

**COMPOSTOS SECUNDÁRIOS DE CAFÉ ASSOCIADOS A *COCCUS VIRIDIS***

Flávio Lemes Fernandes<sup>1</sup>; Jorgiane da Silva Benevenuto<sup>1</sup>; Marcelo Coutinho Picanço<sup>1</sup>; Suzana de Sá Moreira<sup>1</sup>; Tarcísio Visintin da Silva Galdino<sup>1</sup>; Renata Ramos Pereira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UFV, Dept<sup>o</sup> de Biologia Animal, 36570-000, Viçosa-MG; flaviolefe@yahoo.com.br

**RESUMO:** A identificação de compostos químicos presentes no cafeeiro pode representar uma importante ferramenta no controle de insetos-praga como a cochonilha verde *Coccus viridis* (Hemiptera: Coccidae). Dessa forma, objetivou-se neste trabalho identificar e quantificar compostos secundários produzidos por *C. arabica* L. como resposta induzida ao ataque de *C. viridis* (Hemiptera: Coccidae) e o efeito destes compostos nesta praga. Esta pesquisa foi realizada em casa de vegetação pertencente a Universidade Federal de Viçosa, nos anos de 2005 e 2006. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e quatro repetições. Cada tratamento foi composto por duas plantas de *C. arabica* (planta 1= infestada e planta 2= não infestada). Quando as plantas atingiram 11 meses de idade elas foram retiradas dos vasos e separadas em raízes, caule e folhas. As folhas foram lavadas com água destilada para eliminação das cochonilhas e dos resíduos existentes. Para identificar e quantificar as substâncias utilizou-se cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC). Foram detectadas diferenças significativas nos teores dos compostos secundários em função do ataque de *C. viridis*.

**Palavras-chaves:** *Coccus viridis*, *Coffea arabica* L, aleloquímicos

**SECONDARY COMPOUNDS ASSOCIATED WITH *COCCUS VIRIDIS* ON COFFEE**

**ABSTRACT:** The identification of chemical compounds present in coffee may represent an important tool in controlling insect pests such as green scale *Coccus viridis* (Hemiptera: Coccidae). Thus, this study aimed to identify and quantify secondary compounds produced by *C. arabica* L. induced in response to the attack of *C. viridis* (Hemiptera: Coccidae) and the effect of these compounds in this pest. This research was conducted in a greenhouse belonging to the University Federal of Viçosa, in the years 2005 and 2006. The experimental design was completely randomized to two treatments and four replications. Each treatment was composed of two plants of *C. arabica* (1 = plants infested and non infested plants = 2). When the plants reached 11 months of age they were removed from pots and separated into roots, stems and leaves. The leaves were washed with distilled water for removal of existing scales and waste. To identify and quantify the substances used were high performance liquid chromatograph (HPLC). Were significant differences in levels of secondary compounds in relation to the attack of *C. viridis*.

**Key words:** *Coccus viridis*, *Coffea arabica* L, alelochemical

**INTRODUÇÃO**

Dentre as pragas do café a cochonilha verde *Coccus viridis* (Hemiptera: Coccidae) causa problemas em plantas jovens de *Coffea arabica* L. e em plantas ou parte do dossel com baixa luminosidade como ocorre em plantios adensados (Hollingsworth, 2000). Esta praga perfura as folhas com seu aparelho bucal picador-sugador e inicia a sucção da seiva e introdução de toxinas. A planta ao ser injuriada pode sofrer modificações bioquímicas como reação ao ataque fitófago. Recentes estudos indicam claramente que plantas podem exibir resistência em resposta aos danos em seus tecidos por um agente causal (Agrawal et al. 1999). No entanto, pode reduzir seu desempenho devido ao custo de síntese de fitoquímicos em resposta ao dano de insetos (Agrawal 1998).

As folhas do cafeeiro possuem vários compostos como fenóis, terpenóides, flavonóides, alcalóides (cafeína), aldeídos, hidrocarbonetos, ácidos clorogênicos, ácidos neoclorogênicos, ésteres, cetonas, pirazinas e cumarinas os quais podem ter importante papel na suscetibilidade dos cafeeiros aos insetos (Kushalapa & Eskes 1989). Dentre esses compostos, os presentes em maiores concentrações nas folhas do cafeeiro são os fenóis e os terpenóides.

Estudos têm sido realizados visando à identificação de compostos químicos presentes no cafeeiro. Esses estudos tem sido feitos no sentido de relacionar os compostos químicos do cafeeiro com a resistência da planta à insetos praga (Magalhães, et al. 2008). No entanto, estes estudos são direcionados para pragas como o bicho mineiro do cafeeiro *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae) e a Broca do café *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Scolytidae). Não havendo estudos com a interação entre os compostos produzidos por plantas do cafeeiro e a cochonilha verde *C. viridis*. Dessa forma, objetivou-se neste trabalho identificar e quantificar compostos secundários produzidos por *C. arabica* L. como resposta ao ataque da cochonilha verde *C. viridis* (Hemiptera: Coccidae).

**MATERIAL E MÉTODOS**

Esta pesquisa foi realizada em casa de vegetação na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil nos anos de 2005 e 2006. Foram utilizadas sementes da linhagem IAC 15 da variedade Catuaí vermelho de café (*C. arabica*). A semeadura ocorreu em bandejas plásticas de (80 cm de comprimento x 5 cm de largura x 10 cm de altura) em substrato tipo arenoso previamente tratado com ácido clorídrico para retirada de argilas, matéria orgânica e nutrientes.

Foi transplantada uma muda por vaso de 3 L quando estas atingiram o estágio de “orelha de onça”. Os nutrientes foram fornecidos as plantas aplicando-se diariamente a areia 0,5L de solução nutritiva. Um recipiente plástico de 3L foi colocado abaixo de cada vaso para coletar a solução que drenava da areia. Este recipiente foi recoberto com papel alumínio para evitar o desenvolvimento de algas no seu interior. Diariamente o volume da solução coletada no recipiente plástico era completado com água destilada até 0,5L. O pH desta solução foi ajustado para a faixa de 5.5 a 6.5 utilizando-se hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol.m<sup>-3</sup>) ou ácido clorídrico (HCl 0,1 mol.m<sup>-3</sup>). Posteriormente esta solução foi reaplicada na areia do vaso acima do recipiente.

As cochonilhas foram coletadas de folhas de café em plantações comerciais em Viçosa, MG. Estas cochonilhas foram criadas em plantas da variedade catuaí vermelho de *C. arabica* mantidas em gaiolas de madeira (100 cm de comprimento x 50 cm de largura x 90 cm de altura) recobertas por organza branca em casa de vegetação diferente daquelas onde se realizaram a pesquisa. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com dois tratamentos e quatro repetições. Cada tratamento foi composto por duas plantas (planta 1= infestada e planta 2= não infestada). Estas plantas foram separadas em duas casas de vegetação vizinhas, para não ocorrer cochonilhas nas plantas não infestadas.

Quando as plantas possuíam oito meses de idade, foram colocadas sobre estas duas folhas contendo cerca de 50 ninfas e 20 adultos por 48 horas. Durante os 110 dias seguintes foram avaliados os números de adultos e de ninfas de primeiro, segundo e terceiro instares em cada parcela. Quando as plantas atingiram 11 meses de idade elas foram retiradas dos vasos e teve suas folhas separadas da planta. As folhas foram acondicionadas em sacos de papel permeável (1L) para a retirada de umidade das folhas. Estas folhas foram levadas para um cômodo contendo um aparelho desumidificador. Seis dias após oito folhas foram moídas, para posterior análise dos compostos secundários.

Após a secagem e moagem das folhas separou-se 1 g de cada amostra em erlenmeyers de 50 mL contendo 20 mL de álcool metílico P.A. para extração dos compostos secundários. Os erlenmeyers foram colocados em banho maria a 50 ± 5 °C por duas horas. O resultante do extrato foi filtrado usando-se papel filtro de 9,0 cm de diâmetro (porosidade 3.0 µm, tipo 10) em funil de vidro com capacidade de 50 mL. O material obtido da filtração foi submetido à evaporação em evaporador rotativo a 45 °C e 500 mmHg de pressão até que restassem 3 mL de extrato.

Para identificação e quantificação dos compostos secundários as amostras armazenadas nos vidros foram diluídas em álcool metílico P.A. até completar o volume de 10 mL. Desta solução retirou-se uma alíquota de 0.5 mL que foi re-diluída em metanol até obter-se 10 mL de solução. Esta solução foi filtrada usando-se uma seringa de vidro de 10 mL acoplada a uma unidade filtrante com membrana de polietileno de 0.45µm de poro (Millipore HV, 13 mm não estéril, fêmea slip). Após a filtragem retirou-se com uma micro-seringa de 100 µL, 20 µL da solução para a injeção em cromatógrafo líquido de alto desempenho (HPLC).

Para se definir o pico e o tempo de retenção de cada composto, os padrões de ácido clorogênico (5-O-cafeoilquínico), cafeína (1,3,7-trimetilxantina), ácido cafeico, teofilina (1,3-dimetilxantina) e teobromina (3,7-dimetilxantina) foram injetados em conjunto e separadamente nas concentrações de 0, 1, 2, 4, 8, 12 e 16%. O tempo de retenção foi utilizado para identificação dos compostos secundários por meio de comparações entre os cromatogramas das amostras com os padrões injetados no HPLC.

Após a identificação realizou-se a quantificação dos teores dos compostos. Confeccionaram-se curvas de calibração entre a área abaixo do pico em função das concentrações. As melhores curvas foram aquelas com coeficiente de determinação de 99,9%. A partir destas curvas e dos resultados das áreas abaixo dos picos quantificaram-se os teores dos compostos secundários.

Os dados dos teores de compostos secundários em plantas infestadas e não infestadas com *C. viridis* obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste Tukey a p<0,01. Além disso, confeccionou-se tabelas com as densidades médias e erro padrão de cada estágio de *C. viridis* nas plantas de *C. arabica*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sistema cromatográfico possibilitou a separação e detecção dos padrões teobromina, cafeína, teofilina, ácido clorogênico e ácido cafeico, nos tempos de retenção de 10,85, 12,01, 14,02, 15,05 e 16,71 minutos, respectivamente. No entanto, os compostos secundários teobromina e teofilina foram identificados em baixas concentrações. Assim, estes compostos não foram considerados nas análises posteriores (Tabela 1).

**Tabela 1** - Identificação dos compostos secundários detectados em folhas de *C. arabica* de plantas não infestadas e infestadas por *C. viridis*.

Plant	Teores dos compostos secundários detectados (PPM) <sup>1</sup>					
	Plantas atacadas					
	Ácido clorogênico	Ácido cafeico	Cafeína	Teobromina	Teofilina	Alantoína
1	963,01	580,20	22,59	1,23	0,92	0,00
2	927,81	739,14	44,11	0,25	0,00	5,25
3	893,72	721,61	83,48	3,25	0,00	3,21
4	880,84	561,53	67,17	6,25	1,02	2,22
----- Plantas Não atacadas -----						
1	7,08	453,35	275,57	0,00	3,25	0,00
2	54,61	436,70	191,00	0,00	0,00	0,00
3	42,07	335,53	220,03	1,00	1,58	0,00
4	30,88	386,64	204,85	1,25	0,00	0,25

<sup>1</sup>Os sinais indicados por traço representam teores não detectáveis do composto.

Foram detectadas diferenças significativas nos teores dos compostos secundários em função do ataque de *C. viridis* (F= 242,23; p<0,001; c.v.= 13,07%). Além disso, houve diferenças entre os teores de cada composto (F= 139,64; p<0,001; c.v.= 13,07%) e a interação entre os compostos e os tratamentos (F= 220,20; p<0,001; c.v.= 13,01%).

Os teores dos compostos secundários ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína foram superiores em plantas de *C. arabica* atacadas do que em plantas não atacadas por *C. viridis*. O composto com maior concentração em plantas atacadas foi o ácido clorogênico (809,98 ppm), seguido por ácido cafeico (626,73 ppm) e cafeína (184,91 ppm). Por outro lado, as plantas não atacadas apresentaram como composto mais concentrado o ácido cafeico (391,92 ppm), cafeína (55,21 ppm) e ácido clorogênico (27,45 ppm) (Tabela 2).

**Table 2** - Média ± erro padrão da concentração de ácido clorogênico, ácido cafeico e cafeína em folhas de *C. arabica* L. atacadas e não atacadas por *Coccus viridis* (Hemiptera: Coccidae)

Tratamentos	Compostos secundários (ppm) <sup>a</sup>		
	ácido clorogênico	ácido cafeico	cafeína
Plantas atacadas	809,98 ± 44,52 Aa	626,73 ± 30,71 Ab	184,91 ± 21,61 Ac
Plantas Não atacadas	27,45 ± 6,54 Ba	391,92 ± 15,42 Bb	55,21 ± 9,11 Bc

<sup>a</sup>Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a p<0.01.

O fato das plantas de *C. arabica* atacadas terem apresentado maior concentração dos fitoquímicos (cafeína, ácido cafeico e ácido clorogênico). A planta em condições de estresse pode aumentar a síntese de compostos secundários (Buschmann et al 2005), dessa forma o ataque de *C. viridis* a plantas de café, pode ter contribuído para o aumento destes compostos. A habilidade das plantas em induzir resistência devido a ação de insetos foi descoberta por bioquímicos e ecologistas em 1970. A capacidade da planta induzir resistência pode ser afetada por fatores bióticos, tais como a ação de insetos fitófagos. Várias famílias de plantas tem apresentado resposta induzida devido o ataque fitófago. verificaram que um par de folhas de diversas espécies de cafeeiros sofre o ataque por *Leucoptera coffeella* (Lepidoptera: Lyonetiidae), ocorre aumento na concentração de cafeína em relação a folha não atacada.

Além da cafeína existem outros compostos presentes nos cafeeiros capazes de provocar a redução no tempo de vida de insetos estes podem ser os precursores da cafeína: (guaninosina monofosfato, adenosinamonofosfato, xantosina, 7-metilxantosina, 7-metilxantina, teobromina, paraxantina, 3-metilxantina e teofilina), bem como os produtos do metabolismo da cafeína: (teofilina, 3metilxantina, xantina, ácido úrico, alantoína, ácido alantóico e amônia (NH<sub>3</sub>)), além de ácidos fenólicos (ácido cafeoil5-O-quinico) e substâncias com característica de flavonóides e terpenos (Ashihara; Crozier, 1999). Dentre os ácidos fenólicos, ácido cafeico, p-cumarico, ferúlico, o-cumárico, 3,4 dimetoxicinamico, 3,4,5-trimetoxicinâmico e 4-metoxicinâmico, trigonelina, têm sido relatadas em cafeeiros (Andrade et al., 1997).

## CONCLUSÃO

Plantas de *C. arabica* atacadas por *C. viridis* produzem maior concentração dos compostos secundários ácido colrogênico, ácido cafeico e cafeína.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao PNP&D/Café pelo financiamento do projeto e pelas bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, A.A. Induced responses to herbivory and increased plant performance. **Science**, 279:1201-1202, 1998.
- AGRAWAL A.; STRAUSS S.; STOUT M. Cost of induced responses and tolerance to herbivory in male and female fitness components of wild radish. **Evolution** 53:1093-104, 1999.
- ANDRADE, P. B.; LEITÃO, R.; SEABRA, R. M.; OLIVEIRA, M. B. & FERREIRA, M.A. Development of an hplc/diode array detector method for simultaneous determination of seven hydroxy cinnamic acids in green coffee. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 20: 2031-2039, 1997
- ASHIHARA, H.; CROZIER, A. Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. **Advances in Botanical Research** 30: 117-205, 1999.
- BUSCHMANN, H., EDWARDS, P., DIETZ, H. Variation in growth pattern and response to lug damage among native and invasive provenances of four perennial Brassicaceae species. **Journal of Ecology** 93; 322-334, 2005.
- HOLLINGSWORTH, R.G. Green scale as a quarantine pest in Hawaii. *Chronica Horticulturae*. **Magazine of the International Society for Horticultural Science** 10: 15-17, 2000.
- KUSHALAPA, A.C.; ESKES, A.B. Coffee rust: Epidemiology, resistance and management. Boca Raton: CRC, 1989. 345p.
- MAGALHÃES, S.T.V.; GUEDES, R.N.C.; LIMA, E.R.; DEMUNER, A.J. Coffee leaf volatiles and egg laying by the coffee leaf miner *Leucoptera coffeella*. **Crop Protection** 27: 1038-1041, 2008.