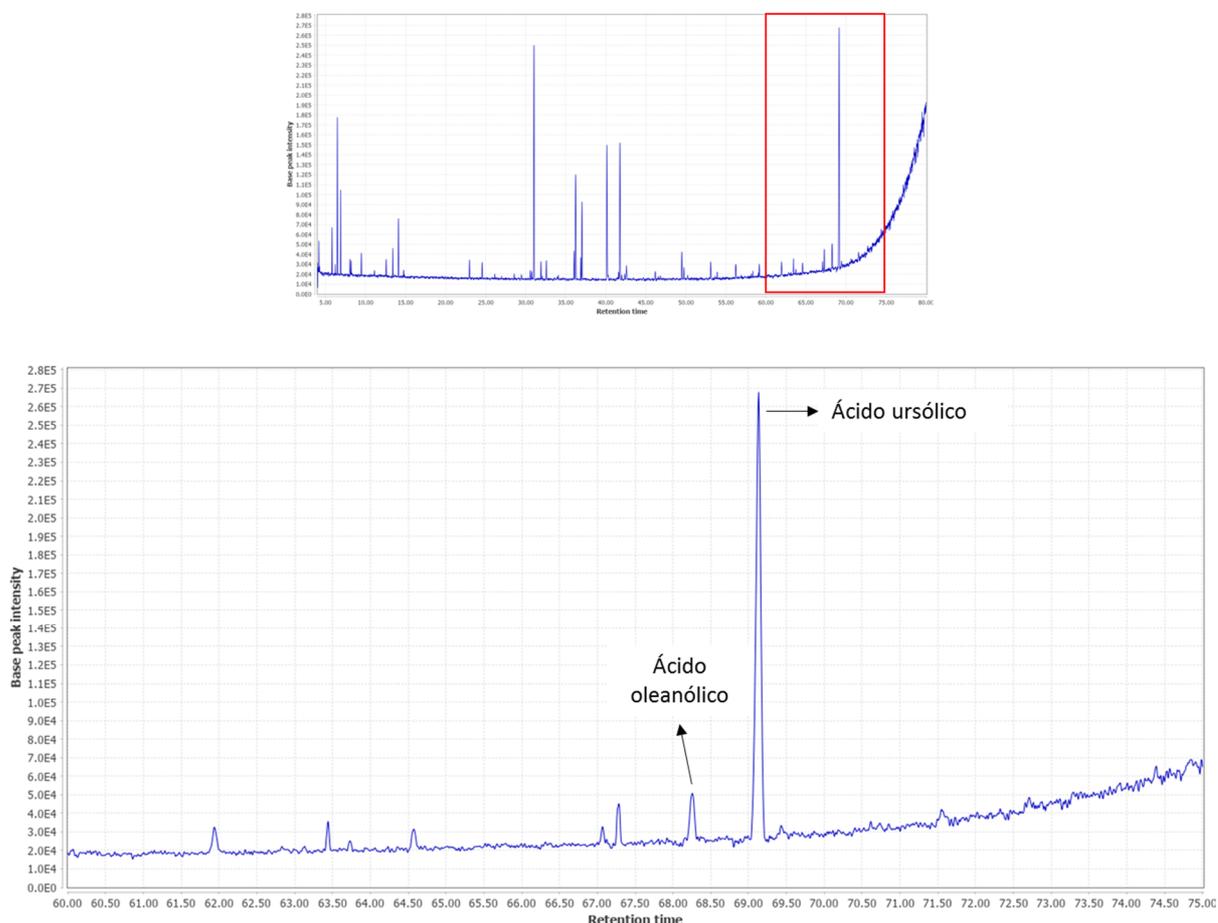


Figura 25 - BPC do extrato diclorometânico do híbrido resistente H14954-1. A região destacada em vermelho encontra-se ampliada para evidenciar os triterpenos pentacíclicos encontrados



4.1.3 Metabolômica global

4.1.3.1 *Fingerprinting* da cera cuticular (GC-MS)

A Tabela 9 mostra a massa de cera encontrada e o rendimento para cada genótipo analisado. As amostras mostraram rendimentos similares, aproximadamente 0,15 % de cera, exceto para o genótipo *C. racemosa*, que apresentou o dobro de massa de cera do que os demais. Essa maior quantidade de cera em folhas de *C. racemosa* quando comparada com *C. arabica* e seus híbridos interespecíficos está de acordo com dados previamente publicados (KITAGAMI et al., 2013).

Utilizou-se um método cromatográfico exploratório e abrangente, para que além do ácido ursólico, outros metabólitos pudessem ser identificados nas amostras.

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

Amostra	Massa cera (mg)	Rendimento (%)
<i>C. racemosa</i> (R)	21,2 \pm 0,25	0,30
<i>C. arábica</i> (S)	10,3 \pm 0,49	0,15
H14954-1 (R)	9,8 \pm 0,42	0,14
H14954-23 (S)	10,7 \pm 0,28	0,15

O *fingerprinting* da cera por GC-MS proporcionou uma identificação de aproximadamente 43,5 %, 69,6 %, 52,1 % e 68,7 % dos picos integrados para *C. racemosa*, *C. arabica*, híbrido resistente (H14954-1) e híbrido suscetível (H14954-23), respectivamente, que estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Compostos identificados na cera por GC-MS

Número pico	Identificação	IR _{exp}	Classe
1	ácido fenilacético	1302	ácido fenólico
2	1-metilnaftaleno	1324	hidrocarboneto
3	bifenilo	1388	hidrocarboneto
4	2,3-dimetilnaftaleno	1427	hidrocarboneto
5	1,3-dimetilnaftaleno	1446	hidrocarboneto
6	ácido decanóico	1458	ácido graxo
7	3'-hidroxiacetofenona	1473	fenil-cetona
8	pentadecano	1501	hidrocarboneto
9	ácido salicílico	1519	ácido fenólico
10	vanilina	1539	éter-aldeído
11	hexadecano	1601	hidrocarboneto
12	ácido láurico	1657	ácido graxo
13	heptadecano	1701	hidrocarboneto
14	2,6,10,14-tetrametilpentadecano	1707	hidrocarboneto
15	3-metil-heptadecano	1772	hidrocarboneto
16	octadecano	1801	hidrocarboneto
17	2,6,10,14-tetrametilhexadecano	1810	hidrocarboneto
18	cafeína	1852	alcaloide
19	ácido mirístico	1854	ácido graxo
20	nonadecano	1901	hidrocarboneto
21	ácido pentadecanóico	1953	ácido graxo
22	palmitato de etila	1996	éster
23	eicosano	2001	hidrocarboneto

24	heneicosano	2101	hidrocarboneto
25	1-octadecanol	2165	álcool
26	docosano	2201	hidrocarboneto
27	ácido linoleico	2215	ácido graxo
28	ácido oleico	2222	ácido graxo
29	tricosano	2301	hidrocarboneto
30	tetracosano	2401	hidrocarboneto
31	ácido eicosanóico	2449	ácido graxo
32	pentacosano	2501	hidrocarboneto
33	hexacosano	2601	hidrocarboneto
34	ácido docosanóico	2645	ácido graxo
35	heptacosano	2701	hidrocarboneto
36	octacosano	2801	hidrocarboneto
37	esqualeno	2830	triterpeno
38	nonacosano	2904	hidrocarboneto
39	triacontano	3001	hidrocarboneto
40	gama-tocoferol	3011	vitamina E
41	hentriacontano	3103	hidrocarboneto
42	1-octacosanol	3149	álcool
43	dotriacontano	3201	hidrocarboneto
44	ácido octacosanóico	3241	ácido graxo
45	tritriacontano	3302	hidrocarboneto
46	1-triacontanol	3350	álcool
47	β -sitosterol	3356	esteróide
48	tetratriacontano	3401	hidrocarboneto
49	pentatriacontano	3502	hidrocarboneto
50	1-dotriacontanol	3547	álcool
51	ácido oleanólico	3588	triterpeno
52	ácido ursólico	3642	triterpeno
53	1-tetratriacontanol	3744	álcool
54	1-hexatriacontanol	3938	álcool

Legenda: IR_{exp} representa índice de retenção experimental

Os compostos identificados na cera são principalmente hidrocarbonetos de cadeia longa, álcoois de cadeia longa, ácidos orgânicos, cafeína, vitamina E, esteroides como β -sitosterol e triterpenos pentacíclicos como ácido ursólico e ácido oleanólico para todas as amostras. Dentre os compostos majoritários, encontram-se os hidrocarbonetos nonacosano (C29) e hentriacontano (C31), os álcoois 1-triacontanol (C30) e 1-dotriacontanol (C32), a cafeína e o ácido ursólico.

A presença de cafeína nessa análise corrobora o trabalho de Santos et al. (2014) que encontraram pela primeira vez a cafeína na cera cuticular nas folhas de *C. arabica*. Esse resultado contrasta com os trabalhos de Kitagami (2013) e Lichston (2005) que não encontraram esse alcaloide na cera de diversos genótipos de café investigados (*C. arabica*, *C. canephora* e *C. racemosa*).

Entretanto, há uma diferença entre as metodologias de extração utilizadas entre os autores. Enquanto Kitagami (2013) e Lichston (2005) utilizaram clorofórmio como solvente extrator, Santos et al. (2014) e esse trabalho utilizaram diclorometano, o que pode ter relação na divergência entre os dados. Porém, esse resultado é contrastante, já que a cafeína é mais solúvel em clorofórmio do que em diclorometano (SHALMASHI; GOLMOHAMMAD, 2010).

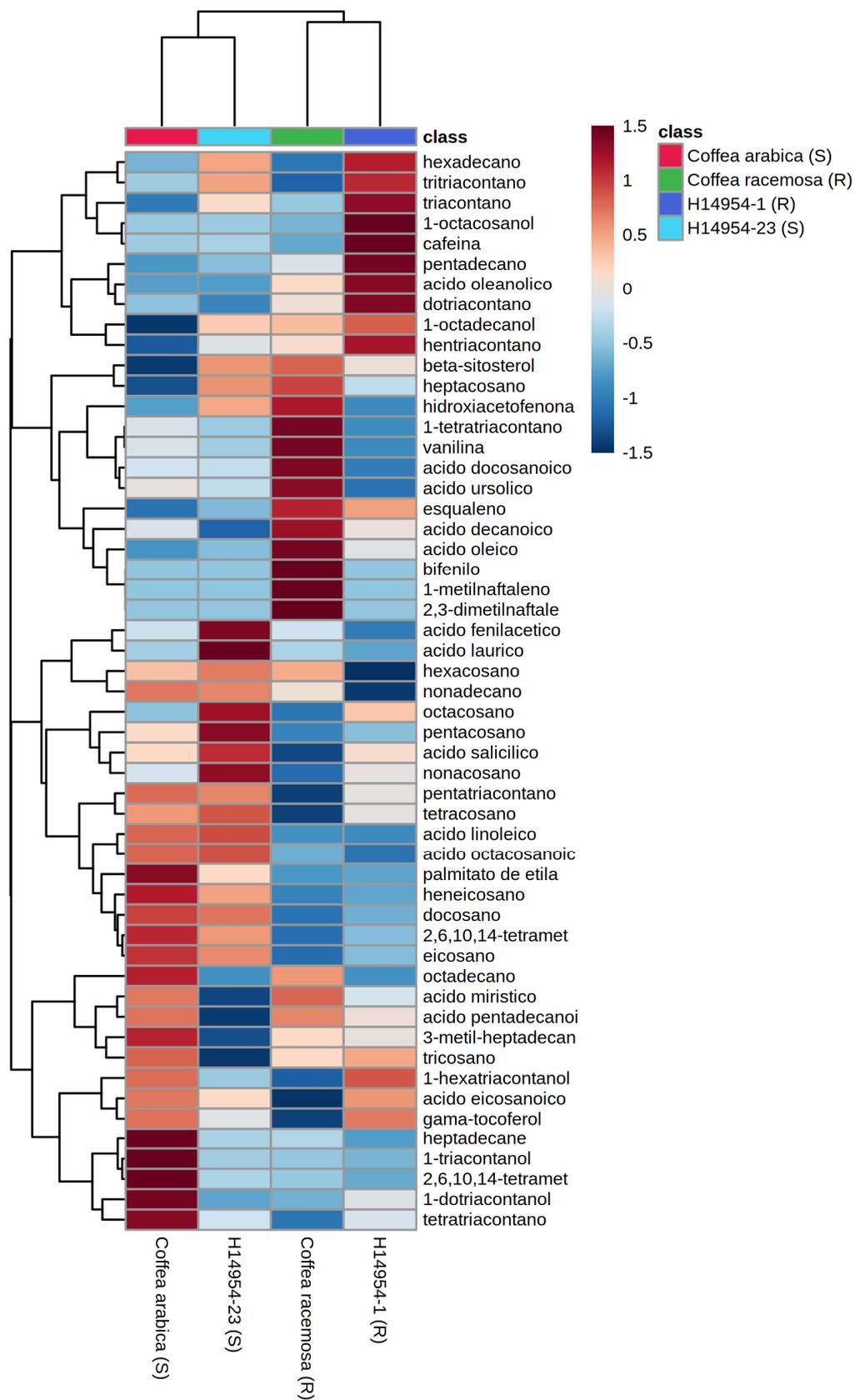
Foi feita uma tabela com as áreas dos picos de cada composto identificado e para melhor visualização dos dados, um mapa de calor (*heatmap*) para análise estatística exploratória foi criado (Figura 26).

Os mapas de calor são uma ferramenta de visualização para observar mudanças nos padrões de concentrações de metabólitos em diferentes amostras. Os gradientes de calor mostram a progressão da concentração em duas direções: gradualmente diminuindo (cor neutra para azul escuro) e gradualmente aumentando (cor neutra para vermelho escuro).

Além disso, o mapa de calor combina a visualização dos dados com a análise de agrupamento hierárquico (HCA). O resultado desse agrupamento é mostrado como um dendrograma na parte esquerda do mapa de calor para os metabólitos e na parte superior para as amostras. Os dendrogramas são criados de acordo com a similaridade dos dados e é uma ferramenta útil para reconhecimento de padrões reduzindo a dimensionalidade quando são utilizados dados multidimensionais. O objetivo principal é reunir as amostras que sejam mais parecidas entre si (FERREIRA, 2015).

Observando o dendrograma do mapa de calor gerado (Figura 27) é possível notar que as amostras foram agrupadas em dois grupos: o primeiro entre as amostras de cera de *C. arabica* e H14954-23 (genótipos suscetíveis) e o segundo grupo entre *C. racemosa* e H14954-1 (genótipos resistentes), evidenciando que as ceras cuticulares de amostras resistentes possuem similaridade na composição antes mesmo do contato com *L. coffeella*.

Figura 26 – Mapa de cores para os compostos identificados na cera cuticular dos genótipos estudados



4.1.3.2 *Fingerprinting* do extrato metanólico (GC-MS)

A Tabela 11 mostra a massa de folhas extraídas, a massa de extrato encontrada e o rendimento da extração para cada genótipo.

Tabela 11 - Extração metanólica do material vegetal

Amostra	Massa folha (mg)	Massa extrato (mg)	Rendimento (%)
C. racemosa (R)	107,0	13,4	12,5
C. arabica (S)	107,0	10,7	10,0
H14954-1 (R)	102,0	9,6	9,4
H14954-23 (S)	105,0	8,5	8,1

Os compostos identificados no extrato estão descritos na Tabela 12 e são principalmente metabólitos primários, como açúcares, aminoácidos, ácidos orgânicos e metabólitos secundários como cafeína, vitamina E, esteróides como campesterol, β -sitosterol e estigmasterol e, triterpenos pentacíclicos como AU e AO.

Dentre os compostos majoritários, encontram-se sacarose, ácido quinico, cafeína, AU e ácido cafeoilquínico.

Tabela 12 - Compostos identificados

Número pico	Identificação	IR _{exp}	Classe
1	Niacina	1300	aminoácido
2	L-prolina (2TMS)	1305	aminoácido
3	L-treonina (2TMS)	1307	aminoácido
4	Ácido fumárico	1359	ácido orgânico
5	L-Serina	1381	aminoácido
6	Ácido aspártico (2TMS)	1429	ácido orgânico
7	Ácido 3,4-dihidroxibutanóico	1445	ácido orgânico
8	Ácido málico (3TMS)	1512	ácido orgânico
9	Ácido piroglutâmico (2TMS)	1545	ácido orgânico
10	Ácido 4-hidroxibenzóico	1634	ácido orgânico
11	Ácido láurico	1657	ácido graxo
12	L-Ramnose	1659	açúcar
13	Arabitol	1759	poliol
14	Ribitol	1763	poliol

15	Ácido ribônico	1805	ácido orgânico
16	Neofitadieno	1841	diterpeno
17	Cafeína	1845	alcaloide
18	Ácido quínico	1900	fenólico
19	Glicose	1931	açúcar
20	Ácido pentadecanóico	1953	ácido graxo
21	Manitol	1973	poliol
22	Linolenato de metila	2101	éster graxo
23	Fitol	2115	diterpeno
24	Mio-inositol	2129	poliol
25	Ácido caféico	2154	fenólico
26	Ácido linoleico	2216	ácido graxo
27	Ácido oleico	2222	ácido graxo
28	L-triptofano	2236	aminoácido
29	3-manobiose	2622	açúcar
30	Sacarose	2715	açúcar
31	Esqualeno	2831	triterpeno
32	Catequina	2935	fenólico
33	Ácido clorogênico	3059	fenólico
34	alfa-tocoferol	3154	vitamina e
35	Campesterol	3268	esteróide
36	Stigmasterol	3299	esteróide
37	β -Sitosterol	3356	esteróide
38	1-Dotriacontanol	3547	álcool
39	Ácido oleanólico	3588	triterpeno
40	Ácido ursólico	3642	triterpeno

Legenda: IR exp e IR lit representam índice de retenção experimental e teórico, respectivamente.

A cafeína não foi observada na análise das folhas de *C. racemosa*, o que está de acordo com dados previamente publicados na literatura, de que os teores de cafeína nos diferentes órgãos dessa espécie são negligenciáveis (GEROMEL et al., 2007).

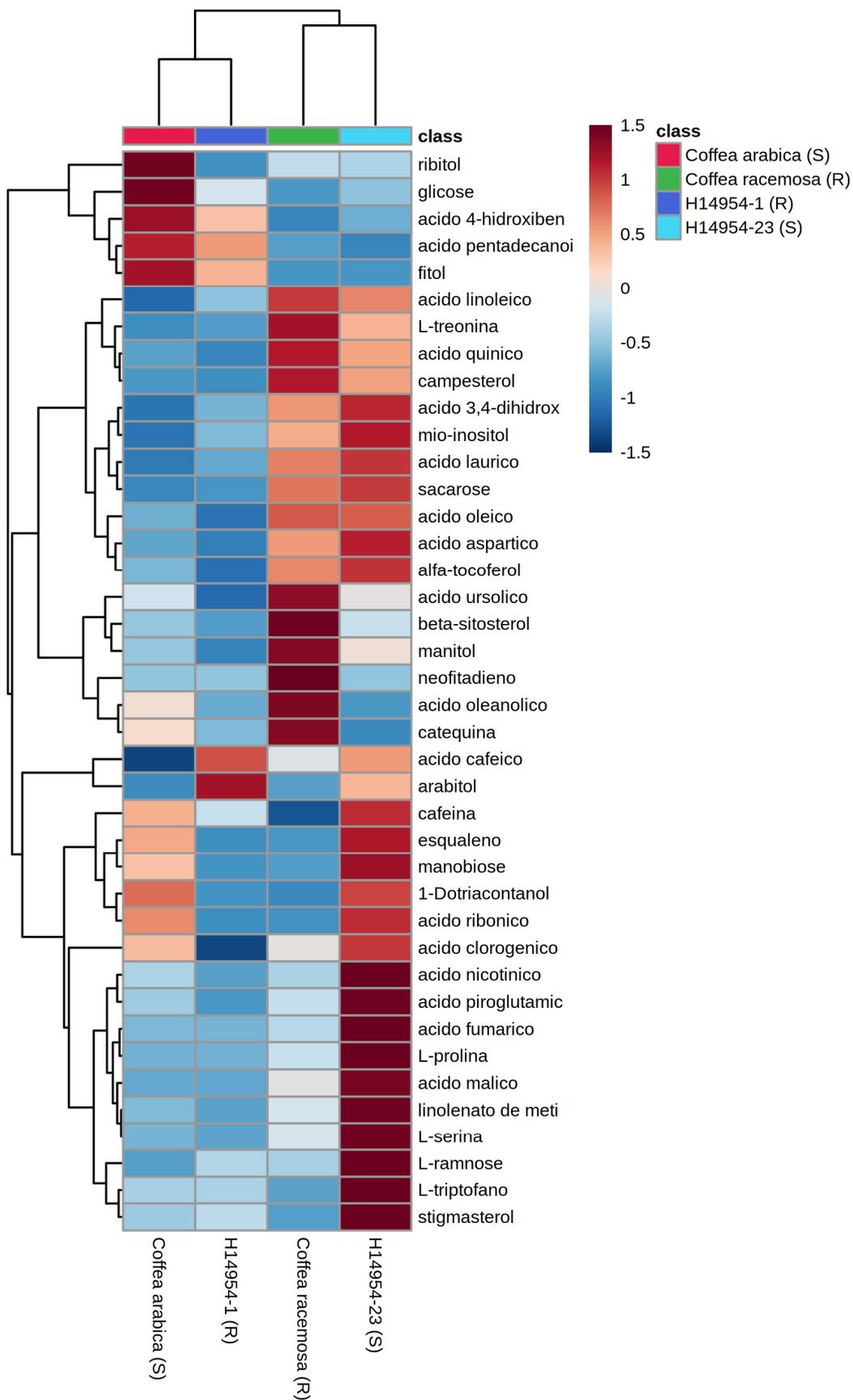
Observando o dendrograma do mapa de calor gerado (Figura 27) é possível notar que as amostras foram agrupadas em dois grupos que não possuem relação com os níveis de resistência: o primeiro entre as amostras do extrato metanólico de *C. arabica* (S) e H14954-1 (R), e o segundo grupo entre *C. racemosa* (R) e H14954-23 (S).

Foi notada uma grande diferença na proporção de alguns metabólitos primários como glicose, ribitol, sacarose, entre outros. Os metabólitos primários são essenciais para as atividades de sobrevivência da planta como fotossíntese, respiração, crescimento e reprodução. Essa grande diferença na proporção relativa desses metabólitos primários e o fato de as amostras não terem sido agrupadas entre os grupos resistentes ou suscetíveis, pode evidenciar que a baixa similaridade entre amostras seja devido à alta plasticidade que o metabolismo primário responde a mudanças ambientais, como clima, luminosidade, umidade, ataques externos, entre outros (SCHWACHTJE; BALDWIN, 2008).

A herbivoria também pode induzir um rearranjo complexo do metabolismo primário. A resposta de resistência de uma planta à alimentação de insetos é coordenada por diferentes vias de sinalização que dependem de metabólitos primários, assim como os próprios metabólitos primários podem funcionar como os aleloquímicos defensivos. Por exemplo, após serem atacadas, algumas plantas diminuem a atividade fotossintética para liberação de recursos, principalmente compostos ricos em nitrogênio, tornando-os disponíveis para uso em vias de defesa secundária (SCHWACHTJE; BALDWIN, 2008). Portanto, o estudo dos metabólitos primários é importante para entender a relação entre plantas e insetos.

Por isso, para a Parte 2 do trabalho a temperatura inicial do método cromatográfico foi alterada de 120 °C para 65 °C, para que mais metabólitos primários pudessem ser detectados.

Figura 27 – Mapa de calor para os compostos identificados no extrato metanólico



4.2 Parte 2: experimento com insetos

A Parte 1 do trabalho foi destinada à otimização dos processos de amostragem, seleção e otimização dos métodos analíticos, utilizando-se como material de partida folhas de indivíduos adultos, tanto dos pais (*C. racemosa* e *C. arabica*) quanto dos híbridos provenientes desse cruzamento (H14954-1 e H14954-23).

Porém, para a Parte 2 do trabalho, escolheu-se trabalhar apenas com mudas de clones de dois híbridos, um resistente (CI-12) e outro suscetível (3-32), similarmente derivados da recombinação entre *C. racemosa* e *C. arabica*.

4.2.1 Avaliação do nível de resistência

Mediante a escala de pontos descrita por Guerreiro-Filho et al. (1999) e Ramiro et al. (2004), o nível de resistência de cada genótipo foi determinado.

A escala de 1 a 5 pontos foi criada de acordo com a intensidade de ataque de *L. coffeella*, sendo 1 ponto atribuído para folhas pouco atacadas e 5, para aquelas severamente atacadas. As plantas consideradas resistentes são aquelas que receberam de 1 a 2 pontos, e as que receberam 3, 4 ou 5 pontos são consideradas suscetíveis.

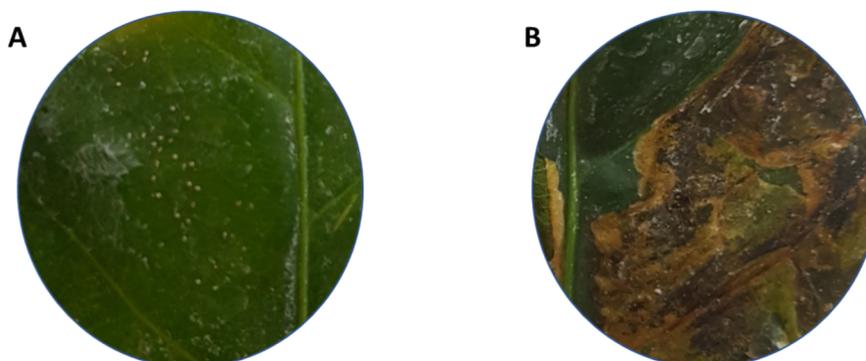
A Tabela 13 indica a nota média da avaliação da reação e a descrição das lesões. O genótipo CI-12, recebeu nota de 1,3, sendo considerada resistente e o genótipo 3-32 recebeu nota de 3,8, sendo considerado suscetível ao bicho-mineiro. Na Figura 28, é possível observar a formação de lesões pontuais no genótipo resistente (CI2) e lesões grandes arredondadas no genótipo suscetível (316) em 10 DAP. Para fins de facilidade na leitura, na Parte 2 do trabalho os genótipos foram chamados apenas pelos símbolos R ou S, representando resistente ou suscetível respectivamente.

Tabela 13 – Notas para avaliação do nível de resistência

Planta	Avaliação da reação*	Descrição das lesões
CI-12 (R)	1,3	Pontuais
3-32 (S)	3,8	Grandes arredondadas

*Avaliação em 2 plantas, 6 folhas cada

Figura 28 - Lesões ampliadas observadas nas folhas. A) Genótipo resistente (CI-12) e B) Genótipo suscetível (3-32)



4.2.2 Experimento de infestação

Foram avaliados quatro momentos, T0: plantas não infestadas, T1: 1 DAP, já que em trabalhos anteriores foi observado que em plantas resistentes, o mecanismo de sinalização de defesa é disparado pela oviposição de *L. coffeella*. Em T2: 6 DAP, momento em que as lagartas eclodiram dos ovos e penetraram nas folhas e em T3: 10 DAP, momento em que as lagartas estão desenvolvidas nos genótipos suscetíveis (MONDEGO et al., 2011; MONDEGO et al., 2005).

4.2.3 Metabolômica alvo

4.2.3.1 Taninos condensados

A reação para determinação dos taninos condensados envolve a despolimerização da proantocianidina em monômeros de cianidina em meio ácido, catalizado por ferro (III), representada na Figura 29. As cianidinas são coloridas e podem ser medidas no comprimento de onda de 550 nm.

O teor de taninos condensados nas amostras foi calculado com base na curva de calibração do padrão de cloreto de cianidina. O coeficiente de determinação encontrado $R^2 = 0,9963$ foi satisfatório. A Tabela 14 e Figura 30 apresentam os dados da curva analítica obtida.

Figura 29 – Representação da formação de cianidina a partir de um dímero de protoantocianidina

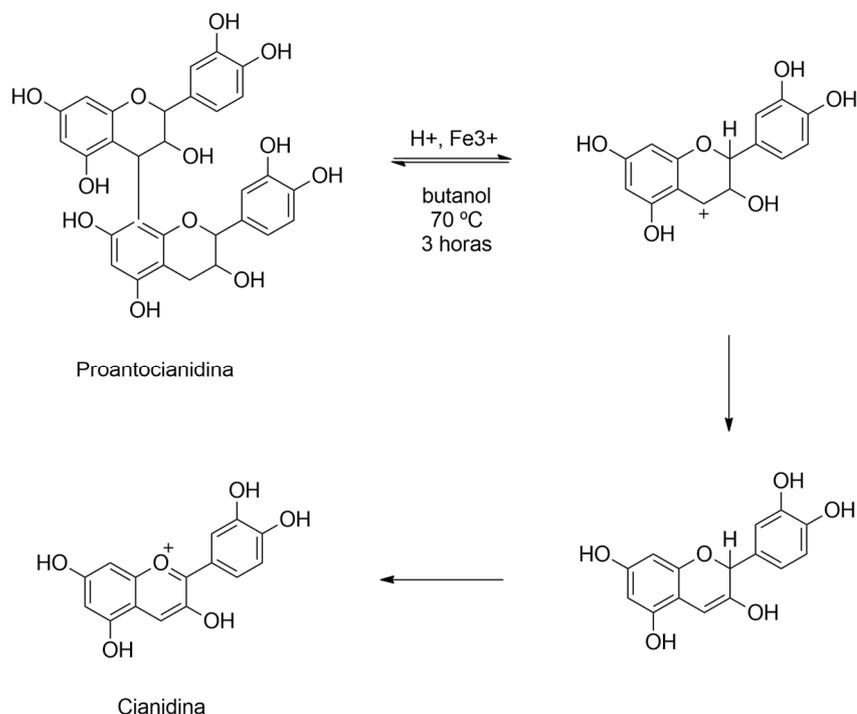
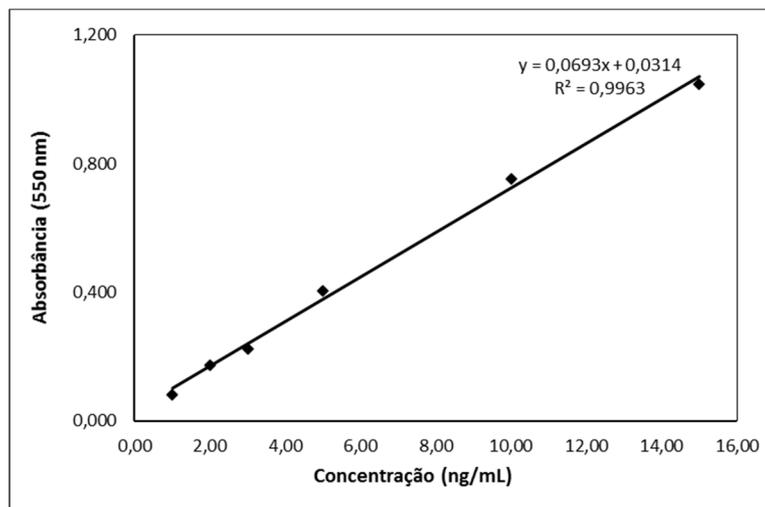


Tabela 14 - Dados experimentais da curva analítica de cloreto de cianidina (n=3)

Concentração (ng/mL)	Absorbância (550 nm)	Absorbância média (550 nm)	Desvio padrão	CV (%)
15,00	1,030	1,048	0,06	5,8
	1,115			
	0,998			
10,00	0,753	0,752	0,03	3,7
	0,780			
	0,724			
5,00	0,401	0,404	0,01	2,9
	0,417			
	0,394			
3,00	0,228	0,223	0,02	8,7
	0,240			
	0,202			
2,00	0,174	0,174	0,02	8,9
	0,189			
	0,158			
1,00	0,083	0,082	0,01	15,8
	0,095			
	0,069			

Figura 30 – Curva de calibração do cloreto de cianidina (n=3)



Os valores de taninos condensados encontrados para os dois genótipos contrastantes em relação à resistência ao bicho-mineiro, analisados nos diferentes tempos, são demonstrados na Tabela 15 e na Figura 31.

Observa-se que o genótipo resistente apresentou valores semelhantes entre os tempos T0 e T1, porém com acréscimo significativo de taninos no intervalo logo após a oviposição dos insetos (entre os tempos T1 e T2), decaindo os valores no tempo T3. Igualmente, o genótipo suscetível apresentou valores similares nos tempos T0 e T1, porém mais elevados do que o genótipo resistente. Entretanto, não produziu taninos logo após a oviposição, tampouco manteve as suas concentrações iniciais, diminuindo os seus valores ao decorrer do tempo.

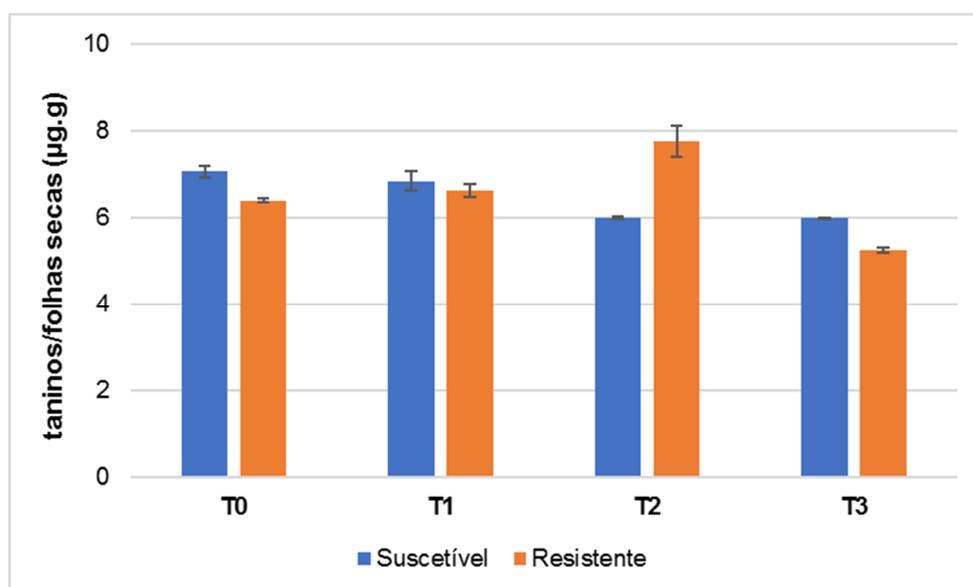
Tabela 15 - Teor médio de taninos condensados nas folhas (\pm desvio padrão; n=2)

Amostra	Taninos/folhas secas ($\mu\text{g/g}$)			
	T0	T1	T2	T3
R	6,40 \pm 0,04 bB	6,63 \pm 0,14 bA	7,76 \pm 0,35 aA	5,26 \pm 0,06 cB
S	7,07 \pm 0,13 aA	6,84 \pm 0,22 aA	6,00 \pm 0,02 bB	6,00 \pm 0,01 bA

*Médias seguidas de uma mesma letra minúscula nas linhas indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre os tempos de coleta para um mesmo genótipo pelo Teste de Tukey

**Médias seguidas de uma mesma letra maiúscula nas colunas indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre os genótipos no correspondente tempo de coleta pelo Teste de Tukey

Figura 31 – Gráfico de barras para o teor médio de taninos condensados dos genótipos resistente e suscetível.



Durante a comparação da expressão gênica de *C. arabica*, *C. racemosa* e seus híbridos interespecíficos (resistente e suscetível) na infestação pelo bicho-mineiro, Cardoso et al. (2014) observaram que os transcritos associados à enzima flavonoide 3'-hidroxilase e leuconianidina dioxigenase são *up*-reguladas no genótipo resistente, sugerindo que a biossíntese de antocianinas e taninos seja favorecida em relação às flavonas, ligninas e isoflavonas.

Os dados encontrados em T2 para o genótipo resistente, corroboram com a observação feita por Cardoso et al. (2014), já que houve um acúmulo de taninos condensados.

Esse resultado contrasta com os dados encontrados por Ramiro et al. (2003) e Ramiro; Guerreiro-Filho e Mazzafera (2006), que utilizaram o teste colorimétrico de FC para medir o teor de fenólicos totais durante a infestação de *L. coffeella*. Os autores não observaram correlação entre o teor de fenólicos totais e a infestação do bicho-mineiro.

Uma possível explicação é que, embora o teste colorimétrico de FC seja frequentemente utilizado para medir a "quantidade" de fenólicos em uma mistura, esse teste na realidade fornece apenas uma estimativa da capacidade da amostra em reduzir o reagente de FC (uma mistura de fosfomolibdato e fosfotungstato). É sabido que esse teste não mede apenas os compostos fenólicos totais, já que reage com

qualquer substância redutora presente no extrato vegetal, como alcaloides, proteínas, entre outros (APPEL et al., 2001).

Já o teste de HCl-butanol-acetona-ferro quantifica as antocianidinas provenientes das proantocianidinas hidrolisadas, por isso, oferece uma determinação real do teor de taninos condensados.

Appel et al. (2001) compararam os níveis de taninos em folhas de 16 espécies diferentes de plantas pelo método de FC e por isolamento e purificação de taninos. Foi encontrado que o teor de taninos e o ensaio de FC variam drasticamente. O autor recomenda que o método de FC não seja utilizado para determinações de fenólicos totais, pois não há relação absoluta entre os valores de FC e a quantidade de fenólicos em um extrato de planta.

Embora os resultados contidos na Tabela 15 tenham demonstrado que os genótipos de café resistente e suscetível ao bicho-mineiro sintetizaram conteúdos de taninos condensados estatisticamente diferenciados tanto no tempo como entre si, será necessário realizar novos experimentos a fim de aprofundar os conhecimentos acerca da evidência encontrada.

4.2.3.2 Ácido ursólico

A cutícula é a camada mais externa das folhas, sendo uma interface acelular entre a planta e o ambiente. Essa camada exerce importante papel na resistência à perda de água, proteção UV e proteção contra patógenos e insetos (BOURGAULT et al., 2020).

A cutícula é composta por cutina, ceras e polissacarídeos. A cutina é uma matriz complexa composta por poliésteres de ácidos graxos insolúveis em água. As ceras, geralmente são formadas por misturas de compostos alifáticos e alicíclicos, que são extraíveis com solventes orgânicos. Os compostos alifáticos são basicamente alcanos, ácidos graxos de cadeias longas, álcoois, aldeídos, cetonas e ésteres. Dentre os compostos alicíclicos, encontram-se os triterpenos pentacíclicos, tocoferóis e esteroides. Porém, a composição e teores das ceras variam muito entre as espécies, órgãos e estágios de desenvolvimento. Além de responderem a efeitos dinâmicos como dano, distúrbios físicos, herbivoria, entre outros (BOURGAULT et al., 2020).

A cera é encontrada de duas maneiras na cutícula: impregnada na cutina (intracuticular) ou depositada sobre a cutina (epicuticular). A cera epicuticular pode

existir como uma película lisa em algumas espécies ou texturizada por cristais de cera protuberantes em outras espécies.

Nesse trabalho não foi possível discriminar se a cera extraída foi intracuticular ou epicuticular, pois o uso do solvente orgânico não extrai seletivamente os dois tipos de cera (BUSCHHAUS; HUBERT; REINHARD, 2007). Por isso, não foi possível determinar se existe diferença entre os tipos de ceras ou se elas são homogêneas.

Porém, a Tabela 16 mostra os conteúdos de cera determinados nos genótipos de café submetidos ao experimento de infestação ao bicho-mineiro. Para as plantas testemunhas (tempo T0), os teores de cera não diferenciaram entre os genótipos resistente e suscetível, como também não diferenciaram nas coletas T2 e T3, mas se discriminaram ao comparar os conteúdos de cera logo após a postura dos ovos (coleta T1).

Apesar dos valores de cera terem decrescido no tempo, com menores valores encontrados nas folhas da coleta T2, momento em que as lagartas eclodem dos ovos e penetraram nas folhas, ambos os genótipos demonstraram comportamentos semelhantes, sem apontar diferenças significativas ao longo do tempo. Apenas o genótipo resistente apresentou diferença significativa ao comparar os teores das coletas nos tempos T0 e T2.

Tabela 16 – Teor médio de cera cuticular encontrada em cada genótipo nos diferentes tempos de coleta (\pm desvio padrão; n=2)

Amostra	Cera/área foliar ($\mu\text{g.cm}^{-2}$)			
	T0	T1	T2	T3
R	19,5 \pm 0,6 aA	12,8 \pm 0,5 abB	11,5 \pm 2,3 bA	12,3 \pm 2,6 abA
S	20,4 \pm 3,4 aA	16,9 \pm 0,5 aA	13,0 \pm 1,5 aA	14,7 \pm 0,1 aA

* Médias seguidas de uma mesma letra minúscula nas linhas ou por letras maiúsculas na mesma coluna, indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias pelo Teste de Tukey

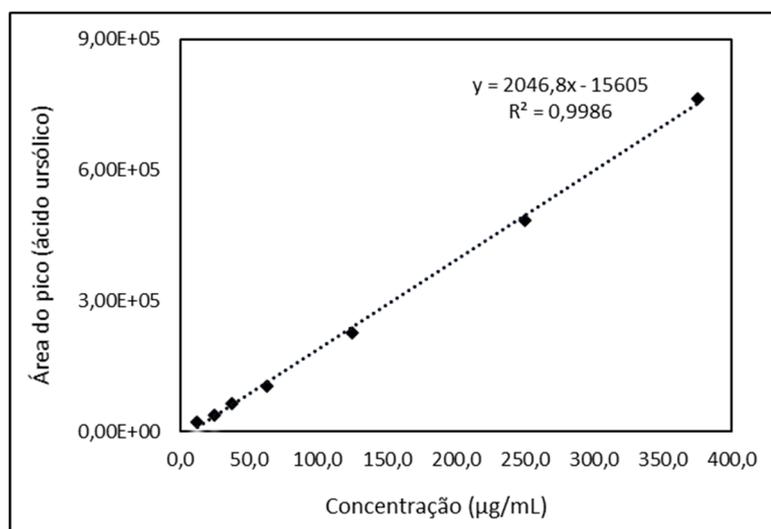
O teor de AU livre foi determinado nas amostras das ceras cuticulares, no extrato diclorometânico das folhas após retirada da cera e nas folhas inteiras (somatória entre cera e tecidos internos), sendo as concentrações calculadas com base na curva de calibração estabelecida com o padrão analítico.

O coeficiente de determinação encontrado $R^2 = 0,9986$ foi satisfatório. A Tabela 17 e Figura 32 apresentam os dados da curva analítica obtida.

Tabela 17 - Dados experimentais da curva analítica de ácido ursólico (AU) (n=3)

Concentração (µg/mL)	Área do pico	Área do pico média	Desvio padrão	CV (%)
	20067,3			
12,5	22691,3 22894,7	21884,4	1577,0	7,2
	40250,4			
25,0	37958,4 40486,9	39565,2	1396,6	3,5
	62735,6			
37,5	66007,1 66996,3	65246,3	2229,9	3,4
	102802,4			
62,5	103356,6 105695,6	103951,5	1535,6	1,5
	224052,9			
125,0	228430,9 231281,2	227921,7	3641,0	1,6
	471696,8			
250,0	487629,0 495244,7	484856,8	12016,2	2,5
	746778,9			
375,0	768625,5 776144,7	763849,7	15254,3	2,0

Figura 32 – Pontos da curva de calibração do AU



Na cera cuticular, é possível observar que no tempo T0 os genótipos não diferiram estaticamente em relação ao conteúdo de AU e houve um aumento da concentração de AU para os dois genótipos quando se compara T0 com T1 (Tabela 18). Para o genótipo R, foi possível observar uma mudança significativa do valor médio de AU presente na cera, de 4,0 µg/mg em T0 para 15,5 µg/mg em T1, um aumento de quase quatro vezes. Um crescimento numérico, também significativo, foi observado para o genótipo suscetível, de 4,5 µg/mg em T0 para 7,3 µg/mg em T1.

Ao aplicar uma análise conjunta aos dados encontrados para os dois genótipos, considerando os três momentos de coleta (T1 a T3) correspondente ao período total pós-infestação das plantas pela praga, verifica-se que os genótipos são estatisticamente distintos. O genótipo resistente sintetizou aproximadamente duas vezes a mais o conteúdo de AU na cera em relação ao genótipo suscetível.

Quando se analisa o teor de AU no extrato DCM seco e o AU total, não é possível observar esse padrão, sugerindo que a mudança no teor de AU está mais restrita à cera cuticular.

Analisando os dados obtidos, é possível sugerir que após a oviposição do bicho-mineiro, o metabolismo da planta resistente acumule o AU na cera cuticular, o que foi observado após 1 dia após a oviposição (T1), sendo um indício de que esse triterpeno tenha função de aleloquímico na interação café-*L. coffeella*.

Existem muitos trabalhos com foco na utilização de AU e AO em estudos de obesidade e diabetes em humanos, por esses compostos serem inibidores de lipases pancreáticas. Nesse contexto, Christeller et al. (2014) avaliaram as lipases digestivas presentes no intestino médio de larvas da mariposa *Epiphyas postvittana* Walker (Lepidoptera) quando alimentadas com uma dieta contendo 0,16 % de ácido ursólico. As larvas de Lepidopteras possuem requerimento essencial por dietas contendo ácidos graxos de cadeia longa poliinsaturados, principalmente ácido linoleico e ácido linolênico. Os autores observaram uma significativa diminuição na massa corporal das larvas e sugeriram que o AU age como um mecanismo de defesa das plantas, como inibidor de lipases para larvas de Lepidopteras.

Wang et al. (1999) sugerem que o ácido ursólico, hentriacontano e nonacosano, presentes na cera cuticular de espécies resistentes de azaleia (*Rhododendron sp.*), sejam os aleloquímicos principais na resposta de antibiose frente às ninfas do percevejo *Stephanitis pyrioides* Scott. Os autores sugerem que os aleloquímicos

tenham um efeito de pós-ingestão, diminuindo o desenvolvimento, tamanho das ninfas e oviposição, o que não ocorre nos genótipos suscetíveis de azaléias.

O AU e seu isômero AO, já foram citados em muitos trabalhos por suas propriedades tóxicas e deterrência na alimentação de diversos insetos, porém, até o momento não se tem conhecimento de nenhum relato que mostre que um inseto incite ao acúmulo de AU na cera epicuticular.

Para validar essa hipótese, a cera cuticular adaxial e abaxial deveria ser extraída e analisada individualmente para validar esse padrão de acúmulo na face superior, pois é conhecido que as faces foliares de *Coffea arabica* cv. Obatã e *Coffea arabica* cv. Catuaí Vermelho possuem morfologia e teores de cera diferentes (LICHSTON; GODOY, 2006).

Outra hipótese levantada é que possivelmente esses triterpenos pentacíclicos atuem apenas sobre a não-preferência de oviposição pelos insetos, visto que os teores de AU total na folha, como os valores de AU do extrato DCM, que corresponde ao teor de AU interno das folhas, não diferiram entre os genótipos em T0, como também no período de pós-infestação das plantas (Análise conjunta – T1 a T3).

Como anteriormente mencionado, Santos-Júnior et al. (2018) demonstraram redução da oviposição de ovos por *L. coffeella* ao tratar folhas de *C. arabica* com AU, isolado da planta *Merremia tomentosa* (velame-do-campo), com redução da oviposição em cerca de 90%.

Tabela 18 – Teor médio de AU nas diferentes frações e tempos de coleta de folhas dos genótipos de café (\pm desvio padrão; n=2)

Amostra	AU/cera ($\mu\text{g}/\text{mg}$)				
	T0	T1	T2	T3	Análise conjunta (T1 a T3)
R	4,0 \pm 0,5 cA	15,5 \pm 0 aA	9,8 \pm 0,4 bA	15,3 \pm 1,1 aA	13,5 \pm 2,9 A
S	4,5 \pm 0,01 bA	7,3 \pm 0,4 aB	8,1 \pm 0,3 aA	7,1 \pm 0,5 aB	7,5 \pm 0,6 B
Amostra	AU/extrato DCM seco ($\mu\text{g}/\text{mg}$)				
	T0	T1	T2	T3	Análise conjunta (T1 a T3)
R	18,4 \pm 1,5 abA	19,4 \pm 0,01 aB	15,2 \pm 0,4 bB	17,8 \pm 0,8 abA	17,4 \pm 1,9 A
S	22,4 \pm 2,4 aA	22,3 \pm 0,2 aA	17,1 \pm 0,01 abA	13,6 \pm 1,8 bA	17,7 \pm 4,0 A
Amostra	AU total/folhas secas (mg/g)				
	T0	T1	T2	T3	Análise conjunta (T1 a T3)
R	1,9 \pm 0,14 abA	2,0 \pm 0,02 aB	1,5 \pm 0,03 bA	1,9 \pm 0,12 abA	1,8 \pm 0,22 A
S	2,3 \pm 0,24 aA	2,3 \pm 0,02 aA	1,7 \pm 0,46 aA	1,4 \pm 0,18 aA	1,8 \pm 0,45 A

*Dentro de cada análise (AU/cera, AU/extrato DCM seco e AU/folhas secas), médias seguidas de uma mesma letra nas linhas ou por letras maiúsculas na mesma coluna indicam que, no nível de 5% de significância, não há diferença entre as médias pelo Teste de Tukey.

4.2.4 Metabolômica global

A metabolômica global (*untargeted*) prevê a análise comparativa do maior número de metabólitos possíveis contidos em uma amostra biológica. Uma das etapas mais críticas nesse processo é o preparo de amostras, pois tem um efeito importante na cobertura metabólica e na qualidade dos resultados obtidos. Preferencialmente, essas amostras devem ser analisadas com o mínimo de pré-tratamento para evitar potencial perda de metabólitos (RATERINK et al., 2014).

Dentre as técnicas para tratamento de amostras conhecidas, encontra-se a extração líquido-líquido (ELL), que é comumente utilizada como “*clean-up*” das amostras, geralmente para a remoção dos lipídeos. Ao retirar os lipídeos e os pigmentos, a supressão iônica das análises de LC-MS pode ser reduzida, o que pode levar a um aumento no número de entidades moleculares obtidas e maior reprodutibilidade das análises (RATERINK et al., 2014).

A utilização dos solventes orgânicos clorofórmio e diclorometano em ELL é bastante conhecida. Porém, recentemente o metil *terc*-butil éter (MTBE) surgiu como uma opção aos solventes clorados (SALEM et al., 2016).

O uso de MTBE para ELL em estudos metabolômicos, foi primeiramente descrito para tecidos e células de plasma numa proporção de MTBE/metanol/água (10:3:2,5, v/v/v) (MATYASH et al., 2008). Seu uso tem se tornado muito popular em relação ao clorofórmio por ser menos tóxico e por ser menos denso que a água, ou seja, a fase aquosa fica na parte de baixo, possibilitando que as proteínas desnaturadas fiquem precipitadas, enquanto com clorofórmio as proteínas ficam na interface das duas fases, dificultando o processo de preparo de amostra (SALEM et al., 2016).

O protocolo estabelecido por Salem et al. (2016) recomenda o uso da mistura MTBE/metanol/água (10:5,5:6,5, v/v/v) para sementes de *Arabidopsis thaliana*. Essa proporção foi testada (dados não mostrados) e adotada para a extração das folhas de café, propiciando que a fração polar pudesse ser analisada independentemente da apolar.

4.2.4.1 Fração hidrofílica: GC-MS

A técnica de GC permite a separação dos constituintes de misturas complexas com alta resolução, tempos de retenção consistentes entre análises, a ionização por impacto eletrônico é consistente entre equipamentos, permitindo a comparação dos índices de retenção e espectros com bibliotecas e a identificação de muitos metabólitos. Porém, a maior limitação da cromatografia gasosa é a necessidade de que os metabólitos sejam voláteis e termicamente estáveis. Para converter um metabólito não volátil em volátil é necessário utilizar métodos de derivatizações químicas.

O método de derivatização clássico é a sililação, que converte grupos -OH e -NH em derivados de trimetilsilano (TMS). Infelizmente, essa reação pode formar vários derivados de apenas um metabólito, por exemplo, mono (1 TMS), di (2TMS), tri (3 TMS), etc, e cada derivado do mesmo metabólito possui tempos de retenção distintos. Por isso na Tabela 19, foi descrito para cada metabólito o número de trimetilsilanos adicionados na molécula com seus respectivos índices de retenção.

Para tratar os dados, as áreas cromatográficas dos picos com diferentes níveis de TMS foram somadas.

Tabela 19 – Metabólitos identificados na parte hidrofílica do extrato

Número	Compostos	Número de sililações	IR exp
1	L-Alanina	TMS	930
2	Ácido glicólico	2TMS	1086
3	L-Valina	TMS	1095
4	L-Alanina	2TMS	1114
5	L-Prolina	TMS	1176
6	Arecolina	-	1223
7	L-valina	2TMS	1228
8	Ureia	2TMS	1252
9	Ácido pipercolico	TMS	1266
10	L-Serina	2TMS	1268
11	L-leucina	2TMS	1286
12	Fosfato	3TMS	1291
13	Niacina	TMS	1293
14	L-Prolina	2TMS	1304
15	L-Treonina	2TMS	1307
16	Ácido succínico	2TMS	1325
17	Ácido glicérico	3TMS	1352
18	Ácido fumárico	2TMS	1359

19	Ácido pipecólico	2TMS	1370
20	L-Serina	3TMS	1381
21	L-Treonina	3TMS	1408
22	Hidroquinona	2TMS	1410
23	Ácido aspártico	2TMS	1434
24	Trigonelina	TMS	1509
25	Ácido málico	3TMS	1512
26	Ácido aspártico	3TMS	1542
27	Ácido piroglutâmico	2TMS	1545
28	Ácido treônico (isômero 1)	TMS	1576
29	Ácido treônico (isômero 2)	TMS	1595
30	L-Asparagina	2TMS	1609
31	Fenilalanina	2TMS	1637
32	L-Ácido glutâmico	3TMS	1641
33	L-Ramnose	4TMS	1663
34	L-Asparagina	3TMS	1692
35	Glutamine	3TMS	1793
36	Cafeína	-	1841
37	Furanose	5TMS	1846
38	Frutose (isômero 1)	5TMS	1854
39	Frutose (isômero 2)	5TMS	1888
40	Ácido quínico	5TMS	1901
41	Glicose (isômero 1)	5TMS	1932
42	Inositol (isômero 1)	6TMS	1958
43	Manitol	6TMS	1973
44	Sorbitol	6TMS	1981
45	Scyllo-inositol (isômero 2)	6TMS	2027
46	Glicose (D-beta)	5TMS	2032
47	Inositol (isômero 2)	5TMS	2035
48	Ácido glucônico	6TMS	2045
49	Mio-inositol	6TMS	2129
50	Ácido caféico	3TMS	2153
51	L-Triptofano	3TMS	2212
52	Fosfato de inositol	7TMS	2467
53	Arbutina	5TMS	2645
54	Sacarose	8TMS	2713
55	Maltose	8TMS	2798
56	Trealose	8TMS	2814
57	Catequina	5TMS	2905
58	Ácido cafeoilquínico (isômero 1)	6TMS	3058
59	Galactinol	9TMS	3069
60	Ácido feruloilquinico	5TMS	3150
61	Ácido cafeoilquínico (isômero 2)	6TMS	3179
62	Ácido cafeoilquínico (isômero 3)	6TMS	3240
63	Ácido cafeoilquínico (isômero 4)	6TMS	3262

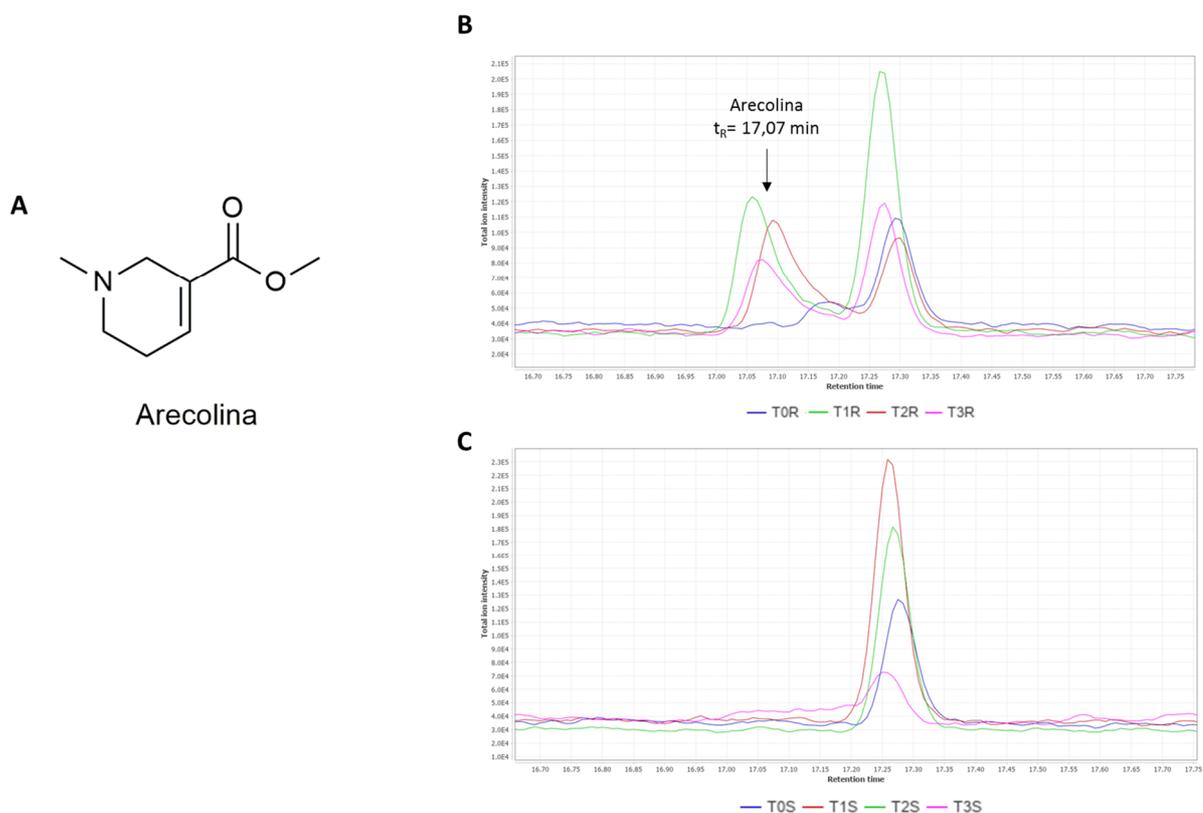
Ao observar o mapa de calor (Figura 33), na penúltima linha ocorre o metabólito arecolina. A arecolina é um alcaloide piridínico proveniente do ácido nicotínico (Figura 34A), e até onde se tem conhecimento, esse é o primeiro relato da presença em café.

Analisando os dados brutos, foi possível observar nos cromatogramas a presença da arecolina no $t_r = 17,07$ min apenas nos cromatogramas do genótipo resistente, conforme região expandida dos cromatogramas mostrada na Figura 34.

Na Figura 34B é possível observar que para o genótipo resistente em T0, o pico atribuído a esse alcaloide aparece em baixa intensidade, aumentando de intensidade em T1, T2 e T3.

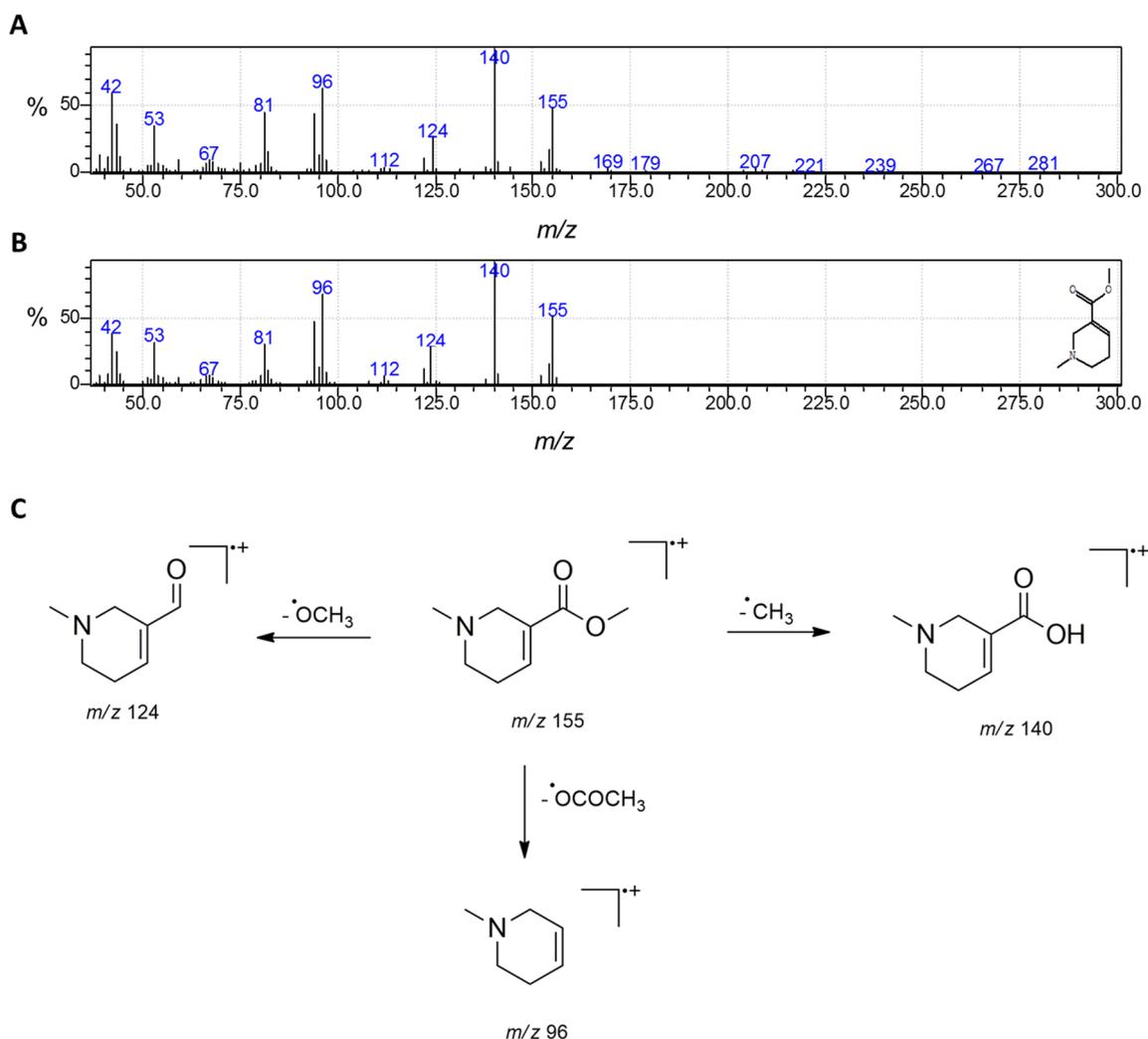
Já nos cromatogramas do genótipo suscetível (Figura 34C), esse pico não é observado em nenhum tempo de coleta.

Figura 34 – Detecção do alcaloide. A) Estrutura química, região expandida dos cromatogramas dos genótipos B) Resistente e C) Suscetível



A identificação da arecolina foi possível pela comparação do índice de retenção (IR) e dos fragmentos observados (Figura 35) com os dados da literatura para GC-MS e pela massa de alta resolução obtida pelo LC-MS, discutida na Seção 4.2.4.2.

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



A arecolina é o alcaloide majoritário encontrado nas sementes de *Areca catechu*, popularmente chamada de “betel nut”, ou noz-de-areca, com teor variando de 0,3-0,6% (PENG et al., 2015). *Areca catechu* é considerada a quarta droga mais utilizada no mundo, após o tabaco, álcool e cafeína, sendo muito difundida no sul da Ásia, ilhas do Pacífico e algumas regiões do leste da África, onde mascar a semente dessa planta é tradicional. Ao mascar as sementes ocorre um efeito psicoativo de euforia e bem-estar, esse efeito está correlacionado à ação da arecolina. Em algumas

regiões, as sementes são consumidas misturando-as com cal (*slacked lime*) na cavidade oral no momento da mastigação (WARNAKULASURIYA, 2002).

Apesar dos alcaloides serem uma das principais classes de metabólitos secundários descritos como aleloquímicos, não foram encontrados trabalhos correlacionando a presença da arecolina nas interações inseto-plantas. Entretanto, foram encontrados trabalhos que descrevem a ação deterrente na alimentação ou tóxica para pragas e doenças quando expostas à arecolina e um breve resumo dos artigos científicos será descrito abaixo.

Liu et al. (2016) descrevem a ação tóxica da arecolina no tratamento de tênias, cisticercose e fascícola hepática.

A arecolina foi tóxica para abelhas, causando alta mortalidade (DETZEL; WINK, 1993).

Lagartas de *Phormia regina* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae) foram expostas a uma dieta contendo 100 ou 1000 ppm de arecolina. Foi observada redução no ganho de massa corporal e tamanho das lagartas com as duas doses, porém apenas com 1000 ppm a mortalidade foi significativa (GREEN; SIMMONDS; BLANEY, 2002).

As lagartas de terceiro ínstar da mosca *Drosophila melanogaster* transgênica (hsp70-lacZ) Bg9, mosca-da-fruta, foram alimentadas com uma dieta contendo 5, 10, 20, 40 e 80 μ M de arecolina por 24 h. Após esse período foi relatada a indução de dano no DNA pelo estresse oxidativo e a arecolina foi considerada tóxica nas doses de 20, 40 e 80 μ M (SHAKYA; SIDDIQUE, 2018).

Folhas de *Areca catechu* tratadas com arecolina, mostraram inibição na infestação fúngica de *Colletotrichum kahawae*, quando as folhas foram inoculadas com seus esporos (YIN et al., 2020). O fungo *C. kahawae* é responsável pela "Coffee Berry Disease" (CBD), doença que ocorre em cafeeiros no continente africano e é responsável por perdas de até 80% na produção. Na América do Sul não há ainda relatos da CBD, porém doenças como antracnose e como a mancha-manteigosa, causadas por fungos da mesma família, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum acutatum*, respectivamente, são considerados um problema fitossanitário.

A arecolina foi utilizada para avaliação acaricida para carrapato-de-boi (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) exibindo mortalidade larval de 100% a 12,5 mg/L. Foi sugerido que a arecolina tenha ação acaricida pela indução do estresse oxidativo (JAIN; SATAPATHY; PANDEY, 2020).

Arecolina se mostrou tóxica para lagartas da mariposa *Manduca sexta* com $LD_{100} = 500$ mg/kg massa corporal (WINK; THEILE, 2002).

A arecolina age como um agonista parcial não seletivo dos receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina e também como receptor adrenérgico de $\alpha 2$. Já os receptores: adrenérgico $\alpha 1$, serotonina (5-HT₂), acetilcolina esterase (AChE), butilcolina esterase (BChE) e colina acetiltransferase (ChAT) não são ativados pela arecolina a 500 μ M (WINK; SCHIMMER, 2018).

Os agonistas de receptores nicotínicos da acetilcolina são um importante grupo de inseticidas utilizados na agricultura, por exemplo os neonicotinoides. O modo de ação é baseado na ligação entre essas moléculas e as enzimas, o que provoca uma transmissão descontrolada e contínua dos impulsos nervosos pela hiperexcitabilidade do sistema nervoso central. Dessa forma, podem ocorrer reações como tremores, convulsões e morte.

Nos insetos em geral, o processo digestivo ocorre principalmente no intestino médio, onde as enzimas digestivas são secretadas. Para as lagartas do bicho-mineiro o intestino médio está dividido em três partes: primário, intermediário e final. Sendo que o intestino médio primário possui o pH alcalino (ROSSI et al., 2009).

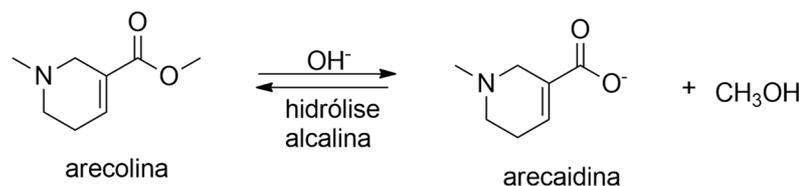
A arecolina possui $pK_a = 7,64$, portanto a arecolina ingerida pelo bicho-mineiro estaria na forma não protonada. A forma não ionizada da arecolina penetra mais facilmente pela barreira lipídica das mucosas por difusão simples (VENKATESH et al., 2018).

Outra possibilidade é que a arecolina sofra uma hidrólise alcalina no intestino médio primário das lagartas de *L. coffella*, formando a arecaidina (Figura 36). A arecaidina, diferentemente da arecolina, não age como agonista dos receptores muscarínicos e nicotínicos de acetilcolina mas sim como um inibidor competitivo da captação do ácido gama-aminobutírico (GABA) (WINK; SCHIMMER, 2018).

O GABA é um neurotransmissor inibidor do sistema nervoso central, responsável por restabelecer o estado de repouso do sistema nervoso central após impulsos nervosos. Existem diversos inseticidas químicos que atuam sobre o sistema nervoso central mediando a captação de GABA, causando paralisia, tremores, convulsões ou ocasionalmente morte.

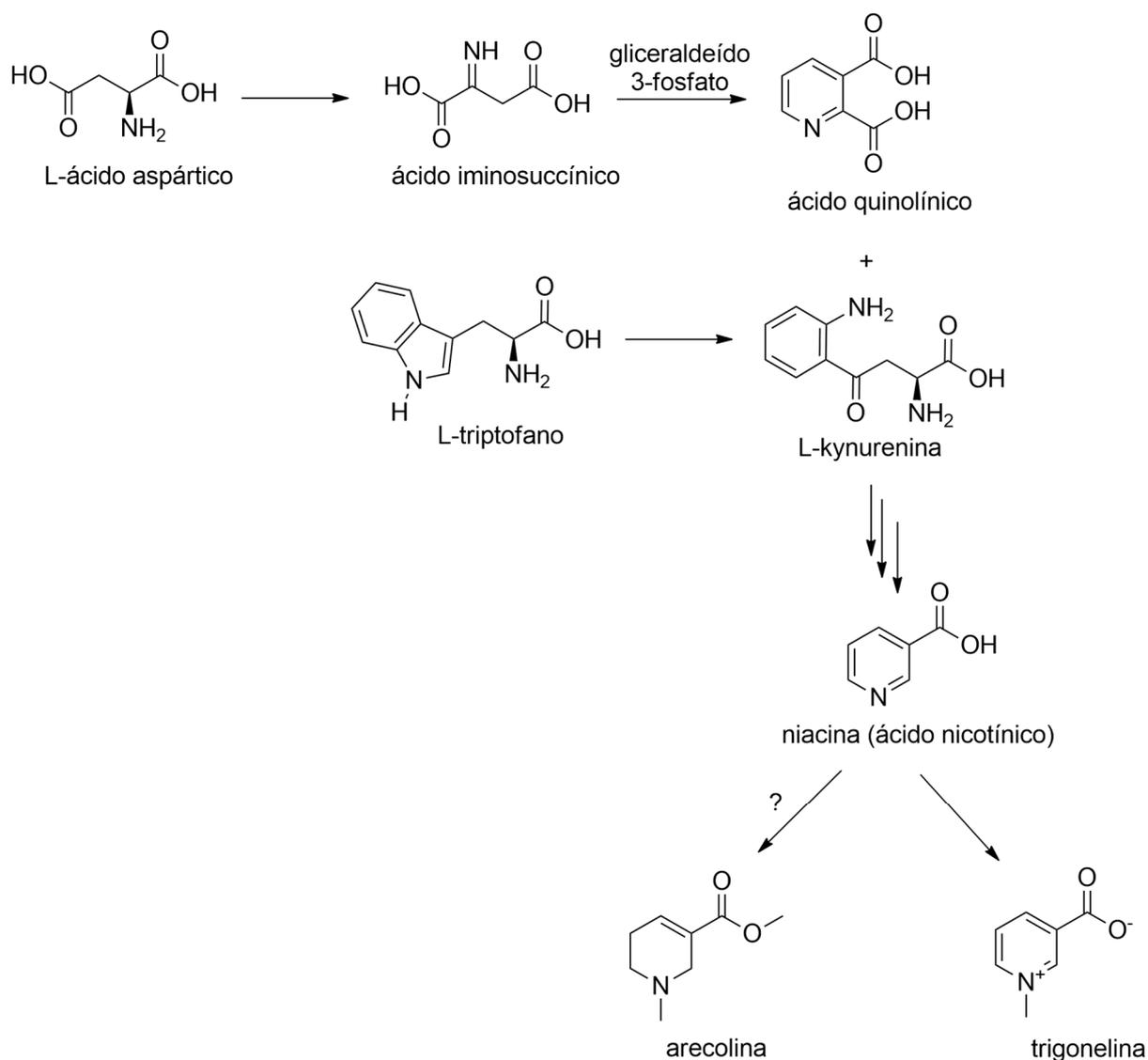
Portanto, existem indícios que sugerem que a arecolina ou a arecaidina tenham função inseticida e possam ser os aleloquímicos responsáveis pela antibiose em genótipos de café resistentes ao bicho-mineiro.

Figura 36 – Mecanismo da hidrólise em meio alcalino da arecolina formando a arecaidina



A biossíntese da arecolina não foi encontrada na literatura, porém sabe-se que esse alcaloide é derivado do ácido nicotínico, assim como a trigonelina. A biossíntese da trigonelina em café já foi estudada e a rota biosintética é mostrada na Figura 37 (ASHIHARA; DENG; NAGAI, 2011).

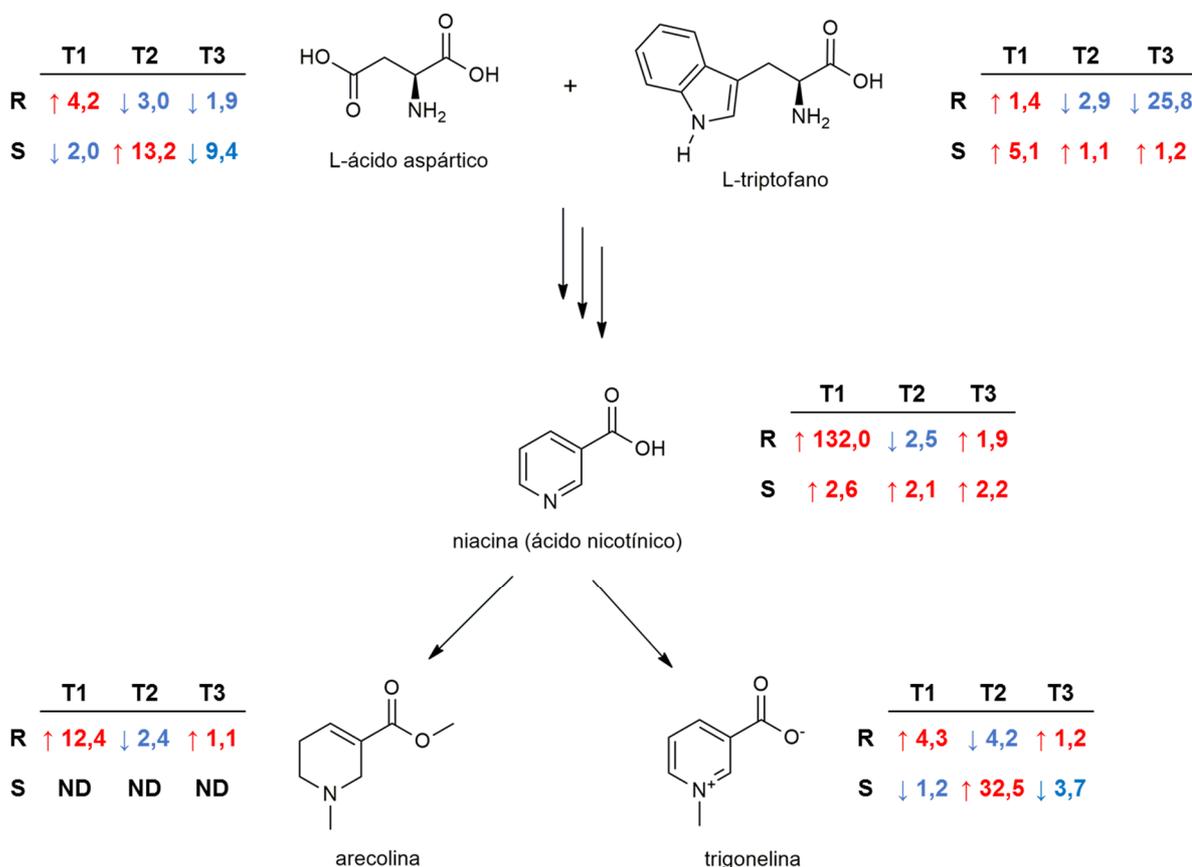
Figura 37 – Biossíntese dos alcaloides provenientes do ácido nicotínico. As enzimas envolvidas em cada etapa da rota biosintética não estão demonstradas



Dentre os compostos envolvidos na biossíntese da trigonelina, foram identificados por GC-MS o L-ácido aspártico, triptofano e ácido nicotínico.

A Figura 38 mostra a rota biosintética resumida mostrando a alteração de cada um dos compostos para os dois genótipos durante os tempos de coleta. Essa alteração positiva ou negativa foi calculada com base na média da área dos picos de três repetições para os tempos de coletas anteriores. Por exemplo, o valor encontrado em T1 representa quantas vezes a área do pico aumentou ou diminuiu em relação a T0, para T2 em relação à T1 e para T3 em relação à T2.

Figura 38 – Alteração positiva (↑) ou negativa (↓) para cada metabólito identificado por GC-MS que está envolvido na biossíntese proposta



Legenda: R: resistente, S: suscetível, T1: 1 DAP, T2: 6 DAP, T3: 10 DAP, ND: não detectado

Pelos dados encontrados, é possível sugerir que o metabolismo do genótipo suscetível aumenta a produção de trigonelina após o contato com o bicho-mineiro. Já para o genótipo resistente, o contato com o inseto desencadeia a produção de arecolina, que pode ser tóxica às lagartas.

4.2.4.2 Fração hidrofílica: LC-MS

Primeiramente foi feita uma biblioteca *in-house* com todos os metabólitos secundários já reportados em folhas de café, contendo os dados de massa molecular e fragmentação. Esses metabólitos foram cruzados com os candidatos sugeridos pela plataforma GNPS (WANG et al., 2016) onde a massa exata foi comparada com a massa observada e os fragmentos característicos para cada composto.

Foram tentativamente anotados 28 metabólitos que estão descritos na Tabela 20, sendo que todas as substâncias propostas possuem erro na exatidão de m/z menor que 3 ppm, que garantem uma maior confiabilidade na identificação.

Todas as substâncias anotadas já foram previamente descritas em folhas do gênero *Coffea*, exceto a arecolina.

A fragmentação da arecolina está proposta na Figura 39 e é baseada no trabalho de Li et al. (2017). A fragmentação do íon $[M+H]^+$ m/z 156,1027 gerou m/z 142,0847; m/z 113,0622; m/z 96,0197 e m/z 81,0321. Já no modo negativo, não ocorreu ionização desse metabólito.

Figura 39 – Mecanismo de fragmentação proposto para a arecolina em LC-ESI-MS/MS

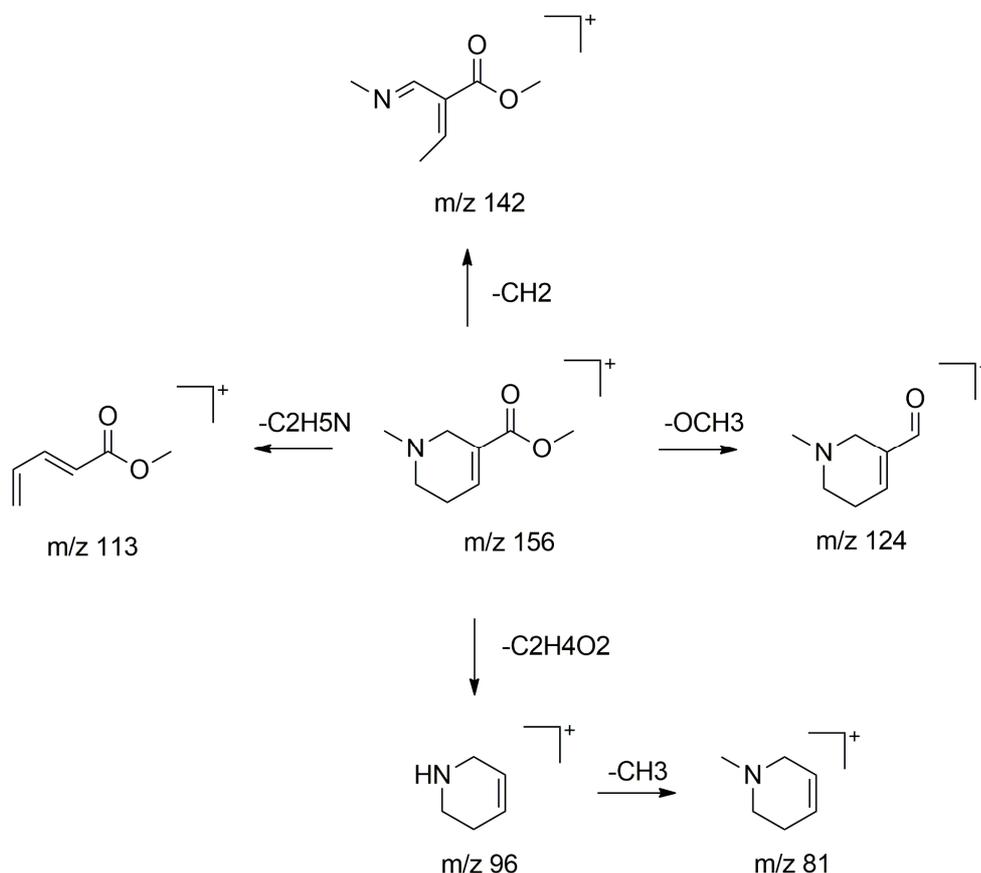
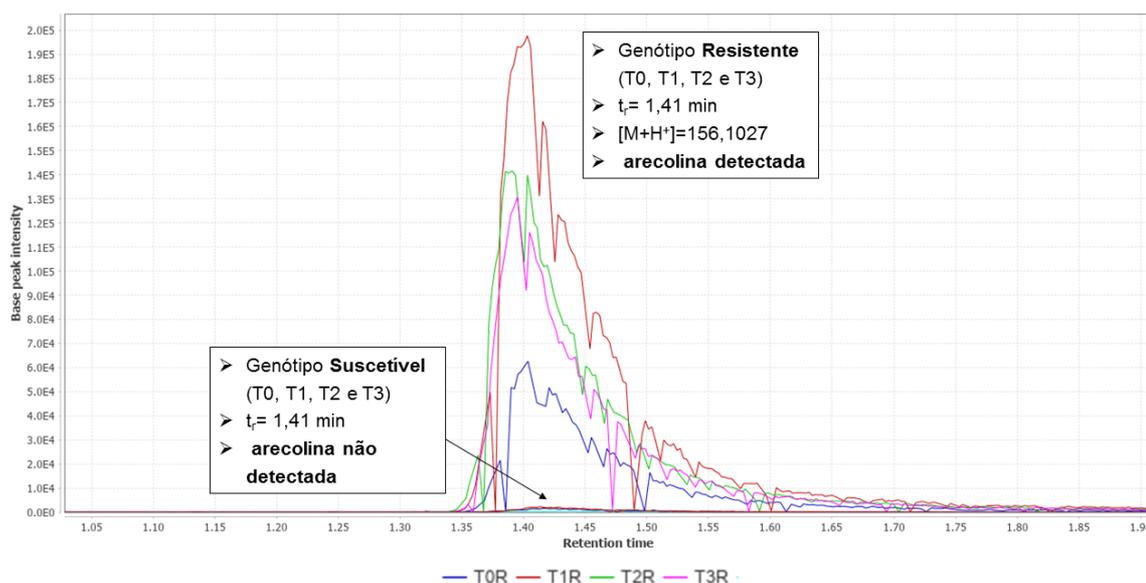


Tabela 20 – Compostos anotados por LC-HRMS/MS

Nº	tr (min)	m/z observada	Aduto	m/z exata aduto	Erro (ppm)	Anotação
1	0,805	138,0558	[M+H] ⁺	138,0555	2,2	trigonelina
2	1,41	156,1027	[M+H] ⁺	156,1025	1,3	arecolina
3	5,45	353,0880	[M-H] ⁻	353,0873	2,0	ácido cafeoilquínico (isômero 1)
4	5,52	353,0875	[M-H] ⁻	353,0873	0,6	ácido cafeoilquínico (isômero 2)
5	5,67	1151,2438	[M-H] ⁻	1151,2457	-1,7	tetrâmero de procianidina A (isômero 1)
6	5,72	577,1348	[M-H] ⁻	577,1346	0,3	procianidina B (isômero 1)
7	5,85	1153,2614	[M-H] ⁻	1153,2614	0	tetrâmero de procianidina B
8	5,89	353,0880	[M-H] ⁻	353,0873	2,0	ácido cafeoilquínico (isômero 3)
9	5,96	353,0880	[M-H] ⁻	353,0873	2,0	ácido cafeoilquínico (isômero 4)
10	6,19	195,0884	[M+H] ⁺	195,0882	1,0	cafeína
11	6,2	289,0721	[M-H] ⁻	289,0712	3,1	catequina/epicatequina
12	6,29	353,0881	[M-H] ⁻	353,0873	2,3	ácido cafeoilquínico (isômero 5)
13	6,43	337,0923	[M-H] ⁻	337,0923	0	ácido p-cumarilquínico
14	6,48	593,1501	[M-H] ⁻	593,1506	-0,8	apigenina-di-C-diglicosídeo*
15	6,55	421,0760	[M-H] ⁻	421,0771	-2,6	mangiferina
16	6,76	575,1188	[M-H] ⁻	575,1189	-0,2	procianidina A
17	6,79	771,1973	[M-H] ⁻	771,1983	-1,3	quercetina-3-O-Hexose-Hexose- Deoxihexose
18	6,80	1151,2438	[M-H] ⁻	1151,2457	-1,7	tetrâmero de procianidina A (isômero 2)
19	6,91	577,1348	[M-H] ⁻	577,1346	0,3	procianidina B (isômero 2)
20	7,05	625,1406	[M-H] ⁻	625,1404	0,3	quercetina di-O-glucosídeo
21	7,50	755,2040	[M-H] ⁻	755,2034	0,8	kaempferol-3-O-Hexose-Hexose- Deoxihexose
22	7,83	609,1454	[M-H] ⁻	609,1455	0,2	kaempferol di-O-glucosídeo
23	7,95	515,1191	[M-H] ⁻	515,1189	0,4	ácido dicafeilquínico (isômero 1)
24	8,13	515,1193	[M-H] ⁻	515,1189	0,8	ácido dicafeilquínico (isômero 2)
25	8,48	421,0760	[M-H] ⁻	421,0771	-2,6	isomangiferina
26	8,95	609,1465	[M-H] ⁻	609,1455	1,6	rutina
27	9,7	515,1191	[M-H] ⁻	515,1189	0,4	ácido dicafeilquínico (isômero 3)
28	10,85	593,1503	[M-H] ⁻	593,1506	-0,5	kaempferol-3-Glc-6''-Rha

O cromatograma do íon extraído para $[M+H]^+ = 156$ (Figura 40), corrobora os dados encontrados por GC-MS discutido na Seção 4.2.4.1. A arecolina é detectada apenas no genótipo resistente em todos os tempos de coleta e parece aumentar a concentração a partir de T1.

Figura 40 – Cromatograma ampliado do íon extraído modo positivo para m/z 156



Além da arecolina, não foi possível identificar visualmente outras diferenças nos cromatogramas entre os grupos resistente e suscetível, por isso a análise de componentes principais (PCA) foi utilizada.

Para tanto, os dados obtidos pela análise de LC-MS foram pré-processados e a área de cada razão massa-carga (m/z) detectada nos espectros foi utilizada como variável.

Os tipos de pré-processamento de dados mais comumente aplicados às variáveis em estudos quimiométricos são centragem na média, escalamento pela variância, autoescalamento e escalamento pela amplitude. Dentre as variações do autoescalamento encontram-se o escalamento de Pareto, escalamento segundo a estabilidade da variável (Vast – variable stability) e escalamento por nivelamento (FERREIRA, 2015).

Para dados ruidosos de LC-MS em estudos de metabolômica, o autoescalamento de Pareto é o mais recomendado. Dessa forma, o impacto de cada pico (variável) é igualado e a importância de valores altos é minimizada, fazendo com que a contribuição de todas as variáveis seja significativa, o que não ocorre com a

centragem na média, onde os picos mais intensos são dominantes na análise (FERREIRA, 2015).

A PCA é um método supervisionado, onde cada amostra analisada provém de uma classe pré-estabelecida. A organização dos dados se deu com todos os tempos de coleta juntos e discriminados em duas classes, resistente e suscetível. Os dados de LC-MS foram adquiridos no modo positivo e negativo e foram analisados separadamente.

A PCA dos dados adquiridos no modo negativo (Figura 41) e no modo positivo (Figura 42) não apresentaram separação entre os genótipos.

Figura 41 – PCA do modo negativo

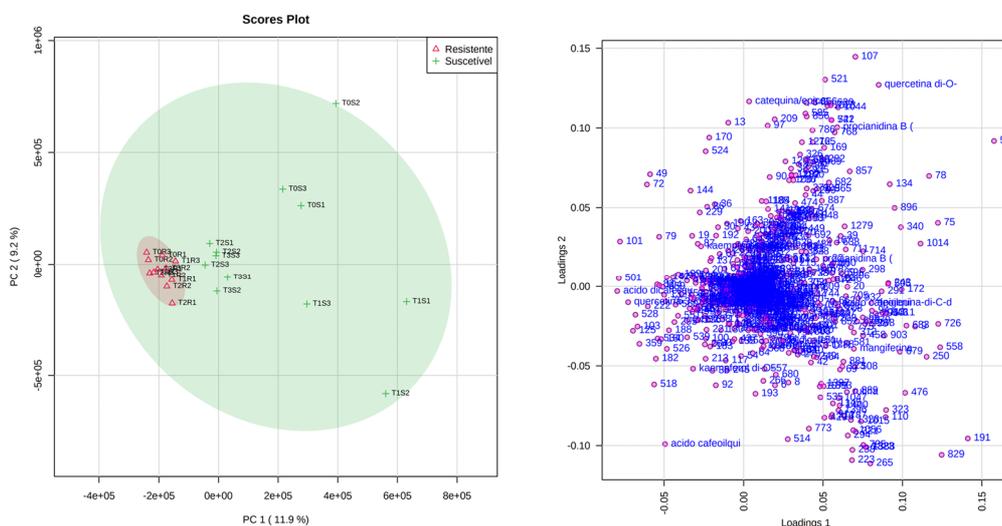
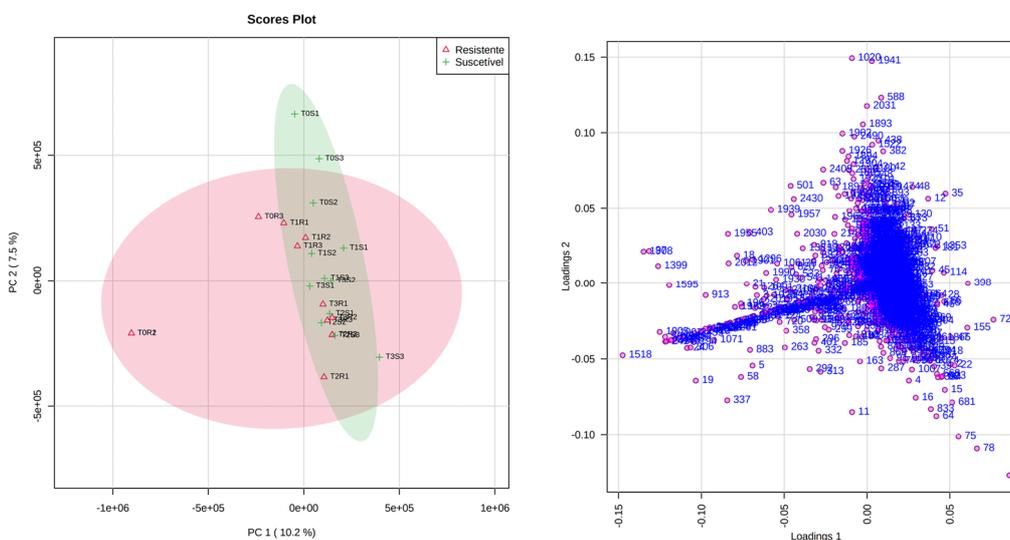


Figura 42 – PCA do modo positivo



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.