

Análise de compostos fenólicos em folhas de cafeeiros resistentes e susceptíveis a *Hemileia vastatrix*^{*/1}

H. V. AMORIM**, M. L. M. ALVARES**, C. R. LOPES***, A. CARVALHO***, I. C. MONACO***

ABSTRACT

The possible relationship between the phenolic compounds in healthy coffee leaves of resistant and susceptible varieties to leaf rust (*Hemileia vastatrix*) was investigated. Young and adult leaves were used for phenolic compounds extracted with 80 per cent methanol and the volume reduced under vacuum. Bidimensional paper chromatography was used for separation of the phenolic compounds, and ultra-violet light (short and long) and different reagents were used for tentative identification. Qualitative differences were found between young and adult leaves (These, differences were not associated with the coffee genotype for resistance to the agent of disease). Resistance to *Hemileia vastatrix* conditioned by SH₂ gene is not associated with phenolic compounds found in the leaves before spore infection. The mechanism of resistance probably is triggered after or during spore germination. The possibility that non phenolic compounds are associated with resistance cannot be excluded.

Introdução

DENTRE os vários compostos relacionados aos mecanismos de resistência a doenças nos vegetais, os fenóis ocupam lugar de destaque, por serem os mais amplamente distribuídos e por terem sido, até o momento, comprovadamente responsáveis pelo maior número de exemplos de resistência e recuperação ao ataque de vários patógenos (25, 7, 28, 14, 8)

Dos mecanismos de resistência conhecidos nenhum deles até o momento foi completamente esclarecido do ponto de vista bioquímico.

Resistência devido à presença de substâncias tóxicas aos patógenos, foi verificada em variedades de cebola resistentes a *Colletotrichum circinans* (26). Plantas resistentes apresentavam níveis mais altos de flavonas, antocianinas, ácido protocatéquico e catecol do que as plantas susceptíveis. Outros trabalhos como os de Martin *et al.* (17) e os de Lee e Le Tourneau (15) comprovaram o mesmo mecanismo de resistência

Apesar dessas provas, vários autores (9, 10, 27) têm apresentado resultados, em outros vegetais, que não confirmam o papel dos compostos fenólicos como determinantes de resistência a doenças

Quanto à formação de substâncias tóxicas aos patógenos após a infecção, diversos trabalhos provam que há um aumento rápido e considerável no teor de compostos fenólicos das plantas hospedeiras após a infecção (22, 23, 12). Kuc (14), enumera uma série de compostos fenólicos sintetizados pelas plantas em resposta a infecção e a injúrias mecânicas, como o ácido cafeico, ácido clorogênico, faseolina, pisatina, orcinol, floretina, hidroquinona e escopolitina. Quanto a essas substâncias, as fitoalexinas, é necessário lembrar que a síntese e seu acúmulo não são especificamente induzidos por patógenos. Estímulos químicos e mecânicos também induzem sua produção (24, 19, 6). Provavelmente as plantas em geral têm o poder de sintetizá-las e a infecção pelo patógeno poderia ser considerada apenas como um desencadeador dessa síntese pelo hospedeiro.

No que se refere ao cafeeiro, Echanti e Fernández (7) estudaram o mecanismo de resistência ao cancro do tronco causado por *Ceratocystis fimbriata*, tendo verificado ocorrência de um maior teor de ácidos fenólicos (clorogênico, férulico, caféico, p-cumárico) nas plantas resistentes e nos troncos jovens. Por sua vez, Zuluaga *et al.* (28) verificaram que a resistência do cafeeiro ao ataque de *C. fimbriata* esta diretamente relacionada com

* Recebido para publicação 12 maio 1978

1/ Com ajuda do Instituto Brasileiro do Café C. R. Lopes é atual Instituto Básico de Biologia Médica e Agrícola, UNESP - Botucatu, S. P., Caixa Postal 102-CEP18600, Brasil

** Departamento de Química, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", USP Piracicaba, S. P. Brasil 13400.

*** Instituto Agronômico do Estado de São Paulo - Campinas S. P. Brasil - Caixa Postal 28 - CEP 13100, Brasil

o maior teor de ácidos fenólicos e inversmente com o maior teor de compostos flavonóides (flavonas, antocianinas, etc.).

Quanto às bases bioquímicas da resistência do cafeeiro a *Hemileia vastatrix*, poucos foram os trabalhos realizados. Bruger e Contreiras (2) conseguiram verificar a existência de maior atividade das polifenoloxidasas em folhas, inoculadas ou não de cafeeiro resistentes a *Hemileia*, em comparação com folhas de plantas susceptíveis.

A determinação de compostos fenólicos totais, reduzidos e oxidados, realizada por Bruger e Contreiras (2) não foi condizente com a teoria da reação de hipersensibilidade ou teoria redox proposta por Királr e Farkas (12), Johnson e Schaal (11), Byrde (3) e Oku (18), em diferentes vegetais.

Carvalho (4) e Carvalho *et al.* (5), trabalhando com cafeeiros resistentes e susceptíveis a duas raças de *Hemileia vastatrix*, encontraram diferenças entre as invertases depois da inoculação do patógeno, assim como no teor de carboidratos solúveis das folhas. Estes autores (4, 5) desenvolveram a hipótese de que a resistência está associada com uma diminuição de carboidratos disponíveis para o patógeno e ou uma mudança no catabolismo destes carboidratos com uma concomitante produção de compostos tóxicos.

A presente investigação foi realizada devido a inconsistência e variedade dos resultados encontrados na literatura e pela necessidade de se conhecer a composição química, quanto aos compostos fenólicos, das folhas dos cafeeiros resistentes, em comparação com as de plantas susceptíveis.

Material e Métodos

O material analisado incluiu variedades de *C. arabica* resistentes e susceptíveis (Quadro 1).

De cada cultivar foram colhidas tres amostras de aproximadamente 30 g de folhas as quais foram postas a secar até peso constante em estufa à $75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Depois de moídas, 2,0 gramas de cada amostra foram extraídas cinco vezes com 100 ml de metanol a 80

Quadro 1 — Plantas de cultivar de *C. arabica*, utilizadas para a análise das folhas quanto à composição em compostos fenólicos

Amostra	Variedades	Genótipos
a	1132-6 (KP 423)	SH ₂ SH ₂ - resistente
b	1136-4 H 66	SH ₂ SH ₂ - resistente
c	1120-26 (X 321)	SH ₂ SH ₂ - resistente
d	LC 367-11-5 (Bourbon Vermelho)	sh ₂ sh ₂ - susceptível
e	CP 375-12-4 (Mundo Novo)	sh ₂ sh ₂ - susceptível

por cento em extrator com refluxo. Os extratos de cada amostra foram reunidos e o volume reduzido a vacuo, à temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 5$, até uma concentração final de 2,5 ml/g de matéria seca e então conservados para uso em atmosfera de nitrogênio à -10°C .

Os compostos foram isolados por cromatografia bidimensional ascendente em papel Whatman N^o 1, tendo sido utilizados como solventes, para a primeira direção n-butanol; ácido acético: água, respectivamente nas proporções de 4:1:2,2 e para a segunda direção, ácido acético a 2 por cento.

Para detecção das manchas isoladas nos melhores cromatogramas foram feitas observações dos mesmos em luz ultravioleta (curta e longa) com e sem vapores de amônia. Foram também realizadas reações com $\text{FeCl}_3 + \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ segundo Barton *et al.* (1), para detecção de fenóis em geral; com SbCl_3 seguida de observação sob luz U. V., segundo Krebs *et al.* (13) para detecção de flavonóides; com vanilina + HCl segundo Swain e Hills (21) e vanilina + ácido p-tolueno sulfônico, segundo Roux e Maihs (20), para determinação de flavonóides com núcleo floglucinol.

As análises foram repetidas em duas épocas diferentes, nas mesmas condições e com os mesmos materiais,

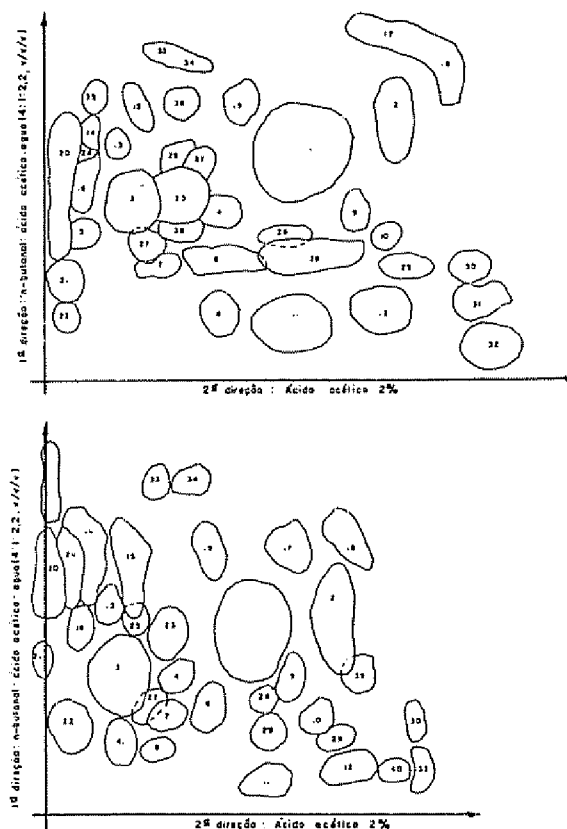


Fig. 1 e 2 — Cromatograma de folhas adultas, 3 e 4^o pares (superior) e de folhas jovens, 1^o e 2^o pares (inferior) de cafeeiros resistentes e susceptíveis a ferrugem

Quadro 2 — Compostos detectados nos cromatogramas de folhas jovens e adultas de cultivares de *C. arabica* susceptíveis e resistentes a *Hemileia vastatrix*

Número das manchas	Identificação Provável dos Compostos	Cultivares*	
		folhas jovens	folhas adultas
1	Acido clorogênico (cis)	abcde	abcde
2	Acido clorogênico (trans)	abcde	abcde
3	Flavonóide	abcde	abcde
4	Flavonóide	abcde	abcde
5	Flavonóide	—	abcde
6	Fenol	abcde	abcde
7	Flavonóide	abcde	abcde
8	?	abcde	abcde
9	Acido neoclorogênico (cis)	abcde	abcde
10	?	abcde	abcde
11	Flavonóide	abcde	abcde
12	Flavonóide	abcde	abcde
13	Flavonóide	abcde	abcde
14	Fenol	abcde	abcde
15	Flavonóide	abcde	abcde
16	Fenol	abcde	abcde
17	Fenol	abcde	abcde
18	Fenol	abcde	abcde
19	Flavonóide com núcleo floroglucinol	abcde	abcde
20	Flavonóide	abcde	abcde
21	Flavonóide	abcde	abcde
22	Flavonóide	abcde	abcde
23	Flavonóide com núcleo floroglucinol	abcde	abcde
24	Fenol	abcde	abcde
25	Flavonóide	c e	abcde
26	Flavonóides com núcleo Floroglucinol	abcde	abcde
27	Flavonóide com núcleo floroglucinol	abcde	abcde
28	Flavonóide	ab d	abcde
29	?	ab d	abcde
30	?	abcde	abcde
31	Flavonóide com núcleo floroglucinol	—	abcde
32	?	bcde	abcde
33	Acido isoclorogênico (cis)	a	abcde
34	Acido isoclorogênico (trans)	a cde	abcde
35	Fenol	—	a cde
36	Flavonóide	—	abcde
37	Flavonóide com núcleo floroglucinol	—	abcde
38	Flavonóide com OH substituído o glicocídio	—	abcde
39	Acido neoclorogênico (trans)	a c e	—
40	Fenol	b de	—
41	?	a d	—

* Cultivares: a= 1132-6(KP 425) - resistente; b= 1136-4 resistentes; c= 1120-26 (X 321) - resistente; d= Bourbon vermelha susceptível; e= mundo novo - susceptível

com a única diferença de que na primeira série de análises (experimento 1) utilizaram-se folhas adultas (3º e 4º pares a partir da ponta do ramo) e na segunda (experimento 2), folhas jovens (1º e 2º pares)

Resultados e Discussão

Cerca de 80 por cento das manchas puderam ser observadas com U.V. curta e longa e com maior clareza quando usaram-se vapores de amônia. Outras manchas só foram detectadas com o auxílio dos reagentes específicos

Nas Figuras 1 e 2 é apresentada a disposição geral nos cromatogramas das manchas detectadas, respectivamente nos experimentos 1 e 2.

O Quadro 2 apresenta a relação total das manchas isoladas, a sua provável identificação e os cultivares em que ocorreram, na análise de folhas jovens e na de folhas adultas

Nos dois experimentos foram isolados 41 compostos, dos quais 32 são comuns a folhas jovens e adultas, mas não de todos os cultivares estudados.

Uma explicação para a variabilidade observada é a de que existe, naturalmente, uma diferença qualitativa entre cultivares de uma mesma espécie, como já foi comprovado por Lopes e Mónaco (16) e também de que possa haver uma diferença quantitativa, ocorrendo manchas em quantidades não detectáveis

Os resultados obtidos por Moraes e colaboradores (comunicação pessoal) de que à atividade da polifenoloxidase aumenta mais rapidamente nas plantas resistentes depois da penetração do fungo, os de Carvalho (4) e Carvalho *et al.* (5) e os deste trabalho preliminar, parecem indicar que o mecanismo de resistência a *Hemileia vastatrix* nas plantas SH_2-SH_2 , inicia-se depois da infecção. Não sabemos se estudos sobre a composição de compostos fenólicos foram realizados em plantas resistentes submetidas à infecção.

No presente trabalho, quanto ao mecanismo de resistência a *Hemileia vastatrix* não foram comprovados mecanismos como aqueles verificados por Echandi e Fernández (7) com relação a infecção do caféiro por *Ceratocytis fimbriata*, nem mesmo como os determinados por Zuluaga *et al.* (28) quanto à resistência de plantas de café ao mesmo patógeno.

Com os resultados conhecidos até o momento não se pode excluir a hipótese de que outro composto não fenólico possa ser o factor de resistência dos cultivares portadores do fator SH_2-SH_2 a alguma reação fisiológica do patógeno

Conclusão

Não foi possível relacionar distribuição diferencial de substâncias fenólicas nos cromatogramas de folhas de caféiros resistentes ou susceptíveis a *Hemileia vastatrix*. Estes resultados indicam que o mecanismo de resistência condicionado pelo fator SH_2-SH_2 não se baseia em inibidores fenólicos préformados mas, provavelmente, em mecanismo que começa a atuar após a infecção na folha do caféiro.

Embora muitos trabalhos sobre resistência ao ataque

de bactérias e fungos em plantas indiquem a participação de compostos fenólicos como fator prévio de resistência, essa hipótese não se aplica ao cafeeiro. Outros compostos como aqueles determinados pelo metabolismo do nitrogênio (proteínas, amino ácidos, amidas), as toxinas, os hormônios reguladores do crescimento, ou ainda diferentes atividades enzimáticas, podem ser responsáveis pela resistência. Da mesma forma não se pode deixar de considerar a possibilidade de que o mecanismo no cafeeiro seja determinado por deficiências nas plantas resistentes, de substâncias essenciais ao patógeno.

Literatura Citada

- 1 BARTON, G.M., EVANS, R.S., e GARNER, J.A.F. Paper chromatography of phenolic substances. *Nature* (London) 170: 249-250 1952.
- 2 BRUGER, J. e CONTREIRAS, J. Aspectos bioquímicos de la resistencia del cafeeiro a *Hemileia vastatrix*. *Portugaliae Acta Biologica* 10: 75-83 1967.
- 3 BYRDE, R.J.W. The varietal resistance of fruits to brown rot: II. The nature of resistance in some varieties of cider apple. *Journal of Horticultural Science* 32: 227-238 1957.
- 4 CARVALHO, P.C.T. Estudos preliminares sobre as invertases de cafeeiros atacados por *Hemileia vastatrix*. *Anais da Escola Superior de Agricultura, "Luiz de Queiroz"*, USP 29: 211-222 1972.
- 5 ——— e ANIUNES RIBEIRO, I.J. Determinação de açúcares totais, sacarose e reductores em cafeeiros inoculados com *Hemileia vastatrix* Berk. e Br. *Summa Phytopatologica* 1(3): 169-176 1975.
- 6 CONDON, P., KUC, J. e DRAUDT, H.N. Production of 3-methoxy-8-hydroxy-3, 4-dihydroisocoumarin by carrot tissue. *Phytopathology* 53: 1244-1250 1963.
- 7 ECHANDI, E. e FERNANDEZ, C.E. Relación entre el contenido de ácido clorogênico y la resistencia a la llaga macana, o cáncer de los cafetos causado por *Ceratocystis fimbriata*. *Turrialba* 12(2): 87-90 1962.
- 8 GOODMAN, R.N., KIRALY, Z., e ZAITLIN, M. Phenol Metabolism. In: *The biochemistry and physiology of infections plant disease*. Princeton, Van Nostrand Co., 1967 pp 187-231.
- 9 HULME, A.C. e EDNEY, K.L. Phenolic substances in the Peel of Cox's Orange Pippin Apples with reference to infection by *G. perennans*. In: *Phenolics in plants health and disease*. J.B. Pridham (Ed.) New York, Pergamon Press, 1960 pp. 87-94.
- 10 JARVIS, W.R. Growth of isolates of *Phytophthora fragariae* Hickman in the presence of various polyphenols. *Transaction of the British Mycological Society* 41: 357-364 1961.
- 11 JOHNSON, G. e SCHALL, I.A. Accumulations of phenolic substances and ascorbic acid in potato tuber tissue upon injury and their possible role in disease resistance. *American Potato Journal* 34: 200-209 1957.
- 12 KIRALY, Z. e FARKAS, G.I. Relations between phenol metabolism and stem rust resistance in wheat. *Phytopathology* 52: 657-664 1962.
- 13 KREBS, K.G., D'HEUSSER, I. e WIMMER, H. Spray Reagents. In: *Thin Layer Chromatography A Laboratory Handbook*. E. Sthal Ed. New York, Spring Verlag, 1969 pp 854-909.
- 14 KUC, J. Phenolic compounds and disease resistance in plants. In: *Proceedings of a Symposium Phenolics in normal and diseased fruits and vegetables*. V.C. Runeckies Ed. 1964 pp 63-81.
- 15 LEE, S. e LE TOURNEAU, D.J. Chlorogenic acid content and *Festibillium Wilt* resistance of potatoes. *Phytopathology* 48: 268-274 1958.
- 16 LOPES, C.R. e MONACO, L.C. Estudos de quimiotaxonomia em cultivares de *Coffea arabica* L. *Turrialba* 27(1): 55-61 1977.
- 17 MARTIN, J.I., BATT, R.F. e BURCHILL, R.F. Defense mechanism of plants against fungi: Fungistatic properties of apple leaf wax. *Nature* 180: 796-797 1957.
- 18 OKU, H. Biochemical studies on *Cochliobolus miyabeanus*: VI. Breakdown of disease resistance of rice plant by treatment with reducing agents. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 25: 92-98 1960.
- 19 PERRIN, D.R. e CRUICKSHANK, J.A.M. Studies on phytoalexins: VII. Chemical stimulation of pisatin formation in *Pisum sativum* L. *Australian Journal of Biological Science* 18: 803-816 1965.
- 20 ROUX, D.G. e MAIHS, A.E. Selective spray reagents for identification and estimation of flavonoid compounds associated with condensed tannins. *Journal of Chromatography* 4: 65-74 1960.
- 21 SWAIN, T. e HILLS, W.E. The phenolic constituents of *Pinus domestica*. I. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 10: 63-68 1959.
- 22 TOMIYAMA, K., TAKASE, N., SAKAI, R. e TAKAKUWA, M. Physiological studies on the defense reaction of potato plant to infection by *Phytophthora infestans*. II. Changes on the physiology of potato tuber induced by the infection of different strains of *P. infestans*. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 29: 59-64 1955.
- 23 ———, TAKASE, N., SAKAI, R. e TAKAKUWA, M. Physiological studies on the defense reaction of potato plant to the infection by *Phytophthora infestans*: I. Changes in the physiology of potato tuber induced by the infection of *P. infestans* and their varietal differences. *Research Bulletin of the Hokkaido Agricultural Experiment Station* 71: 32-50 1956.
- 24 URTIANI, T., URTIANI, M. e YAMADA, H. Similar metabolic alterations induced in sweet potato by poisonous chemicals and by *Ceratostomella fimbriata*. *Phytopathology* 50: 30-34 1960.
- 25 ———. The role of plant phenolics in disease resistance and immunity. Symposium in "Biochemistry of plant phenol substances". Colorado State University, Fort Collins 1961 pp 89-124.
- 26 WALKER, J.C. e LINK, K.P. Toxicity of phenolic compounds to certain onion bulb parasitoid. *Botanical Gazette* 96: 468-484 1935.
- 27 WILLIAMS, A.H. Enzyme inhibition by phenolic compounds. In: *Enzyme Chemistry of Phenolic Compounds*. J.B. Pridham (Ed.) New York, Pergamon Press, 1963 pp 87-93.
- 28 ZULUAGA, V.J., VALENCIA, A.G. e GONZALEZ, J. Contribución al estudio de la naturaleza de la resistencia del cafeeiro a *Ceratocystis fimbriata* (Ell. Halst.) Hunt. *Cenicafé* (Colombia) 22 (2): 43-68 1971.