



**DYANNA RANGEL PEREIRA**

**CONTROLE GENÉTICO E QUÍMICO DA FERRUGEM DO  
CAFEEIRO E SUA RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DA  
DOENÇA, PRODUTIVIDADE, COMPOSIÇÃO QUÍMICA,  
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUALIDADE DO CAFÉ**

**LAVRAS – MG  
2021**

**DYANNA RANGEL PEREIRA**

**CONTROLE GENÉTICO E QUÍMICO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO E SUA  
RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DA DOENÇA, PRODUTIVIDADE, COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUALIDADE DO CAFÉ**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

Pesquisador Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Pereira, Dyanna Rangel.

Controle genético e químico da ferrugem do cafeeiro e sua  
relação com a expressão da doença, produtividade, composição  
química, atividade antioxidante e qualidade do café / Dyanna  
Rangel Pereira. - 2021.

104 p. : il.

Orientador(a): Gladyston Rodrigues Carvalho.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. Cafeicultura. 2. Ferrugem do cafeeiro. 3. Qualidade do café.  
I. Carvalho, Gladyston Rodrigues. II. Título.

**DYANNA RANGEL PEREIRA**

**CONTROLE GENÉTICO E QUÍMICO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO E SUA  
RELAÇÃO COM A EXPRESSÃO DA DOENÇA, PRODUTIVIDADE, COMPOSIÇÃO  
QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUALIDADE DO CAFÉ**

**GENETIC AND CHEMICAL CONTROL OF COFFEE RUST AND ITS  
RELATIONSHIP WITH DISEASE EXPRESSION, YIELD, CHEMICAL  
COMPOSITION, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND COFFEE QUALITY**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, área de concentração em Produção Vegetal, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 31 de março de 2021.

Dr. Samuel Pereira de Carvalho	UFLA
Dr. Marcelo Ribeiro Malta	EPAMIG
Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa	EMBRAPA
Dr. Mário Lúcio Vilela de Resende	UFLA

Pesquisador Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2021**

*Aos meus pais, Maristela e Célio, e ao meu companheiro Rodrigo, pelo apoio em todos os momentos, tornando possível esta conquista.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Primeiramente agradeço a Deus, por ter guiado e iluminado cada passo meu até que eu chegasse aqui.

Aos meus pais, Maristela e Célio, e à minha irmã Luana, por todo o apoio, incentivo e compreensão em todas as fases dessa minha formação pessoal e profissional.

Ao Rodrigo, por sempre me mostrar que eu seria capaz, pelo amor, companheirismo e por ser a pessoa com quem amo partilhar a vida.

Aos meus amigos, por toda a consideração e carinho.

Aos meus orientadores, Dr. Gladyston Rodrigues Carvalho e Dr. Samuel Pereira de Carvalho, pela confiança, ensinamentos, empenho e profissionalismo, sendo exemplos de profissionais nos quais me inspiro.

Ao Dr. Marcelo Ribeiro Malta, por todo o apoio, dedicação e disponibilidade em contribuir em todas as etapas de desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas da EPAMIG, pela amizade, momentos de descontração, troca de conhecimentos e apoio na condução dos experimentos.

Aos demais professores do curso e funcionários da UFLA e EPAMIG, que contribuíram para a minha formação e para a realização deste trabalho.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, pela disponibilização da estrutura e recursos, pela parceria, colaboração, e por promover o contato com excelentes pesquisadores e funcionários, fundamentais para o meu crescimento pessoal e profissional.

Ao CNPq, à CAPES, à Fapemig, ao Consórcio Pesquisa Café, à EMBRAPA e ao INCT Café pelo apoio no desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade concedida e estrutura disponível para a realização do trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que contribuíram de alguma forma para a minha formação acadêmica e pessoal.

Muito obrigada!

## RESUMO

Objetivou-se verificar a eficiência do controle genético e químico da ferrugem e sua influência no progresso da doença e produtividade do cafeeiro, os efeitos da ferrugem e de suas formas de controle na atividade de enzimas antioxidantes e teores de metabólitos de folhas e frutos, e na composição mineral de folhas. Além disso, avaliar os efeitos da expressão da ferrugem e suas formas de controle na qualidade do café. O experimento foi conduzido no Banco Ativo de Germoplasma de *Coffea* spp. de Minas Gerais, Brasil, no Campo Experimental de Patrocínio (CEPC). Foram avaliados quatro genótipos de café arábica, dos grupos Híbrido de Timor (HT) (MG0277 e MG0313) e Bourbon (MG0006 e MG0012), com e sem tratamento químico para controle de ferrugem (Verdadero 600 WG®, Ciproconazol + Tiametoxan, 1,0 kg.ha<sup>-1</sup>). Nas plantas não tratadas para controle de ferrugem, realizou-se controle de bicho mineiro (Actara 250 WG®, Tiametoxan, 1,0 kg.ha<sup>-1</sup>). As avaliações de incidência e severidade de ferrugem e as coletas de folhas e frutos para análise da atividade enzimática, e de frutos para a análise química, ocorreram nos estádios de maturação verde, verde-cana e maduro. Após a colheita, foi realizada coleta de folhas para análise mineralógica foliar de macro e micronutrientes. As produtividades em sacas de café beneficiado por hectare (SC ha<sup>-1</sup>) foram obtidas por meio da pesagem do café beneficiado após a secagem (12 % de umidade). Após o processamento via seca e preparo das amostras, realizou-se avaliações químicas e físicas do grão, e sensorial da bebida. Todas as avaliações foram realizadas na safra de 2018/19. Existe variabilidade no grupo HT para resistência à ferrugem, sendo o MG0277, resistente, e o MG0313, suscetível. O controle genético é pelo menos tão eficiente quanto o químico, com resposta diferencial dos genótipos ao uso de defensivo. Não houve efeito do controle químico sobre a produtividade na primeira safra após a infestação e os genótipos apresentaram produtividade semelhante, com ou sem uso de defensivo. O controle químico não afeta o teor de nutrientes nas folhas, mas a expressão da ferrugem está associada ao teor desses nutrientes. A atividade das enzimas antioxidantes e os teores de metabólitos nas folhas e frutos estão relacionados à expressão da ferrugem e são afetados pelo tipo de controle e estágio de maturação, indicando uma resposta sistêmica da planta à infecção. Os controles genético e químico são eficazes na redução dos prejuízos provocados pela doença na composição dos grãos. Genótipos com ascendência resistente, mesmo que apresentem quebra de resistência, respondem melhor ao controle químico, refletindo positivamente na qualidade do grão e da bebida. Os componentes químicos e físico-químicos dos grãos que foram afetados pela ferrugem, se associam com atributos avaliados na análise sensorial. Cafés com maior e menor frequência de notas de sabor ‘frutadas’ e ‘achocolatadas’, respectivamente, como os HT, apresentam maior nota total na análise sensorial, independentemente do uso de controle químico. A combinação do controle genético e químico favorece o aumento do teor de açúcares nos grãos, a nota sensorial total e a riqueza de sabores percebidos.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. *Hemileia vastatrix* Berk et. Br. Híbrido de Timor. Triazol. Atividade antioxidante. Composição química. Análise foliar. Maturação. Qualidade.

## ABSTRACT

The objective of this study was to verify the efficiency of rust genetic and chemical control and its influence on disease progress and coffee yield, the effects of rust and its control forms on the activity of antioxidant enzymes and metabolite levels of leaves and fruits and on leaf mineral composition, in addition to evaluating the effects of rust expression and its control forms on coffee quality. The experiment was conducted in the Germplasm Active Bank of *Coffea* spp., in Minas Gerais, Brazil, in the Experimental Field of Patrocínio (CEPC). Four arabica coffee genotypes were evaluated, from the groups Híbrido de Timor (HT) (MG0277 and MG0313) and Bourbon (MG0006 and MG0012), with and without chemical treatment for rust control (Verdadero 600 WG® - Cyproconazole + Thiamethoxam, 1.0 kg.ha<sup>-1</sup>). In plants not treated for rust control, the leaf miner was controlled (Actara 250 WG®, Thiamethoxam, 1.0 kg.ha<sup>-1</sup>). The assessments of rust incidence and severity, as well as the collection of leaves and fruits for analysis of enzymatic activity and of fruits for chemical analysis occurred when the fruits were green, sugarcane-green and ripe. After harvesting, leaves were collected for leaf mineralogical analysis of macro- and micronutrients. Yields in bags of processed coffee per hectare (SC ha<sup>-1</sup>) were measured by weighing the processed coffee after drying (12% moisture). After dry processing and sample preparation, chemical and physical evaluations of the bean and sensory assessments of the beverage were carried out. All evaluations were performed in the 2018/19 harvest. There is variability in the HT group for rust resistance, with MG0277 resistant and MG0313 susceptible. Genetic control is at least as efficient as chemical control, with a differential response of genotypes to the use of pesticides. There was no effect of chemical control on yield in the first harvest after infestation and the genotypes showed similar yield, with or without the use of pesticides. Chemical control does not affect nutrient content in the leaves, but rust expression is associated with the content of these nutrients. The activity of antioxidant enzymes and the levels of metabolites in leaves and fruits are related to rust expression and are affected by the type of control and ripening stage, indicating a systemic response of the plant to the infection. Genetic and chemical controls are effective in reducing the damage caused by the disease in bean composition. Genotypes with resistant ancestry, even with resistance breakdown, respond better to chemical control, reflecting positively on bean and beverage quality. The chemical and physicochemical components of beans that were affected by rust are associated with attributes evaluated by sensory analysis. Coffees with a higher and lower frequency of “fruity” and “chocolate” flavor notes, respectively, such as HT, have a higher total score in sensory analysis, regardless of the use of chemical control. The combination of genetic and chemical control favors an increase in the sugar content in the beans, the total sensory score and the richness of perceived flavors.

Keywords: *Coffea arabica* L. *Hemileia vastatrix* Berk et. Br. “Híbrido de Timor”. Triazole. Antioxidant activity. Chemical composition. Leaf analysis. Ripening. Quality.

## SUMÁRIO

<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO ..... 12</b>
	<b>REFERÊNCIAS ..... 14</b>
<b>SEGUNDA PARTE - ARTIGOS* ..... 16</b>	
<b>ARTIGO 1 - INFLUÊNCIA DA RESISTÊNCIA GENÉTICA NA EFICIÊNCIA DO CONTROLE QUÍMICO DA FERRUGEM DO CAFEIRO ..... 17</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO ..... 17</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS ..... 19</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS ..... 21</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO ..... 26</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES ..... 30</b>
	<b>REFERÊNCIAS ..... 30</b>
<b>ARTIGO 2 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ EM FUNÇÃO DO CONTROLE GENÉTICO OU QUÍMICO DA FERRUGEM..... 33</b>	
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO ..... 33</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS ..... 35</b>
<b>2.1</b>	<b>Descrição do experimento ..... 35</b>
<b>2.2</b>	<b>Avaliação da ferrugem ..... 35</b>
<b>2.3</b>	<b>Avaliação da atividade enzimática em folhas e frutos ..... 36</b>
<b>2.4</b>	<b>Análises da composição químicas dos frutos de café..... 38</b>
<b>2.5.</b>	<b>Análise de compostos fenólicos nas folhas..... 39</b>
<b>2.6</b>	<b>Análise mineralógica foliar ..... 39</b>
<b>2.7</b>	<b>Análises estatísticas dos dados..... 40</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS ..... 40</b>
<b>3.1</b>	<b>Folhas..... 40</b>
<b>3.2</b>	<b>Frutos..... 45</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO ..... 45</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES ..... 53</b>
	<b>REFERÊNCIAS ..... 53</b>

	<b>ARTIGO 3 - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NO CAFÉ EM FUNÇÃO DA MATURAÇÃO E DO MÉTODO DE CONTROLE DA FERRUGEM .....</b>	<b>57</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>57</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>59</b>
<b>2.1</b>	<b>Descrição do experimento.....</b>	<b>59</b>
<b>2.2</b>	<b>Avaliação da ferrugem.....</b>	<b>60</b>
<b>2.3</b>	<b>Avaliação da atividade enzimática em folhas e frutos .....</b>	<b>60</b>
<b>2.4</b>	<b>Análises da composição químicas dos frutos .....</b>	<b>62</b>
<b>2.5</b>	<b>Análise de compostos fenólicos nas folhas.....</b>	<b>63</b>
<b>2.6</b>	<b>Análises estatísticas dos dados.....</b>	<b>63</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
<b>3.1</b>	<b>Alterações na produção de metabólitos ao longo da maturação dos frutos de café .....</b>	<b>64</b>
<b>3.2</b>	<b>Atividade enzimática nos frutos e nas folhas de café ao longo da maturação ....</b>	<b>65</b>
<b>3.3</b>	<b>Incidência e severidade da ferrugem nas folhas do cafeeiro durante a maturação dos frutos .....</b>	<b>66</b>
<b>3.4</b>	<b>Estimativas de correlação da incidência e severidade da ferrugem com as demais variáveis analisadas.....</b>	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>76</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>76</b>
	<b>ARTIGO 4 - CONTROLE GENÉTICO E QUÍMICO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO: IMPACTOS NA QUALIDADE DO CAFÉ.....</b>	<b>80</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
<b>2.1</b>	<b>Descrição do experimento.....</b>	<b>81</b>
<b>2.2</b>	<b>Avaliação da ferrugem.....</b>	<b>82</b>
<b>2.3</b>	<b>Colheita e processamento do café .....</b>	<b>82</b>
<b>2.4</b>	<b>Análises químicas e físico-químicas dos grãos de café .....</b>	<b>83</b>
<b>2.5</b>	<b>Análise sensorial .....</b>	<b>84</b>
<b>2.6</b>	<b>Análise dos dados.....</b>	<b>85</b>
<b>3</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>85</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>94</b>

<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>101</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>101</b>

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1 INTRODUÇÃO

A ferrugem do cafeeiro é considerada a principal doença da cultura, em abrangência e em danos em todos os países produtores (CAPUCHO *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2017; ROMERO *et al.*, 2014). Dependendo das condições climáticas, do estado nutricional das plantas e da carga pendente, essa doença, na ausência de medidas de controle, pode provocar perdas na produção de 35 a 50% em média do biênio (CAPUCHO *et al.*, 2013; ZAMBOLIM, 2016).

O controle da ferrugem pode ser eficientemente realizado tanto por medidas de natureza química, quanto genética (ROMERO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2006). No Brasil, no período de 1999 a 2019, foram disponibilizadas 132 cultivares melhoradas de cafeeiro, sendo 76 delas selecionadas para a resistência à ferrugem utilizando germoplasma derivado de Híbrido de Timor, um híbrido natural entre *C. arabica* e *C. canephora*, bem como derivados do cafeeiro IAC 1330, um tetraploide artificial de *C. canephora* (MAPA, 2019).

Entretanto, a maior parte dos cultivos de café arábica no país ainda é constituída pelas cultivares Mundo Novo e Catuaí, suscetíveis à ferrugem (CARVALHO; CUNHA; SILVA, 2012; CARVALHO *et al.*, 2013). Assim, o controle químico é a medida mais adotada, por meio do uso de fungicidas protetores, como os cúpricos (POZZA; CARVALHO; CHALFOUN, 2010; SILVA, 2018) ou sistêmicos, como os do grupo químico triazol, que são aplicados na folha e/ou solo ou em mistura com estrobilurinas nas folhas (ZAMBOLIM, 2016).

Porém, flutuações no preço do café influenciam a decisão do produtor a respeito do manejo da lavoura, o que reflete na incidência e severidade da doença (TALHINHAS *et al.*, 2017). Desta forma, a combinação de resistência genética e práticas de controle é recomendada no manejo integrado da doença (ECHEVERRIA-BEIRUTE *et al.*, 2018).

Para isso, é importante compreender de que forma a planta responde à infecção pelo patógeno quando se adota o controle químico ou genético. Ou seja, quais são as alterações provocadas no metabolismo e composição das folhas, órgãos diretamente afetados pela ferrugem, quando há ocorrência da doença em plantas suscetíveis ou resistentes, bem como, quando se adota o controle químico da doença.

Cafeeiros resistentes à ferrugem apresentam como mecanismos de defesa uma grande liberação de  $H_2O_2$ , uma rápida e localizada morte da célula vegetal, associada à restrição do crescimento de fungos, além do aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase do ascorbato (APX) (GUERRA-GUIMARÃES *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2002, 2008). Também é constatada a deposição de

compostos fenólicos, acumulação de calose e lignificação da parede celular na zona de infecção, limitando o crescimento do fungo (DINIZ *et al.*, 2012; GUERRA-GUIMARÃES *et al.*, 2009; RAMIRO *et al.*, 2009; SILVA, 2018; SILVA *et al.*, 2002; 2008). Assim, o monitoramento da atividade de enzimas antioxidantes e da composição dos tecidos pode ser usado como um indicador dos mecanismos de defesa ativados na planta (LARRÉ *et al.*, 2016).

Entretanto, são escassas na literatura, as informações sobre quais mecanismos de defesa das plantas são induzidos pelo uso do controle químico. Outro ponto pouco elucidado é a possibilidade de um dano no tecido foliar, provocado por um patógeno, ter reflexo no metabolismo e composição de outros órgãos da planta quando se adota o controle genético ou químico. Sabe-se que a ocorrência de doenças, ainda que não diretamente nos frutos, pode provocar modificações no metabolismo da planta, levando a alterações na composição química dos grãos, o que, conseqüentemente, se reflete em uma bebida de qualidade inferior. É necessário, entretanto, que se especifique quais aspectos da qualidade do café são, de fato, afetados por doenças como a ferrugem e suas formas de controle (BELAY *et al.*, 2016; RIBEYRE; AVELINO, 2012; SILVA *et al.*, 2015), uma vez que a valorização do café no mercado está intimamente ligada à sua qualidade.

Diante do exposto, objetivou-se verificar a eficiência do controle genético e químico da ferrugem, bem como sua influência na evolução da doença e na produtividade de café. Também buscou-se conhecer os efeitos da ocorrência de ferrugem e suas formas de controle na atividade de enzimas antioxidantes de folhas e frutos, nos teores de metabólitos dos frutos e na composição mineral de folhas, considerando ou não o progresso da doença ao longo dos estádios de maturação. Além disso, desejou-se avaliar quais os reflexos da expressão da ferrugem e suas formas de controle sobre diferentes aspectos ligados à qualidade do café, desde a composição química, físico-química e classificação física do grão, até a avaliação sensorial e seu perfil de nuances de sabores. Os resultados deste estudo podem contribuir para o entendimento das rotas de defesa ativadas na planta pelo controle genético e químico em resposta ao progresso da doença, assim como seus efeitos no produto final em termos quantitativos e qualitativos, de forma a facilitar a decisão do produtor sobre um manejo da ferrugem mais eficiente e sustentável.

## REFERÊNCIAS

- BELAY, S. *et al.* Factors affecting coffee (*Coffea arabica* L.) quality in ehtiopia: a review. **Journal of Multidisciplinary Scientific Research**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 27-33, 2016.
- CAPUCHO, A. S. *et al.* Climate favorability to leaf rust in Conilon coffee. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 42, n. 5, p. 511–514, 2013.
- CAPUCHO, A. S. *et al.* Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV 443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. **Revista Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 276-282, 2009.
- CARVALHO, A. M. *et al.* Desempenho agrônômico de cultivares de café resistentes à ferrugem no estado de Minas Gerais, Brasil. **Bragantia**, [S. l.], v. 71, n. 4, p. 481-487, 2013.
- CARVALHO, A. M. *et al.* Comportamento de cultivares de cafeeiro sob a incidência das doenças da ferrugem e cercosporiose em dois ambientes de cultivo. **Coffee Science**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 100, 30 mar. 2017.
- CARVALHO, V. L.; CUNHA, R. L.; SILVA, N. R. N. Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. **Coffee Science**, Lavras, v. 7, n. 1, p. 42-49, 2012.
- DINIZ, I. *et al.* Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 133, n. 1, p. 141-157, 2012.
- ECHEVERRIA-BEIRUTE, F. *et al.* Rust and thinning management effect on cup quality and plant performance for two cultivars of *Coffea arabica* L. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 66, n. 21, p. 5281-5292, 2018.
- GUERRA- GUIMARÃES, L. *et al.* Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. **Biologia Plantarum**, [S. l.], v. 53, n. 4, p. 702-706, 2009.
- GUERRA-GUIMARÃES, L. *et al.* Differential induction of superoxide dismutase in *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COFFEE SCIENCE, 22., 2008, Campinas. **Proceedings...** Campinas: ASIC, 2008. p. 14-19.
- LARRÉ, C. F. *et al.* Antioxidant activity and fermentative metabolism in the plant *Erythrina crista-galli* L. under flood conditions. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 37, n. 2, p. 567-580, 2016.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Registro nacional de cultivares**. Brasília: MAPA, 2019. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: 09 nov. 2019.
- POZZA, E. A.; CARVALHO, L. C.; CHALFOUN, S. M. Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: GUIMARÃES, R. J.; MENDES, A. N. G.; BALIZA, D. P. (Ed.). **Semiologia do cafeeiro: sintomas de deosrdens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas**. Lavras: UFLA, 2010. p. 68-106.

- RAMIRO, D. A. *et al.* Biphasic haustorial differentiation of coffee rust (*Hemileia vastatrix* race II) associated with defence responses in resistant and susceptible coffee cultivars. **Plant Pathology**, Bethesda, v. 58, n. 5, p. 944-955, 2009.
- RIBEYRE, F.; AVELINO, J. Impact of field pests and diseases on coffee quality. *In*: OBERTHÜR, T.; LÄDERACH, P.; COCK, J. H. (Ed.). **Specialty coffee: managing quality**. Southeast Asia: IPNI, 2012. p. 151-176.
- ROMERO, G. *et al.* 2014. Identification of a major QTL for adult plant resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) in the natural Timor hybrid (*Coffea arabica* x *C. canephora*). **Plant Breeding**, [S.l.], v. 133, n. 1, p. 121–129, 2014.
- SILVA, A. C. A. *et al.* Fitossanidade do cafeeiro: relação com a qualidade sensorial. *In*: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 10., 2015, Curitiba, **Anais...** Curitiba [S. n.], p. 1-5.
- SILVA, J. A. G. **Indutores de resistência e demais associações no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*): análises bioquímicas e fisiológicas**. 2018. 131 p. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2018.
- SILVA, M. C. *et al.* Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [S.l.], v. 18, n. 1, p. 119-147, 2006.
- SILVA, M. C. *et al.* Hypersensitive cell death and post-haustorial defence responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 60, n. 4, p. 169-183, 2002.
- SILVA, M. C. *et al.* Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 72, n. 1, p. 29-38, 2008.
- TALHINHAS, P. *et al.* The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics: Coffee leaf rust caused by *Hemileia vastatrix*. **Molecular Plant Pathology**, [S.l.], n. 18, p. 1039–1051, 2017.
- ZAMBOLIM, L. Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. **Tropical plant pathology**, [S.l.], v. 41, p. 1–8, 2016.

**SEGUNDA PARTE – ARTIGOS\***

## ARTIGO 1

# INFLUÊNCIA DA RESISTÊNCIA GENÉTICA NA EFICIÊNCIA DO CONTROLE QUÍMICO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO

Coffee Science

(Versão preliminar)

### RESUMO

A ferrugem do cafeeiro pode ser controlada eficientemente por medidas de natureza genética ou química. O uso de cultivares resistentes é a alternativa mais indicada. Entretanto, grande parte do parque cafeeiro brasileiro é constituída por cultivares suscetíveis, sendo o controle químico, o mais adotado. Objetivou-se verificar a eficiência do controle genético e químico da ferrugem e sua influência na evolução da doença e na produtividade. Quatro genótipos de café arábica foram avaliados, os quais pertencem a dois grupos: a) Híbrido de Timor (HT) representado pelos genótipos MG0277 e MG0313, e b) Bourbon, representado pelos genótipos MG0006 e MG0012. Os tratamentos foram: com controle químico da ferrugem (Verdadero 600 WG<sup>®</sup>, Ciproconazol + Tiametoxan, 1,0 kg.ha<sup>-1</sup>) e sem controle de ferrugem. As avaliações de incidência e severidade de ferrugem ocorreram nos estádios de maturação verde, verde-cana e maduro. As produtividades em sacas de café beneficiado por hectare (SC ha<sup>-1</sup>) foram obtidas por meio da pesagem do café beneficiados após a secagem (12 % de umidade). O genótipo MG0277 apresentou resistência à ferrugem enquanto o MG0313 foi suscetível. O controle genético é no mínimo tão eficiente quanto o controle químico e os genótipos respondem de forma diferente ao uso de fungicida. A expressão da doença é influenciada pela época de avaliação, e os genótipos expressam a doença de forma diferente ao longo da maturação dos frutos. Não houve efeito do controle químico sobre a produtividade, e os genótipos apresentaram produtividade semelhante, com ou sem uso de defensivo. Demonstrou-se pela primeira vez que genótipos de background resistente, como os HT, ainda que se comportem como suscetíveis, respondem de forma mais eficiente ao controle químico da ferrugem, sendo uma vantagem a mais da adoção de cultivares resistentes na busca de uma cafeicultura mais sustentável.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Coffea arabica* L.; *Hemileia vastatrix* Berk et. Br.; incidência; severidade; produtividade; Híbrido de Timor

### 1. INTRODUÇÃO

A ferrugem do cafeeiro é considerada a principal doença da cultura em todos os países produtores (CAPUCHO et al., 2009; CARVALHO et al., 2017; ECHEVERRIA-BEIRUTE et al., 2018). Apesar dos avanços

na pesquisa durante os mais de 45 anos, desde a sua identificação no Brasil, essa doença ainda impõe significativa ameaça à produção de café no país (ZAMBOLIM, 2016).

Os principais prejuízos causados pela ferrugem, cujo agente etiológico é o fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk et. Br., estão relacionados à redução da área foliar pela formação de lesões e queda prematura das folhas, resultando em redução na eficiência fotossintética e vigor da planta. A desfolha provoca redução no crescimento de ramos produtivos, já que os fotoassimilados produzidos são direcionados aos frutos da safra atual, prejudicando a safra seguinte (ADEPOJU et al., 2017). Dependendo das condições climáticas, do estado nutricional das plantas e carga pendente, essa doença, na ausência de medidas controle, pode provocar perdas na produção de 35 a 50% (ZAMBOLIM et al., 2005; ZAMBOLIM, 2016).

O controle da ferrugem pode ser realizado tanto por medidas de natureza química quanto genética (SILVA et al., 2006). Porém, cultivares resistentes são a melhor alternativa para o controle da doença (CAPUCHO et al., 2009). Isso porque os efeitos do controle químico no meio ambiente e em organismos não-alvo podem levar ao aumento populacional de pragas e outras doenças (de BRITO et al., 2010). Além disso, a pressão de seleção exercida sobre o patógeno com essa estratégia de controle, pode induzir a emergência de novas raças resistentes do fungo, o que pode ocorrer também na resistência genética (VÁRZEA; MARQUES, 2005). O uso de fungicidas na agricultura tem efeito negativo também na contaminação do meio ambiente e dos trabalhadores, bem como contribui para o aumento nos custos de produção, podendo chegar a quase 50% do custo total em condições favoráveis à doença (CARVALHO et al., 2012). Outro desafio se refere à dificuldade de aplicação, principalmente em lavouras implantadas em áreas de declividade acentuada ou no sistema de plantio adensado (ZAMBOLIM, 2016). Em sistemas produtivos com cultivares suscetíveis, mesmo com o controle químico, a doença pode ultrapassar o nível de dano econômico, principalmente em anos de alta safra.

Diversos programas de melhoramento em todo o mundo desenvolveram cultivares com resistência duradoura contra a ferrugem do cafeeiro, utilizando os genes dominantes de efeito maior da série  $S_H$  (VAN DER VOSSSEN, 2005). Os genes  $S_{H1}$ ,  $S_{H2}$  e  $S_{H4}$  estão presentes em variedades não comerciais de *C. arabica*. O  $S_{H5}$  está presente em cultivares comerciais de *C. arabica*, como Caturra, Typica, Bourbon, entre outras. O gene  $S_{H3}$  vem da espécie *C. liberica* e os genes  $S_{H6}$  a  $S_{H9}$  foram introduzidos de *C. canephora* em genótipos de Híbrido de Timor (HT), um híbrido proveniente de cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora* (CAPUCHO et al., 2009). Devido à variedade de genes de resistência proveniente principalmente de *C. canephora*, o germoplasma de HT tem sido explorado para transferência de alelos de resistência à ferrugem para genótipos de interesse comercial de *C. arabica*. Progênies do HT foram distribuídas ao redor do mundo e intensivamente utilizadas como a principal fonte de resistência em programas de melhoramento de café (GICHIMU, 2012). No período de 1999 a 2019, foram disponibilizadas no Brasil 132 cultivares melhoradas de cafeeiro, sendo 76 delas selecionadas para a resistência a ferrugem utilizando germoplasma derivado de HT, bem como derivados do cafeeiro IAC 1330, um tetraploide artificial de *C. canephora* (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2019).

Entretanto, a maior parte dos cultivos de café arábica no país ainda é constituída pelas cultivares Mundo Novo e Catuaí, suscetíveis à ferrugem (CARVALHO et al., 2012). Assim, o controle químico é a medida de controle de ferrugem mais adotada, por meio do uso de fungicidas protetores, como os cúpricos (POZZA et al., 2010) ou sistêmicos, os quais apresentam vantagens em relação aos protetores por induzirem efeito curativo sobre as lesões novas e inibição de esporulação das lesões velhas (NUNES, 1986). Dentre os fungicidas sistêmicos, os

do grupo químico triazol são aplicados na folha e/ou no solo ou em mistura com estrobilurinas nas folhas. Em geral, os triazóis aplicados no solo estão associados a inseticidas sistêmicos para controle simultâneo da ferrugem e do bicho mineiro (*Leucoptera coffeella*) e são associados por promover incremento no vigor das plantas. Estes devem ser aplicados no início da estação chuvosa (novembro, no Brasil) e têm demonstrado elevada eficiência no controle da ferrugem (ZAMBOLIM, 2016).

De acordo com o MAPA, existem 160 produtos químicos protetores e sistêmicos registrados no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT) disponíveis para controle da ferrugem do cafeeiro (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2020). Destes, 66.8% são formulados com triazol e/ou estrobilurina. Porém, flutuações no preço do café influenciam a decisão do produtor a respeito do manejo da lavoura, o que reflete na incidência e severidade da doença (TALHINHAS et al., 2017). Desta forma, a combinação de resistência genética e práticas de controle é recomendada no manejo integrado da doença (ECHEVERRIA-BEIRUTE et al., 2018).

Portanto, objetivou-se avaliar a eficiência do controle genético e químico da ferrugem e sua influência na evolução da doença e na produtividade do cafeeiro, visando verificar se a resistência encontrada nos genótipos de HT tem efeito semelhante ao dos produtos químicos no controle da ferrugem e se genótipos resistentes e suscetíveis possuem comportamento similar ao uso de defensivo para controle da doença. Os resultados deste estudo podem contribuir para o manejo genético e químico da ferrugem do cafeeiro de forma a tornar a cafeicultura mais sustentável.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no ano agrícola de 2018/19, no Banco Ativo de Germoplasma de *Coffea* spp. de Minas Gerais, Brasil no Campo Experimental de Patrocínio (CEPC), situado a 18°59'26" S, 48°58'95" O e 975 metros de altitude, na Região do Cerrado Mineiro, 1ª Denominação de Origem de cafés do Brasil. O solo é do tipo Latossolo Vermelho (GEOINFO, 2004) e a topografia é plana, com ligeira inclinação. Patrocínio se encontra em uma região de Clima Tropical, com inverno seco e estação chuvosa no verão (Aw), conforme classificação Köppen (MARTINS et al., 2018). Os valores médios de temperatura e precipitação para o ano agrícola de avaliação estão descritos na Figura 1.

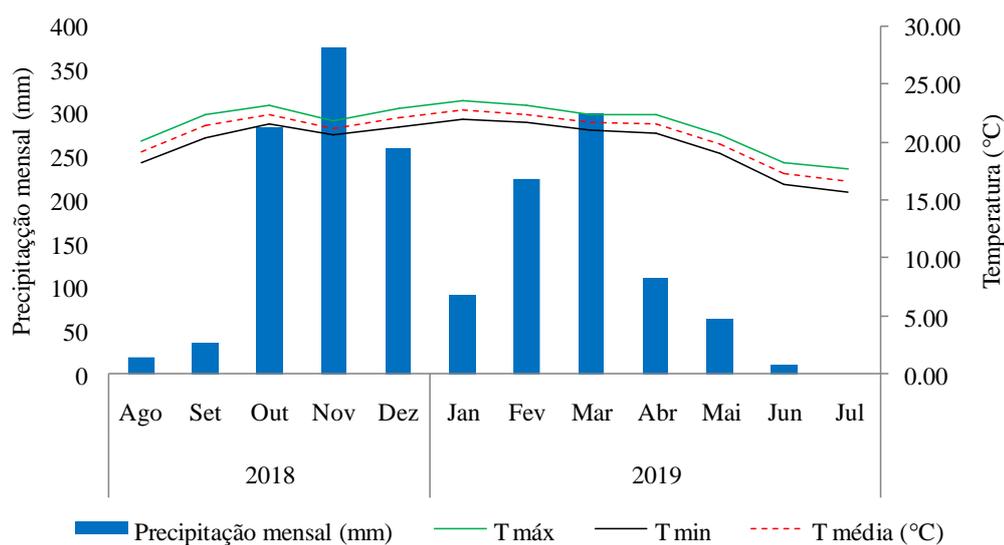


Figura 1. Temperatura média mensal (°C) e precipitação (mm) em Patrocínio no ano agrícola de 2018/19. Fonte: Dados Campo Experimental de Patrocínio - CEPC.

Foram avaliados quatro genótipos de café arábica, implantados no ano de 2006 em delineamento de blocos completos casualizados com duas repetições e dez plantas por parcela. Dois genótipos pertencem ao grupo Híbrido de Timor (MG0277- origem Híbrido de Timor UFV 376-52 e MG0313 - origem Híbrido de Timor UFV 428-04) e dois do grupo Bourbon (MG0006 e MG0012, originados de coletas em lavouras de propriedades particulares nos municípios de Araponga e Manhumirim – MG, respectivamente). Esses genótipos foram escolhidos pela resistência dos genótipos dos grupos Híbrido de Timor e suscetibilidade à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) dos Bourbons.

Metade das plantas de cada parcela recebeu tratamento químico via solo para controle da ferrugem (Verdadero 600 WG® - Ciproconazol (30% m/m) + Tiametoxan (30% m/m), na dose de 1,0 kg ha<sup>-1</sup> ou 1,75 g por parcela, aplicado manualmente), no início do período das chuvas, em novembro de 2018, conforme recomendação. Esse produto controla simultaneamente o bicho mineiro do cafeeiro pelo ingrediente ativo Tiametoxan. Para se evitar mistura dos efeitos nas variáveis analisadas, na outra metade de cada parcela foi realizado o controle de bicho mineiro por meio da aplicação de Actara 250 WG® - Tiametoxan (25% m/m), na dose de 1,0 kg ha<sup>-1</sup> ou 1,75 g por parcela, aplicado manualmente, resultando em um esquema de parcela subdividida composto de oito tratamentos com duas repetições em subparcelas de cinco plantas. Os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendação técnica baseada na análise de solo e monitoramento de pragas e doenças realizados durante a condução do experimento.

Para verificar o progresso da ferrugem foram realizadas três avaliações de incidência e severidade, quando os frutos de café se apresentavam nos estádios de maturação verde (12/04/2019), verde-cana (03/05/2019) e maduro (09/05/2019). Foram coletadas dez folhas por planta, no terceiro ou quarto par de folhas de ramos plagiotrópicos, tomados aleatoriamente no terço médio da planta, totalizando 50 folhas por subparcela experimental. A incidência da doença foi determinada com base no número de folhas com pústulas esporuladas em relação ao número total de folhas avaliadas por subparcela experimental, sendo posteriormente convertida para porcentagem. A severidade da ferrugem foi avaliada por meio de escala diagramática para ferrugem, descrita por

Capucho et al. (2011), de acordo com a porcentagem de área foliar lesionada. A resposta dos genótipos avaliados foi para a população natural de raças de ferrugem presentes no campo experimental de Patrocínio.

Foram obtidos também os dados de produtividade em sacas de café beneficiado por hectare (SC ha<sup>-1</sup>), por meio da pesagem do café beneficiados após a secagem (12 % de umidade), com base no espaçamento de plantas de 3.5 x 1 metro.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Genes (CRUZ, 2016), obtendo-se as análises de variância para incidência e severidade de ferrugem, bem como para produtividade, de acordo com o modelo estatístico  $Y_{ijkl} = \mu + R_i + A_j + B_k + AB_{jk} + e_1 + C_l + CA_{lj} + CB_{lk} + CAB_{ljk} + e_2$ , em que  $Y_{ijkl}$  é o valor fenotípico;  $\mu$  é a constante inerente a todas as observações;  $R_i$  é o efeito da repetição  $i$ ;  $A_j$  efeito do genótipo (G)  $j$ ;  $B_k$  é o efeito do tratamento para em controle de ferrugem (C)  $k$ ;  $AB_{jk}$  é o efeito da interação GxC;  $e_1$  é o erro associado à parcela;  $C_l$  é o efeito do estágio de maturação (M)  $l$ ;  $CA_{lj}$  é o efeito da interação MxG;  $CB_{lk}$  é o efeito da interação MxC;  $CAB_{ljk}$  é o efeito da interação MxGxC e  $e_2$  é o erro associado à subparcela, sendo  $e_1 = e_2 \sim N(0, \sigma_e^2)$ . A precisão experimental foi aferida por meio da estimativa do coeficiente de variação experimental (CV%). O agrupamento das médias foi realizado pelo teste de Scott-Knott (1974) ( $p < 0.05$ ) quando identificado efeito significativo do fator pela análise de variância. Estimou-se também o acréscimo na produtividade, em porcentagem (A%), proporcionado pelo uso de defensivo químico para controle da ferrugem, em comparação às subparcelas que não receberam aplicação do produto.

### 3. RESULTADOS

Para a incidência, foram significativas as fontes de variação genótipos (G), o controle químico (C), o estágio de maturação (M) e as interações GxC, GxM e GxCxM (Tabela 1). Analisando-se as fontes de variação para a severidade percebeu-se comportamento semelhante ao da incidência, porém, não foi verificado efeito significativo das interações GxM e tripla para severidade (Tabela 1).

Tabela 1 – Resumo das análises de variância para incidência (%) e severidade (% de área lesionada) de ferrugem em folhas de cafeeiro.

Fonte de Variação	Graus de Liberdade	Incidência		Severidade	
		Quadrado Médio		Quadrado Médio	
<b>Repetição</b>	1	0.011		0.003	
<b>Genótipo (G)</b>	3	28.906	*	1.586	*
<b>Controle (C)</b>	1	133.300	*	8.036	*
<b>G x C</b>	3	18.423	*	1.034	*
<b>Erro A</b>	7	1.094		0.101	
<b>Maturação (M)</b>	2	7.516	*	0.222	*
<b>G x M</b>	6	1.109	*	0.053	
<b>C x M</b>	2	1.044		0.085	
<b>G x C x M</b>	6	2.001	*	0.068	
<b>Erro B</b>	16	0.375		0.028	
<b>Total</b>	47	6.909		0.392	
<b>Média</b>		12.639		0.687	
<b>Cva (%)</b>		30.568		20.477	
<b>CVb (%)</b>		17.893		10.825	

\*p <0.05 pelo teste F.

O único genótipo resistente à ferrugem foi o MG0277, com menor I (0.28%) e S (0.01%). Não houve diferença significativa entre os genótipos MG0313, MG0006 e MG0012 para a incidência e severidade na média geral. O uso de controle químico foi eficiente, reduzindo a incidência de ferrugem de 22.78% para 2.50% e a severidade de 1.28% para 0.09% na média geral (TABELA 2).

Tabela 2 –Médias para incidência (%) e severidade (% de área lesionada) de ferrugem em folhas de cafeeiro considerando genótipos, aplicação de controle químico e estágio de maturação dos frutos.

Genótipos	Incidência (%)		Severidade (%)	
<b>MG0277</b>	0.28	b	0.01	b
<b>MG0313</b>	21.11	a	1.13	a
<b>MG0006</b>	17.22	a	0.99	a
<b>MG0012</b>	11.94	a	0.62	a
<b>Controle</b>				
<b>Com controle</b>	2.50	b	0.09	b
<b>Sem controle</b>	22.78	a	1.28	a
<b>Maturação</b>				
<b>Verde</b>	8.33	c	0.53	b
<b>Verde-cana</b>	13.54	b	0.76	a
<b>Maduro</b>	16.04	a	0.76	a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, para cada fonte de variação, pertencem a um mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ).

Observa-se pela análise da interação GxC que o genótipo MG0277 sem controle químico apresentou menor incidência e severidade de ferrugem que os Bourbons (MG0006 e MG0012) com ou sem controle químico, indicando sua resistência genética. Já o genótipo de HT suscetível (MG0313) apresentou elevada expressão da doença sem o controle químico, indicando uma possível quebra de resistência ou insuficiência de alelos que promovem a característica. Por outro lado, quando foi adotado o uso de controle químico, esse genótipo apresentou melhor resposta que os Bourbons. Aqui, demonstra-se pela primeira vez que genótipos de ascendência resistente, ainda que se comportem como suscetíveis, respondem melhor ao controle químico da ferrugem. Os Bourbons não tratados apresentaram alta I e S, indicando sua conhecida suscetibilidade (FIGURA 2).

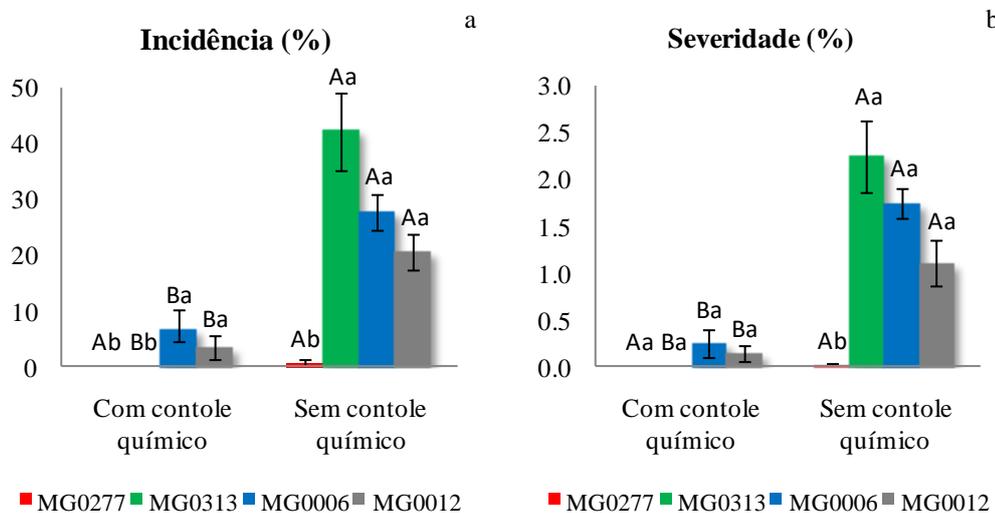


Figura 2. Médias e erro padrão para (a) Incidência (%) e (b) severidade (% de área lesionada) de ferrugem em folhas de cafeeiro, em função do genótipo e aplicação de controle químico. Letras minúsculas indicam a

comparação entre genótipos dentro de um mesmo tipo de tratamento químico para ferrugem (com ou sem controle químico) e letras maiúsculas correspondem à comparação do mesmo genótipo em diferentes tratamentos para controle da doença. Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ).

Com relação à expressão da doença nas plantas em função do estágio de maturação, observou-se que a incidência e severidade foram menores quando os frutos estavam verdes (abril). No geral, a incidência aumentou ao longo da maturação, ao contrário da severidade, que se estabilizou após o estágio verde, não havendo diferença significativa entre os dois últimos estágios de maturação (TABELA 2). Os genótipos se comportaram diferentemente com relação à doença quando avaliados em diferentes estágios de maturação e com ou sem controle químico (interação GxCxM). Os genótipos de Bourbon não tratados apresentaram um pico de incidência no estágio verde-cana, sendo que o pico no MG0012 foi menos acentuado. Quando os Bourbons foram controlados quimicamente para a ferrugem iniciaram o período de avaliação com incidência zero e apresentaram um pico da doença após o estágio verde-cana, mas sem se aproximarem do nível de incidência dos não tratados. O Bourbon MG0012 teve um pico mais repentino que o MG0006, terminando as avaliações na maturação cereja dos frutos com menor incidência e severidade. Observa-se que o Bourbon MG0012 teve menor expressão da doença que o Bourbon MG0006 independentemente de ser ou não tratado com defensivo para controle da ferrugem (FIGURA 3).

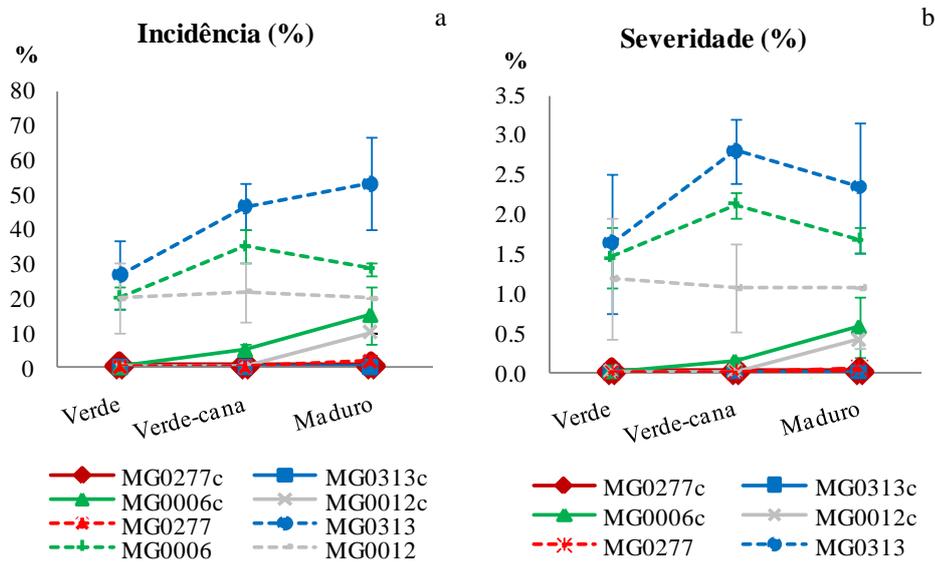


Figura 3. Médias e erro padrão para (a) Incidência (%) e (b) severidade (% de área lesionada) de ferrugem em folhas de cafeeiro em função do genótipo, aplicação de controle químico e estágio de maturação do fruto. Os tratamentos com aplicação de controle químico correspondem às linhas sólidas enquanto os tratamentos sem aplicação de controle químico correspondem às linhas tracejadas.

Nos genótipos de HT sem o controle químico o MG00277 teve pequena incidência no final da maturação dos frutos e o HT MG0313 já iniciou o período de avaliações com elevada incidência e permitiu a evolução da doença até a maturação dos frutos. Por outro lado, quando controlados quimicamente para a ferrugem os HT

tiveram o mesmo comportamento ao longo do período de avaliação, com nenhuma incidência da doença. Quando se analisou a severidade ao longo da maturação dos frutos percebeu-se tendência diferente da incidência apenas no genótipo de HT MG0313 sem o controle químico, indicando que para a severidade, nesse genótipo, a folha está sendo eficiente no controle da progressão da doença, porém a incidência mostra que folhas saudáveis continuaram a ser infectadas (FIGURA 3).

Não houve efeito significativo de genótipos, controle ou da interação entre esses fatores para a produtividade de grãos considerando a colheita da safra 2018/2019 (TABELA 3).

Tabela 3 – Resumo da análise de variância para produtividade em 2019 (sacas de 60 kg.ha<sup>-1</sup>).

Fonte de Variação	Produtividade	
	Graus de Liberdade	Quadrado Médio
<b>Repetição</b>	1	1155.8844
<b>Genótipo (G)</b>	3	579.2890
<b>Erro A</b>	3	197.9394
<b>Controle (C)</b>	1	35.9964
<b>G x C</b>	3	37.5201
<b>Erro B</b>	4	50.5256
<b>Total</b>	15	
<b>Média</b>		59.50
<b>CVa (%)</b>		23.65
<b>CVb (%)</b>		11.95

Analisando-se as médias dos genótipos, com e sem o controle químico, percebeu-se que os genótipos suscetíveis (MG0313, MG0006 e MG0012), principalmente os Bourbons, tendem a apresentar incrementos em produtividade quando a doença foi controlada quimicamente, ao contrário do genótipo resistente (MG0277), o que poderá ser validado em outros estudos (TABELA 4).

Tabela 4 – Produtividade média (sacas de 60 kg.ha<sup>-1</sup>) em 2019, referente aos genótipos manejados com e sem controle químico para controle da ferrugem do cafeeiro e acréscimo em porcentagem (A%) devido ao uso de controle químico.

	Produtividade média		
	Com controle químico	Sem controle químico	A%
<b>MG0277</b>	71.43	77.14	-7.41
<b>MG0313</b>	52.57	48.57	8.24
<b>MG0006</b>	68.57	60.00	14.29
<b>MG0012</b>	51.43	46.28	11.11

#### 4. DISCUSSÃO

Na agricultura a existência de ferramentas à disposição dos produtores no manejo de pragas e doenças é fundamental, pois sabe-se que a eficiência no manejo rumo a lucratividade é obtida por um conjunto de práticas agrícolas. Neste trabalho demonstrou-se que tanto o método genético quanto o químico podem ser usados no controle da ferrugem. Portanto, a escolha correta da cultivar para um objetivo específico de produção e ambiente de cultivo pode ser determinante no sucesso da atividade e do correto manejo químico da doença, que produz resultados diferenciados em função da cultivar de café utilizado.

O efeito significativo do fator genótipos sobre a incidência e severidade de ferrugem evidencia a existência de diferentes níveis de resistência entre os acessos avaliados. Como esperado, os genótipos pertencentes ao grupo Bourbon apresentaram alta suscetibilidade à ferrugem. Isso se deve ao fato de que as variedades tradicionais como Typica e Bourbon possuem apenas um fator de resistência ( $S_H5$ ), deixando-as vulneráveis à maioria das raças de ferrugem (AVELINO et al., 2006). Diversos estudos comprovam essa suscetibilidade de genótipos do grupo Bourbon, sendo utilizados geralmente como testemunha suscetível nos experimentos (Del GROSSI et al., 2013; CARVALHO et al., 2017).

Dentre os genótipos do grupo HT, um deles se destacou como resistente (MG0277), com incidência e severidade de ferrugem quase nulas mesmo sem o uso de defensivo. A expressão da ferrugem nesse genótipo sem o uso de controle químico foi inferior aos Bourbons, mesmo quando esses últimos foram tratados quimicamente para a doença, demonstrando que a resistência genética pode ser pelo menos tão eficiente quanto o controle químico e, em alguns casos, mais eficiente. Os genótipos derivados do Híbrido de Timor são provenientes de um cruzamento natural entre *C. arabica* e *C. canephora* e têm sido intensivamente utilizados nos programas de melhoramento em todo o mundo por ser uma excelente fonte de resistência à ferrugem, contendo uma série de genes ( $S_H5$  a  $S_H9$ ) provenientes das duas espécies genitoras (de BRITO et al., 2010). Estes genes podem não ser os únicos já que sua resistência foi mantida frente a novas raças que atacam os genes  $S_H5$ - $S_H9$  (VÁRZEA; MARQUES, 2005).

Entretanto, algumas cultivares melhoradas derivadas de HT têm perdido sua resistência (VÁRZEA; MARQUES, 2005). A cultivar Oeiras MG 6851, mencionada como resistente à ferrugem (PEREIRA et al., 2010), foi altamente suscetível ao patógeno em estudos recentes (Del GROSSI et al., 2013; CARVALHO et al., 2017). Outras cultivares também apresentaram quebra de resistência, pelo menos parcial, como a Acauã, Araponga MG 1, IPR 99, Obatã IAC 1669-20, Sabiá 398 e Tupi IAC 1669-33, todas derivadas de HT (Del GROSSI et al., 2013).

No presente trabalho, o genótipo MG0313 apresentou comportamento oposto ao MG0277, ambos pertencentes ao grupo HT, com os maiores valores de incidência e severidade quando não foi realizado o controle químico, comportando-se como suscetível. Esses dados demonstram a grande variabilidade existente para reação de resistência às raças de *H. vastatrix* no germoplasma derivado de HT, a qual deve ser explorada nos programas de melhoramento. Isso porque a perda de resistência em alguns genótipos pode ser justificada tanto pela erosão genética devida aos sucessivos cruzamentos com cultivares comerciais nas diversas fases do melhoramento, quanto pela mutação dos genes de *H. vastatrix* para novas formas de virulência (ADEPOJU et al., 2017), não invalidando o grande interesse deste germoplasma. Apesar dos relatos de quebra de resistência citados anteriormente, existem casos de eficiência duradoura que permitem a preservação da imunidade ou a manutenção da incidência e severidade em níveis moderados (CARVALHO et al., 2017).

Acredita-se que a resistência observada nas cultivares derivadas de HT seja durável dependendo das raças do patógeno presentes em cada local (Del GROSSI et al., 2013). Até o momento, mais de 50 raças fisiológicas do fungo *H. vastatrix* foram identificados em todo o mundo (TALHINHAS et al., 2017), contendo nove genes de virulência (v1-v9), sozinhos ou combinados (VÁRZEA; MARQUES, 2005), das quais pelo menos 16 delas já foram encontradas no Brasil (CAPUCHO et al., 2013). Os genes de resistência S<sub>H1</sub>, S<sub>H2</sub>, S<sub>H4</sub> e S<sub>H5</sub>, presentes em *C. arabica*, já foram superados por diversas raças de *H. vastatrix*, incluindo as identificadas no Brasil (CAPUCHO et al., 2009). Em estudo realizado em Londrina, foi observado que os genes S<sub>H1</sub>, S<sub>H2</sub>, S<sub>H4</sub>, S<sub>H5</sub> e S<sub>H8</sub> já tiveram sua resistência superada pela população local de raças de ferrugem (Del GROSSI et al., 2013). Segundo Zambolim et al. (2005), é difícil prever a durabilidade da resistência das cultivares atuais e as quebras de resistência observadas são devidas ao aparecimento de novas raças do fungo.

O desenvolvimento e manutenção de raças de *H. vastatrix* são devidos à exposição do patógeno a plantas de café com vários genes de resistência, uma vez que o fungo causador da ferrugem é de alta mutabilidade (VÁRZEA; MARQUES, 2005). Assim, a permanência espacial e temporal de genótipos resistentes no campo como nas plantas perenes, favorece a emergência de novas raças compatíveis do patógeno devido a pressão de seleção (VÁRZEA; MARQUES 2005). Portanto, é esperado que novas raças do patógeno provavelmente surjam em áreas onde há mais plantas que possuam genes de resistência, e, quanto maior a variedade de genes, mais as raças podem se desenvolver. Campos com essas características, como bancos de germoplasma, podem então ser considerados como “campos de alto risco” quando se trata do desenvolvimento de raças de ferrugem (GICHURU et al., 2012).

É importante ressaltar que o HT MG0313 apresentou maior expressão da ferrugem que os genótipos do grupo Bourbon, o que não era esperado. Porém, uma característica não avaliada no experimento, e que pode ter influência nesse resultado, foi o enfolhamento ou vigor das plantas. Foi perceptível visualmente que as plantas dos genótipos HT se encontravam mais vigorosas que as do grupo Bourbon e, segundo Avelino et al. (2006), o número de folhas do cafeeiro está positivamente correlacionado com o desenvolvimento da epidemia de ferrugem. Assim, maior área foliar favorece a maior interceptação por urediniósporos, além de criar um microclima mais propício ao desenvolvimento do fungo, com maior umidade e menor luminosidade (GODOY et al., 1997; AVELINO et al., 2004; MONTEIRO, 2014).

O controle ou não com produto químico também teve efeito significativo sobre a incidência e severidade de ferrugem. A aplicação do fungicida foi eficiente no controle da doença em todos os genótipos avaliados, principalmente nos genótipos HT, que não apresentaram sintomas. Destaca-se o genótipo MG0313 que apesar de apresentar a maior expressão da doença quando não foi realizada aplicação de defensivo, teve sua incidência e severidade anuladas quando houve controle, ao contrário dos Bourbons. Alguns autores relatam que a maioria dos genótipos derivados de HT apresenta resistência parcial quando a resistência completa é quebrada, graças à presença de genes de menor efeito (ESKES et al., 1990; SILVA, et al. 2006). Esse resultado demonstra o potencial das cultivares derivadas do HT, pois mesmo quando ocorre a quebra de resistência vertical apresentam resposta ao controle químico mais eficiente que cultivares totalmente suscetíveis. Isso pode ocorrer por meio de uma ação sinérgica entre esses genes de resistência parcial e mecanismos de defesa induzidos pela aplicação do fungicida. Esses resultados evidenciam também o efeito da interação GxC, em que os genótipos respondem de forma diferente ao tratamento aplicado.

Na atividade cafeeira sem irrigação são consideradas boas produtividades médias ao longo do tempo aquelas acima de 45 sacas.ha<sup>-1</sup> (CARVALHO et al., 2017). Não se observa, entretanto, efeito significativo do controle químico sobre a produtividade na safra de 2018/19. Esse efeito não significativo do uso de controle químico na produtividade, em relação à testemunha, é esperado, visto que, apesar dos danos causados pela ferrugem, os fotoassimilados produzidos pela planta são direcionados aos frutos da safra atual, prejudicando a safra seguinte (ADEPOJU et al., 2017). Assim, o dano da ferrugem se reflete em uma redução na produção do ano posterior a uma alta incidência da doença (AVELINO et al. 2006; ZAMBOLIM, 2016). Isso pode ser justificado pela maior desfolha observada nas plantas não tratadas em comparação às plantas que receberam controle químico. Ou seja, a redução significativa da taxa fotossintética devido à queda de folhas provocada pela ferrugem do cafeeiro pode afetar algumas funções da planta, como iniciação floral e crescimento de raízes e ramos (CHALFOUN et al., 1981).

O efeito da doença na produtividade da planta é, portanto, indireto, por meio da desfolha provocada na safra anterior. Segundo Godoy et al. (1997), se a desfolha dos cafeeiros provocada pela ferrugem ocorrer antes da indução floral ou durante o desenvolvimento dos frutos ocorrerá, respectivamente, a redução da floração e a má formação dos frutos. Porém, em geral, o pico da doença ocorre durante a colheita dos frutos. Por isso, perdas em produtividade no primeiro ano de infestação são frequentemente de baixa importância (TALHINHAS et al., 2017). É esperado, considerando o presente trabalho, que na safra 2019/2020 seja observada diferença significativa em produtividade entre as parcelas tratadas e não tratadas com controle químico para ferrugem.

Não houve também diferença significativa entre genótipos para produtividade nessa primeira safra, independentemente do uso ou não de controle químico. De forma semelhante, Echeverria-Beirute et al. (2018), ao avaliarem dois genótipos de café (Catuaí Vermelho IAC 144 – suscetível a ferrugem, e um híbrido F1 de Caturra x Ethiopian 531 – leve tolerância às raças predominantes de ferrugem), com uso de fungicida (ciproconazol + epixiconazol a 500 mL.ha<sup>-1</sup>) e sem controle químico de ferrugem, verificaram que houve efeito significativo de genótipos e do controle químico sobre a incidência e severidade da doença. Porém, assim como no presente trabalho, não identificaram efeito significativo do controle e genótipos sobre a primeira produção avaliada. Constata-se, também, no trabalho de Echeverria-Beirute et al. (2018), uma superioridade na produção do híbrido (tolerante) em relação a cultivar suscetível tanto no tratamento com e sem controle, assim como observado no presente trabalho, em que existe uma tendência de o genótipo resistente MG0277 apresentar produtividade superior aos suscetíveis. Além disso, os genótipos suscetíveis tendem a responder melhor ao uso de defensivo quanto à produtividade, o que é visível pelo acréscimo em produtividade quando é realizado o controle, apesar de o controle químico da doença ser mais eficiente em genótipos de *background* resistente (HTs), de forma que esses resultados poderão ser validados em trabalhos futuros.

O estágio de maturação dos frutos teve efeito significativo sobre a incidência e severidade de ferrugem. No geral, a incidência aumentou ao longo da maturação, enquanto a severidade se estabilizou após o estágio verde-cana. Não há evidências de existência de defesas constitutivas em café que poderiam limitar a infecção da folha por *H. vastatrix*. Os urediniosporos de *H. vastatrix* geralmente germinam e diferenciam o apressório dentro do estômato igualmente em plantas suscetíveis ou resistentes (SILVA et al., 2006). Ainda assim, vários mecanismos de resistência são ativados após a infecção. Esses mecanismos de defesa são ativados nas plantas que apresentam algum nível de resistência ao patógeno. A infecção leva a uma cascata de respostas de defesa que vai impedir a progressão do patógeno e consequentemente da doença (MONTEIRO, 2014). Estudos têm mostrado que em

diferentes genótipos de cafeeiro a resistência a *H. vastatrix* é expressa pela liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com uma rápida e localizada morte da célula vegetal associada à restrição do crescimento de fungos e pelo aumento da atividade de enzimas de defesa e dos teores de compostos fenólicos (MONTEIRO, 2014). Isso explica a crescente incidência e a estabilização da severidade observada na média geral dos genótipos, indicando que ao longo da maturação outras folhas continuam sendo infectadas, mas a progressão da doença em cada folha é contida.

Deve-se atentar, entretanto, ao fato de que existe resposta diferencial dos genótipos quanto à expressão da doença ao longo da maturação. Para os genótipos do grupo Bourbon sem controle químico a incidência de ferrugem aumentou ao longo de todo o período de maturação dos frutos, mas o pico de incidência ocorreu no estágio verde-cana, correspondente à segunda avaliação no mês de abril.

Já o genótipo resistente não apresentou alteração na incidência mesmo sem o uso de fungicida. Diferentemente, no HT suscetível, observou-se aumento progressivo da incidência de ferrugem até atingir nível máximo no estágio maduro. A severidade do HT suscetível apresentou comportamento semelhante ao dos Bourbons, porém, no HT suscetível houve redução da severidade no estágio maduro, mesmo com o aumento na incidência. Essas diferenças estão possivelmente ligadas aos variados níveis de resistência ou suscetibilidade de cada genótipo.

Em café tem sido observada resistência completa e parcial. A resistência completa à ferrugem do cafeeiro é condicionada por pelo menos nove genes dominantes de efeito maior (S<sub>H1</sub>-S<sub>H9</sub>) e ocorre quando esses genes se encontram em homozigose, individualmente ou combinados (ESKES et al., 1990). A seleção de genótipos resistentes tem sido, até então, baseada nessa resistência completa e altamente específica derivada desses genes maiores, sendo o germoplasma HT a principal fonte desses alelos (HERRERA et al., 2009). A evolução da ferrugem no genótipo MG0277 ao longo da maturação, com expressão quase nula da doença indica que esse acesso apresenta provavelmente esse tipo de resistência.

Por outro lado, a resistência parcial à ferrugem do cafeeiro é menos compreendida. Esse tipo de resistência é considerado geneticamente complexo e frequentemente não específico, envolvendo mecanismos de defesa constitutivos e induzidos (VAN DER VOSSSEN, 2005). Fontes desse tipo de resistência têm sido identificadas em *C. canephora* e em alguns genótipos de *C. arabica*, incluindo os HT (VAN DER VOSSSEN, 2005). De fato, a maioria dos genótipos derivados de HT apresenta resistência parcial quando a resistência completa é quebrada (ESKES et al., 1990; SILVA, et al. 2006). Segundo Castillo e Alvarado (1997), em café, esse tipo de resistência é claramente associado com o progresso da epidemia e enfolhamento no campo. Indivíduos parcialmente resistentes exibem progresso lento da epidemia com um atraso de até cinco meses comparado ao material suscetível e desfolha reduzida. Outro aspecto relevante é que uma menor severidade pode indicar resistência horizontal. A avaliação da severidade e da incidência da ferrugem é justificada devido à sua importância na identificação de cultivares que suportam melhor o patógeno, pois aquelas que apresentarem menor severidade provavelmente toleram mais a doença devido à menor desfolha (CARVALHO et al., 2017). Segundo Campbell e Madden (1990), em condições naturais de epidemia, a severidade é o componente que melhor discrimina níveis de resistência horizontal. Esse pode ser um indício do motivo de no tratamento sem controle químico o genótipo HT MG0313, aparentemente sem resistência completa, foi o único a demonstrar queda acentuada na severidade após o estágio verde-cana, mesmo com o aumento na incidência. Considerando-se que existem genes de resistência parcial também em alguns genótipos de café arábica, como citado anteriormente, a diferença de incidência e severidade de ferrugem entre

genótipos do grupo Bourbon, tanto com como sem o uso de controle químico, pode ter relação com a expressão de alguns desses genes.

As diferentes respostas dos genótipos à aplicação do controle químico ao longo da maturação podem também ser reflexo da constituição genética de cada acesso avaliado, de forma que os genes de resistência completa ou parcial podem atuar em conjunto com o defensivo na resposta à doença. Além disso, aspectos ambientais, como diferenças no microclima devido ao menor vigor dos genótipos do grupo Bourbon, também podem interferir na resposta da planta ao produto químico e, conseqüentemente, no nível de expressão da ferrugem. Os efeitos de cada genótipo, práticas culturais, e fatores ambientais, sobre os quais há pouca ou nenhuma possibilidade de ação humana, interferem na fisiologia da planta tornando complexo o entendimento do desenvolvimento da epidemia (AVELINO et al., 2004). Porém, destaca-se que genótipos de background resistente respondem de forma mais eficiente ao controle químico, ainda que se comportem como suscetíveis devido a uma possível quebra de resistência. Isso demonstra mais uma vantagem da adoção de cultivares resistentes na busca de uma cafeicultura mais sustentável.

## 5. CONCLUSÕES

O genótipo de HT MG0277 apresenta resistência à ferrugem, sendo o controle genético pelo menos tão eficiente quanto o controle químico.

Os genótipos avaliados respondem diferentemente ao controle químico ao longo do tempo, sendo mais eficiente o controle aplicado em genótipos com *background* resistente.

Os genótipos apresentam produtividade semelhante na safra correspondente à infecção, independentemente do uso ou não de controle químico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à EPAMIG pela disponibilização da infraestrutura e equipamentos, ao CNPq pelas bolsas de produtividade (Carvalho, G.R.) e de doutorado (Pereira, D.R.) e pelo apoio financeiro (número de concessão 425088/2018-9) e à Fapemig e Consórcio Pesquisa Café pelo apoio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- Adepoju AF, Adenuga OO, Mapayi EF, Olaniyi OO, Adepoju FA (2017) Coffee: botany, distribution, diversity, chemical composition and its management. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)* 10: 57–62.
- Avelino J, Willocquet L, Savary S (2004) Effects of crop management patterns on coffee rust epidemics. *Plant Pathology* 53:541–547. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2004.01067.x>
- Avelino J, Zelaya H, Merlo A, et al (2006) The intensity of a coffee rust epidemic is dependent on production situations. *Ecological Modelling* 197:431–447. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.03.013>
- Campbell CL, Madden LV (1990) *Introduction to plant disease epidemiology*. John Wiley & Sons: New York.
- Capucho AS, Caixeta ET, Zambolim EM, Zambolim L (2009) Herança da resistência do Híbrido de Timor UFV

- 443-03 à ferrugem-do-cafeeiro. *Pesq agropec bras* 44:276–282. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000300009>
- Capucho AS, Zambolim L, Cabral PGC, et al (2013) Climate favourability to leaf rust in Conilon coffee. *Australasian Plant Pathol* 42:511–514. <https://doi.org/10.1007/s13313-012-0187-6>
- Capucho AS, Zambolim L, Duarte HSS, Vaz GRO (2011) Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*: Estimation of coffee leaf rust severity. *Plant Pathology* 60:1144–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02472.x>
- Carvalho AM, Cardoso DA, Carvalho GR, et al (2017) Comportamento de cultivares de cafeeiro sob a incidência das doenças da ferrugem e cercosporiose em dois ambientes de cultivo. *CSci* 12:100. <https://doi.org/10.25186/cs.v12i1.1248>
- Carvalho VL, Cunha RL da, Silva NRN (2012) Alternativas de controle de doenças do cafeeiro. *CoffeeSci* 7:1, 42-49.
- Castillo J, Alvarado G (1997) Resistencia incompleta de genotipos de café a la roya bajo condiciones de campo em la region central de Colombia. *Cenicafe* 48: 40–58.
- Chalfoun SM (1981) Relações de diferentes índices de infecção de ferrugem sobre a produção de cafeeiro em algumas localidades do estado Minas Gerais. *Fitopatol bras* 6: 137-142.
- Cruz CD (2016) Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Sci Agron* 38:547. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i3.32629>
- de Brito GG, Caixeta ET, Gallina AP, et al (2010) Inheritance of coffee leaf rust resistance and identification of AFLP markers linked to the resistance gene. *Euphytica* 173:255–264. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0119-x>
- Del Grossi L, Sera T, Sera GH, et al (2013) Rust resistance in Arabic Coffee cultivars in northern Paraná. *Braz arch biol technol* 56:27–33. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100004>
- Echeverria-Beirute F, Murray SC, Klein P, et al (2018) Rust and Thinning Management Effect on Cup Quality and Plant Performance for Two Cultivars of *Coffea arabica* L. *J Agric Food Chem* 66:5281–5292. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03180>
- Eskes AB, Hoogstraten JGJ, Toma-Braghini M, Carvalho A (1990) Race-specificity and inheritance of incomplete resistance to coffee leaf rust in some Icatu coffee progenies and derivatives of Híbrido de Timor. *Euphytica* 47:11–19. <https://doi.org/10.1007/BF00040356>
- Geoinfo (2004) Mapa de solos do estado de Minas Gerais. [http://geoinfo.cnps.embrapa.br/layers/geonode%3Alev\\_mg\\_estado\\_solos\\_lat\\_long\\_wgs84\\_vt#category-more](http://geoinfo.cnps.embrapa.br/layers/geonode%3Alev_mg_estado_solos_lat_long_wgs84_vt#category-more). Accessed 15 April 2020
- Gichimu BM (2012) Field screening of selected *Coffea arabica* L. genotypes against coffee leaf rust. *Afr J Hort Sci* 6:82-91.
- Gichuru EK, Ithiru JM, Silva MC, et al (2012) Additional physiological races of coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix*) identified in Kenya. *Trop plant pathol* 37:424–427. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762012000600008>
- Godoy CV, Bergamim Filho A, Salgado CL (1997) Doenças do cafeeiro (*Coffea arabica* L.). In: Kimati H, Amorim L, Bergamim Filho A, Camargo, LEA, Rezende JAM (Eds.) *Manual de fitopatologia: Vol. 2: Doenças de plantas cultivadas*. (3.ed.). Agronômica Ceres, São Paulo, pp.178-192.
- Herrera P. JC, Alvarado A. G, Cortina G. HA, et al (2009) Genetic analysis of partial resistance to coffee leaf rust (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.) introgressed into the cultivated *Coffea arabica* L. from the diploid *C. canephora* species. *Euphytica* 167:57–67. <https://doi.org/10.1007/s10681-008-9860-9>
- Martins FB, Gonzaga G, Dos Santos DF, Reboita MS (2018) Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite para Minas Gerais: cenário atual e projeções futuras. *ABCLima* 1:. <https://doi.org/10.5380/abclima.v1i0.60896>
- Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2019) Registro nacional de cultivares. <http://www.agricultura.gov.br/>. Accessed 09 November 2019
- Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2020) Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários - Agrofit. Brasília. [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/). Accessed 24 March 2020
- Monteiro ACA (2014) Indutores de resistência no manejo da ferrugem e cercosporiose do cafeeiro (*Coffea arabica*): análises bioquímicas e moleculares. Thesis, Universidade Federal de Lavras.
- Nunes AML (1986) Tempo de absorção, efeito protetor, curativo e de translocação de fungicidas no controle da ferrugem do cafeeiro (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.). Dissertation, Universidade Federal de Viçosa.
- Pereira AA, Carvalho GR, Moura WM, Botelho EC, Rezende JC, Oliveira ACB, Silva FL (2010). Cultivares: Origem e suas características. In: Reis PR, Cunha RL (Eds.) *Café arábica do plantio a colheita*. EPAMIG, Lavras, pp163-222.
- Pozza EA, Carvalho LC, Chalfoun SM (2010) Sintomas de injúrias causadas por doenças em cafeeiro. In: Guimarães RJ, Mendes ANG, Baliza DP (Eds.). *Semiologia do cafeeiro: sintomas de deosrdens nutricionais, fitossanitárias e fisiológicas*. Editora UFLA, Lavras, pp. 68-106.

- Scott AJ, Knott M (1974) A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. *Biometrics* 30:507. <https://doi.org/10.2307/2529204>
- Silva M do C, Várzea V, Guerra-Guimarães L, et al (2006) Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz J Plant Physiol* 18:119–147. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100010>
- Talhinhas P, Batista D, Diniz I, et al (2017) The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics: Coffee leaf rust caused by *Hemileia vastatrix*. *Molecular Plant Pathology* 18:1039–1051. <https://doi.org/10.1111/mpp.12512>
- Van der Vossen HAM (2005). State-of-the-art of developing durable resistance to biotrophic pathogens in crop plants, such as coffee leaf rust. In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea VMP (Eds.) Durable resistance to coffee leaf rust, UFV Viçosa, pp. 1-32.
- Várzea VMP, Marques DV (2005). Population variability of *Hemileia vastatrix* VS coffee durable resistance. In: Zambolim L, Zambolim EM, Várzea VMP (Eds.) Durable resistance to coffee leaf rust, UFV, Viçosa, pp. 53-74.
- Zambolim L (2016) Current status and management of coffee leaf rust in Brazil. *Trop plant pathol* 41:1–8. <https://doi.org/10.1007/s40858-016-0065-9>
- Zambolim L, Vale FXR, Zambolim EM (2005) Doenças do cafeeiro (*C. arabica* e *C. canephora*). In: Kimati H, Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A, Camargo LEA (Eds.) Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. v. 2, Agronômica Ceres, São Paulo.

## ARTIGO 2

# ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CAFÉ EM FUNÇÃO DO CONTROLE GENÉTICO OU QUÍMICO DA FERRUGEM

**European Journal of Plant Pathology**

(Versão preliminar)

### RESUMO

Os mecanismos de defesa de genótipos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) resistentes à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk. et Br.) compreendem a ativação de enzimas antioxidantes e fortalecimento de barreiras físicas e químicas. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos ativados pelo controle químico, bem como os reflexos dessas duas formas de controle em órgãos não diretamente afetados pelo patógeno. Objetivou-se avaliar a relação entre a expressão da ferrugem no cafeeiro e a atividade enzimática de folhas e frutos, o teor de nutrientes e de compostos fenólicos nas folhas e de metabólitos nos frutos, em função do controle genético ou químico. Foram avaliados quatro genótipos de café arábica dos grupos Híbrido de Timor (MG0277 e MG0313) e Bourbon (MG0006 e MG0012), com e sem tratamento químico para controle de ferrugem (Verdadero 600 WG® - Ciproconazol (30% m/m) + Tiametoxan (30% m/m), 1,0 kg ha<sup>-1</sup>), em um esquema de parcela subdividida. O controle químico não afeta o teor de nutrientes, mas sim a concentração de compostos fenólicos nas folhas e de proteínas nos frutos. A atividade das enzimas antioxidantes nas folhas e frutos não sofre efeito de genótipos ou controle químico. Os teores de açúcares totais, cafeína e trigonelina nos frutos estão relacionados com a resistência genética. A expressão da ferrugem está associada ao teor de compostos fenólicos e nutrientes nas folhas, à composição química de frutos e à atividade de enzimas antioxidantes nas folhas e frutos, indicando uma resposta sistêmica da planta à infecção. Essas associações dependem do tipo de controle adotado.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Coffea arabica* L.; *Hemileia vastatrix* Berk et. Br.; superóxido dismutase; catalase; peroxidase do ascorbato; resistência genética; triazol.

### 1. INTRODUÇÃO

Os mecanismos de defesa em genótipos de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) nos quais se observa uma interação incompatível entre o agente agressor e o hospedeiro são frequentemente estudados. Uma das primeiras respostas das plantas resistentes corresponde à ativação de uma explosão oxidativa, caracterizada por um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), que precede a síntese de compostos antimicrobianos e ativação de genes relacionados à defesa (Monteiro et al, 2016, Pandey et al., 2017). No entanto, as EROs produzidas em

excesso quando as plantas são submetidas a condições adversas, tornam-se tóxicas às células (Monteiro et al, 2016, Pandey et al., 2017). Para removê-las ou minimizar seus efeitos, as plantas contam com o sistema antioxidante. Esse sistema é constituído por componentes não enzimáticos consumidores de oxirradicais e por enzimas antioxidantes, dentre as quais se destacam a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e a peroxidase do ascorbato (APX, L-ascorbate peroxidase, EC 1.11.1.11), sendo um mecanismo de tolerância das plantas ao estresse (Monteiro et al, 2016, Pandey et al., 2017, Silveira et al., 2015).

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. é considerada a principal doença da cultura em abrangência e danos, e seu controle pode ser eficientemente realizado por medidas de natureza genética ou química (Echeverria-Beirute et al., 2018). A defesa do cafeeiro a ferrugem engloba estratégias como grande liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, rápida e localizada morte da célula vegetal, associada à restrição do crescimento de fungos, além do aumento da atividade de enzimas de defesa como a SOD, CAT e APX (Silva et al., 2008). Também foi constatada a deposição de compostos fenólicos, acúmulo de calose e lignificação da parede celular na zona de infecção, limitando o crescimento do fungo (Silva et al., 2008). Assim, o monitoramento da atividade de enzimas antioxidantes pode ser usado como um indicador do estresse oxidativo em plantas.

Além disso, os minerais absorvidos pelas plantas também estão relacionados a diferentes respostas de defesa das plantas, já que são constituintes de barreiras físicas e químicas e atuam como cofatores essenciais de enzimas envolvidas na desativação de EROs, como a SOD e a CAT (Silva et al. 2020). A disponibilidade de nutrientes em equilíbrio afeta significativamente a anatomia, morfologia e composição química celular da planta em sua constituição ou melhora à resistência fisiológica a patógenos (Pérez et al., 2019). Já o excesso, ou deficiência mineral, afetam direta ou indiretamente o metabolismo vegetal, alterando o equilíbrio de seus constituintes químicos (Acuña et al., 1992).

A fisiologia das plantas é drasticamente alterada quando tratadas com fungicidas (Honorato-Junior et al., 2015). Os fungicidas do grupo dos triazóis estão associados com a redução da taxa de transpiração por meio do ajuste osmótico nos estômatos, evitando murchamento e senescência foliar (Herzog et al., 2018). Também promovem alterações na morfologia das folhas e estimula o florescimento e formação dos frutos, aumentando o rendimento das culturas, além da maior capacidade fotossintética da planta por meio do aumento nos teores de clorofila total e maior taxa de assimilação líquida, resultando em incremento da massa seca total (Demant e Maringoni, 2012, Moura, 2013). Também é relatado efeito positivo ou negativo do uso de fungicidas para controle de ferrugem nos atributos avaliados na análise sensorial da bebida e no teor de compostos voláteis do café torrado, dependendo do composto avaliado (Echeverria-Beirute et al., 2018).

Entretanto, são escassas na literatura, as informações sobre quais os mecanismos de defesa das plantas são induzidos pelo uso do controle químico, bem como sobre sua semelhança com as respostas determinadas pela resistência genética (Honorato-Junior et al., 2015). Outro ponto pouco elucidado é a possibilidade de um dano no tecido foliar, provocado por um patógeno, ter reflexo no metabolismo e composição de outros órgãos da planta quando se adota o controle genético ou químico. Até o momento não foram encontrados estudos em condições de campo sobre o efeito do controle genético e químico da ferrugem no metabolismo antioxidante da planta e na composição química de folhas e frutos de café. Compreender a maneira pela qual o patógeno afeta o metabolismo da planta, bem como a forma que os diferentes métodos de controle auxiliam no combate desses danos, pode auxiliar na escolha do manejo a ser adotado e, com isso, reduzir os danos causados às culturas (Honorato-Junior et al., 2015).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a relação entre a expressão da ferrugem no cafeeiro e a atividade enzimática de folhas e frutos, o teor de nutrientes e compostos fenólicos nas folhas e de metabólitos nos frutos, em função do controle genético ou químico da doença. Questiona-se se os mecanismos de defesa encontrados nos genótipos resistentes são semelhantes àqueles induzidos pelo uso do produto químico para controle da ferrugem. Além disso, deve-se avaliar se a ocorrência da doença nas folhas e suas formas de controle têm reflexo no metabolismo e composição química dos frutos. Os resultados deste estudo podem contribuir para o entendimento das rotas de defesa à ferrugem, ativadas pelo controle genético e químico na planta, assim como seus efeitos no produto final.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Descrição do experimento**

O experimento foi realizado no ano agrícola de 2018/19, no Banco Ativo de Germoplasma de *Coffea* spp. de Minas Gerais, Brasil no Campo Experimental de Patrocínio (CEPC), situado a 18°59'26" de latitude sul, 48°58'95" de longitude oeste e 975 metros de altitude, na Região do Cerrado Mineiro, 1ª Denominação de Origem de Cafés do Brasil. O solo é do tipo Latossolo Vermelho (Geoinfo, 2004) e a topografia é plana, com ligeira inclinação. Patrocínio se encontra em uma região de clima Tropical, com inverno seco e estação chuvosa no verão (Aw), conforme classificação de Köppen (Martins et al., 2018).

Foram avaliados quatro genótipos de café arábica (*Coffea arabica* L.), implantados no ano de 2006, em blocos casualizados com duas repetições e dez plantas por parcela, sendo dois do grupo Híbrido de Timor (MG0277- origem Híbrido de Timor UFV 376-52 e MG0313 - origem Híbrido de Timor UFV 428-04) e dois do grupo Bourbon (MG0006 e MG0012, coletados em lavouras de propriedades particulares nos municípios de Araponga e Manhumirim – MG, respectivamente). Esses genótipos foram escolhidos pela conhecida resistência e suscetibilidade à ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) dos genótipos dos grupos Híbrido de Timor e Bourbon, respectivamente.

Metade das plantas de cada parcela recebeu tratamento químico via solo para controle da ferrugem (Verdadero 600 WG® - Ciproconazol (30% m/m) + Tiametoxan (30% m/m), 1,0 kg ha<sup>-1</sup>), no início do período das chuvas, em novembro de 2018, conforme recomendação agrônômica. Esse produto também é eficiente no controle do bicho mineiro, pela presença do ingrediente ativo Tiametoxan. Desta forma, na outra metade de cada parcela, foi realizado, simultaneamente, o controle de bicho mineiro (Actara 250 WG® - Tiametoxan (25% m/m), 1,0 kg ha<sup>-1</sup>), totalizando, em um esquema de parcela subdividida, oito tratamentos com duas repetições em subparcelas de cinco plantas. Os demais tratamentos culturais foram realizados conforme recomendação técnica baseada na análise de solo e monitoramento de pragas e doenças.

### **2.2. Avaliação da ferrugem**

Para verificar o progresso da ferrugem, foram realizadas, de abril a maio de 2019, três avaliações de incidência e severidade quando os frutos de café se apresentavam predominantemente nos estádios de maturação verde, verde-cana e maduro. Foram coletadas dez folhas por planta, no terceiro ou quarto par de folhas de ramos

plagiotrópicos, tomados aleatoriamente no terço médio da planta, totalizando 50 folhas por subparcela experimental. A incidência da doença foi determinada com base no número de folhas com pústulas esporuladas em relação ao número total de folhas avaliadas por subparcela experimental, sendo, posteriormente, convertida para porcentagem. A severidade da ferrugem foi avaliada por meio de escala diagramática para ferrugem, descrita por Capucho et al. (2011), de acordo com a porcentagem de área foliar lesionada. Os resultados apresentados correspondem à média dos valores obtidos nos três tempos de avaliação em cada subparcela. A resposta dos genótipos avaliados foi para a população natural de raças de ferrugem presentes no campo experimental de Patrocínio.

### **2.3. Avaliação da atividade enzimática em folhas e frutos**

Simultaneamente às avaliações de ferrugem, foram realizadas coletas de material vegetal para análise de atividade enzimática. Para cada tempo de coleta, folhas e frutos localizados no terço médio das plantas, no terceiro ou quarto par de folhas dos ramos plagiotrópicos foram coletados e imediatamente congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a -86 °C para posterior análise. Os resultados apresentados correspondem à média dos valores obtidos nos três tempos de coleta em cada subparcela.

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase do ascorbato (APX, L-ascorbate peroxidase, EC 1.11.1.11) nas folhas, amostras de 200 mg de tecido foliar foram maceradas com N<sub>2</sub> líquido em almofariz, com adição de polivinilpirrolidona (PVP)-Vetec 1% (p/p), até obtenção de um pó fino. Já para a análise dos frutos, as amostras de frutos foram liofilizadas por 96 horas (liofilizador Terroni, modelo Enterprise II) e moídos por cerca de 1 minuto em moinho 11A basic (IKA, Brasil), adicionando-se nitrogênio líquido para facilitar a moagem e evitar oxidações das amostras, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/p), até a obtenção de um pó fino.

Em seguida, 200 mg do pó obtido no preparo de amostras de folhas e frutos foram homogeneizados em tampão de extração descrito na Tabela 1, para cada tipo de amostra. Os homogeneizados foram centrifugados (Centrifuge 5804 R Eppendorf) a 14000 rpm, por 25 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes utilizados para realização das análises enzimáticas (Bimelt; Keetman; Albrecht, 1998).

Tabela 1 – Descrição das soluções tampão de extração e incubação para análise das enzimas SOD, CAT e APX em folhas e frutos de cafeeiro

	<b>Folhas</b>	<b>Frutos</b>
<b>Tampão de extração -1500 µL de volume total</b>	375 µL de fosfato de potássio (Vetec) 100 mM e pH 7,8; 15 µL de EDTA 0,1 mM; 75 µL de ácido ascórbico (Vetec) 10 mM; 1035 µL de água destilada.	1452 µL de fosfato de potássio 100 mM e pH 7; 15 µL de EDTA 100 mM; 15 µL de ácido ascórbico 100 mM; 6 µL de DDT 500 mM; 12 µL de PMSF 100 mM.
<b>Incubação APX</b>	7 µL do extrato enzimático (ajustado para 360 µL de solução final); fosfato de potássio (Vetec) 100 mM pH 7,0; ácido ascórbico (Vetec) 0,5 mM; peróxido de hidrogênio (Dinâmica) 0,1 mM; água destilada.	5 µL do extrato enzimático (ajustado para 200 µL de solução final); fosfato de potássio 200 mM pH 7,0; ácido ascórbico 10 mM; peróxido de hidrogênio 250 mM; água destilada.
<b>Incubação CAT</b>	9 µL do extrato enzimático (ajustado para 360 µL de solução final); fosfato de potássio (Vetec) 100 mM pH 7,0; peróxido de hidrogênio (Dinâmica) 12,5 mM; água destilada.	9 µL do extrato enzimático (ajustado para 180 µL de solução final); fosfato de potássio 100 mM pH 7,0; peróxido de hidrogênio 12,5 mM; água destilada.
<b>Incubação SOD</b>	12,5 µL do extrato enzimático (ajustado para 360 µL de solução final); fosfato de potássio (Vetec) 50 mM pH 7,8; metionina (Vetec) 14 mM; EDTA (Synth) 0,1 µM; NBT (Vetec) 75 µM; riboflavina (Exodo) 2 µM; água destilada.	5 µL do extrato enzimático (ajustado para 200 µL de solução final); fosfato de potássio 100 mM pH 7,8; metionina 70 mM; EDTA 10 µM; NBT 1 mM; riboflavina 0,2 mM; água destilada.

A atividade da APX foi determinada por meio de adaptação do método de Nakano e Asada (1981), descrita na Tabela 1, para as amostras de folhas e frutos. A atividade enzimática foi determinada pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 290 nm durante 3 minutos a 30 °C para folhas e 28 °C para frutos em espectrofotômetro (BioteK Power Wave XS). O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade da APX. O resultado foi expresso em µmol AsAmin<sup>-1</sup>µg P<sup>-1</sup>.

A atividade da CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 3 minutos, a 30 °C em espectrofotômetro (BioteK Power Wave XS) a partir da incubação das amostras de folhas e frutos descrita na Tabela 1. O coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade da CAT (Havir; Mchale, 1987). O resultado foi expresso em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>µg P<sup>-1</sup>.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT-Vetec) (Giannopolitis e Ries, 1977), a partir da incubação das amostras de folhas e frutos

descrita na Tabela 1. Após incubação por 7 minutos, em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30 W, realizou-se leitura a 560 nm em espectrofotômetro (BioteK Power Wave XS). Uma unidade da SOD correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio. O resultado foi expresso em  $U\ SOD\ min^{-1}\mu g\ P^{-1}$ .

A proteína total de cada extrato enzimático de folhas e frutos foi mensurada em espectrofotômetro (BioteK Power Wave XS), de acordo com o método de Bradford (1976). O resultado foi expresso em  $\mu g\ P\ mg^{-1}$  de massa fresca.

#### **2.4. Análises da composição químicas dos frutos de café**

As análises de avaliação da composição química dos frutos de café foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Café Dr. Alcides Carvalho, situado na EPAMIG, em Lavras, MG. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos em percentagem de matéria seca (%MS), correspondendo à média dos valores obtidos nos três tempos de coleta em cada subparcela.

As amostras de frutos foram moídas por cerca de um minuto em moinho modelo IKA A11 Basic Analytic®, adicionando-se nitrogênio líquido para facilitar a moagem e evitar oxidações na amostra. Após a moagem das amostras, estas foram acondicionadas em embalagens de plástico e armazenadas em freezer, à temperatura de  $-18\ ^\circ C$ , até a realização das análises. A composição dos frutos, nos três estádios de maturação, foi avaliada quanto à umidade, teores de proteínas totais, lipídeos, açúcares totais, compostos fenólicos, cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos.

A umidade dos frutos foi determinada em estufa a  $105\ ^\circ C$ , durante 24 horas, segundo Brasil (2009).

Os compostos fenólicos foram extraídos por refluxo da amostra em solução aquosa de acetona 50 % (v/v) e determinados pelo método Folin-Denis segundo metodologia da AOAC (2000). Para a extração dos compostos fenólicos, foi utilizada 0,5 gramas de amostra à qual foi acrescentada 50 mL de solução aquosa de acetona 50% (v/v). O extrato foi então aquecido em chapa aquecedora até o ponto de ebulição durante 15 minutos. O extrato em suspensão foi filtrado em papel de filtro de filtragem rápida e recolhido, acrescentando-se novamente 50 mL do solvente a amostra residual precipitada. Esse procedimento foi realizado três vezes. Uma vez recolhidos os extratos, o solvente foi evaporado até a obtenção de aproximadamente 5 mL de extrato o qual foi diluído em 50 mL de água destilada e submetido à determinação dos compostos fenólicos.

O conteúdo de proteína bruta foi determinado pelo método Kjeldahl citado pela AOAC (2000), utilizando-se 0,5 g de amostra pulverizada em tubo para digestão. A mesma quantidade de amostra foi utilizada para a determinação de lipídeos totais pelo método Soxhlet (AOAC, 2000).

Os açúcares totais nos frutos de café foram extraídos pelo método de Antrona e quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 620 nm, utilizando uma curva padrão de glicose anidro, conforme método descrito por Dische (1962). Os compostos bioativos cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos (5-ACQ) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia de Vitorino et al. (2001) adaptada por Malta e Chagas (2009). Amostras de 0,5 g de café cru moído foram extraídas em 50 mL de água ultra pura em ebulição, e colocadas em banho-maria, com água em ebulição, durante 3 min. O extrato foi filtrado em papel de filtro comum e, em seguida, filtrado em membrana PTFE de  $0,45\ \mu m$ . A determinação desses compostos foi realizada em cromatógrafo da marca Perkin Elmer Flexar, Software: Chromera

Flexar, com sistema de detecção por arranjo de diodos (PDA Detector Flexar), coluna cromatográfica Perkin Elmer C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m), comprimento de onda de 272 nm. A fase móvel constituiu-se de metanol:água:ácido acético (20:80:1), com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Para a identificação e análise quantitativa, foi elaborada curva-padrão, utilizando-se padrões de cafeína, trigonelina e ácido-5-cafeiolquínico (5-ACQ).

## 2.5. Análise de compostos fenólicos nas folhas

Os teores de compostos fenólicos foram avaliados também nas folhas por serem frequentemente relacionados à defesa das plantas a estresses, incluindo à infecção por *H. vastatrix* (Farah e Donangelo, 2006). Para a realização dessas análises, amostras de folhas foram coletadas quando os frutos de café se apresentavam predominantemente nos estádios verde, verde-cana e maduro, sendo mantidas refrigeradas em gelo durante o transporte e até o preparo das amostras para as análises.

As folhas frescas foram reduzidas manualmente utilizando-se uma tesoura, de forma a ficarem com tamanho aproximado de 1 cm<sup>2</sup>. Em seguida, 20 gramas de folhas reduzidas foram acondicionadas em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de mistura extratora (180 mL de metanol grau HPLC marca Exodo Científica e 20 mL de água destilada).

A extração foi realizada com auxílio de ultrassom em cinco ciclos, divididos em três etapas de oito minutos cada. Entre cada etapa de oito minutos, a solução extratora contendo a amostra foi agitada manualmente por alguns segundos e, ao final das três etapas de cada ciclo, o líquido de extração foi coletado, sendo substituído por mais 200 mL de mistura extratora para a realização do próximo ciclo.

Ao final da extração, a solução extratora total coletada, com volume de 1000 mL, foi armazenada em frasco de vidro escuro em freezer a -18 °C. Em seguida, o extrato de folhas de café foi concentrado em evaporador rotativo de marca Buchi (Rotavapor RII) a 55 °C até evaporação total do metanol.

Após a evaporação da solução extratora, a amostra concentrada foi diluída com água destilada para o volume de 50 mL. Os compostos fenólicos presentes no extrato foram determinados pelo método Folin-Denis segundo metodologia da AOAC (2000). Os resultados apresentados em porcentagem de matéria seca (%MS) correspondem à média das três épocas de coleta para cada tratamento.

## 2.6. Análise mineralógica foliar

Para a avaliação do estado nutricional das plantas após o ataque do patógeno, foram coletadas, após a colheita dos frutos da safra 2018/19, dez folhas por planta, no terceiro ou quarto par de folhas de ramos plagiotrópicos, tomados aleatoriamente no terço médio da planta, totalizando 50 folhas por subparcela experimental. As análises foram realizadas em laboratório terceirizado, segundo metodologia proposta por Malavolta et al. (1997). Os teores dos macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e enxofre) foram expressos em g kg<sup>-1</sup>, enquanto os teores de micronutrientes (boro, zinco, manganês, ferro e cobre) foram expressos em mg kg<sup>-1</sup>.

## 2.7. Análises estatísticas dos dados

Utilizou-se o software Genes (Cruz, 2016) para as análises de variância de todas as variáveis avaliadas de acordo com o modelo estatístico  $Y_{ijk} = \mu + R_i + A_j + e_1 + B_k + AB_{kj} + e_2$ , em que  $Y_{ijk}$  é o valor fenotípico;  $\mu$  é a constante inerente a todas as observações;  $R_i$  é o efeito da repetição  $i$ ;  $A_j$  efeito do genótipo (G)  $j$ ;  $e_1$  é o erro associado à parcela;  $B_k$  é o efeito do tratamento para controle de ferrugem (C)  $k$ ;  $AB_{jk}$  é o efeito da interação GxC e  $e_2$  é o erro associado à subparcela, sendo  $e_1 = e_2 \sim N(0, \sigma_e^2)$ . A precisão experimental foi aferida por meio da estimativa do coeficiente de variação experimental (CV%). As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott (1974) ( $p < 0.05$ ) quando identificado efeito significativo do fator pela análise de variância. Foram obtidas as estimativas de correlação entre incidência e severidade de ferrugem e as demais variáveis quando as plantas receberam tratamento químico para controle da ferrugem ou não, visando identificar possíveis associações entre a expressão da doença e a atividade enzimática e/ou composição de folhas e frutos em função do método de controle da doença. A significância das correlações foi avaliada pelos testes  $t$  e de Mantel. Foi apresentado também um *heatmap* com as médias de todas as variáveis, para visualização das associações obtidas entre expressão da doença e as demais variáveis, considerando cada genótipo individualmente, bem como o tratamento ou não com defensivo para controle da ferrugem.

## 3. RESULTADOS

A composição química e a atividade enzimática nas folhas e frutos, bem como a expressão da ferrugem, foram avaliadas visando identificar possíveis diferenças, bem como semelhanças nessas características, provocadas pela adoção do controle genético ou químico da doença. Foi verificado efeito significativo de genótipos (G), controle (C) e interação GxC na incidência e a severidade da ferrugem. Destaca-se que, dentre os quatro genótipos avaliados, apenas o MG0277 é resistente à ferrugem, uma vez que não apresentou os sintomas característicos da doença (resultados não publicados). O estudo do efeito das fontes de variação genótipos, controle e sua interação sobre a expressão da doença já foi discutido em outro trabalho (resultados não publicados) sendo que, aqui, deseja-se estudar o efeito dos genótipos e tipo de controle nas variáveis analisadas nas folhas e frutos, bem como relacionar a ocorrência e intensidade da doença em função do tipo de controle com a composição e metabolismo das folhas e frutos do cafeeiro.

### 3.1. Folhas

Visando verificar se existe efeito dos genótipos e do uso ou não de controle químico sobre o estado nutricional dos cafeeiros após o ataque de ferrugem, foi realizada, no final do período experimental, uma amostragem foliar e sua análise mineralógica. Constatou-se efeito significativo dos genótipos (G) apenas para o teor de potássio (K), porém, a diferença nas médias não foi detectada pelo teste de agrupamento utilizado. Ainda assim, pode-se observar na Tabela 2, que os teores de K nas folhas foram menores no único genótipo resistente MG0277, podendo ter relação com essa característica. O uso de controle químico (C) e a interação GxC, não tiveram efeito significativo sobre os teores dos nutrientes nas folhas (dados não apresentados). Apesar da ausência de significância dos fatores para a maioria das variáveis em estudo, foram observadas algumas tendências com

relação aos grupos genéticos, de forma que os teores de fósforo (P) e ferro (Fe) tendem a ser menores nos genótipos de HT em relação aos Bourbons, independentemente da adoção de controle químico (TABELA 2).

Tabela 2 – *Heatmap* dos dados de cada tratamento para todas as variáveis analisadas, para visualização das associações obtidas entre expressão da doença e os demais caracteres, considerando cada genótipo individualmente, bem como o tratamento ou não com defensivo químico para controle da ferrugem.

Grupo genético	Com Controle Químico				Sem Controle Químico			
	HT		Bourbon		HT		Bourbon	
	MG0277	MG0313	MG0006	MG0012	MG0277	MG0313	MG0006	MG0012
<sup>1</sup> Incidência	0.0000	0.0000	6.6667	3.3333	0.5556	42.2222	27.7778	20.5556
Severidade	0.0000	0.0000	0.2367	0.1367	0.0133	2.2500	1.7483	1.1067
SOD folha	0.0428	0.0267	0.0293	0.0443	0.0308	0.0323	0.0413	0.0295
CAT folha	0.7867	1.0662	1.4242	1.2303	0.9603	1.3995	1.4472	1.4082
APX folha	8.0805	9.6742	10.0910	10.3422	10.9988	12.2165	9.7892	11.1647
SOD Fruto	0.1105	0.0803	0.1088	0.1097	0.0918	0.1087	0.0815	0.1230
CAT Fruto	0.3828	0.3460	0.9915	0.5527	0.3257	0.4393	0.7042	0.3518
APX Fruto	21.4053	21.5573	15.8665	20.0082	16.5652	24.8745	16.0188	20.9215
CF folha	8.1111	8.1600	6.0622	6.0222	8.5556	7.3511	5.4844	4.9200
CF fruto	5.0868	5.0139	4.7331	4.8897	5.1138	5.103	5.0436	5.0841
Açúcares	9.5117	8.7167	8.5450	9.2567	9.8150	8.9483	8.0250	8.6483
Lipídios	6.5683	6.6717	6.5400	6.3467	6.6533	6.4633	6.5467	6.5367
Proteínas	12.1314	11.8616	12.9833	13.1553	12.2509	12.8165	13.1652	13.8564
Trigonelina	1.0467	1.1567	1.1367	1.1833	1.0633	1.1950	1.2217	1.1983
Ac. clorog.	3.4083	3.3783	3.0383	3.0483	3.3733	3.5600	3.0783	3.0433
Cafeína	0.9600	1.1117	1.1100	1.1367	1.0183	1.1100	1.2233	1.1083
N	24.1500	28.0000	28.7000	33.2500	27.6500	30.8000	27.6500	29.4000
P	1.5500	1.4500	1.9500	2.3500	1.5500	1.7000	1.9500	2.4000
K	17.4500	18.1000	21.0000	21.2500	14.4500	19.0000	21.2500	17.7000
Ca	12.0500	11.4000	13.5000	14.8000	13.9000	9.8000	13.8500	14.6000
Mg	3.4000	2.9500	3.2000	4.0500	3.9000	2.8500	3.6000	3.6000
S	2.8500	2.4500	2.3500	2.4000	2.2000	2.5500	2.6500	2.1500
B	43.0000	43.8800	81.0700	41.9100	55.0400	32.0300	41.4500	70.2200
Zn	7.4500	10.4800	10.1500	11.2500	3.4500	3.2500	7.1300	12.4300
Mn	100.0000	75.0000	122.5000	85.0000	80.0000	55.0000	127.5000	107.5000
Fe	420.0000	387.5000	617.5000	500.0000	430.0000	285.0000	505.0000	522.5000
Cu	5.8800	5.0500	3.5300	3.6500	4.0500	5.6300	4.6500	4.7800

<sup>1</sup>Incidência de ferrugem em %; Severidade de ferrugem em % de área lesionada; Atividade da SOD (U SOD min<sup>-1</sup> μg P<sup>-1</sup>), CAT (μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>min<sup>-1</sup>μg P<sup>-1</sup>) e APX (μmol AsAmin<sup>-1</sup>μg P<sup>-1</sup>) nas folhas e frutos; teores de compostos fenólicos nas folhas (CF folha) e nos frutos (CF fruto), açúcares totais, lipídios, proteínas, trigonelina, ácidos clorogênicos (Ac. Clorog.) e cafeína nos frutos em %MS; teores foliares de nitrogênio (N), fósforo (P), potássio

(K), cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S) em  $\text{g kg}^{-1}$  e boro (B), zinco (Zn), manganês (Mn), ferro (Fe) e cobre (Cu) em  $\text{mg kg}^{-1}$ .

Com o objetivo de investigar se os teores de nutrientes nas folhas estão relacionados com a expressão da doença, foram estimadas as correlações da incidência e severidade com os nutrientes analisados, considerando separadamente o controle químico e o genético (sem controle químico). Quando as plantas não foram controladas quimicamente contra a ferrugem, o nitrogênio e o cobre foram correlacionados positivamente com a incidência, indicando que a maior concentração do nutriente pode estar relacionada com maior número de folhas infectadas. Já o magnésio foi associado negativamente, o que pode induzir à hipótese de que valores elevados desse nutriente podem diminuir a infecção das folhas pelo patógeno (TABELA 3). Essas associações podem ser visualizadas individualmente para cada genótipo na Tabela 2. Quando se analisa a severidade da doença, a diferença foi que o potássio, e não o nitrogênio, se relacionou com a área foliar afetada. Já com a adoção do controle químico, houve associação positiva da incidência e severidade da doença com os teores de ferro e negativas para o enxofre e o cobre. O cálcio foi correlacionado positivamente apenas com a severidade. Por meio desses resultados verifica-se que, mediante o controle químico, maiores concentrações de ferro favorecem a maior infecção pela doença, assim como o cálcio, favorece maior área foliar lesionada, ao contrário do enxofre e cobre, que, quando presentes em alta concentração, diminuem a adaptabilidade do patógeno (TABELA 3).

Tabela 3 – Correlações das variáveis analisadas nas folhas e frutos com a incidência e severidade de ferrugem, considerando os tratamentos com e sem aplicação de produto químico para controle da ferrugem do cafeeiro.

	Com controle químico				Sem controle químico			
	Incidência		Severidade		Incidência		Severidade	
<b>Severidade</b>	0.998 **	++			0.996 **	++		
<b>SOD folha</b>	-0.146		-0.106		0.351		0.432	
<b>CAT folha</b>	0.904	++	0.906	++	0.943		0.952 *	
<b>APX folha</b>	0.660		0.682		0.186		0.102	
<b>SOD Fruto</b>	0.490		0.503		0.263		0.188	
<b>CAT Fruto</b>	0.969 *	++	0.953 *	++	0.510		0.584	
<b>APX Fruto</b>	-0.959 *	++	-0.941	++	0.606		0.534	
<b>CF folha</b>	-0.913	+	-0.936		-0.568		-0.591	
<b>CF fruto</b>	-0.981 *	++	-0.978 *	++	-0.470		-0.541	
<b>Açúcares</b>	-0.503		-0.474		-0.752		-0.798	
<b>Lipídios</b>	-0.461		-0.510		-0.963 *	++	-0.936	++
<b>Proteínas</b>	0.855		0.883		0.547		0.543	
<b>Trigonelina</b>	0.395		0.426		0.930		0.946	
<b>Ac. Clorog.</b>	-0.925	++	-0.946	++	-0.015		-0.060	
<b>Cafeína</b>	0.522		0.543		0.714	+	0.772	
<b>N</b>	0.500		0.544		0.647	+	0.578	
<b>P</b>	0.682		0.724		0.375		0.371	
<b>K</b>	0.889		0.913		0.857		0.899	++
<b>Ca</b>	0.709		0.748	+	-0.529		-0.490	
<b>Mg</b>	0.217		0.269		-0.802	++	-0.762	++
<b>S</b>	-0.673	++	-0.683	++	0.653		0.699	
<b>B</b>	0.832		0.798		-0.474		-0.491	
<b>Zn</b>	0.450		0.478		0.205		0.206	
<b>Mn</b>	0.710		0.679		0.027		0.095	
<b>Fe</b>	0.988 **	++	0.981 *	++	-0.248		-0.201	
<b>Cu</b>	-0.893	++	-0.912	++	0.882	++	0.843	++

<sup>1</sup>SOD Folha; CAT Folha; APX Folha: atividade da SOD, CAT e APX nas folhas; SOD Fruto; CAT Fruto; APX Fruto: atividade da SOD, CAT e APX nos frutos e teores de compostos fenólicos nas folhas (CF Folha) e nos frutos (CF Fruto), açúcares totais, lipídios, proteínas, trigonelina, ácidos clorogênicos (Ac. Clorog.) e cafeína nos frutos; nitrogênio (N), fósforo (P), potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), enxofre (S), boro (B), zinco (Zn), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu) nas folhas.

\*Significativo ( $p < 0.05$ ) pelo teste t.

++/+ Significativo ( $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ ) pelo teste de Mantel.

Adicionalmente, foram realizadas análises da atividade enzimática nas folhas. A análise de variância para essas características revelou significância apenas da interação GxC para a enzima SOD. Considerando as outras duas enzimas, nenhuma fonte de variação foi significativa (dados não apresentados). Analisando-se as correlações entre a atividade das enzimas nas folhas e a expressão da ferrugem, observa-se que a severidade foi associada positivamente com a CAT quando se considera os tratamentos sem o controle químico. Com a adoção de controle químico, essa enzima se correlacionou positivamente também com a incidência. Isso sugere que, considerando a média das avaliações, a maior atividade dessa enzima está ligada com maior nível da doença (TABELA 3).

Também foi realizada nas folhas, a avaliação do teor de compostos fenólicos, frequentemente relatados como compostos importantes na defesa das plantas a estresses. Foi encontrado efeito significativo de genótipos e do controle químico da doença sobre o teor de compostos fenólicos nas folhas (dados não apresentados). Na tabela 3 observa-se que o teor de compostos fenólicos nas folhas se correlacionou negativamente com a incidência da ferrugem quando foi aplicado o controle químico nas plantas. Isso indica que nas folhas das plantas que responderam de forma mais eficiente ao uso de fungicida, há maior teor de compostos fenólicos. Na Tabela 4 observa-se que os genótipos do grupo HT apresentam maiores teores de compostos fenólicos nas folhas que os Bourbons. Ainda nessa tabela, verifica-se que os tratamentos com controle químico apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos nas folhas.

Tabela 4 – Médias (%MS ) para teores de compostos fenólicos nas folhas e metabólitos nos frutos, considerando genótipos e adoção de controle químico para ferrugem do cafeeiro.

<b>Genótipos</b>	<b><sup>1</sup>CF folha</b>		<b>CF fruto</b>		<b>Açúcares</b>		<b>Lipídios</b>		<b>Proteína</b>		<b>Trig.</b>		<b>Ac. Clor.</b>		<b>Cafeína</b>	
<b>MG0277</b>	8.33	a	5.10	a	9.66	a	6.61	a	12.19	b	1.06	b	3.39	a	0.99	b
<b>MG0313</b>	7.76	a	5.06	a	8.83	a	6.57	a	12.34	b	1.18	a	3.47	a	1.11	a
<b>MG0006</b>	5.77	b	4.99	a	8.29	a	6.54	a	13.07	a	1.18	a	3.06	b	1.17	a
<b>MG0012</b>	5.47	b	4.89	a	8.95	a	6.44	a	13.51	a	1.19	a	3.05	b	1.12	a
<b>Controle químico</b>	<b>CF folha</b>		<b>CF fruto</b>		<b>Açúcares</b>		<b>Lipídios</b>		<b>Proteína</b>		<b>Trig.</b>		<b>Ac. Clor.</b>		<b>Cafeína</b>	
<b>Com controle</b>	7.09	a	4.93	a	9.01	a	6.53	a	12.53	b	1.13	a	3.22	a	1.08	a
<b>Sem controle</b>	6.58	b	5.09	a	8.86	a	6.55	a	13.02	a	1.17	a	3.26	a	1.12	a
<b>CVa (%)</b>	5.05		5.44		11.59		8.54		6.20		6.62		10.21		8.07	
<b>CVb (%)</b>	5.64		6.04		5.77		3.09		4.14		11.61		9.50		8.41	

<sup>1</sup>Teores de compostos fenólicos nas folhas (CF folha) e nos frutos (CF fruto) açúcares totais, lipídios, proteínas, trigonelina (Trig.), ácidos clorogênicos (Ac. Clor.) e cafeína nos frutos em %MS para as fontes de variação genótipos e controle químico de ferrugem.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, considerando cada fonte de variação, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Frutos

Visando verificar se existe relação entre a atividade enzimática nos frutos e a expressão da ferrugem, manejada por meio de controle genético e químico, além das análises de variância, foram obtidas as estimativas de correlação entre as atividades enzimáticas e a incidência e severidade. Pela análise de variância, não foi observado efeito significativo de genótipos, do uso de controle químico ou da sua interação sobre a atividade das enzimas nos frutos (dados não apresentados). Também não foi encontrada correlação significativa entre a expressão da doença e a atividade das três enzimas avaliadas nos frutos quando se considera apenas o controle genético. Já quando as plantas foram tratadas com fungicida, verificou-se correlação significativa positiva entre a incidência e a severidade com a CAT, e negativa com a APX, indicando que, na média das avaliações, a maior atividade da CAT nos frutos associou-se com maior nível da doença, enquanto a maior atividade da APX foi expressa em infecções mais brandas (TABELA 3).

Com relação à composição dos frutos, verifica-se pela análise de variância, efeito significativo dos genótipos sobre os teores de açúcares, proteínas, trigonelina, ácidos clorogênicos e cafeína (dados não apresentados). Para o conteúdo de proteínas, verificou-se que os genótipos do grupo HT apresentam valores inferiores aos Bourbons, ao contrário das concentrações de ácidos clorogênicos, que foram maiores nos HTs. O teste de agrupamento aplicado não foi capaz de diferenciar as médias dos genótipos para teores de açúcares, porém, observa-se que o genótipo resistente MG0277 apresentou maior teor em relação aos demais, podendo indicar uma relação com a resistência genética. Ao contrário, os teores de cafeína e trigonelina foram inferiores apenas no genótipo resistente, podendo também ter alguma relação com essa característica (TABELA 4).

Houve efeito significativo do controle químico apenas sobre o teor de proteínas nos frutos, de forma que as menores concentrações de proteínas foram encontradas nas plantas que receberam controle químico para ferrugem (TABELA 4).

As estimativas de correlação entre os teores de metabólitos nos frutos e a expressão da doença, demonstram que nas plantas que não receberam controle químico, existe associação negativa entre os teores de lipídios e a incidência e severidade de ferrugem e positiva entre a cafeína presente no fruto e a incidência. Ou seja, plantas com maior expressão da doença apresentaram menores teores de lipídios nos frutos e maiores de cafeína. Já quando se considera as plantas tratadas com fungicida, encontra-se correlação negativa entre as duas variáveis que medem a infecção com os teores de ácidos clorogênicos e compostos fenólicos, os quais foram menores nas plantas que expressaram mais a doença (TABELA 3). Na Tabela 2, essas associações podem ser visualizadas individualmente para cada genótipo.

## 4. DISCUSSÃO

Entender as respostas de defesa das plantas aos patógenos em função da forma de controle adotada, pode auxiliar na escolha de um manejo mais eficiente e sustentável. Além disso, contribui para a compreensão de processos que podem ter consequências na planta como um todo, incluindo na qualidade do produto comercializado. Neste trabalho, demonstrou-se que a adoção do controle genético ou químico da ferrugem afeta diferentemente o metabolismo da planta, o que reflete também em órgãos não diretamente afetados pela doença. Destaca-se que este trabalho foi realizado em condições de campo, representando as situações práticas de lavouras

em produção, ao contrário da maioria dos estudos nessa área, que são realizados com plantas em estádios iniciais de desenvolvimento e em ambiente controlado.

Com relação à composição mineralógica das folhas, apesar de não ser verificada diferença significativa entre genótipos para os teores dos nutrientes, exceto para o K, foram observadas algumas tendências, as quais podem ser verificadas na Tabela 2. Os teores de P e Fe tendem a ser menores nos genótipos de HT em relação aos Bourbons, independentemente do uso ou não de controle químico, indicando ser uma característica relacionada ao grupo genético. Para os níveis de K foi observada diferença significativa entre genótipos, porém, o teste adotado não foi capaz de agrupar as médias. Observa-se, entretanto, que o genótipo resistente apresentou menor teor de K que os suscetíveis com e sem aplicação de controle químico de ferrugem, o que pode ter relação com essa característica.

Não foi verificada diferença significativa nos teores de minerais quando se considera os tratamentos com e sem controle de ferrugem. Porém, quando se considera esses tratamentos separadamente, foram observadas associações entre o teor de alguns nutrientes nas folhas e a expressão da doença. Considerando o controle genético, quando não foi realizado o controle químico da ferrugem, foi observada correlação positiva da incidência com N e Cu e negativa com Mg. Já considerando a severidade, as correlações com Cu e Mg se mantiveram, porém, ao invés do N, foi observada correlação positiva com o K. Alguns autores citam que concentrações específicas de N e K estão entre os macronutrientes que mais influenciam as respostas de defesa da planta de café a patógenos como *Cercospora coffeicola* e *Phoma tarda* (Lima et al., 2010).

Sabe-se que baixas concentrações de K induzem distúrbios fisiológicos, enquanto altas taxas, estimulam o crescimento das plantas, minimizando a concentração de outros elementos ou induzindo a competição com outros cátions, como Mg e Ca, nos sítios de absorção, necessários durante a fotossíntese e no estabelecimento de barreiras de resistência, respectivamente (Marschner, 2012). Assim, explica-se o menor teor de K apenas no genótipo resistente, bem como a correlação positiva encontrada entre a severidade e os teores de K nas folhas, já que altos teores de K podem prejudicar a formação de barreiras de resistência, principalmente quando existe um desequilíbrio nas proporções dos nutrientes. Outros autores também verificaram maior progresso da ferrugem em elevadas concentrações de K (Pérez et al., 2019, Santos et al., 2008).

Por outro lado, Pérez et al. (2019) constataram que o aumento nas doses de K está diretamente relacionado à maior resistência a ferrugem, desde que em equilíbrio com os outros nutrientes. Rosyady et al. (2020) também verificaram menor ocorrência de ferrugem em plantas com maior teor de lignina nas folhas, a qual coincidiu com os tratamentos que receberam aplicação foliar de K. De modo geral, o K favorece a resistência às doenças, aumenta a espessura da cutícula e da parede celular, estimula a rigidez da estrutura do tecido, regula o mecanismo de abertura e fechamento estomático e promove a rápida recuperação dos tecidos colonizados por patógenos biotróficos, incluindo a ferrugem, o que dificulta a penetração do patógeno e o progresso da infecção (Marschner, 2012; Pérez et al., 2019; Santos et al., 2008). Pode-se sugerir então, que a correlação positiva entre o teor de K e a severidade da doença seria um mecanismo de defesa da planta direcionando mais K para as folhas tentando combater ou minimizar os danos causados pela ferrugem. Também pode-se entender que o desequilíbrio entre nutrientes pode proporcionar maior intensidade das doenças e promover variações nos mecanismos bioquímicos e estruturais de defesa do hospedeiro (Acuña et al., 1992). No presente trabalho, observa-se na Tabela 2, que, em cada genótipo, nem todos os teores foliares de nutrientes se encontram dentro da faixa de suficiência para a cultura, de acordo com as recomendações propostas por Ribeiro et al. (1999), indicando um desequilíbrio nutricional. Isso

implica que o equilíbrio entre os nutrientes é importante para diminuir a intensidade de expressão da doença, dificultando a generalização do efeito de algum nutriente específico, como o K.

O N é um componente essencial de proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos e citocromos, além de fazer parte da molécula de clorofila (Fenilli et al., 2008). Altas concentrações de N na folha desencadeiam o rápido crescimento e multiplicação celular, levando ao afinamento da cutícula e da parede celular, além de aumentar o turgor da célula, diminuir a produção de compostos fenólicos, como a lignina, e estimular o acúmulo de carboidratos de cadeia curta. Esses açúcares podem ser utilizados pelo fungo causador da ferrugem como fonte de energia para penetrar na folha diretamente através cutícula (Pérez et al., 2019). Isso pode explicar a correlação positiva encontrada entre o teor de N nas folhas e a incidência de ferrugem.

Segundo Avelino et al. (2006), dentre as variáveis que apresentam alguma associação com a ocorrência de ferrugem, destacam-se várias características do solo. Em seu estudo, os menores valores de incidência máxima anual de ferrugem foram encontrados em solos ricos em Mg, ou seja, a maior disponibilidade de Mg está relacionada com a menor expressão da doença, assim como no presente trabalho. Silva et al. (2020) também verificaram que é possível estabelecer uma relação entre a concentração de nutrientes e compostos nas folhas e a resistência à ferrugem. Em seu estudo, as concentrações de Mg, juntamente com o teor de ácidos clorogênicos, foram os maiores responsáveis pela diferenciação entre plantas resistentes e suscetíveis, de forma que ambos foram encontrados em menores concentrações em folhas de plantas suscetíveis. Há relatos de que o Mg nas plantas atua modificando a permeabilidade de células contra microrganismos, bem como na produção de ATP (Zaynab et al., 2018). Assim, é esperado que o maior conteúdo de Mg esteja relacionado a plantas mais resistentes a doenças. Além disso, um aumento no conteúdo de Mg está relacionado com a formação de sesquiterpenos, como fitoalexinas, compostos conhecidos por prevenir doenças em plantas (Silva et al., 2020).

Assim como no presente trabalho, no estudo realizado por Silva et al. (2020), além dos maiores teores de Mg, os genótipos resistentes também foram correlacionados com menores concentrações de Cu. O controle preventivo da ferrugem com o uso de fungicidas cúpricos foi bastante utilizado, principalmente até o advento dos fungicidas sistêmicos. Sua ação se dá por meio da formação de uma camada protetora sobre a folha, a qual impede a germinação e penetração do agente causador da ferrugem, devendo, portanto, ser aplicado via foliar (Veneziano, 1999). No presente trabalho, o cobre detectado nas folhas é proveniente da absorção de nutrientes pelas raízes, uma vez que não foi realizada aplicação foliar. Assim, o teor de cobre encontrado nas folhas não tem relação com a proteção contra a infecção pelo patógeno, ao contrário do que acontece quando se utiliza fungicidas cúpricos. Essa correlação direta ocorre, provavelmente, devido ao alto requerimento de Cu no sistema antioxidante, para a formação de enzimas de defesa da planta contra a infecção, já que o Cu é um elemento traço essencial que atua como cofator em enzimas como SOD e PPO. Desta forma, quanto maior a expressão da doença nas plantas suscetíveis, maior o requerimento de Cu para a formação de enzimas de defesa, justificando sua correlação positiva com a expressão da ferrugem (Silva et al., 2020).

Já quando se considera as plantas que receberam controle químico para ferrugem, são observadas importantes alterações nos nutrientes correlacionados com a expressão da doença. O cobre, que nas plantas sem controle apresentou correlação positiva com incidência e severidade, se correlacionou negativamente com a ocorrência da doença nas plantas que receberam tratamento químico, ou seja, o maior teor de Cu nas folhas está associado à menor expressão da doença. Essa diferença entre o controle genético e químico ocorre provavelmente porque no controle químico outros mecanismos de defesa não dependentes de Cu podem ser ativados, de forma

que a demanda por Cu é menor. Além disso, o N, K e Mg não mais apresentaram correlação com a ferrugem nessas plantas tratadas, mas foi observada correlação positiva do teor de Fe com incidência e severidade, bem como negativa do conteúdo de S com esses dois parâmetros avaliados. Avelino et al. (2006) verificaram em plantas sem tratamento para controle da ferrugem, os menores valores de incidência em solos com baixos teores de Fe, indicando também, uma correlação positiva, mas não foi avaliado o teor desse nutriente nas folhas da planta.

Segundo Zaynab et al., (2018) alguns metabólitos secundários são conhecidos por participar de mecanismos de defesa das plantas a patógenos e insetos, dentre eles, compostos contendo N e S. É possível que metabólitos estejam associados à resposta de defesa ativada pelo defensivo químico, explicando a correlação negativa da expressão da doença com os teores de S. Acuña et al. (1992) constataram que a maior incidência da doença coincidiu com reduções nos teores de S em plantas não tratadas com fungicida.

Além disso, o Ca apresentou correlação positiva com a severidade da doença nas plantas submetidas ao controle químico da ferrugem. Esse resultado não é esperado, já que o Ca é essencial para a integridade das células, principalmente por serem constituintes estruturais dos poligalacturonatos de Ca, requeridos na lamela média para a estabilidade da parede celular. Fungos produzem enzimas pectinolíticas, que destroem os poligalacturonatos durante a infecção e colonizam os tecidos vegetais, e essas enzimas são inibidas pelo Ca (Biggs et al., 1997). Santos et al. (2008) verificaram que o maior progresso da ferrugem coincidiu com a redução no teor foliar de Ca em tratamento sem controle químico da ferrugem. Belan et al. (2015) ao estudarem a distribuição de nutrientes nas folhas de café com lesões provocadas por cinco diferentes doenças, verificaram que maior teor de cálcio foi encontrado em tecidos sintomáticos, decrescendo em direção à zona de transição e atingindo seu teor mínimo em tecidos assintomáticos em três das doenças avaliadas, mas não para ferrugem. Porém, esta correlação positiva poderia ser um mecanismo de resposta da planta tratada quanto à severidade da ferrugem, em que há maior direcionamento de Ca para folhas com infecções mais severas, na tentativa de combater a infecção.

Não foram encontrados estudos anteriores sobre o efeito de fungicidas sistêmicos sobre o teor de nutrientes na folha. Segundo com Matiello e Almeida (1997), o uso de fungicidas do grupo triazol, como o triadimenol, aplicados via solo, para o controle da ferrugem, promove um acréscimo no vigor dos cafezais. Isso porque o produto favorece o incremento em tamanho do sistema radicular do cafeeiro e, por consequência, ocorre uma maior absorção de nutrientes, acarretando melhor desenvolvimento da parte aérea e aumento de vigor. Entretanto, no presente trabalho, não foi observado efeito significativo do uso do defensivo sobre os teores de nutrientes nas folhas.

Apesar de escassos os estudos sobre os efeitos de fungicidas nos mecanismos de defesa das plantas, sabe-se que fungicidas sistêmicos como os triazóis provocam alterações nos processos fisiológicos das plantas, estimulando a biossíntese de clorofila nas plantas (Jaleel; Gopi; Panneerselvam, 2008) e o florescimento e produção de frutos, (Moura, 2013), alteram o metabolismo do etileno (Rademacher, 2000) e reduzem a taxa de transpiração, o que pode proporcionar aumento de produtividade em algumas culturas (Biggs, 1990). Segundo Martins et al., (2011), os produtos sistêmicos, após serem aplicados no solo, absorvidos e translocados pelo xilema, alcançam as folhas do café, sítio de ação contra certas doenças como a ferrugem. O princípio ativo instala-se nesses órgãos, prolongando a atividade fotossintética. Acredita-se, então, que o uso do produto químico pode ativar rotas metabólicas de defesa diferentes daquelas ativadas pela resistência genética, o que alteraria o requerimento de nutrientes na ativação e formação dos mecanismos bioquímicos e estruturais de defesa do hospedeiro. Os

resultados aqui apresentados evidenciam a necessidade de se explorar a relação entre o uso de defensivos e as alterações provocadas no metabolismo e composição química da planta no combate às infecções.

Com relação à atividade enzimática nas folhas, não foi observado efeito dos genótipos ou do controle químico na atividade das três enzimas avaliadas. Foi verificado apenas efeito significativo da interação genótipos x controle sobre a atividade da SOD, demonstrando que a atividade da SOD nos genótipos responde de forma diferente ao uso ou não do defensivo. A SOD é considerada a primeira na linha de defesa contra as EROs e pode ser uma enzima chave, uma vez que atua na dismutação do  $O_2^-$  convertendo-o em  $H_2O_2$ , sendo o  $O_2^-$  a primeira ERO formada em excesso em situação de estresse e uma das mais danosas à célula (Pandey et al., 2017). Não se tem, entretanto, relato na literatura científica dos efeitos de fungicidas sistêmicos na atividade dessa enzima.

Não foi detectada também correlação entre a atividade de SOD e APX com a expressão da doença nos tratamentos com ou sem controle químico. Porém, observa-se nos tratamentos sem controle químico, que houve correlação positiva significativa entre a atividade da CAT e a severidade de ferrugem. Nos tratamentos com controle, além da severidade, essa correlação foi verificada também com a incidência. Isso pode indicar que nos tratamentos com controle químico, a ativação da CAT como mecanismo de defesa, ocorre já no início da manifestação da doença, uma vez que a atividade da CAT se correlaciona também com a incidência. Por outro lado, no controle genético, o acionamento desse mecanismo aparenta ser mais tardio, já que é ativado apenas quando a doença ocorre com maior intensidade, fato evidenciado pela correlação positiva da atividade dessa enzima apenas com a severidade. A CAT é uma enzima do sistema antioxidante que atua neutralizando o  $H_2O_2$  produzido em resposta a diferentes situações de estresse (Yang; Poovaiah, 2002), convertendo-o em água e oxigênio molecular, já que é tóxico à célula (Pandey et al., 2017). A resistência a *H. vastatrix* é expressa por uma grande liberação de  $H_2O_2$ , uma rápida e localizada morte da célula vegetal associada à restrição do crescimento de fungos, além do aumento da atividade de enzimas de defesa como a CAT (Silva et al. 2008). Honorato-Júnior et al. (2015), ao avaliarem as folhas de cafeeiros suscetíveis inoculados com *H. vastatrix* e tratados com epoxiconazol (triazol) ou piraclostrobina (estrobilurina) em comparação à testemunha verificaram aumento na atividade da CAT quando foi adotado o controle químico, sugerindo que o sistema antioxidante nas plantas pulverizadas foi bastante aprimorado, o que evitou possíveis danos às células foliares devido a produção de EROs. No presente trabalho, foi observada situação contrária, ou seja, a maior atividade da CAT foi correlacionada à maior expressão da doença nos tratamentos com e sem controle químico.

Sabe-se entretanto, que em plantas suscetíveis, algumas das respostas de defesa, como a ativação de enzimas antioxidantes, são observadas em fases mais tardias do processo de infecção, tornando-se ineficazes no controle da ação do patógeno (Possa, 2015), enquanto nas resistentes, sua ativação precoce pode ser um mecanismo de tolerância (Silveira et al., 2015). Como no presente trabalho avaliou-se a infecção em condição de campo, considerando-se a média das diferentes épocas de avaliação, não se tem total controle sobre o momento em que ocorreu a infecção, nem informação sobre o tempo decorrido até que os tratamentos apresentassem resposta de defesa. Desta forma, é possível que a ativação tardia dessa enzima nos tratamentos que expressaram mais a ferrugem, tenha influenciado no resultado dessa correlação. A avaliação da intensidade da doença bem como da atividade enzimática separadamente em cada tempo de avaliação, poderia esclarecer esses resultados.

Ainda nas folhas, observa-se que os genótipos derivados de HT apresentam maiores teores de compostos fenólicos, indicando uma relação desses metabólitos com o grupo genético, mas não necessariamente com a resistência à ferrugem, já que apenas genótipo MG0277 apresentou resistência. Destaca-se que essa diferenciação

entre grupos genéticos pelo teor de compostos fenólicos é possível apenas quando avaliado nas folhas. Quando se considera a concentração desses compostos nos frutos, não há diferença entre os genótipos avaliados. Kitzberger et al. (2013) também não encontraram diferença entre o teor de compostos fenólicos nos grãos de cultivares modernas, derivadas de HT e tradicionais, como Bourbons.

Já quando se considera o uso de controle químico, observa-se que as folhas de plantas tratadas com fungicidas apresentaram maiores concentrações desses compostos. Esse resultado pode indicar que o uso de fungicida estimula a produção de compostos fenólicos nas folhas, sendo um mecanismo eficiente no controle da ferrugem. A correlação negativa observada entre os teores de compostos fenólicos na folha, e a incidência da ferrugem nos tratamentos que receberam controle químico, confirmam essa tendência, pois, demonstram que, quanto mais eficiente a resposta da planta ao uso de fungicida, maior o teor de compostos fenólicos nas suas folhas. Alguns estudos sobre a resistência de plantas a pragas e patógenos indicam que os ácidos clorogênicos e compostos fenólicos em geral estão envolvidos em diversas funções biológicas das plantas, incluindo os seus mecanismos de defesa, graças às suas propriedades antioxidantes e antibióticas (Salgado et al., 2008). Esses compostos podem ser substratos de peroxidases, levando à polimerização de produtos como pigmentos insolúveis e lignina, que contribuem para o mecanismo de defesa das plantas (Farah e Donangelo, 2006). Além disso, foi verificado por Leitão et al. (2011) seu acúmulo diferencial em folhas durante o processo de desenvolvimento do patógeno, que pode sugerir seu possível envolvimento na resistência de café contra *H. vastatrix*. No presente trabalho, não foi observada essa relação com a resistência genética, mas sim, com a defesa da planta ao patógeno quando tratada com fungicida. Essa ausência de correlação entre o teor de compostos fenólicos e a incidência e severidade de ferrugem quando os genótipos não receberam controle químico da doença, pode ser devido à quebra de resistência observada no genótipo MG0313. Apesar de pertencer ao grupo HT, no qual apenas cerca de 2% dos genótipos apresentam suscetibilidade à raça mais comum de ferrugem (Rodrigues Jr. et al., 2004), a alta incidência e a severidade observada nesse genótipo, quando não tratado com fungicida, sugere a quebra de resistência, assim como verificado em algumas cultivares derivadas do grupo HT (Del Grossi et al., 2013). Assim, apesar da presença de altos teores de compostos fenólicos nas folhas do MG0313, outros importantes mecanismos de defesa da planta ao patógeno podem não estar ativos, levando à alta expressão da doença. Isso indica que, apesar da sua relação com mecanismos de defesa das plantas, maior concentração de compostos fenólicos, por si só, não garante a resistência do cafeeiro à ferrugem.

Os resultados discutidos demonstram a possibilidade de se associar a maior ou menor expressão da doença à concentração de nutrientes, compostos fenólicos e atividade enzimática das folhas, tanto quando é adotado o controle genético ou químico. Entretanto, não se tem informação sobre a capacidade da ocorrência de ferrugem nas folhas influenciar a concentração de metabólitos e a atividade enzimática dos frutos. Pouco se sabe também sobre a possibilidade do uso de defensivo atingir estes órgãos a partir de uma ação sistêmica, podendo afetar, em última instância, a qualidade sensorial da bebida.

Com relação à composição dos frutos, houve efeito significativo dos genótipos sobre os teores de proteínas, ácidos clorogênicos, açúcares, trigonelina e cafeína. Para o conteúdo de proteínas, verificou-se que os genótipos do grupo HT apresentam valores inferiores aos Bourbons, ao contrário das concentrações de ácidos clorogênicos, que foi maior nos HTs, indicando que o teor destes compostos pode estar associado ao grupo genético. Bertrand et al. (2003) ao avaliarem a influência da introgressão de genes de resistência de *C. canephora* em genótipos de *C. arabica*, também constataram que os indivíduos descendentes desses cruzamentos

apresentaram maiores concentrações de ácidos clorogênicos. Kitzberger et al. (2013) ao avaliarem o teor de proteínas nos grãos de café, não encontraram, por outro lado, relação entre o teor de proteínas e a origem genética, de forma que, dentre as cultivares avaliadas, uma cultivar tradicional (Bourbon) e uma moderna (IPR99) apresentaram os menores teores de proteína.

O teste de agrupamento aplicado não foi capaz de diferenciar as médias dos genótipos para teores de açúcares. Alguns autores relatam menor teor de açúcares totais em grãos de cultivares modernas derivadas de HT, característica que pode ter sido herdada do *C. canephora* (Mendonça et al., 2007). No presente trabalho, por outro lado, o maior teor de açúcares totais foi encontrado para a cultivar resistente MG0277. Apesar desse resultado ter sido obtido a partir dos frutos, e não do grão, o que poderia ser uma causa da não concordância com trabalhos encontrados na literatura, é compreensível que plantas menos afetadas pela doença, como as resistentes, apresentem maior teor de açúcares nos frutos. Isso porque os carboidratos necessários para o desenvolvimento dos frutos são fornecidos a partir das folhas (Yamaki, 2010). Esses carboidratos são normalmente utilizados durante a formação de grãos e no crescimento vegetativo, porém, em situações de estresse, eles podem ser desviados do seu principal caminho metabólico para o mecanismo de defesa das plantas, participando da produção de compostos fenólicos, os quais, devido às propriedades antioxidantes e antibióticas, estão envolvidos em funções biológicas como a resistência a pragas e doenças (Salgado et al., 2008). Além disso, doenças de folha como a ferrugem podem causar desfolha ou redução da área fotossinteticamente ativa devido à formação de lesões, reduzindo o fornecimento de fotoassimilados para os frutos (Ribeyre e Avelino, 2012). Isso explica por que o genótipo resistente foi o que apresentou maior teor de açúcares totais.

Os teores de cafeína e trigonelina foram inferiores apenas no genótipo MG0277, único que apresentou resistência genética, podendo indicar alguma relação desses componentes com sua resposta de defesa ao patógeno, e não necessariamente, com o grupo genético ao qual pertence. Kitzberger, Scholz e Benassi (2014) também não encontraram maiores teores de cafeína nos genótipos obtidos a partir de introgressão de genes de resistência em relação aos arábicas tradicionais, assim como Mendonça et al. (2007), apesar da espécie *C. canephora* apresentar mais que o dobro da cafeína presente em *C. arabica*. Alguns autores relatam que a cafeína, juntamente com outros alcalóides, trigonelina e outros compostos, contribuem para suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Kitzberger, et al., 2014). Além disso, segundo Dessalegn et al. (2007), a biossíntese da cafeína, bem como seu acúmulo, é mais acentuada em situações de estresse. Isso explicaria as maiores concentrações de cafeína em plantas suscetíveis. Constata-se então, que os teores de cafeína, trigonelina e açúcares totais estão relacionados à resistência genética, uma vez que seu conteúdo diferencial é observado apenas no genótipo resistente.

Com relação ao efeito do controle químico, houve efeito significativo apenas sobre os teores de proteínas nos frutos, de forma que os maiores valores foram encontrados nos frutos de plantas que não receberam controle químico para ferrugem. Entretanto, não são encontrados na literatura, relatos sobre o efeito do uso de controle químico sobre o teor de proteínas nos frutos ou outros órgãos do café.

Ao avaliar as estimativas de correlação entre os teores de metabólitos nos frutos e a expressão da doença, verifica-se que nas plantas que não receberam controle químico, existe correlação negativa entre os teores de lipídios e a incidência e severidade de ferrugem e correlação positiva entre a cafeína presente no fruto e a incidência. Segundo Dessalgen et al. (2007), a biossíntese e o acúmulo da cafeína são mais acentuados em situações de estresse, razão pela qual esse composto foi encontrado em maiores quantidades em frutos de plantas com maior severidade da doença. Sabe-se também que as EROs, produzidas em excesso na planta sob condição

de estresse, são extremamente reativas e citotóxicas, podendo reagir com biomoléculas como ácidos graxos insaturados na membrana plasmática, nas membranas das organelas e endomembranas, causando a peroxidação dos lipídios e a ruptura da membrana (Monteiro et al, 2016). Isso pode explicar o menor teor de lipídios encontrado em plantas com maior expressão da doença.

Já quando se considera as plantas que receberam tratamento para controle da doença, encontra-se correlação negativa da incidência e severidade com os teores de ácidos clorogênicos e compostos fenólicos, os quais foram menores nos frutos das plantas que expressaram mais a doença quando a ferrugem é manejada com o uso de fungicida, assim como observado para os teores de compostos fenólicos e incidência nas folhas. Mhlongo et al. (2014) relataram que compostos fenólicos que estimulam a defesa das plantas também induzem o acúmulo de ácido clorogênico e outros ácidos cafeoilquinínicos mono e di-acilados. Também tem sido demonstrado que menor concentração de ácidos clorogênicos nas folhas as tornariam mais suscetíveis ao ataque de insetos (Fernandez et al., 2012). Não foram encontradas, no entanto, informação sobre a influência do uso de produtos químicos para controle de doenças sobre os teores de compostos fenólicos e ácidos clorogênicos nas folhas e, principalmente, nos frutos. Porém, pode-se inferir que a presença do fungicida sistêmico na planta estimula a maior produção de ácidos clorogênicos e compostos fenólicos na planta como um todo, principalmente nos genótipos que respondem de forma mais eficiente a esse tipo de controle.

Referente à atividade enzimática nos frutos, não foi constatado efeito significativo de genótipos ou do uso de controle químico pela análise de variância. Também não foi encontrada correlação significativa entre a expressão da doença e a atividade das três enzimas avaliadas nos frutos quando as plantas não receberam tratamento químico para ferrugem. Infere-se por esses resultados que, na média das avaliações, a ocorrência ou não de ferrugem, controlada por resistência genética, não tem efeito sobre a atividade enzimática antioxidante no fruto, sendo, portanto, uma ação localizada de defesa. Destaca-se, no entanto, que esses resultados foram obtidos considerando a média de três épocas de avaliação, a qual pode influenciar nas estimativas de correlações.

Já quando as plantas foram tratadas com defensivo, observa-se correlação significativa positiva entre a incidência e severidade com a CAT, e negativa com a APX. Esses resultados confirmam o efeito sistêmico do produto químico para controle da ferrugem em outros órgãos da planta, além daquele onde ocorre a lesão, podendo interferir no metabolismo da planta como um todo, dependendo do nível de estresse enfrentado. Os dados de correlação demonstram que, quanto maior é expressão da doença na planta, maior é a atividade de CAT e menor a da APX nos frutos.

Considerando que a CAT e a APX atuam de forma coordenada na neutralização do  $H_2O_2$ , sendo que a CAT apresenta baixa afinidade pelo substrato, atuando na presença de altos níveis de  $H_2O_2$ , ao contrário da enzima APX, que atua em baixos níveis do substrato (Sharma et al., 2012), e sabendo que a intensidade de expressão da APX é diretamente correlacionada com a duração e intensidade do estresse imposto, de forma que o mesmo tipo de estresse pode induzir diferentes expressões dessa enzima (Pandey et al., 2017), pode-se inferir que o uso de controle químico induz a produção de maiores concentrações de  $H_2O_2$  em frutos de plantas com infecções mais severas, de forma que a CAT apresenta atividade nesses casos. Já em infecções mais brandas, com menores concentrações dessa ERO, é favorecida a atuação da APX. Deve-se atentar, entretanto, que os resultados do presente trabalho se referem à média de três épocas de avaliação, a qual pode influenciar nas correlações obtidas.

Assim, é possível que o fungicida sistêmico atue na planta ativando suas rotas de defesa como um todo, de acordo com o nível de epidemia enfrentado pela planta. Echeverria-Beirute et al. (2018), ao avaliarem como o

uso ou não de defensivo para controle da ferrugem afetam a qualidade de bebida, verificaram que dois dos 10 atributos avaliados em análises sensoriais e quatro de 154 compostos voláteis mensurados em análises químicas dos grãos torrados, foram significativamente afetados pelo controle químico, demonstrando que o uso de produto químico para controle da ferrugem, que ocorre nas folhas, pode ter reflexo em outros órgãos da planta.

Os resultados desse estudo evidenciam a relação existente entre a expressão da ferrugem e a composição e metabolismo dos órgãos do cafeeiro, as quais podem apresentar divergências, dependendo do método de controle adotado. Existem também indícios de uma ação sistêmica dos mecanismos de defesa ativados na planta, tanto pelo controle químico, quanto pelo controle genético, que são constatados em tecidos além daqueles diretamente afetados pelo patógeno. Assim, novos estudos devem ser conduzidos visando compreender essas alterações em função do tipo de controle, considerando, principalmente, o tempo de resposta ao patógeno nos diferentes órgãos, para que correlações mais precisas possam ser estabelecidas. O entendimento desses processos pode contribuir para a escolha e condução de um manejo mais sustentável das doenças no campo, o que pode ter reflexo também no produto final.

## 5. CONCLUSÕES

O controle químico utilizado no experimento não afeta diretamente o teor de nutrientes nas folhas e a maioria dos metabólitos nos frutos, mas afeta o teor de compostos fenólicos nas folhas e de proteínas nos frutos.

A atividade das enzimas antioxidantes nas folhas e frutos não sofre efeito de genótipos ou do controle químico nas condições avaliadas.

Os teores de açúcares totais, cafeína e trigonelina, nos frutos avaliados nesse experimento, sofrem efeito significativo dos genótipos, estando relacionados com a resistência genética.

Nas condições de avaliação, o nível de expressão da ferrugem está associado ao teor de nutrientes e de compostos fenólicos nas folhas e à composição química de frutos, bem como à atividade de enzimas antioxidantes nas folhas e frutos. Porém, existem diferenças nessas respostas quando se considera o controle genético ou químico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à EPAMIG pela disponibilização da infraestrutura e equipamentos, ao CNPq pelas bolsas de produtividade (Carvalho, G.R.) e de doutorado (Pereira, D.R.) e pelo apoio financeiro (número de concessão 425088/2018-9) e à Fapemig e Consórcio Pesquisa Café pelo apoio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- Acuña, R. S., Zambolim, L., Venegas, V. H. A., Chaves, G. M, 1992. Relação entre a produção de grãos, o teor foliar de macronutrientes e a severidade da ferrugem do cafeeiro. *Revista Ceres*, 39 (224), 365-377.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2000. *Official methods of analysis of AOAC International*, 17th ed. Eds.; AOAC International, Arlington, 1094p.
- Avelino, J., Zelaya, H., Merlo, A., Pineda, A., Ordoñez, M., Savary, S., 2006. The intensity of a coffee rust

- epidemic is dependent on production situations. *Ecological Modelling* 197, 431–447. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.03.013>
- Belan, L.L., Pozza, E.A., Freitas, M.L. de O., Pozza, A.A.A., de Abreu, M.S., Alves, E., 2015. Nutrients distribution in diseased coffee leaf tissue. *Australasian Plant Pathol.* 44, 105–111. <https://doi.org/10.1007/s13313-014-0329-0>
- Bertrand, B., Guyot, B., Anthony, F., Lashermes, P., 2003. Impact of the *Coffea canephora* gene introgression on beverage quality of *C. arabica*. *Theor Appl Genet* 107, 387–394. <https://doi.org/10.1007/s00122-003-1203-6>
- Biggs, A.R., 1990. Reduction in Transpiration and Return Bloom in Apple by Two Sterol-inhibiting Fungicides. *HortSci* 25, 1403–1405. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.25.11.1403>
- Biggs, A.R., El-Kholi, M.M., El-Neshawy, S., Nickerson, R., 1997. Effects of Calcium Salts on Growth, Polygalacturonase Activity, and Infection of Peach Fruit by *Monilinia fructicola*. *Plant Disease* 81, 399–403. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1997.81.4.399>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Regras para análise de sementes. Brasília: CLAV/DNDV/SAND/MA, 398p. URL ([https://www.abrates.org.br/files/regras\\_analise\\_de\\_sementes.pdf](https://www.abrates.org.br/files/regras_analise_de_sementes.pdf)) (May 21, 2020).
- Capucho, A.S., Zambolim, L., Duarte, H.S.S., Vaz, G.R.O., 2011. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*: Estimation of coffee leaf rust severity. *Plant Pathology* 60, 1144–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02472.x>
- Cruz, C.D., 2016. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Sci. Agron.* 38, 547. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i3.32629>
- Del Grossi, L., Sera, T., Sera, G.H., Fonseca, I.C. de B., Ito, D.S., Shigueoka, L.H., Andreazi, E., Carvalho, F.G., 2013. Rust resistance in Arabic Coffee cultivars in northern Paraná. *Braz. arch. biol. technol.* 56, 27–33. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132013000100004>
- Demant, L.A.R., Maringoni, A.C., 2012. Controle da mancha angular do feijoeiro com uso de fungicidas e seu efeito na produção das plantas. *Idesia* 30, 93–100. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292012000200012>
- Dessalegn, Y., Labuscagne, M.T., Osthoff, G., Herselman, L., 2008. Variation of green bean caffeine, chlorogenic acid, sucrose and trigonelline contents among Ethiopian *Arabica coffee* accessions. *SEJS* 30, 77–82. <https://doi.org/10.4314/sinet.v30i1.18286>
- Dische, Z., 1962. General color reactions, in: Whistler, R.L., Wolfram, M.L. (Eds.), *Carbohydrate chemistry*. Academic Press: New York, 477–512p.
- Echeverria-Beirute, F., Murray, S.C., Klein, P., Kerth, C., Miller, R., Bertrand, B., 2018. Rust and Thinning Management Effect on Cup Quality and Plant Performance for Two Cultivars of *Coffea arabica* L. *J. Agric. Food Chem.* 66, 5281–5292. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03180>
- Farah, A., Donangelo, C.M., 2006. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 23–36. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>
- Fenilli, T.A.B., Reichardt, K., Favarin, J.L., Bacchi, O.O.S., Silva, A.L., Timm, L.C., 2008. Fertilizer 15N balance in a coffee cropping system: a case study in Brazil. *Rev. Bras. Ciênc. Solo* 32, 1459–1469. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000400010>
- Fernandez, D., Tisserant, E., Talhinas, P., Azinheira, H., Vieira, A., Petitot, A.-S., Loureiro, A., Poulain, J., Da Silva, C., Silva, M.D.C., Duplessis, S., 2012. 454-pyrosequencing of *Coffea arabica* leaves infected by the rust fungus *Hemileia vastatrix* reveals in planta-expressed pathogen-secreted proteins and plant functions in a late compatible plant-rust interaction: Coffee-Rust 454-pyrosequencing. *Molecular Plant Pathology* 13, 17–37. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00723.x>
- Geoinfo, 2004. Mapa de solos do estado de Minas Gerais. URL ([http://geoinfo.cnps.embrapa.br/layers/geonode%3Alev\\_mg\\_estado\\_solos\\_lat\\_long\\_wgs84\\_vt#category-more](http://geoinfo.cnps.embrapa.br/layers/geonode%3Alev_mg_estado_solos_lat_long_wgs84_vt#category-more)) (April 15, 2020).
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* 84, 450–455. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- Herzog, T.T., E Silva, B.S.O., Da Silva, M.B., Partelli, F.L., De Souza, A.F., 2018. EFEITO DE FUNGICIDAS NO CAFEEIRO CONILON. *NAT* 6, 435. <https://doi.org/10.31413/nativa.v6i5.5664>
- Honorato Júnior, J., Zambolim, L., Aucique-Pérez, C.E., Resende, R.S., Rodrigues, F.A., 2015. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 123, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.016>

- Jaleel, C.A., Gopi, R., Panneerselvam, R., 2008. Growth and photosynthetic pigments responses of two varieties of *Catharanthus roseus* to triadimefon treatment. *Comptes Rendus Biologies* 331, 272–277. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2008.01.004>
- Kitzberger, C.S.G., Scholz, M.B. dos S., Benassi, M. de T., 2014. Bioactive compounds content in roasted coffee from traditional and modern *Coffea arabica* cultivars grown under the same edapho-climatic conditions. *Food Research International* 61, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.031>
- Kitzberger, C.S.G., Scholz, M.B. dos S., Pereira, L.F.P., Benassi, M. de T., 2013. Composição química de cafés árabe de cultivares tradicionais e modernas. *Pesq. agropec. bras.* 48, 1498–1506. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013001100011>
- Leitão, S., Guerra-Guimarães, L., Bronze, M.R., Vilas Boas, L., Sá, M., Almeida, M.H.G., Silva, M.C., 2011. Chlorogenic acid content in coffee leaves: possible role in coffee leaf rust resistance. in *Proceedings of the 23th International Conference on Coffee Science (ASIC), Bali*. URL ([https://www.researchgate.net/publication/280738973\\_Chlorogenic\\_Acid\\_Content\\_in\\_Coffee\\_Leaves\\_Possible\\_Role\\_in\\_Coffee\\_Leaf\\_Rust\\_Resistance](https://www.researchgate.net/publication/280738973_Chlorogenic_Acid_Content_in_Coffee_Leaves_Possible_Role_in_Coffee_Leaf_Rust_Resistance)) (May 30, 2020).
- Lima, L.M., Pozza, E.A., Torres, H.N., Pozza, A.A.A., Salgado, M., Pfenning, L.H., 2010. Relationship between nitrogen/potassium with phoma spot and nutrition of coffee seedlings cultivated in nutrient solution. *Tropical Plant Pathology*, 35(4), 223–228. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762010000400003>.
- Malavolta, E.; Vitti, G.C.; Oliveira, S.A., 1997. Avaliação do estado nutricional da plantas: princípios e aplicações. second ed. POTAFOS, Piracicaba, 319 p.
- Malta, M.R., Chagas, S.J.D.R., 2009. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. *Acta Sci. Agron.* 31, 57–61. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i1.6629>
- Marschner, H., 2012. Mineral nutrition of higher plants , third ed. Elsevier, London.
- Martins, F.B., Gonzaga, G., Dos Santos, D.F., Reboita, M.S., 2018. Classificação climática de köppen e de thornthwaite para minas gerais: cenário atual e projeções futuras. *ABCLima* 1. <https://doi.org/10.5380/abclima.v1i0.60896>
- Martins, L.D., Tomaz, M.A., Souza, A.F., Jesus Junior, W.C. de, Rodrigues, W.N., 2011. Influência da aplicação de ciproconazol + tiametoxam no crescimento de mudas de *Coffeacaneophora Pierre ex A. Froehner*. *Revista de Ciências Agrárias*, v.34, n.1, p.220-228, 2011. URL (<http://www.scielo.mec.pt/pdf/rca/v34n1/v34n1a20.pdf>). (May 30, 2020).
- Matiello, J. B.; Almeida, S. R., 1997. Variedades de café – como escolher, como plantar. *Boletim Técnico MA/PROCAFÉ*, 64p.
- Mendonça, L.M.V.L., Pereira, R.G.F.A., Mendes, A.N.G., Borém, F.M., Marques, E.R., 2007. Composição química de grãos crus de cultivares de *Coffea arabica* L. suscetíveis e resistentes à *Hemileia vastatrix* Berg et Br. *Ciênc. agrotec.* 31, 413–419. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000200022>
- Mhlongo, M.I., Piater, L.A., Steenkamp, P.A., Madala, N.E., Dubery, I.A., 2014. Priming agents of plant defence stimulate the accumulation of mono- and di-acylated quinic acids in cultured tobacco cells. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 88, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.09.002>
- Monteiro, A.C.A., de Resende, M.L.V., Valente, T.C.T., Ribeiro Junior, P.M., Pereira, V.F., da Costa, J.R., da Silva, J.A.G., 2016. Manganese Phosphite in Coffee Defence against *Hemileia vastatrix* , the Coffee Rust Fungus: Biochemical and Molecular Analyses. *J Phytopathol* 164, 1043–1053. <https://doi.org/10.1111/jph.12525>
- Moura, P.C.S., 2013. Efeitos fisiológicos da aplicação de triazol e estrobilurina em soja (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas). Universidade de São Paulo, Piracicaba. <https://doi.org/10.11606/D.11.2013.tde-19042013-102707>
- Nakano, Y.; Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867-880.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y.K., Arora, S., Reddy, M.K., 2017. Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Front. Plant Sci.* 8, 581. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00581>
- Pérez, C.D.P., Pozza, E.A., Pozza, A.A.A., de Freitas, A.S., Silva, M.G., da Silva Gomes Guimarães, D., 2019. Impact of nitrogen and potassium on coffee rust. *Eur J Plant Pathol* 155, 219–229. <https://doi.org/10.1007/s10658-019-01765-4>
- Possa, K. F. Abordagem proteômica de folhas da cultivar mundo novo (*Coffea arabica* L.) induzida para a resistência à ferrugem, 2015. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 123p. URL ([http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/5159/1/TESE\\_Abordagem%20prote%20mica%20de%20folhas%20da%20cultivar%20mundo%20novo%2028Coffea%20arabica%20L.%29%20induzida%20para%20a%20resist%20ancia%20a%20ferrugem.pdf](http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/5159/1/TESE_Abordagem%20prote%20mica%20de%20folhas%20da%20cultivar%20mundo%20novo%2028Coffea%20arabica%20L.%29%20induzida%20para%20a%20resist%20ancia%20a%20ferrugem.pdf)) (May 30, 2020).
- Rademacher, W., 2000. G ROWTH R ETARDANTS : Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic

- Pathways. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 51, 501–531.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.501>
- Ribeiro, A.C.; Guimarães, P.T.G.; Alvarez V., V.H., 1999. Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. CFSEMG/UFV, Viçosa, 359p.
- Ribeyre, F.; Avelino, J., 2012. Impact of field pests and diseases on coffee quality. in: Oberthür, T.; Läderach, P.; Cock, J. H. (Eds) Specialty coffee : managing quality. IPNI, Southeast Asia, pp. 151-176. URL ([https://www.researchgate.net/publication/259574741\\_Impact\\_of\\_field\\_pests\\_and\\_diseases\\_on\\_coffee\\_quality](https://www.researchgate.net/publication/259574741_Impact_of_field_pests_and_diseases_on_coffee_quality)) (May 30, 2020).
- Rodrigues Júnior, C.J.; Gonçalves, M.M.; Várzea, V.M.P., 2004. Importância do Híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. *Revista de Ciências Agrárias*, 27(2), 203-213.
- Rosyady, M.G., Wijaya, K.A., Wulanjari, D., Wafa, A., 2020. Role of Mineral Elements to Induce the Resistance of Arabica Coffee Against Rust Disease at Lowland Area. *E3S Web Conf.* 142, 03003. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202014203003>
- Salgado, P.R., Favarin, J.L., Leandro, R.A., Lima Filho, O.F. de, 2008. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 65, 354–359. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400005>
- Santos, F. da S., Souza, P.E. de, Pozza, E.A., Miranda, J.C., Carvalho, E.A., Fernandes, L.H.M., Pozza, A.A.A., 2008. Adubação orgânica, nutrição e progresso de cercosporiose e ferrugem-do-cafeeiro. *Pesq. agropec. bras.* 43, 783–791. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000700001>
- Scott, A.J., Knott, M., 1974. A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. *Biometrics* 30, 507. <https://doi.org/10.2307/2529204>
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012, 1–26. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>
- Silva, F.L.F., Nascimento, G.O., Lopes, G.S., Matos, W.O., Cunha, R.L., Malta, M.R., Liska, G.R., Owen, R.W., Trevisan, M.T.S., 2020. The concentration of polyphenolic compounds and trace elements in the *Coffea arabica* leaves: Potential chemometric pattern recognition of coffee leaf rust resistance. *Food Research International* 134, 109221. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109221>
- Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L., Loureiro, A., Nicole, M.R., 2008. Involvement of peroxidases in the coffee resistance to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72, 29–38. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2008.04.004>
- Silveira, H.R. de O., Souza, K.R.D. de, Andrade, C. A., Santos, M. de O.; Rodrigues-Brandão, I.; Silva, D.M. da; Alves, J.D., 2015. Antioxidant system response in coffee seedlings under waterlogging. *Coffee Science*, 10 (4), 437 - 444. URL ([http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/922/pdf\\_4](http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/922/pdf_4)) (May 30, 2020).
- Vitorino, M.D., França, A.S., Oliveira, L.S. de, Borges, M.L.A., 2001. Metodologia para obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis, *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, Especial (3), 17-24, 2001. URL ([https://www.researchgate.net/publication/291979569\\_Metodologias\\_de\\_obtencao\\_de\\_extrato\\_de\\_cafe\\_visando\\_a\\_dosagem\\_de\\_compostos\\_ao\\_volateis#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/291979569_Metodologias_de_obtencao_de_extrato_de_cafe_visando_a_dosagem_de_compostos_ao_volateis#fullTextFileContent)) (May 30, 2020).
- Yamaki, S., 2010. Metabolism and Accumulation of Sugars Translocated to Fruit and Their Regulation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 79, 1–15. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.79.1>
- Yang, T., Poovaiah, B.W., 2002. Hydrogen peroxide homeostasis: Activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *PNAS* 99, 4097–4102. <https://doi.org/10.1073/pnas.052564899>
- Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M.H., Bahadar, K., 2018. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis* 124, 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.08.034>

## ARTIGO 3

# ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E PRODUÇÃO DE METABÓLITOS NO CAFÉ EM FUNÇÃO DA MATURAÇÃO E DO MÉTODO DE CONTROLE DA FERRUGEM

**European Journal of Plant Pathology**

(Versão preliminar)

### RESUMO

No controle genético da ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) em cafeeiros (*Coffea arabica* L.), a resistência ou suscetibilidade da planta depende da ativação precoce ou tardia de mecanismos de defesa, respectivamente. Porém, pouco se sabe sobre os mecanismos ativados pelo controle químico ao longo do desenvolvimento da doença. O efeito nos frutos do progresso da ferrugem também é pouco conhecido. Objetivou-se avaliar as alterações no teor de metabólitos e na atividade enzimática de folhas em frutos ao longo da maturação dos frutos bem como correlações dessas características com o progresso da ferrugem, quanto manejada pelo controle genético ou químico. Foram avaliados quatro genótipos de café arábica, dos grupos Híbrido de Timor (MG0277 e MG0313) e Bourbon (MG0006 e MG0012), com e sem tratamento químico para controle de ferrugem (Verdadero 600 WG® - Ciproconazol (30% m/m) + Tiametoxan (30% m/m), 1,0 kg ha<sup>-1</sup>) nos estádios de maturação verde, verde-cana e maduro. Existe efeito dos estádios de maturação sobre o teor de metabólitos e atividade de enzimas antioxidantes nos frutos, e nos teores de compostos fenólicos nas folhas, mas não na atividade de enzimas antioxidantes nas folhas. O estágio de maturação tem efeito na expressão da ferrugem, a qual varia dependendo da adoção do controle químico ou genético. Existem correlações entre a expressão da ferrugem e as variáveis analisadas, indicando que há uma resposta sistêmica da planta à infecção tanto no controle genético, quanto no químico. Essas associações dependem do estágio de maturação dos frutos e do tipo de controle da ferrugem adotado.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Coffea arabica* L.; *Hemileia vastatrix* Berk et. Br.; superóxido dismutase; catalase; peroxidase do ascorbato; resistência genética; triazol.

### 1. INTRODUÇÃO

O amadurecimento de frutos pode ser considerado um fenômeno oxidativo (Santos et al., 2018) e em espécies comerciais de café (*Coffea arabica* L.), é um processo longo, caracterizado por alterações e evoluções nos tecidos (De Castro e Marracini, 2006). A resistência das plantas a patógenos é frequentemente afetada pelo seu estágio de desenvolvimento, de forma que as plantas se tornam mais resistentes quando adultas. No entanto, em culturas perenes, a idade dos órgãos da planta pode ser mais importante que a idade da planta em si, existindo

relatos do efeito da idade da folha e do estágio de desenvolvimento de frutos do café, na resistência a doenças fúngicas (Eskes e Braghini, 1982).

Os mecanismos de defesa em genótipos resistentes a patógenos são frequentemente estudados. Uma das primeiras respostas detectadas em interações incompatíveis, a qual leva à resistência das plantas, é a ativação de uma explosão oxidativa, caracterizada por um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), que precede a síntese de compostos antimicrobianos e ativação de genes relacionados à defesa (Ballester et al., 2006, Monteiro et al., 2016, Pandey et al., 2017). Porém, as EROs são altamente reativas e citotóxicas para todos os organismos (REIS et al., 2015). Para removê-las ou minimizar seus efeitos, as plantas contam com o sistema antioxidante, que é um sistema de defesa a estresses, formado por componentes não enzimáticos consumidores de oxirradicais e por enzimas antioxidantes, dentre as quais se destacam a superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), a catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e a peroxidase do ascorbato (APX, L-ascorbate peroxidase, EC 1.11.1.11) (Monteiro et al., 2016, Pandey et al., 2017, Resende et al., 2003).

A ferrugem do cafeeiro, causada pelo fungo biotrófico *Hemileia vastatrix* Berk. et Br. é considerada a principal doença da cultura em abrangência e danos, e seu controle pode ser eficientemente realizado por medidas de natureza genética e química (Carvalho et al., 2017, Echeverria-Beirute et al., 2018, Silva et al., 2006). Na literatura são relatadas algumas estratégias de defesa do cafeeiro à infecção por *H. vastatrix*: a resistência é expressa nas folhas por uma grande liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, uma rápida e localizada morte da célula vegetal, associada à restrição do crescimento de fungos, além do aumento da atividade de enzimas de defesa como a SOD, CAT e APX (Guerra-Guimarães et al., 2008). Também foi verificada nas folhas a deposição de compostos fenólicos, acumulação de calose e lignificação da parede celular na zona de infecção, limitando o crescimento do fungo (Diniz et al., 2012, Guerra-Guimarães et al., 2009).

Existem estudos que associam o teor de metabólitos secundários à intensidade do ataque de ferrugem visando encontrar indicadores de resistência para seleções futuras de genótipos de café (Subroto et al., 2019). Deve-se, porém, se atentar ao fato de que o momento de avaliação é um fator fundamental para o sucesso dessa estratégia. Isso porque a ativação precoce do sistema antioxidante, o aumento na atividade de enzimas de defesa e as alterações nos teores de compostos bioquímicos, podem ser um mecanismo de tolerância das plantas aos estresses bióticos e abióticos (Silveira et al., 2015). No entanto, na interação compatível, algumas das respostas de defesa citadas anteriormente são também observadas, mas nas fases mais tardias do processo de infecção, tornando-se ineficazes no controle da ação do patógeno. Assim, o monitoramento do teor de metabólitos e da atividade de enzimas antioxidantes ao longo do tempo, pode ser usado como um indicador do estresse oxidativo em plantas e ser relacionado com a reação da planta à doença.

Com relação ao controle químico, sabe-se que a utilização de fungicidas altera drasticamente a fisiologia das plantas (Honorato-Junior et al., 2015). Os fungicidas do grupo dos triazóis estão associados com a redução da taxa de transpiração, evitando murchamento e senescência foliar (Herzog et al., 2018), promovem alterações na morfologia das folhas e estimula o florescimento e a formação dos frutos, aumentando o rendimento das culturas, assim como proporcionam maior capacidade fotossintética, com incremento nos teores de clorofila total e maior taxa de assimilação líquida, aumentando a massa seca total (Demant e Maringoni, 2012). Estudos demonstram também, que o uso de fungicida para controle da ferrugem do cafeeiro pode afetar positiva ou negativamente os atributos avaliados na análise sensorial da bebida e o teor de compostos voláteis em grãos torrados (Echeverria-Beirute et al., 2018).

Entretanto, as informações disponíveis na literatura sobre quais são os mecanismos de defesa das plantas induzidos pelo uso do controle químico, ao longo do desenvolvimento da doença, são escassas (Honorato-Junior et al., 2015). Pouco se sabe também sobre a capacidade desse tipo de tecnologia ou da resistência genética em provocar alterações em tecidos não diretamente afetados pelo patógeno, de forma que a escolha do manejo em campo pode ter influência no processo de desenvolvimento dos frutos, refletindo na qualidade do produto. Até o momento não foram encontrados relatos do efeito do controle genético e químico da ferrugem no metabolismo antioxidante da planta e na produção de metabólitos em frutos de café, considerando o progresso da doença ao longo do tempo em condições de campo. Compreender a maneira pela qual o patógeno afeta o metabolismo da planta, bem como a forma com que os diferentes métodos de controle auxiliam no combate desses danos, pode auxiliar na escolha do manejo a ser adotado e com isso reduzir os danos causados às culturas (Honorato-Junior et al., 2015).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito do estágio de maturação no teor de metabólitos dos frutos e na atividade enzimática de folhas e frutos, bem como verificar se existe correlação entre essas características e o progresso da ferrugem, quando manejada por meio do controle genético ou químico. Questiona-se, portanto, se os mecanismos de defesa encontrados nos genótipos resistentes são semelhantes às respostas induzidas pelo uso do produto químico para controle da ferrugem, e se eles se expressam da mesma forma com o progresso da doença. Além disso, deve-se avaliar se a ocorrência da doença nas folhas e suas formas de controle têm influência no metabolismo e síntese de metabólitos nos frutos durante a maturação, já que esse órgão não é diretamente afetado pelo patógeno. Os resultados deste estudo podem contribuir para o entendimento das rotas de defesa ativadas na planta pelo controle genético e químico em resposta ao progresso da doença, assim como seus efeitos na formação dos grãos de café.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Descrição do experimento**

O experimento foi realizado no ano agrícola de 2018/19, no Banco Ativo de Germoplasma de *Coffea* spp. de Minas Gerais, Brasil no Campo Experimental de Patrocínio (CEPC), situado a 18°59'26" de latitude sul, 48°58'95" de longitude oeste e 975 metros de altitude, na Região do Cerrado Mineiro, 1ª Denominação de Origem de Cafés do Brasil. O solo é do tipo Latossolo Vermelho (Geoinfo, 2004) e a topografia é plana, com ligeira inclinação. Patrocínio se encontra em uma região de clima Tropical, com inverno seco e estação chuvosa no verão (Aw), conforme classificação de Köppen (Martins et al., 2018).

Foram avaliados quatro genótipos de café arábica, implantados no ano de 2006, em blocos casualizados com duas repetições e dez plantas por parcela, sendo dois do grupo Híbrido de Timor (MG0277- origem Híbrido de Timor UFV 376-52 e MG0313 - origem Híbrido de Timor UFV 428-04) e dois do grupo Bourbon (MG0006 e MG0012, coletados em lavouras de propriedades particulares nos municípios de Araponga e Manhumirim – MG, respectivamente). Esses genótipos foram escolhidos pela conhecida resistência e suscetibilidade à ferrugem dos genótipos dos grupos Híbrido de Timor e Bourbon, respectivamente.

Metade das plantas de cada parcela recebeu tratamento químico via solo para controle da ferrugem (Verdadero 600 WG® - Ciproconazol (30% m/m) + Tiametoxan (30% m/m), 1,0 kg ha<sup>-1</sup>), no início do período das

chuvas, em novembro de 2018, conforme recomendação agrônômica. Esse produto também é eficiente no controle do bicho mineiro, pela presença do ingrediente ativo Tiametoxan. Desta forma, na outra metade de cada parcela, foi realizado simultaneamente o controle de bicho mineiro (Actara 250 WG® - Tiametoxan (25% m/m), 1,0 kg ha<sup>-1</sup>), totalizando, em um esquema de parcela subdividida, oito tratamentos com duas repetições em subparcelas de cinco plantas. Os demais tratos culturais foram realizados conforme recomendação técnica baseada na análise de solo e monitoramento de pragas e doenças.

## **2.2. Avaliação da ferrugem**

Para verificar o progresso da ferrugem, foram realizadas, de abril a maio de 2019, três avaliações de incidência e severidade, quando os frutos de café se apresentavam predominantemente nos estádios de maturação verde, verde-cana e maduro, visando relacionar a expressão da ferrugem sob diferentes métodos de controle com o processo de desenvolvimento dos frutos. Foram coletadas dez folhas por planta, no terceiro ou quarto par de folhas de ramos plagiotrópicos, tomados aleatoriamente no terço médio da planta, totalizando 50 folhas por subparcela experimental. A incidência da doença foi determinada com base no número de folhas com pústulas esporuladas em relação ao número total de folhas avaliadas por subparcela experimental, sendo, posteriormente, convertida para porcentagem. A severidade da ferrugem foi avaliada por meio de escala diagramática para ferrugem, descrita por Capucho et al. (2011), de acordo com a porcentagem de área foliar lesionada. A resposta dos genótipos avaliados foi para a população natural de raças de ferrugem presentes no campo experimental de Patrocínio.

## **2.3. Avaliação da atividade enzimática em folhas e frutos**

Simultaneamente às avaliações de ferrugem, foram realizadas coletas de material vegetal para análise de atividade enzimática. Para cada tempo de coleta, folhas e frutos localizados no terço médio das plantas, no terceiro ou quarto par de folhas dos ramos plagiotrópicos, foram coletados e, imediatamente, congelados em nitrogênio líquido. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer a -86 °C para posterior análise.

Para a obtenção dos extratos utilizados na determinação da atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6) e peroxidase do ascorbato (APX, L-ascorbate peroxidase, EC 1.11.1.11) nas folhas, amostras de 200 mg de tecido foliar foram maceradas com N<sub>2</sub> líquido em almofariz, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) -Vetec 1% (p/p), até obtenção de um pó fino. Já para a análise dos frutos, as amostras de frutos foram liofilizadas por 96 horas (liofilizador Terroni, modelo Enterprise II) e moídos por cerca de 1 minuto em moinho 11A basic (IKA, Brasil), adicionando-se nitrogênio líquido para facilitar a moagem e evitar oxidações das amostras, com adição de polivinilpirrolidona (PVP) 1% (p/p), até obtenção de um pó fino.

Em seguida, 200 mg do pó obtido no preparo de amostras de folhas e frutos foi homogeneizado em tampão de extração descrito na Tabela 1 para cada tipo de amostra.

Os homogeneizados foram centrifugados (Centrifuge 5804 R Eppendorf) a 14000 rpm, por 25 minutos, a 4 °C, e os sobrenadantes utilizados para realização das análises enzimáticas (Biemelt et al., 1998).

Tabela 1 – Descrição das soluções tampão de extração e incubação para análise das enzimas SOD, CAT e APX em folhas e frutos de cafeeiro

	<b>Folhas</b>	<b>Frutos</b>
<b>Tampão de extração -1500 µL de volume total</b>	375 µL de fosfato de potássio (Vetec) 100 mM e pH 7,8; 15 µL de EDTA 0,1 mM; 75 µL de ácido ascórbico (Vetec) 10 mM; 1035 µL de água destilada.	1452 µL de fosfato de potássio 100 mM e pH 7; 15 µL de EDTA 100 mM; 15 µL de ácido ascórbico 100 mM; 6 µL de DDT 500 mM; 12 µL de PMSF 100 mM.
<b>Incubação APX</b>	7 µL do extrato enzimático (ajustado para 360 µL de solução final); fosfato de potássio (Vetec) 100 mM pH 7,0; ácido ascórbico (Vetec) 0,5 mM; peróxido de hidrogênio (Dinâmica) 0,1 mM; água destilada.	5 µL do extrato enzimático (ajustado para 200 µL de solução final); fosfato de potássio 200 mM pH 7,0; ácido ascórbico 10 mM; peróxido de hidrogênio 250 mM; água destilada.
<b>Incubação CAT</b>	9 µL do extrato enzimático (ajustado para 360 µL de solução final); fosfato de potássio (Vetec) 100 mM pH 7,0; peróxido de hidrogênio (Dinâmica) 12,5 mM; água destilada.	9 µL do extrato enzimático (ajustado para 180 µL de solução final); fosfato de potássio 100 mM pH 7,0; peróxido de hidrogênio 12,5 mM; água destilada.
<b>Incubação SOD</b>	12,5 µL do extrato enzimático (ajustado para 360 µL de solução final); fosfato de potássio (Vetec) 50 mM pH 7,8; metionina (Vetec) 14 mM; EDTA (Synth) 0,1 µM; NBT (Vetec) 75 µM; riboflavina (Exodo) 2 µM; água destilada.	5 µL do extrato enzimático (ajustado para 200 µL de solução final); fosfato de potássio 100 mM pH 7,8; metionina 70 mM; EDTA 10 µM; NBT 1 mM; riboflavina 0,2 mM; água destilada.

A atividade da APX foi determinada por meio de adaptação do método de Nakano e Asada (1981), descrita na Tabela 1, para as amostras de folhas e frutos. A atividade enzimática foi determinada pelo consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 290 nm durante 3 minutos a 30 °C para folhas e 28 °C para frutos em espectrofotômetro (BioteK Power Wave XS). O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade da APX. O resultado foi expresso em µmol AsAmin<sup>-1</sup>µg P<sup>-1</sup>.

A atividade da CAT foi avaliada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, durante 3 minutos, a 30 °C em espectrofotômetro (BioteK Power Wave XS) a partir da incubação das amostras de folhas e frutos descrita na Tabela 1. O coeficiente de extinção molar de 36 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> foi usado para calcular a atividade da CAT (Havir e Mchale, 1987). O resultado foi expresso em µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup>µg P<sup>-1</sup>.

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT-Vetec) (Giannopolitis e Ries, 1977), a partir da incubação das amostras de folhas e frutos

descrita na Tabela 1. Após incubação por 7 minutos, em câmara fechada com lâmpada fluorescente de 30 W, realizou-se leitura a 560 nm em espectrofotômetro (BioteK Power Wave XS). Uma unidade da SOD correspondeu à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotoredução do NBT nas condições do ensaio. O resultado foi expresso em  $U\ SOD\ min^{-1}\mu g\ P^{-1}$ .

A proteína total de cada extrato enzimático de folhas e frutos foi mensurada em espectrofotômetro (BioteK Power Wave XS), de acordo com o método de Bradford (1976). O resultado foi expresso em  $\mu g\ P\ mg^{-1}$  de massa fresca.

#### 2.4. Análises da composição químicas dos frutos

As análises de avaliação da composição química dos frutos de café foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Café Dr. Alcides Carvalho, situado na EPAMIG, em Lavras, MG. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os resultados foram expressos em percentagem de matéria seca (%MS).

As amostras de frutos foram moídas por cerca de um minuto em moinho modelo IKA A11 Basic Analytic®, adicionando-se nitrogênio líquido para facilitar a moagem e evitar oxidações na amostra. Após a moagem das amostras, estas foram acondicionadas em embalagens de plástico e armazenadas em freezer, à temperatura de  $-18\ ^\circ C$ , até a realização das análises. A composição dos frutos, nos três estádios de maturação, foi avaliada quanto à umidade, teores de proteínas totais, lipídeos, açúcares totais, compostos fenólicos, cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos.

A umidade dos frutos foi determinada em estufa a  $105\ ^\circ C$  durante 24 horas, segundo Brasil (2009).

Os compostos fenólicos foram extraídos por refluxo da amostra em solução aquosa de acetona 50 % (v/v) e determinados pelo método Folin-Denis segundo metodologia da AOAC (2000). Para a extração dos compostos fenólicos, foram utilizadas 0,5 gramas de amostra sendo acrescentado 50 mL de solução aquosa de acetona 50% (v/v). O extrato foi então aquecido em chapa aquecedora até o ponto de ebulição durante 15 minutos. O extrato em suspensão foi filtrado em papel de filtro de filtragem rápida e recolhido, acrescentando-se novamente 50 mL do solvente a amostra residual precipitada. Esse procedimento foi realizado por três vezes. Uma vez recolhidos os extratos, o solvente foi então evaporado até a obtenção de aproximadamente 5 mL de extrato, o qual foi diluído em 50 ml de água destilada e submetido a determinação dos compostos fenólicos.

O conteúdo de proteína bruta foi determinado pelo método Kjeldahl citado pela AOAC (2000), utilizando-se 0,5 g de amostra pulverizada em tubo para digestão. A mesma quantidade de amostra foi utilizada para a determinação de lipídeos totais, pelo método Soxhlet (AOAC, 2000).

Os açúcares totais nos frutos de café foram extraídos pelo método de Antrona e quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 620 nm, utilizando-se uma curva padrão de glicose anidro, conforme método descrito por Dische (1962).

Os compostos bioativos cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos (5-ACQ) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia de Vitorino et al. (2001) adaptada por Malta e Chagas (2009). Amostras de 0,5 g de café cru moído foram extraídas em 50 mL água ultra pura em ebulição e colocadas em banho-maria, com água em ebulição, durante 3 min. O extrato foi filtrado em papel de filtro comum e, em seguida, filtrado em membrana PTFE de  $0,45\ \mu m$ . A determinação desses compostos foi realizada em cromatógrafo da marca Perkin Elmer Flexar, Software: Chromera Flexar, com sistema de detecção por arranjo de

diodos (PDA Detector Flexar), coluna cromatográfica Perkin Elmer C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu$ m), comprimento de onda de 272 nm. A fase móvel constituiu-se de metanol:água:ácido acético (20:80:1), com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Para a identificação e análise quantitativa, foi elaborada curva-padrão, utilizando-se padrões de cafeína, trigonelina e ácido-5-cafeiolquínico (5-ACQ).

## 2.5. Análise de compostos fenólicos nas folhas

Os teores de compostos fenólicos foram avaliados também nas folhas por serem frequentemente relacionados à defesa das plantas a estresses, incluindo a infecção por *H. vastatrix* (Farah e Donangelo, 2006; Subroto et al., 2019). Para a realização dessas análises, amostras de folhas foram coletadas quando os frutos de café se apresentavam predominantemente nos estádios verde, verde-cana e maduro, sendo mantidas refrigeradas em gelo durante o transporte e até o preparo das amostras para as análises.

As folhas frescas foram reduzidas manualmente utilizando-se uma tesoura, de forma a ficarem com tamanhos aproximado de 1 cm<sup>2</sup>. Em seguida, 20 gramas de folhas reduzidas foram acondicionadas em Erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de mistura extratora (180 mL de metanol grau HPLC marca Exodo Científica e 20 mL de água destilada).

A extração foi realizada com auxílio de ultrassom em cinco ciclos, divididos em três etapas de oito minutos cada. Entre cada etapa de oito minutos, a solução extratora contendo a amostra foi agitada manualmente por alguns segundos e, ao final das três etapas de cada ciclo, o líquido de extração foi coletado, sendo substituído por mais 200 mL de mistura extratora para a realização do próximo ciclo.

Ao final da extração, a solução extratora total coletada, com volume de 1000 mL, foi armazenada em frasco de vidro escuro em freezer a -18 °C. Em seguida, o extrato de folhas de café foi concentrado em evaporador rotativo de marca Buchi (Rotavapor RII) a 55 °C até a evaporação total do metanol.

Após a evaporação da solução extratora, a amostra concentrada foi diluída com água destilada para o volume de 50 mL. Os compostos fenólicos presentes no extrato foram então determinados pelo método Folin-Denis segundo metodologia da AOAC (2000). Os resultados foram expressos em porcentagem de matéria seca (%MS).

## 2.6. Análises estatísticas dos dados

Utilizou-se o software Genes (Cruz, 2016) para as análises de variância de todas as variáveis avaliadas de acordo com o modelo estatístico  $Y_{ijkl} = \mu + R_i + A_j + B_k + AB_{jk} + e_1 + C_l + CA_{lj} + CB_{lk} + CAB_{ljk} + e_2$ , em que  $Y_{ijkl}$  é o valor fenotípico;  $\mu$  é a constante inerente a todas as observações;  $R_i$  é o efeito da repetição  $i$ ;  $A_j$  efeito do genótipo ( $G$ )  $j$ ;  $B_k$  é o efeito do tratamento para controle de ferrugem ( $C$ )  $k$ ;  $AB_{jk}$  é o efeito da interação  $G \times C$ ;  $e_1$  é o erro associado à parcela;  $C_l$  é o efeito do estágio de maturação ( $M$ )  $l$ ;  $CA_{lj}$  é o efeito da interação  $M \times G$ ;  $CB_{lk}$  é o efeito da interação  $M \times C$ ;  $CAB_{ljk}$  é o efeito da interação  $M \times G \times C$  e  $e_2$  é o erro associado à subparcela, sendo  $e_1 = e_2 \sim N(0, \sigma_e^2)$ . A precisão experimental foi aferida por meio da estimativa do coeficiente de variação experimental (CV%). As médias foram agrupadas pelo teste de Scott-Knott (1974) ( $p < 0.05$ ) quando identificado efeito significativo do fator pela análise de variância. Foram obtidas as correlações entre incidência e severidade de ferrugem e as demais variáveis quando as plantas receberam tratamento químico para controle da ferrugem, ou

não, e considerando os diferentes estádios de maturação, visando identificar possíveis associações entre a expressão da doença e a composição dos frutos e/ou atividade enzimática. A significância das correlações foi avaliada pelos testes t e de Mantel.

### **3. RESULTADOS**

As análises de composição química dos frutos e atividade enzimática de folhas e frutos de café foram realizadas quando os frutos se apresentavam predominantemente nos estádios de maturação verde, verde-cana e maduro, visando correlacionar a expressão da doença e suas formas de controle com o processo de desenvolvimento dos frutos. Os efeitos dos genótipos (G) e do uso de controle químico (C), bem como de sua interação (GxC) sobre essas variáveis, já foi abordado em estudo anterior (Pereira, resultados não publicados), sendo o objetivo desse trabalho, avaliar o efeito dos estádios de maturação nas variáveis analisadas, assim como sua relação com a expressão da ferrugem. Destaca-se, com base nas avaliações de incidência e severidade de ferrugem, que dentre os quatro genótipos avaliados, apenas o MG0277 apresenta resistência ao patógeno (Pereira, resultados não publicados).

#### **3.1. Alterações na produção de metabólitos ao longo da maturação dos frutos de café**

Todos os metabólitos avaliados nos frutos, e o teor de compostos fenólicos nas folhas, sofreram influência do estágio de maturação (M), ou seja, todos eles têm sua concentração alterada ao longo dos estádios de maturação. Compostos fenólicos nos frutos, açúcares, lipídios e proteínas, também foram influenciados pela interação GxM, indicando que a variação nos teores desses metabólitos nos diferentes estádios de maturação depende do genótipo. Efeito significativo da interação CxM foi observado para o teor de proteínas e trigonelina, demonstrando que esses metabólitos são acumulados diferentemente durante a maturação, dependendo do tipo de controle, se genético ou químico. Verificou-se também efeito significativo da interação tripla GxCxM nos teores de açúcares e proteínas, indicando que esses três fatores atuam simultaneamente no acúmulo desses metabólitos no fruto, resultando em teores diferentes, considerando cada caso específico (TABELA 1).

Tabela 1 – Resumo das análises de variância dos teores de metabólitos nos frutos e compostos fenólicos nas folhas.

FV	GL	<sup>1</sup> CF Fol.		CF Fru.		Açúcares	Lipídios	Proteína	Trig.	Ac. Clor.	Cafeína						
		QM	*	QM	*	QM	QM	QM	QM	QM	QM						
<b>Rep</b>	1	6.810	*	0.177		0.105	0.011	0.175	0.125	*	0.000	0.048					
<b>Genótipos (G)</b>	3	24.319	*	0.103		3.855	*	0.062	4.619	*	0.049	*	0.584	0.069			
<b>Controle (C)</b>	1	3.135	*	0.289		0.264		0.004	2.873	*	0.018		0.025	0.015			
<b>G x C</b>	3	1.356		0.047		0.698	*	0.085	0.493		0.003		0.028	0.012			
<b>Erro A</b>	7	0.408		0.192		0.109		0.072	0.119		0.008		0.200	0.021			
<b>Maturação (M)</b>	2	5.192	*	6.444	*	255.147	*	14.122	*	8.028	*	0.134	*	2.904	*	0.698	*
<b>G x M</b>	6	0.987		0.276	*	2.383	*	0.542	*	1.503	*	0.004		0.057		0.008	
<b>C x M</b>	2	0.630		0.004		0.216		0.066	0.536	*	0.050	*	0.015		0.002		
<b>G x C x M</b>	6	0.498		0.092		0.654	*	0.010	0.423	*	0.009		0.094		0.006		
<b>Erro B</b>	16	0.592		0.036		0.147		0.103	0.141		0.013		0.080		0.005		
<b>Total</b>	47	2.550		0.382		11.619		0.730	1.067		0.022		0.240		0.043		
<b>Média</b>		6.833		5.009		8.933		6.541	12.778		1.150		3.241		1.097		
<b>CVa (%)</b>		9.343		8.750		3.700		4.110	2.700		7.800		13.780		13.070		
<b>CVb (%)</b>		11.264		3.790		4.290		4.910	2.930		10.020		8.700		6.190		

Teores de compostos fenólicos nas folhas (CF Fol) e nos frutos (CF Fru), açúcares totais, lipídios, proteínas, trigonelina (trig.), ácidos clorogênicos (Ac. Clor.) e cafeína nos frutos.

\* Significativo pelo teste F ( $p < 0.05$ ).

### 3.2. Atividade enzimática nos frutos e nas folhas de café ao longo da maturação

A atividade das enzimas SOD, CAT e APX nos frutos teve efeito apenas do fator estágio de maturação, não sendo afetada pelos genótipos, métodos de controle ou suas interações (dados não apresentados). Já nas folhas, não houve efeito significativo das fontes de variação ou interações sobre a atividade das enzimas avaliadas, exceto na atividade da SOD, em que a interação GxC foi significativa (dados não apresentados).

Na Tabela 2 são apresentadas as médias das variáveis analisadas em cada estágio de maturação dos frutos. Observa-se que os teores de açúcares e lipídios aumentaram ao longo da maturação. Comportamento contrário foi observado em relação aos compostos fenólicos nos frutos, ácidos clorogênicos e cafeína, os quais apresentaram redução nos teores ao longo do desenvolvimento dos frutos, sendo os menores valores encontrados no estágio maduro. Em relação aos teores de trigonelina, verifica-se que se mantiveram estáveis nos dois estágios iniciais de maturação, reduzindo, posteriormente, na maturidade dos frutos. Já o teor de proteínas foi mediano quando o fruto estava verde, apresentando seu pico no estágio verde cana e reduzindo significativamente no fruto maduro. Nas folhas, o teor de compostos fenólicos apresentou um pico no estágio verde cana, diferentemente do que ocorre nos frutos. Com relação à atividade enzimática nos frutos, observa-se que a SOD apresentou menor atividade no estágio verde, com aumento significativo no estágio verde-cana, se mantendo até o final da maturação. Já a atividade da CAT e APX se manteve baixa nos dois estágios iniciais, com expressivo incremento apenas na maturidade.

Tabela 2 – Médias para atividade enzimática e teores de metabólitos nos frutos avaliados durante a maturação.

	<sup>1</sup> SOD Fru.		CAT Fru.		APX Fru.		CF Fol.		CF Fru.		Açúcares		Lipídios		Proteínas		Trig.		Ac. Clor.		Cafeína	
<b>Verde</b>	0.06	b	0.37	b	12.91	b	6.698	b	5.71	a	5.04	c	5.65	c	13.04	b	1.22	a	3.71	a	1.32	a
<b>V. Cana</b>	0.13	a	0.23	b	17.95	b	7.458	a	4.83	b	8.75	b	6.45	b	13.32	a	1.18	a	3.14	b	1.07	b
<b>Maduro</b>	0.12	a	0.93	a	28.10	a	6.343	b	4.48	c	13.02	a	7.52	a	11.98	c	1.05	b	2.87	c	0.90	c
<b>CVa(%)</b>	5.97		26.12		21.32		9.34		8.75		3.70		4.11		2.70		7.80		13.78		13.08	
<b>CVb(%)</b>	6.94		18.84		16.84		11.26		3.79		4.29		4.91		2.93		10.02		8.70		6.19	

<sup>1</sup>SOD Fru. (U SOD min<sup>-1</sup> µg P<sup>-1</sup>), CAT Fru. (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> µg P<sup>-1</sup>) e APX Fru. (µmol AsA min<sup>-1</sup> µg P<sup>-1</sup>) nos frutos e teores de compostos fenólicos nas folhas (CF Fol.) e nos frutos (CF Fru.), açúcares totais, lipídios, proteínas, trigonelina (Trig.), ácidos clorogênicos (Ac. Clor.) e cafeína nos frutos (%MS). Médias seguidas pela mesma letra na coluna pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott (p<0.05).

### 3.3. Incidência e severidade da ferrugem nas folhas do cafeeiro durante a maturação dos frutos

A incidência e a severidade da ferrugem em função do uso do controle genético ou químico foram avaliadas concomitantemente à coleta de folhas e frutos. Tanto a incidência, quanto a severidade, foram significativamente afetadas pela época de coleta. Também foi verificado efeito significativo de genótipos, controle e interação GxC nessas duas variáveis, além do efeito das interações GxM e GxCxM sobre a incidência da ferrugem (dados não apresentados). Os efeitos do genótipo, controle químico, estádios de maturação, bem como de suas interações sobre a incidência e severidade da ferrugem não serão abordados, uma vez que no presente estudo objetiva-se relacionar a expressão da ferrugem com a composição química e com a atividade enzimática de folhas e frutos do cafeeiro durante a maturação.

Na Tabela 3 observa-se que a incidência média da ferrugem nas folhas do cafeeiro aumentou ao longo da maturação dos frutos, ao contrário da severidade, que se estabilizou após o estádio verde, não havendo diferença significativa entre os dois últimos estádios de maturação. É importante ressaltar, que os genótipos se comportaram diferentemente com relação à doença quando avaliados em diferentes estádios de maturação, com ou sem controle químico, o que pode ser observado na Figura 1.

Tabela 3 – Médias para incidência (%) e severidade (% de área lesionada) de ferrugem em folhas de cafeeiro nos diferentes estádios de maturação.

	Incidência		Severidade	
<b>Verde</b>	2.731	c	1.429	b
<b>Verde Cana</b>	3.435	b	1.560	a
<b>Maduro</b>	4.101	a	1.664	a
<b>CVa (%)</b>	30.57		20.48	
<b>CVb (%)</b>	17.89		10.83	

Médias seguidas pela mesma letra na pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott (p<0.05).

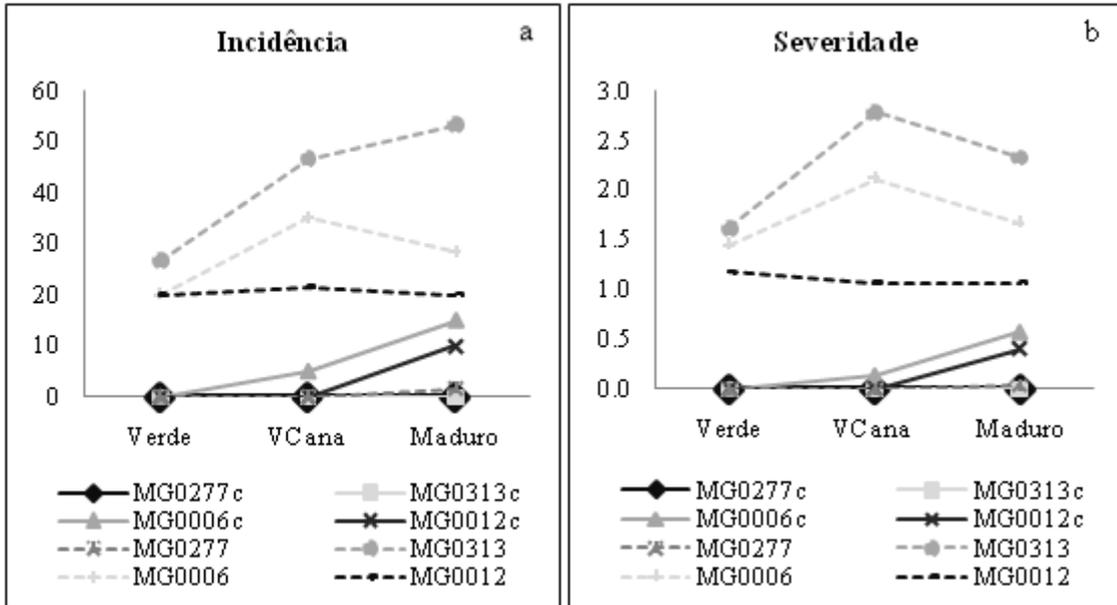


Figura 1. (a) Incidência (%) e (b) severidade (% de área lesionada) de ferrugem em folhas de cafeeiro em função do genótipo, aplicação de controle químico e estágio de maturação do fruto. MG0277c; MG0313c; MG0006c e MG0012c: com aplicação de controle químico; MG0277; MG0313; MG0006 e MG0012: sem aplicação de controle químico.

### 3.4. Estimativas de correlação da incidência e severidade da ferrugem com as demais variáveis analisadas

As estimativas de correlação entre a incidência e severidade de ferrugem e as demais variáveis analisadas, nos diferentes estádios de maturação, e considerando os tratamentos com e sem controle químico, são apresentadas na Tabela 4. Observa-se que, para os tratamentos com controle químico não houve correlação significativa no estágio verde, já que nesta ocasião nenhum dos genótipos apresentou sintomas da doença (FIGURA 1). No estágio verde-cana, houve correlação significativa e positiva entre incidência/severidade e atividade da CAT nas folhas, bem como lipídios e cafeína nos frutos, indicando que quanto maior a expressão da doença, maior a atividade dessa enzima nas folhas e maior o teor desses metabólitos nos frutos. Foi significativa também, nesse estágio, a correlação negativa entre incidência/severidade e a atividade da SOD nas folhas, da CAT e APX nos frutos, e teores de açúcares nos frutos, bem como de compostos fenólicos nas folhas e frutos. Já no estágio maduro a correlação negativa significativa da incidência e severidade com compostos fenólicos nos frutos se manteve, sendo observada também para os teores de ácidos clorogênicos, enquanto a atividade da CAT nos frutos apresentou correlação significativa positiva com a expressão da doença.

Tabela 4 – Correlação entre as variáveis analisadas nas folhas e frutos do cafeeiro e a incidência e severidade da ferrugem, com e sem aplicação de produto químico, nos estádios de maturação

	Verde			Verde Cana			Maduro									
	Incidência	Severidade		Incidência	Severidade		Incidência	Severidade								
<b>Severidade</b>	0.00			1.00	++		1.00	**	++							
<b><sup>1</sup>SOD Fol.</b>	0.00	0.00		-0.96	*	++	-0.96	*	++	0.51	0.53					
<b>CAT Fol.</b>	0.00	0.00		0.56	++		0.56	++		-0.21	-0.19					
<b>APX Fol.</b>	0.00	0.00		0.37			0.37			-0.43	-0.44					
<b>SOD Fru.</b>	0.00	0.00		-0.12			-0.12			0.91	0.91					
<b>CAT Fru.</b>	0.00	0.00		-0.89	++		-0.89	++		0.80	++	0.78	++			
<b>APX Fru.</b>	0.00	0.00		-0.59	++		-0.59	++		0.34		0.37				
<b>CF Fol.</b>	0.00	0.00		-0.79	++		-0.79	++		-0.88		-0.89				
<b>CF Fru.</b>	0.00	0.00		-0.50	++		-0.50	++		-0.97	*	-0.98	*			
<b>Açúcares</b>	0.00	0.00		-1.00	**	++	-1.00	**	++	-0.64		-0.63				
<b>Lipídios</b>	0.00	0.00		1.00	**	++	1.00	**	++	0.66		0.65				
<b>Proteínas</b>	0.00	0.00		0.46			0.46			-0.20		-0.21				
<b>Trigonelina</b>	0.00	0.00		0.18			0.18			-0.27		-0.27				
<b>Ac. Clorog.</b>	0.00	0.00		0.26			0.26			-0.98	*	++	-0.98	*	++	
<b>Cafeína</b>	0.00	0.00		0.78	++		0.78	++		0.10		0.11				
<b>Severidade</b>	0.99	**	++				1.00	**	++			0.99	*	++		
<b>SOD Fol.</b>	0.41			0.51	++		-0.11			-0.23		-0.07				
<b>CAT Fol.</b>	0.83			0.86			-0.38			0.96	*	++	0.90	++		
<b>APX Fol.</b>	0.94			0.91			-0.18			0.12		-0.03				
<b>SOD Fru.</b>	0.33			0.27			0.87			0.84		-0.89		-0.95	*	++
<b>CAT Fru.</b>	-0.49			-0.46			-0.22			-0.16		0.47		0.59		
<b>APX Fru.</b>	1.00	**	++	0.99	**	++	0.60	++		0.63	++	0.40		0.31		
<b>CF Fol.</b>	-0.38			-0.39			-0.63			-0.58		-0.65		-0.75		
<b>CF Fru.</b>	0.49			0.57			0.65			0.58		-0.76		-0.85		
<b>Açúcares</b>	-0.60			-0.63			-0.23			-0.18		-0.57		-0.69		
<b>Lipídios</b>	-0.61			-0.63			-0.13			-0.13		-0.04		0.08		
<b>Proteínas</b>	0.53			0.56			0.27			0.19		0.88		0.88	+	
<b>Trigonelina</b>	0.76			0.75			0.99	**	++	1.00	**	++	0.86		0.93	
<b>Ac. Clorog.</b>	-0.11			-0.17			-0.36			-0.31		0.62		0.49		
<b>Cafeína</b>	0.75			0.80			0.76			0.79	++	0.60		0.72		

<sup>1</sup>SOD Fol.; CAT Fol.; APX Fol.: atividade da SOD, CAT e APX nas folhas; SOD Fru.; CAT Fru.; APX Fru.: atividade da SOD, CAT e APX nos frutos e teores de compostos fenólicos nas folhas (CF Fol.) e nos frutos (CF Fru.), açúcares totais, lipídios, proteínas, trigonelina, ácidos clorogênicos (Ac. Clorog.) e cafeína nos frutos.

\*Significativo ( $p < 0.05$ ) pelo teste t.

++/+ Significativo ( $p < 0.01$  e  $p < 0.05$ ) pelo teste de Mantel.

Quando foi avaliado o controle genético da ferrugem, ou seja, sem tratamento químico, foi verificada correlação significativa entre a expressão da doença e as demais variáveis analisadas nos três estádios de maturação. No estágio verde verificou-se correlação positiva entre incidência e severidade com a atividade de APX no fruto, assim como com a SOD na folha, porém, neste caso, apenas para a variável severidade. A correlação positiva da atividade da APX no fruto com incidência e severidade da doença se manteve no estágio verde cana,

estádio no qual também foi verificada correlação positiva da incidência e severidade com o teor de trigonelina, bem como da severidade com a cafeína. Já no estágio maduro, a incidência e severidade se correlacionaram positivamente com a atividade da CAT na folha. Correlação positiva também foi verificada entre a severidade e o teor de proteínas nos frutos. Por outro lado, foi observada a correlação negativa da atividade da SOD nos frutos com a severidade da doença.

#### 4. DISCUSSÃO

Entender o processo de defesa das plantas a um patógeno ao longo da maturação, considerando práticas como o uso de defensivos ou cultivares resistentes, pode auxiliar na escolha do manejo adotado na lavoura. Também contribui para a compreensão dos fatores que influenciam em características importantes para a agregação de valor na comercialização do produto final. Neste trabalho, demonstrou-se que a adoção do controle genético ou químico da ferrugem afeta diferentemente o metabolismo da planta, com variações nas formas e tempos de resposta da planta à infecção. Além disso, verificou-se que essas alterações se refletem também em outros órgãos além daquele atacado diretamente pelo patógeno. Destaca-se que a maioria das pesquisas nessa área utiliza plantas em condições de laboratório ou casa de vegetação. Portanto, o mérito do presente estudo consiste na abordagem prática em que o experimento foi realizado, em condições de campo e com plantas em produção.

A maturação do café envolve uma série de reações bioquímicas que modificam todo o metabolismo do fruto, causando alterações nos seus constituintes químicos ao longo desse processo (Alves, 2019, Angélico et al., 2009, Pimenta, 2003). No começo do período de desenvolvimento do fruto, de 60 a 90 dias após o florescimento (DAF), o perisperma passa por intensa divisão e expansão celular, ocupando o volume total do lóculo, enquanto o endosperma (parte comercial do fruto) ainda não é aparente (De Castro, Joët et al., 2009, Marraccini, 2006). O desenvolvimento do perisperma é crucial para a biossíntese de compostos que irão contribuir para as características bioquímicas finais do café, incluindo açúcares, diterpenos, ácidos clorogênicos e cafeína (Joët et al., 2009).

Os frutos de café colhidos no estágio de maturação verde apresentam menor teor de lipídios (Illy; Viani, 1995) e açúcares (Joët, 2010) e maiores concentrações de compostos fenólicos, ácidos clorogênicos e dos alcalóides cafeína e trigonelina, quando comparados aos frutos totalmente maduros (Montavón et al. 2003; Pimenta, 2003). Nos frutos no estágio verde-cana, esses metabólitos se encontram em níveis intermediários (Alves, 2019; Pimenta, 2003). Essas informações corroboram os resultados encontrados no presente trabalho. Para proteína bruta, de forma semelhante ao verificado, Angélico et al. (2009) também encontraram maior teor médio no estágio verde/verde-cana em relação aos frutos maduros. Este fato pode ser devido à presença de maiores teores de alguns aminoácidos no fruto verde, que podem ser precursores de sabores e aromas característicos desse estágio de maturação (Angélico et al., 2009). Não foram encontrados na literatura, trabalhos que evidenciem o efeito da interação entre maturação e os fatores genótipos, ou controle químico de patógenos no teor de metabólitos dos frutos de café. Entretanto, de acordo com os resultados do presente trabalho, é possível constatar que os fatores avaliados podem agir de forma simultânea, alterando o padrão de acúmulo desses compostos ao longo da maturação, principalmente em relação aos teores de compostos fenólicos, proteínas, açúcares, lipídios e trigonelina.

A atividade das enzimas SOD, CAT e APX nos frutos também foi influenciada pelos estágios de maturação, todas com menor atividade nos estágios iniciais, considerando a média dos tratamentos. Essa atividade

aumentada das enzimas nos frutos ao longo da maturação pode ser uma resposta ao processo de amadurecimento e senescência, no qual as EROs possuem papéis importantes, contribuindo para a transformação de cloroplasto em cromoplasto (Martí et al. 2009), e contribuindo para uma deterioração geral do metabolismo celular (Huang et al. 2007). Montavon et al. (2003) sugeriram que as sementes provenientes de frutos verdes são mais sensíveis à oxidação do que as maduras porque os mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo se tornam mais eficientes à medida em que a maturação avança. Além disso, o aumento na atividade da SOD anterior às demais enzimas pode ser explicado pelo fato de esta ser a primeira enzima na linha de defesa da planta, responsável por neutralizar a primeira ERO formada, o  $O_2^-$ , o qual é convertido em  $H_2O_2$ , neutralizado posteriormente pela CAT e APX (Pandey et al., 2017).

Montavon e Bortlik (2004), ao avaliarem a atividade da CAT em grãos de café *C. canéfora*, provenientes de frutos em diferentes estádios de maturação, verificaram aumento expressivo na atividade dessa enzima nos grãos maduros em relação ao estágio anterior, indicando que a sensibilidade dos grãos de café ao estresse oxidativo, bem como suas consequências, devem diminuir drasticamente com a maturação. Esse aumento na atividade da CAT no fruto maduro também foi verificado no presente trabalho. Santos et al. (2018) verificaram em plantas de Bourbon Amarelo menor atividade da SOD nos frutos verdes em relação aos verde-cana, cultivados no município de Carmo de Minas, Sul de Minas Gerais, Brasil a 965 metros de altitude. Esses mesmos autores observaram que a CAT apresentou atividade estável nos estádios verde e verde-cana, o que também foi observado no presente trabalho. Por outro lado, um pico da atividade da APX durante o estágio de maturação verde em relação ao verde-cana, conforme observado no trabalho de Santos et al. (2018), diverge do que foi encontrado neste estudo.

Quanto aos teores de compostos fenólicos nas folhas, diferentemente do que se observa nos frutos, verifica-se que, na média dos tratamentos, as maiores concentrações são encontradas no estágio verde-cana. Não foram encontrados, entretanto, trabalhos que relatem alterações nos teores de compostos fenólicos nas folhas ao longo do processo de maturação dos frutos de café. Já com relação à atividade das enzimas antioxidantes, ao contrário do que foi observado nos frutos, nas folhas não foi verificado efeito significativo dos estádios de maturação na atividade das enzimas analisadas. Reis et al. (2015), por outro lado, constataram aumento na atividade das enzimas SOD, CAT e APX em folhas de café ao longo da maturação, considerando diferentes suprimentos de N, sugerindo que o sistema antioxidante das folhas é muito ativo durante o amadurecimento dos frutos, principalmente em indivíduos com deficiência de N, devido a remobilização de nutrientes das folhas para os frutos. Segundo Geromel (2006), a demanda dos frutos/sementes por fotoassimilados é diferente ao longo do desenvolvimento. A produção de frutos requer grandes quantidades de fotoassimilados durante as etapas de expansão e formação de grãos, quando há maior acúmulo de matéria seca (Salgado et al., 2008). Isso sugere que no trabalho de Reis et al. (2015) o aumento na demanda dos frutos por fotoassimilados e nutrientes ao longo da maturação intensificou a condição de estresse provocada pela deficiência de N, refletindo no aumento da atividade enzimática nas folhas, de forma coincidente com o observado nos estádios de maturação dos frutos. Montavon e Bortlik et al. (2004) citam que diversos são os estressores da planta, dentre eles seca, calor, deficiência mineral, baixa temperatura, insetos, patógenos etc. Considerando o presente trabalho, deve-se então verificar, se nas folhas, a atividade das enzimas antioxidantes e os teores de compostos fenólicos, frequentemente relacionados com a defesa das plantas a estresses, coincide com os momentos de maior estresse enfrentados pela planta, devido a ocorrência de ferrugem simultaneamente à maior demanda de fotoassimilados pelos frutos, e se esse estresse se reflete na atividade enzimática e na composição dos frutos.

Observa-se que no geral, a incidência de ferrugem nas folhas aumentou com a maturação dos frutos, enquanto a severidade se estabilizou a partir do estágio verde-cana. Entretanto, a evolução da doença divergiu quando se adotou o controle genético ou químico. No controle genético, os genótipos responderam diferentemente à ocorrência de ferrugem, sendo que o único genótipo que se mostrou resistente foi o MG0277. Já o controle químico foi eficiente em reduzir a expressão da doença em todos os genótipos, mas alguns responderam melhor a esse tipo de controle: enquanto os Híbridos de Timor, incluindo o MG0313 que demonstrou alta suscetibilidade no controle genético, não apresentaram sintomas durante todo o período de avaliação, nos Bourbons, a doença se expressou a partir do estágio verde-cana. De fato, é relatado que a maioria dos genótipos derivados de HT apresenta resistência parcial quando a resistência completa é quebrada (Silva, et al. 2006). Isso demonstra o grande potencial das cultivares derivadas de HT, as quais, mesmo quando ocorre a quebra de resistência, têm melhor resposta ao uso do controle químico por meio de uma possível ação sinérgica entre esses genes de resistência parcial e os mecanismos de defesa induzidos pelo uso do fungicida.

A expressão diferencial dos sintomas de ferrugem nos diferentes tratamentos foi então correlacionada com as variáveis analisadas nas folhas e frutos, visando identificar algum padrão que possa ser associado a mecanismos de defesa ativados pelo controle genético e/ou químico. Também é importante verificar se a ocorrência da doença nas folhas tem reflexo na composição e atividade enzimática dos frutos.

Considerando-se o controle genético, foram observadas algumas correlações já no estágio verde de maturação, uma vez que, apesar de o genótipo resistente não apresentar sintomas, sendo eficiente no controle da doença, as plantas suscetíveis expressaram os primeiros sintomas ainda nesse estágio. Foi observada correlação positiva da SOD nas folhas com a severidade da doença, bem como da APX nos frutos com a incidência e a severidade. Isso quer dizer que, quanto maior a expressão da doença, maior é a atividade dessas enzimas nos respectivos órgãos.

A atividade da SOD desempenha um papel importante na dismutação dos radicais superóxido ( $O_2^-$ ), primeira ERO formada em condição de estresse, sendo esta, a primeira enzima a atuar na linha de defesa das plantas (Ballester et al., 2006). É relatado o aumento precoce na atividade de enzimas antioxidantes de plantas resistentes, em resposta à grande liberação de EROs logo após o reconhecimento do patógeno pela planta, o que impediria o progresso da doença. Ao contrário, em plantas suscetíveis, essa ativação enzimática ocorreria em fases mais tardias do processo de infecção, sendo, portanto, ineficaz no controle da ação do patógeno (Silveira et al., 2015). No presente trabalho foi observado que as plantas suscetíveis apresentaram maior atividade da SOD nesse primeiro momento de avaliação. Entretanto, deve-se considerar que a resposta das plantas resistentes é muito rápida, antes mesmo que as plantas apresentem sintomas (Monteiro et al., 2016). Guerra-Guimarães et al. (2008), ao estudar o papel da SOD na resistência de café a *H. vastatrix*, observaram na interação incompatível, um pico de atividade desta enzima, entre 17 e 20 horas após a infecção. Assim, considerando que no presente trabalho os experimentos foram realizados em campo, com infecção natural pelo patógeno, sem controle do tempo decorrido desde a infecção até a avaliação, e utilizando como marcadores de avaliação os estágios de maturação dos frutos, é possível que o pico de atividade da SOD nas plantas resistentes tenha ocorrido antes da primeira avaliação, sendo, portanto, eficiente em controlar a doença, já que essas plantas não apresentavam sintomas no estágio verde. Já a maior atividade da SOD nas plantas suscetíveis pode representar uma ativação tardia dessa enzima, ineficiente no controle do progresso da doença, explicando essa correlação positiva.

A alta correlação positiva entre a atividade da APX nos frutos e a incidência e severidade da ferrugem sugere que existem reflexos da ocorrência da doença em outros órgãos além daqueles afetados diretamente pelo patógeno. Segundo Resende et al. (2003), o aumento dos níveis de EROs provocado pelo estresse ativa a síntese de ácido salicílico, o qual, por sua vez, potencializa a produção de EROs. Portanto, a explosão oxidativa não está confinada apenas à reação de hipersensibilidade (HR) macroscópica local, já que explosões oxidativas secundárias podem ocorrer em tecidos distantes, causando micro-HR's e conduzindo à resistência sistêmica adquirida (SAR) (Resende et al., 2003). Além disso, em outros estudos, também foi demonstrado que a atividade da APX é aumentada na presença de outras enzimas antioxidantes, como a SOD, sugerindo que a ação dessas enzimas está interligada (Pandey et al., 2017). Isso poderia explicar a associação dessas duas enzimas com a ocorrência de ferrugem, ainda que em órgãos diferentes.

O fato dessa associação ser positiva, assim como a observada para SOD nas folhas, ou seja, há maior atividade da APX nos frutos de plantas com maior expressão da doença, parece também refletir uma interação compatível, em que a resposta do sistema antioxidante é tardia, não evitando os prejuízos causados pelo estresse. Sabe-se que a APX e a CAT atuam de forma coordenada na neutralização do  $H_2O_2$ , sendo que a CAT apresenta baixa afinidade pelo substrato, atuando na presença de altos níveis de  $H_2O_2$ , ao contrário da enzima APX, que atua em baixos níveis do substrato (Shigeoka et al., 2002). Considerando que a infecção no estádio verde ainda é relativamente baixa, espera-se menor concentração de EROs nos frutos, de forma que a APX, e não a CAT, é ativada. O pico da APX nos frutos das plantas resistentes pode ter ocorrido em momento anterior à primeira avaliação. Porém, não foram encontrados relatos anteriores na literatura, já que geralmente os estudos da interação patógeno/hospedeiro com inoculação controlada são realizados em casa de vegetação, utilizando-se plantas de café não produtivas (Subroto et al., 2019; Honorato-Junior et al., 2015).

Essa correlação positiva entre a expressão da doença e a atividade da APX nos frutos, foi mantida durante o estádio verde-cana nos tratamentos sem controle químico, porém, em menor magnitude. Isso poderia indicar que, com o avanço da doença nas plantas suscetíveis, é possível que a concentração de EROs esteja aumentando gradativamente. Desta forma, outros mecanismos de defesa, além da ativação da APX (que atua em baixas concentrações de  $H_2O_2$ , como citado anteriormente), começam a ser acionados nos frutos como reflexo da maior intensidade da doença nas folhas.

Isso pode ser observado pelas altas correlações positivas entre os teores de trigonelina com a incidência e severidade, bem como entre a cafeína e a severidade de ferrugem. A trigonelina e a cafeína são dois tipos de alcalóides presentes no grão de café (Ashihara, 2006), havendo relatos de ambos contribuírem para suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Green et al., 2015). Tem sido proposto que a biossíntese de cafeína em gemas e folhas de cafeeiro esteja relacionada com a prevenção de predação por animais (Frischknecht et al., 1986). Subroto et al. (2019) sugerem que a combinação de flavonóides e cafeína nas folhas pode ser utilizada como indicador de resistência de genótipos de café a *H. vastatrix*. Além disso, segundo Dessalegn et al. (2007), a biossíntese de cafeína, bem como seu acúmulo, é mais acentuada em situações de estresse. Isso explicaria a correlação positiva desses metabólitos com a expressão da ferrugem.

No estádio maduro, foi observada nas plantas sem controle químico, uma correlação positiva da incidência e severidade com a atividade da CAT na folha, indicando a ativação tardia dessa enzima nos genótipos suscetíveis, ineficiente no controle da infecção. Além disso, é encontrada correlação negativa entre a atividade de SOD no fruto e a severidade de ferrugem. Isso indica que, quanto menor a severidade nesse estádio de maturação,

maior a atividade da SOD nos frutos, o que pode ser o reflexo de algum mecanismo eficiente de controle da doença, que levou à estabilização/redução da severidade no final da maturação, nos genótipos sem tratamento químico. A severidade também é positivamente correlacionada com o teor de proteínas nos frutos no estágio maduro. Tem sido demonstrado que, em plantas de café suscetíveis a *H. vastatrix*, é observado em estádios posteriores ao processo de infecção, um aumento nos teores de proteínas relacionadas à defesa, como fenilalanina amônia liase, peroxidase, superóxido dismutase, quitinase, gene 1 (PR1) relacionado à patogênese, tipo taumatina, proteína NtPRp27 e b-1, 3-glucanase, (Guerra-Guimarães et al., 2009), o que pode justificar essa correlação positiva observada no estágio maduro do fruto.

Quando foi adotado o controle químico, a ausência de sintomas de ferrugem em todos os genótipos no estágio verde, impossibilitou a obtenção de estimativas de correlação com as variáveis analisadas nesse estágio. Esses resultados demonstram a eficiência desse tipo de tecnologia de controle em adiar o início da infecção em genótipos suscetíveis. A aparição tardia dos sintomas da ferrugem em plantas tratadas com fungicidas foi também verificada por Honorato-Júnior et al. (2015).

No estágio verde-cana, considerando-se o controle químico da ferrugem, observa-se forte correlação negativa entre a atividade da SOD nas folhas e a incidência e severidade da doença. Ou seja, a alta atividade da SOD após a infecção é eficiente no controle do progresso da doença, de forma que, quanto maior a atividade dessa enzima nas folhas, menor a expressão da ferrugem. Não foram encontrados trabalhos que tenham avaliado a atividade da SOD em resposta à aplicação de controle químico. Porém, os resultados observados sugerem que a ativação da SOD nas folhas, induzida pelo controle químico para controlar os primeiros sintomas de infecção, se assemelha ao que é relatado na literatura para a interação incompatível nos genótipos resistentes (Guerra-Guimarães et al., 2008).

Já a correlação positiva entre a incidência e severidade e a CAT nas folhas, se assemelha a uma interação compatível, ou seja, plantas com maior atividade dessa enzima nas folhas apresentam mais sintomas, devido a uma ativação tardia dos mecanismos de defesa. De forma contrária, Honorato-Junior et al. (2015), ao avaliarem em casa de vegetação, plantas de café suscetíveis à ferrugem, aos três meses de idade (não produtivas), verificaram que a atividade da CAT nas folhas frente ao progresso da severidade da doença indica uma correlação negativa entre esses caracteres quando se aplica o controle químico. Outros autores também sugerem que na interação incompatível com *H. vastatrix* há um aumento na atividade da CAT (Guerra-Guimarães et al., 2008). Deve-se atentar, entretanto, que no presente trabalho, o tempo de inoculação não foi monitorado, já que foi avaliada a infecção natural em campo. Isso pode indicar que nos genótipos onde o controle químico está sendo menos eficiente, a alta atividade da CAT pode ser uma resposta tardia ao possível excesso de EROs provocado pelo estresse, já que essa enzima atua em maiores concentrações do substrato. Isso evidencia o efeito significativo da interação GxC para incidência e severidade de ferrugem, em que os genótipos respondem diferentemente à aplicação do fungicida.

Ainda no estágio de maturação verde-cana, pode-se inferir, pela correlação negativa entre a incidência e severidade de ferrugem e as atividades da CAT e APX nos frutos, que a ocorrência ou não de ferrugem manejada pelo uso de fungicida também provoca um efeito sistêmico no metabolismo da planta. Isso significa que, de forma semelhante ao que foi observado para o controle genético, há indução de alterações em outros tecidos da planta, além dos diretamente lesionados pelo patógeno. Essas correlações indicam que, quanto menor a incidência e severidade da doença, maior a atividade da CAT e APX nos frutos, comportamento típico de interação

incompatível. Como relatado anteriormente, a CAT e a APX atuam conjuntamente na neutralização do  $H_2O_2$  e a atividade da APX é aumentada na presença de outras enzimas como a SOD (Shigeoka et al., 2002; Pandey et al., 2017), a qual se encontra em alta atividade no estágio de maturação verde-cana em folhas das plantas controladas quimicamente. Não foram encontrados, entretanto, trabalhos anteriores que demonstrem o efeito do controle químico da ferrugem na atividade de enzimas antioxidantes nos frutos.

Esse efeito sistêmico em resposta ao controle químico da ferrugem pode ser comprovado também pelas correlações observadas entre os teores de metabólitos e a expressão da doença. Assim como no controle genético, observa-se correlação positiva entre o teor de cafeína e a severidade da ferrugem, mas no caso do controle químico, essa correlação é observada também com a incidência, indicando novamente que a biossíntese e acúmulo da cafeína são mais acentuados em condição de estresse, independentemente de ser adotado o controle químico ou genético. Porém, são notadas algumas divergências nas alterações provocadas no fruto pelo manejo químico da ferrugem em relação ao controle genético. Com o uso de controle químico, não ocorre correlação significativa entre a trigonelina e a expressão da doença, mas sim, com os teores de lipídios, açúcares e compostos fenólicos nas folhas e frutos.

O teor de lipídios no estágio verde-cana, considerando os tratamentos que receberam controle químico da ferrugem, está positivamente correlacionado com a incidência e severidade da ferrugem, ou seja, quanto maior a expressão da doença, maior o teor de lipídios nos frutos. Esse resultado não é coincidente com o relatado na literatura, de que as EROs são extremamente reativas e citotóxicas e podem reagir com biomoléculas como ácidos graxos insaturados na membrana plasmática, em membranas plasmáticas das organelas e endomembranas, causando a peroxidação dos lipídeos e a ruptura de membranas (Monteiro et al., 2016). Assim, seria esperado um menor teor de lipídios nos frutos das plantas mais afetadas pela doença.

Já quanto ao teor de açúcares totais, sabe-se que os carboidratos são normalmente utilizados durante a formação dos grãos e no crescimento vegetativo das plantas, e que os açúcares são transportados das folhas para os frutos (Yamaki, 2010). No entanto, eles podem ser desviados do seu principal caminho metabólico para o mecanismo de defesa das plantas, produzindo compostos fenólicos envolvidos em funções biológicas nas plantas, como a resistência a pragas e doenças, graças às suas propriedades antioxidantes e antibióticas (Salgado et al., 2008). Assim, é compreensível que o teor de açúcares no fruto esteja negativamente correlacionado com a expressão da ferrugem, pois quanto menor a utilização desses compostos na tentativa de combate à doença, maior a disponibilidade de açúcares para a formação dos frutos.

Também foi observada nesse estágio de maturação, correlação negativa entre o teor de compostos fenólicos nas folhas e frutos e a incidência e severidade de ferrugem, ou seja, estão presentes em maior concentração nas plantas com menos sintomas da doença quando esta é manejada com uso de fungicida. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários geralmente envolvidos na defesa contra radiação ultravioleta ou agressão por patógenos, sendo relatado aumento nos teores desses compostos em folhas genótipos de cafeeiro resistentes à ferrugem (Diniz et al., 2012, Farah e Donangelo, 2006). No presente trabalho, esse aumento não foi verificado quando a ferrugem foi manejada pelo controle genético, mas sim, pelo controle químico. A observação da correlação negativa nesses tratamentos entre os teores de compostos fenólicos nas folhas e a incidência e severidade de ferrugem, indica que os genótipos que respondem melhor ao uso de fungicida, tendem a apresentar maiores teores de compostos fenólicos nas folhas, sendo eficiente no controle da ferrugem. Essa correlação negativa observada também nos frutos indica uma reação sistêmica da planta ao patógeno quando manejado pelo

controle químico, com produção de compostos de defesa em tecidos não diretamente afetados pela doença. Ou seja, esses resultados demonstram que o uso do controle químico estimula a maior produção desses metabólitos principalmente nos genótipos que respondem de forma mais eficiente a esse tipo de controle, tanto nas folhas quanto nos frutos, indicando, portanto, a ação sistêmica do produto no metabolismo de defesa da planta.

No estágio maduro, observou-se nas plantas que receberam controle químico de ferrugem, que essa correlação negativa entre a incidência e severidade da ferrugem e os teores de compostos fenólicos nos frutos se manteve, apresentando ainda, maior intensidade, o que não aconteceu nas folhas. Isso indica que nesse estágio de maturação os efeitos sistêmicos induzidos anteriormente continuam sendo refletidos em tecidos não afetados diretamente pelo patógeno, enquanto nas folhas, outros mecanismos de defesa podem estar sendo ativados para combater a crescente infecção, já que nos tratamentos com controle químico o auge da expressão da ferrugem aconteceu no estágio maduro. Neste estágio de maturação foi observada também correlação negativa da incidência e severidade com o teor de ácidos clorogênicos nos frutos, indicando que, quanto menor a expressão da doença, maior o teor de ácidos clorogênicos nos frutos nesse estágio. Os ácidos clorogênicos são tipos específicos de compostos fenólicos, também relacionados à defesa da planta ao ataque de patógenos (Farah e Donangelo, 2006), atuando na neutralização de radicais livres (Abrahão et al., 2010), protegendo o grão de predadores por meio das suas altas concentrações nos frutos (Baumann, 2006) e apresentando propriedades antifúngicas nos tecidos onde se encontra (Castaldo et al., 2018).

A detecção de correlação significativa entre a expressão da ferrugem e os teores de ácidos clorogênicos apenas no estágio maduro indica que, quando o controle químico é adotado, outros compostos fenólicos de defesa são produzidos nos estádios mais precoces da infecção, ao contrário dos ácidos clorogênicos, que são produzidos em resposta ao patógeno em estádios mais tardios. Alguns autores relatam o aumento nos teores de ácidos clorogênicos em folhas de café sob ataque de *H. vastatrix* (Hammerschmidt, 2014, Silva et al., 2020). Subroto et al. (2019) também encontraram associação negativa entre a severidade de ferrugem e o teor de compostos fenólicos nas folhas de café. Esses resultados não foram observados no presente trabalho, sendo verificada associação entre a ferrugem e os teores de compostos fenólicos nas folhas e frutos e de ácidos clorogênicos nos frutos, apenas quando é adotado o controle químico. Essa ausência de correlação entre compostos fenólicos e a expressão da ferrugem pode ser devido à quebra de resistência verificada no genótipo MG0313. Apesar de pertencer ao grupo dos HT, no qual apenas cerca de 2% dos genótipos são suscetíveis à raça mais comum da ferrugem (Rodrigues JR. et al., 2004), a alta incidência e severidade observada quando este genótipo não recebeu controle químico sugere a quebra de resistência, assim como relatado em algumas cultivares derivadas de HT (Carvalho et al., 2017). Desta forma, pode-se inferir que apesar da presença de altos teores de compostos fenólicos nas folhas do MG0313, outros mecanismos de defesa ao patógeno podem não estar ativos, levando à alta expressão da doença. Assim, constata-se que apesar da sua relação com os mecanismos de defesa das plantas, a alta concentração de compostos fenólicos, por si só, não garante a resistência do cafeeiro à ferrugem.

Além disso, verificou-se em frutos no estágio maduro, correlação positiva da doença com a CAT quando as plantas receberam controle químico, contrariamente ao que foi observado no estágio anterior, indicando que esta pode ser uma resposta tardia à infecção, não sendo eficiente no controle da ferrugem, já que as plantas com maior atividade dessa enzima, nesse estágio, apresentam mais sintomas da doença.

Destaca-se que, maior número de correlações significativas entre a expressão da doença e as variáveis analisadas ocorre no estágio verde-cana, no qual se observa também maior incremento na incidência e severidade

da doença para a maioria dos genótipos estudados. Este fato reflete na ativação de diferentes mecanismos de defesa das plantas visando controlar o processo de infecção, seja induzido pela resistência genética ou pelo controle químico. A defesa da planta deve ser entendida como um grupo de processos interconectados, de forma que dificilmente pode ser explicada por um único mecanismo (Oliveira e Romeiro, 1991). Assim, as complexas vias metabólicas das plantas que são ativadas frente ao estresse biótico devem continuar sendo estudadas. Este trabalho representa um passo inicial no entendimento de alguns desses mecanismos de defesa ativados pelo controle químico e genético, e seus reflexos em órgãos não diretamente afetados pelo patógeno, sendo útil para melhorias no processo de produção e obtenção de um produto final de qualidade.

## 5. CONCLUSÕES

Foi constatado efeito dos estádios de maturação sobre o teor de metabolitos e atividade de enzimas antioxidantes nos frutos, bem como nos teores de compostos fenólicos nas folhas. Porém, a atividade de enzimas antioxidantes nas folhas não sofre influência dos estádios de maturação.

A incidência e severidade da ferrugem são afetadas pelo estágio de maturação e esse efeito é variável se o controle adotado é genético ou químico, já que o último, adia a expressão dos sintomas iniciais nos genótipos suscetíveis.

Há correlação entre a expressão da ferrugem e a atividade enzimática e o teor de metabolitos nas folhas e frutos, indicando uma resposta sistêmica da planta à infecção, tanto no controle genético quanto no químico, correlação esta, dependente do estágio de maturação e do tipo de controle, se genético ou químico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à EPAMIG pela disponibilização da infraestrutura e equipamentos, ao CNPq pelas bolsas de produtividade (Carvalho, G.R.) e de doutorado (Pereira, D.R.) e pelo apoio financeiro (número de concessão 425088/2018-9) e à Fapemig e Consórcio Pesquisa Café, pelo apoio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- Abrahão, S.A., Pereira, R.G.F.A., Duarte, S.M. da S., Lima, A.R., Alvarenga, D.J., Ferreira, E.B., 2010. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café (*Coffea arabica* L.). *Ciênc. agrotec.* 34, 414–420. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000200020>
- Alves, J. J., 2019. Café brasileiro de qualidade. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 99p. URL (<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/25554>) (May 31, 2020).
- Angélico, C.L., Pimenta, C.J., Chalfoun, S.M., Chagas, S.J.R., Chalfoun, Y., Pires, T.C., 2009. Composição bromatológica de cafés (*Coffea arabica* L.) em diferentes estádios de maturação ensacados antes da secagem. *Proceedings of the VI Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, Vitória, ES. URL ([http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb\\_anais/simposio6/196.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio6/196.pdf)) (May 31, 2020).
- Ashihara, H., 2006. Metabolism of alkaloids in coffee plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 1–8. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100001>

- Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 2000. Official methods of analysis of AOAC International, 17th ed. Eds.; AOAC International, Arlington, 1094p.
- Ballester, A.R., Lafuente, M.T., González-Candelas, L., 2006. Spatial study of antioxidant enzymes, peroxidase and phenylalanine ammonia-lyase in the citrus fruit–*Penicillium digitatum* interaction. *Postharvest Biology and Technology* 39, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.10.002>
- Baumann, T.W., 2006. Some thoughts on the physiology of caffeine in coffee: and a glimpse of metabolite profiling. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 243–251. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100017>
- Biemelt, S., Keetman, U., Albrecht, G., 1998. Re-Aeration following Hypoxia or Anoxia Leads to Activation of the Antioxidative Defense System in Roots of Wheat Seedlings. *Plant Physiol.* 116, 651–658. <https://doi.org/10.1104/pp.116.2.651>
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Regras para análise de sementes. Brasília: CLAV/DNDV/SAND/MA, 398p. URL ([https://www.abrates.org.br/files/regras\\_analise\\_de\\_sementes.pdf](https://www.abrates.org.br/files/regras_analise_de_sementes.pdf)) (May 21, 2020).
- Carvalho, A.M., Cardoso, D.A., Carvalho, G.R., Carvalho, V.L., Pereira, A.A., Ferreira, A.D., Carneiro, L.F., 2017. Comportamento de cultivares de café sob a incidência das doenças da ferrugem e cercosporiose em dois ambientes de cultivo. *C.Sci.* 12, 100. <https://doi.org/10.25186/cs.v12i1.1248>
- Castaldo, L., Graziani, G., Gaspari, A., Izzo, L., Luz, C., Mañes, J., Rubino, M., Meca, G., Ritieni, A., 2018. Study of the Chemical Components, Bioactivity and Antifungal Properties of the Coffee Husk. *JFR* 7, 43. <https://doi.org/10.5539/jfr.v7n4p43>
- Capucho, A.S., Zambolim, L., Duarte, H.S.S., Vaz, G.R.O., 2011. Development and validation of a standard area diagram set to estimate severity of leaf rust in *Coffea arabica* and *C. canephora*: Estimation of coffee leaf rust severity. *Plant Pathology* 60, 1144–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02472.x>
- Cruz, C.D., 2016. Genes Software – extended and integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Sci. Agron.* 38, 547. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i3.32629>
- De Castro, R.D., Marraccini, P., 2006. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 175–199. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100013>
- Demant, L.A.R., Maringoni, A.C., 2012. Controle da mancha angular do feijoeiro com uso de fungicidas e seu efeito na produção das plantas. *Idesia* 30, 93–100. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292012000200012>
- Dessalegn, Y., Labuscagne, M.T., Osthoff, G., Herselman, L., 2008. Variation of green bean caffeine, chlorogenic acid, sucrose and trigonelline contents among Ethiopian Arabica coffee accessories. *SEJS* 30, 77–82. <https://doi.org/10.4314/sinet.v30i1.18286>
- Diniz, I., Talhinhos, P., Azinheira, H.G., Várzea, V., Medeira, C., Maia, I., Petitot, A.-S., Nicole, M., Fernandez, D., do Céu Silva, M., 2012. Cellular and molecular analyses of coffee resistance to *Hemileia vastatrix* and nonhost resistance to *Uromyces vignae* in the resistance-donor genotype HDT832/2. *Eur J Plant Pathol* 133, 141–157. <https://doi.org/10.1007/s10658-011-9925-9>
- Dische, Z., 1962. General color reactions, in: Whistler, R.L., Wolfram, M.L. (Eds.), *Carbohydrate chemistry*. Academic Press: New York, 477–512p.
- Echeverria-Beirute, F., Murray, S.C., Klein, P., Kerth, C., Miller, R., Bertrand, B., 2018. Rust and Thinning Management Effect on Cup Quality and Plant Performance for Two Cultivars of *Coffea arabica* L. *J. Agric. Food Chem.* 66, 5281–5292. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03180>
- Eskes, A.B., Toma-Braghini, M., 1982. The effect of leaf age on incomplete resistance of coffee to *Hemileia vastatrix*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 88, 219–230. <https://doi.org/10.1007/BF02000128>
- Farah, A., Donangelo, C.M., 2006. Phenolic compounds in coffee. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 23–36. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100003>
- Frischknecht, P.M., Ulmer-Dufek, J., Baumann, T.W., 1986. Purine alkaloid formation in buds and developing leaflets of *Coffea arabica*: Expression of an optimal defence strategy? *Phytochemistry* 25, 613–616. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(86\)88009-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(86)88009-8)
- Geoinfo, 2004. Mapa de solos do estado de Minas Gerais. URL ([http://geoinfo.cnps.embrapa.br/layers/geonode%3Alev\\_mg\\_estado\\_solos\\_lat\\_long\\_wgs84\\_vt#category-more](http://geoinfo.cnps.embrapa.br/layers/geonode%3Alev_mg_estado_solos_lat_long_wgs84_vt#category-more)) (April 15, 2020).
- Geromel, C., 2006. Metabolismo da sacarose em frutos de café. 94p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP, 94p. URL ([http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/315479/1/Geromel\\_Clara\\_D.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/315479/1/Geromel_Clara_D.pdf)) (May 31, 2020).
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide Dismutases: I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiol.* 59, 309–314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309>
- Green, P.W.C., Davis, A.P., Cossé, A.A., Vega, F.E., 2015. Can Coffee Chemical Compounds and Insecticidal

- Plants Be Harnessed for Control of Major Coffee Pests? *J. Agric. Food Chem.* 63, 9427–9434. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03914>
- Guerra-Guimarães, L., Cardoso, S., Martins, I., Loureiro, A., Bernardes da Silva, A., Várzea, V.M.P., Silva, M.D., 2008. Differential induction of superoxide dismutase in *Coffea arabica* – *Hemileia vastatrix* interactions. *Proceedings of the 22nd International Conference on Coffee Science*, Campinas: ASIC, 14-19. URL ([https://www.academia.edu/18275126/Differential\\_induction\\_of\\_superoxide\\_dismutase\\_in\\_Coffea\\_Arabica\\_Hemileia\\_vastatrix\\_interactions](https://www.academia.edu/18275126/Differential_induction_of_superoxide_dismutase_in_Coffea_Arabica_Hemileia_vastatrix_interactions)) (May 31, 2020).
- Guerra-Guimarães, L., Silva, M.C., Struck, C., Loureiro, A., Nicole, M., Rodrigues, C.J., Ricardo, C.P.P., 2009. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. *Biol Plant* 53, 702–706. <https://doi.org/10.1007/s10535-009-0126-8>
- Hammerschmidt, R., 2014. Chlorogenic acid: A versatile defense compound. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 88, iii–iv. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.11.002>
- Havir, E.A., McHale, N.A., 1987. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiol.* 84, 450–455. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>
- Herzog, T.T., E Silva, B.S.O., Da Silva, M.B., Partelli, F.L., De Souza, A.F., 2018. EFEITO DE FUNGICIDAS NO CAFEEIRO CONILON. *NAT* 6, 435. <https://doi.org/10.31413/nativa.v6i5.5664>
- Honorato Júnior, J., Zambolim, L., Aucique-Pérez, C.E., Resende, R.S., Rodrigues, F.A., 2015. Photosynthetic and antioxidative alterations in coffee leaves caused by epoxiconazole and pyraclostrobin sprays and *Hemileia vastatrix* infection. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 123, 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.016>
- Huang, R., Xia, R., Hu, L., Lu, Y., Wang, M., 2007. Antioxidant activity and oxygen-scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. *Scientia Horticulturae* 113, 166–172. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.03.010>
- Illy, A.; Viani, R. 1995. Espresso coffee: the chemistry of quality. San Diego: Academic, 253 p.
- Joët, T., Laffargue, A., Descroix, F., Doulebeau, S., Bertrand, B., Kochko, A. de, Dussert, S., 2010. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. *Food Chemistry* 118, 693–701. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.048>
- Joët, T., Laffargue, A., Salmona, J., Doulebeau, S., Descroix, F., Bertrand, B., de Kochko, A., Dussert, S., 2009. Metabolic pathways in tropical dicotyledonous albuminous seeds: *Coffea arabica* as a case study. *New Phytologist* 182, 146–162. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02742.x>
- Malta, M.R., Chagas, S.J.D.R., 2009. Avaliação de compostos não-voláteis em diferentes cultivares de cafeeiro produzidas na região sul de Minas Gerais. *Acta Sci. Agron.* 31, 57–61. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i1.6629>
- Martí, M.C., Camejo, D., Olmos, E., Sandalio, L.M., Fernández-García, N., Jiménez, A., Sevilla, F., 2009. Characterisation and changes in the antioxidant system of chloroplasts and chromoplasts isolated from green and mature pepper fruits. *Plant Biology* 11, 613–624. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00149.x>
- Martins, F.B., Gonzaga, G., Dos Santos, D.F., Reboita, M.S., 2018. Classificação climática de Köppen e de Thornthwaite para Minas Gerais: cenário atual e projeções futuras. *ABCLIMA* 1. <https://doi.org/10.5380/abclima.v1i0.60896>
- Montavon, P., Bortlik, K., 2004. Evolution of Robusta Green Coffee Redox Enzymatic Activities with Maturation. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3590–3594. <https://doi.org/10.1021/jf0308004>
- Montavon, P., Duruz, E., Rumo, G., Pratz, G., 2003. Evolution of Green Coffee Protein Profiles with Maturation and Relationship to Coffee Cup Quality. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2328–2334. <https://doi.org/10.1021/jf020831j>
- Monteiro, A.C.A., de Resende, M.L.V., Valente, T.C.T., Ribeiro Junior, P.M., Pereira, V.F., da Costa, J.R., da Silva, J.A.G., 2016. Manganese Phosphite in Coffee Defence against *Hemileia vastatrix*, the Coffee Rust Fungus: Biochemical and Molecular Analyses. *J Phytopathol* 164, 1043–1053. <https://doi.org/10.1111/jph.12525>
- Nakano, Y.; Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 22(5), 867–880.
- Nicholson, R.L., Hammerschmidt, R., 1992. Phenolic Compounds and Their Role in Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 30, 369–389. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.002101>
- Oliveira, J.R.; Romeiro, R.S., 1991. Compostos fenólicos, idade da folha e resistência do cafeeiro a *Pseudomonas cicgorii* e *Pseudomonas syringae*, pv. *Garcae*. *Revista Ceres*, 38, 445–452.
- Pandey, S., Fartyal, D., Agarwal, A., Shukla, T., James, D., Kaul, T., Negi, Y.K., Arora, S., Reddy, M.K., 2017. Abiotic Stress Tolerance in Plants: Myriad Roles of Ascorbate Peroxidase. *Front. Plant Sci.* 8, 581. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00581>
- Pimenta, C. J. 2003. Qualidade de café. Lavras: UFLA, 304 p.

- Reis, A.R., Favarin, J.L., Gratão, P.L., Capaldi, F.R., Azevedo, R.A., 2015. Antioxidant metabolism in coffee (*Coffea arabica* L.) plants in response to nitrogen supply. *Theor. Exp. Plant Physiol.* 27, 203–213. <https://doi.org/10.1007/s40626-015-0045-3>
- Resende, M.L.V., Salgado, S.M.L., Chaves, Z.M., 2003. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatol. bras.* 28, 123–130. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000200001>
- Rodrigues Júnior, C.J.; Gonçalves, M.M.; Várzea, V.M.P., 2004. Importância do Híbrido de Timor para o território e para o melhoramento da cafeicultura mundial. *Revista de Ciências Agrárias*, 27(2), 203-213.
- Salgado, P.R., Favarin, J.L., Leandro, R.A., Lima Filho, O.F. de, 2008. Total phenol concentrations in coffee tree leaves during fruit development. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* 65, 354–359. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400005>
- Santos, M.O., de Oliveira Silveira, H.R., de Souza, K.R.D., Lima, A.A., Boas, L.V.V., Barbosa, B.C.F., Barreto, H.G., Alves, J.D., Chalfun-Junior, A., 2018. Antioxidant System Differential Regulation is Involved in Coffee Ripening Time at Different Altitudes. *Tropical Plant Biol.* 11, 131–140. <https://doi.org/10.1007/s12042-018-9206-2>
- Scott, A.J., Knott, M., 1974. A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. *Biometrics* 30, 507. <https://doi.org/10.2307/2529204>
- Shigeoka, S., 2002. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *Journal of Experimental Botany* 53, 1305–1319. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.372.1305>
- Silva, F.L.F., Nascimento, G.O., Lopes, G.S., Matos, W.O., Cunha, R.L., Malta, M.R., Liska, G.R., Owen, R.W., Trevisan, M.T.S., 2020. The concentration of polyphenolic compounds and trace elements in the *Coffea arabica* leaves: Potential chemometric pattern recognition of coffee leaf rust resistance. *Food Research International* 134, 109221. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109221>
- Silva, M. do C., Várzea, V., Guerra-Guimarães, L., Azinheira, H.G., Fernandez, D., Petitot, A.-S., Bertrand, B., Lashermes, P., Nicole, M., 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Braz. J. Plant Physiol.* 18, 119–147. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100010>
- Silveira, H.R. de O., Souza, K.R.D. de, Andrade, C. A., Santos, M. de O.; Rodrigues-Brandão, I.; Silva, D.M. da; Alves, J.D., 2015. Antioxidant system response in coffee seedlings under waterlogging. *Coffee Science*, 10 (4), 437 - 444. URL ([http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/922/pdf\\_4](http://www.coffeescience.ufla.br/index.php/Coffeescience/article/view/922/pdf_4)) (May 30, 2020).
- Subroto, G., Kusbianto, D.E., Avivi, S., Slameto, S., Setiyono, S., 2019. Correlation Between Secondary Metabolites of Leaf and the Resistance to Leaf Rust (*Hemileia vastatrix*) on Several Arabica Coffee Clones. *ipas* 4, 71. <https://doi.org/10.22146/ipas.42124>
- Vitorino, M.D., França, A.S., Oliveira, L.S. de, Borges, M.L.A., 2001. Metodologia para obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis, *Revista Brasileira de Armazenamento*, Viçosa, Especial (3), 17-24, 2001. URL ([https://www.researchgate.net/publication/291979569\\_Metodologias\\_de\\_obtencao\\_de\\_extrato\\_de\\_cafe\\_visando\\_a\\_dosagem\\_de\\_compostos\\_ao\\_volateis#fullTextFileContent](https://www.researchgate.net/publication/291979569_Metodologias_de_obtencao_de_extrato_de_cafe_visando_a_dosagem_de_compostos_ao_volateis#fullTextFileContent)) (May 30, 2020).
- Yamaki, S., 2010. Metabolism and Accumulation of Sugars Translocated to Fruit and Their Regulation. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 79, 1–15. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.79.1>

## ARTIGO 4

# CONTROLE GENÉTICO E QUÍMICO DA FERRUGEM DO CAFEIEIRO: IMPACTOS NA QUALIDADE DO CAFÉ

**Journal of the Science of Food and Agriculture**

(Versão preliminar)

### RESUMO

A ocorrência de doenças pode alterar o metabolismo do cafeeiro (*Coffea arabica* L.), provocando modificações na composição dos grãos e na qualidade de bebida. Porém, pouco se sabe sobre quais aspectos da qualidade do café são de fato alterados pela ferrugem (*Hemileia vastatrix* Berk et Br.) e por seus principais métodos de controle. Foi investigado o efeito dos métodos químico e genético de controle da ferrugem do cafeeiro sobre a qualidade do grão e da bebida do café. Tanto o controle genético quanto o químico reduzem os prejuízos causados pela doença na composição dos grãos. Genótipos com ascendência resistente, mesmo que apresentem quebra de resistência, respondem melhor ao controle químico. Nas condições avaliadas, cafés com maior e menor frequência de notas de sabor ‘frutadas’ e ‘achocolatadas’, respectivamente, apresentam maior nota total na análise sensorial. A combinação do controle genético e químico favorece o aumento do teor de açúcares nos grãos, a nota sensorial total e a riqueza de sabores percebidos.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Coffea arabica* L.; *Hemileia vastatrix* Berk et Br.; Híbrido de Timor; café especial; perfil sensorial; caracterização físico-química; triazol.

### 1. INTRODUÇÃO

A demanda por cafés de alta qualidade tem aumentado constantemente nos últimos anos em todo o mundo, não apenas por seus benefícios à saúde, mas principalmente pelas sensações prazerosas proporcionadas pela bebida.<sup>1-4</sup> Essa mudança de comportamento vem destacando o conceito de cafés especiais, que se referem a cafés que possuem características qualitativas que o distinguem positivamente quanto ao sabor, aroma, acidez, doçura e corpo.<sup>5</sup> Quanto mais exóticas e raras essas sensações, maior sua valorização no mercado, o que se reflete em ganhos para o produtor, já que cafés especiais podem ter um valor de venda até 50% superior aos cafés *commodities*.<sup>1,6</sup>

A qualidade do café é definida como um conjunto de atributos físicos, químicos, sensoriais e higiênico-sanitários, que proporcionam prazer e segurança aos seus consumidores, sendo uma característica complexa, que

pode ser avaliada em diferentes níveis, englobando a composição química e integridade dos grãos, sua classificação física, além da análise sensorial.<sup>3,4,7,8</sup>

Diferentes fatores envolvidos no processo de produção do café, colheita e pós-colheita, armazenamento e preparo da bebida podem interagir entre si e ter influência nos diferentes aspectos da qualidade, alterando a percepção final.<sup>9</sup> Inúmeros estudos têm mostrado a grande influência sobre a qualidade do café da adoção de diferentes genótipos, condições ambientais, como altitude e clima, práticas de manejo como o sombreamento e desbaste de frutos, tipo de processamento pós-colheita, bem como da interação entre esses fatores.<sup>4,8,10</sup>

No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos causados na qualidade do café pela utilização dos principais métodos de controle de doenças do cafeeiro que, no caso da ferrugem, é o controle químico com uso de fungicidas preventivos-curativos sistêmicos, e a adoção de cultivares com resistência genética, como as derivadas do grupo genético Híbrido de Timor (HT).<sup>11,12</sup>

Também é pouco estudada a interação entre genótipos e a adoção do controle químico quanto a sua resposta em termos de qualidade.<sup>9</sup> Isso pode ser crucial para o produtor que busca a diferenciação do seu produto, principalmente quando se considera níveis detalhados do perfil sensorial, decisivos na produção de cafés destinados a nichos de mercado específicos.

Sabe-se que a ocorrência de doenças, ainda que não diretamente nos frutos, pode provocar modificações no metabolismo da planta, levando a alterações na composição química dos grãos, o que, conseqüentemente, pode acarretar numa bebida de menor qualidade. É necessário, entretanto, a realização de estudos que especifiquem quais aspectos da qualidade do café são afetados por doenças como a ferrugem,<sup>13</sup> uma vez que esta é considerada a principal doença do cafeeiro em danos e abrangência e, muitas vezes, os estudos envolvendo sua ocorrência e controle consideram apenas suas conseqüências na produtividade.<sup>14</sup> Além disso, as medidas de controle que amenizam os prejuízos da ferrugem no vigor da planta, e produtividade, podem provocar efeitos colaterais favoráveis ou não na qualidade, por meio de mecanismos não diretamente relacionados à doença que controla.<sup>13</sup>

Diante do exposto, objetivou-se verificar o efeito dos métodos químico e genético de controle da ferrugem do cafeeiro, bem como de sua interação, sobre diferentes aspectos ligados à qualidade do café, desde a composição química, físico-química e granulometria, até a avaliação sensorial da bebida e seu perfil de nuances de sabores. Espera-se encontrar alterações dentro de cada um desses parâmetros de qualidade que possam embasar a decisão do produtor a respeito do genótipo e manejo da doença adotado, principalmente quando se deseja agregar valor ao produto café por meio da diferenciação e qualidade.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Descrição do experimento**

O experimento foi realizado no ano agrícola de 2018/19, no Banco Ativo de Germoplasma de *Coffea* spp. de Minas Gerais, Brasil no Campo Experimental de Patrocínio (CEPC), situado a 18°59'26" de latitude sul, 48°58'95" de longitude oeste e 975 metros de altitude, na Região do Cerrado Mineiro, 1ª Denominação de Origem de Café do Brasil. O solo é do tipo Latossolo Vermelho<sup>15</sup> e a topografia é plana, com ligeira inclinação. Patrocínio se encontra em uma região de clima Tropical, com inverno seco e estação chuvosa no verão (Aw), conforme classificação de Köppen.<sup>16</sup>

Foram avaliados quatro genótipos de café arábica, implantados no campo no ano de 2006, em blocos casualizados com duas repetições e dez plantas por parcela, sendo dois do grupo Híbrido de Timor (HT), de ascendência resistente a ferrugem (MG0277- origem Híbrido de Timor UFV 376-52 e MG0313 - origem Híbrido de Timor UFV 428-04) e dois do grupo Bourbon, considerado padrão de qualidade de bebida do café (MG0006 e MG0012, originados de coletas em lavouras de propriedades privadas nos municípios de Araponga e Manhumirim – MG, respectivamente). Em cada parcela, metade das plantas recebeu tratamento químico via solo para controle da ferrugem (Verdadero 600 WG® - Ciproconazol + Tiametoxan, 1,0 kg.ha<sup>-1</sup>), no início do período das chuvas, em novembro de 2018, conforme recomendação. Esse produto também é eficiente no controle do bicho mineiro, pela presença do ingrediente ativo Tiametoxan. Desta forma, na outra metade de cada parcela, foi realizado simultaneamente o controle de bicho mineiro (Actara 250 WG® - Tiametoxan, 1,0 kg.ha<sup>-1</sup>), totalizando, em um esquema de parcela subdividida, oito tratamentos com duas repetições em subparcelas de cinco plantas. Os demais tratamentos culturais foram realizados conforme recomendação técnica baseada na análise de solo e monitoramento de pragas e doenças.

## **2.2. Avaliação da ferrugem**

Foram realizadas, de abril a maio de 2019, três avaliações de incidência e severidade da ferrugem. Essas avaliações foram realizadas quando os frutos de café se apresentavam nos estádios de maturação verde, verde-cana e maduro, visando representar o progresso da doença durante a formação do grão, já que esta tem influência no metabolismo da planta e, conseqüentemente, pode afetar a composição do grão. Foram coletadas dez folhas por planta, no terceiro ou quarto par de folhas de ramos plagiotrópicos, tomados aleatoriamente no terço médio da planta, totalizando 50 folhas por subparcela experimental. A incidência da doença foi determinada com base no número de folhas com pústulas esporuladas em relação ao número total de folhas avaliadas por subparcela experimental, sendo posteriormente convertida para porcentagem. A severidade da ferrugem foi avaliada por meio de escala diagramática para ferrugem, descrita por Capucho et al.,<sup>17</sup> de acordo com a porcentagem de área foliar lesionada. Os resultados apresentados correspondem à média dos valores obtidos nos três tempos de avaliação em cada subparcela. Com base nessas avaliações, constatou-se que, dentre os quatro genótipos avaliados, apenas o MG0277 apresentou resistência a ferrugem (PEREIRA, não publicado). A resposta dos genótipos avaliados foi para a população natural de raças de ferrugem presentes no campo experimental de Patrocínio - MG.

## **2.3. Colheita e processamento do café**

A colheita do café foi realizada em maio de 2019, quando os frutos se apresentavam predominantemente no estágio de maturação cereja (maduro), ideal para obtenção de uma bebida de qualidade superior. Os frutos de café foram lavados para separação dos frutos chochos, malformados, brocados e impurezas e, posteriormente, selecionados, sendo retirada uma amostra de oito litros de frutos maduros de cada subparcela experimental. As amostras foram processadas via seca (café natural), e submetidas à secagem em peneiras de fundo telado constituída de polietileno de 1,00 mm<sup>2</sup> de malha, montadas em suportes de madeira e dispostas de forma suspensa, conforme técnicas específicas estabelecidas pela tecnologia de pós-colheita do café<sup>18</sup>. O final da secagem foi determinado quando os frutos atingiram o teor de água de 11 % (base úmida). Em seguida, as amostras de café em

coco de cada parcela experimental foram acondicionadas em sacos impermeáveis e armazenadas em câmara fria por 30 dias a 16 °C, para uniformização do teor de água nos grãos e harmonização dos compostos químicos precursores do sabor e aroma. Após o período de descanso, o café em coco foi beneficiado e os grãos foram preparados para as análises químicas, físico-químicas e sensorial. Realizou-se a remoção dos defeitos das amostras e a classificação granulométrica foi realizada por meio da passagem da massa de grãos em peneiras de crivos circulares para grãos chatos de numeração 16, 17 e 18/64 polegadas, em jogo de peneiras específico para classificação de grãos de café, sendo que estabeleceu-se a porcentagem de grãos chatos retidos nas peneiras 16 acima, a partir de uma amostra inicial de 300 gramas.<sup>19</sup> Para a realização das análises químicas, físico-químicas e sensorial foram utilizados grãos sem defeitos e classificados em peneira 16 acima.

#### **2.4. Análises químicas e físico-químicas dos grãos de café**

As análises de avaliação da composição química dos grãos de café foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Café Dr. Alcides Carvalho, situado na EPAMIG, em Lavras, MG. As amostras de grãos foram moídas por cerca de um minuto em moinho modelo IKA A11 Basic Analytic®, adicionando-se nitrogênio líquido para facilitar a moagem e evitar oxidações na amostra. Após a moagem das amostras, estas foram acondicionadas em embalagens de plástico e armazenadas em freezer, à temperatura de -18 °C, até a realização das análises. A composição dos grãos crus provenientes dos diferentes tratamentos foram avaliados quanto à umidade, teores de proteínas totais, lipídios, açúcares totais, compostos fenólicos, cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos, pois estes são considerados compostos chave para a qualidade do café.<sup>3</sup> Os resultados dessas análises foram expressos em porcentagem de matéria seca (%MS). Além disso, foi realizada a avaliação da condutividade elétrica, lixiviação de potássio e atividade da polifenoloxidase dos grãos. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

A umidade dos grãos foi determinada em estufa ventilada a 105 °C ± 1 °C, durante 24 horas.<sup>20</sup>

Os compostos fenólicos foram extraídos por refluxo da amostra em solução aquosa de acetona 50 % (v/v) e determinados pelo método Folin-Denis segundo metodologia da AOAC.<sup>21</sup> Para a extração dos compostos fenólicos, foi utilizada 0,5 grama de amostra a qual foi acrescentada 50 mL de solução aquosa de acetona 50% (v/v). O extrato foi então aquecido em chapa aquecedora até o ponto de ebulição durante 15 minutos. O extrato em suspensão foi filtrado em papel de filtro de filtragem rápida e recolhido, acrescentando-se novamente 50 mL do solvente à amostra residual precipitada. Esse procedimento foi realizado por três vezes. Uma vez recolhidos os extratos, o solvente foi evaporado até a obtenção de aproximadamente 5 mL de extrato o qual foi diluído em 50 mL de água destilada e submetido a determinação dos compostos fenólicos.

O conteúdo de proteína bruta foi determinado pelo método Kjeldahl citado pela AOAC,<sup>21</sup> utilizando 0,5g de amostra pulverizada em tubo para digestão. A mesma quantidade de amostra foi utilizada para a determinação de lipídios totais pelo método Soxhlet citado pela AOAC.<sup>21</sup>

Os açúcares totais nos grãos de café foram extraídos pelo método de Antrona e quantificados por espectrofotometria a um comprimento de onda de 620 nm, utilizando-se uma curva padrão de glicose anidro, conforme método descrito por Dische.<sup>22</sup>

Os compostos bioativos cafeína, trigonelina e ácidos clorogênicos (5-ACQ) foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo metodologia de Vitorino et al.<sup>23</sup> adaptada por Malta e Chagas.<sup>24</sup> Amostras de 0,5 g de café cru moído foram extraídas em 50 mL água ultra pura em ebulição e colocadas

em banho-maria, com água em ebulição, durante 3 min. O extrato foi filtrado em papel de filtro comum e em seguida, filtrado em membrana PTFE de 0,45  $\mu\text{m}$ . A determinação desses compostos foi realizada em cromatógrafo da marca Perkin Elmer Flexar, Software: Chromera Flexar, com sistema de detecção por arranjo de diodos (PDA Detector Flexar), coluna cromatográfica Perkin Elmer C18 (250 x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), comprimento de onda de 272 nm. A fase móvel constituiu-se de metanol:água:ácido acético (20:80:1), com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Para a identificação e análise quantitativa, foi elaborada curva-padrão, utilizando-se padrões de cafeína, trigonelina e ácido-5-cafeiolquínico (5-ACQ).

A condutividade elétrica foi determinada segundo Malta, Pereira e Chagas.<sup>25</sup> Quatro amostras de 50 grãos de cada parcela foram pesadas e imersas em 75 mL de água deionizada (no interior de copos plásticos de 180 mL de capacidade) e colocadas em estufa ventilada a 25 °C. Após o período de embebição de 5 horas, as soluções sem os grãos de café foram vertidas para outro recipiente, onde se realizou a leitura da condutividade elétrica em condutivímetro Digimed CD-20. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$  de amostra.

Imediatamente após a leitura da condutividade elétrica, realizou-se a leitura do potássio lixiviado na solução em fotômetro de chama Digimed NK-2002 de acordo com metodologia proposta por Prete.<sup>26</sup> Os resultados da quantidade de potássio lixiviado foram expressos em ppm.

O extrato enzimático utilizado na determinação da atividade da polifenoloxidase foi obtido por meio da adaptação do processo de extração descrito por Draetta e Lima<sup>27</sup> e determinada pelo método descrito por Ponting e Joslyng,<sup>28</sup> utilizando-se extrato de amostra sem DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine) como branco.<sup>29</sup> Os resultados foram expressos em  $\text{u min}^{-1}\text{g}^{-1}$  de amostra.

## 2.5. Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada por três juízes certificados e calibrados, de acordo com o protocolo da Associação de Cafés Especiais (SCA),<sup>30</sup> segundo a metodologia proposta por Lingle<sup>5</sup> para avaliação sensorial de cafés especiais. Amostras contendo 100 g de grãos de café peneira 16 acima, ausentes de grãos mocas e defeitos, foram torradas monitorando-se a temperatura para que o tempo de torração não fosse inferior a 8 minutos ou superior a 12 minutos, sendo obtida uma coloração ao final da torra entre 55# e 65# na escala Agtron. Todas as amostras foram torradas dentro de um prazo de 24 horas antes da degustação.

Foram avaliadas cinco xícaras representando cada amostra, sendo atribuídas notas no intervalo de 6 a 10 pontos para as características fragrância/aroma, sabor, acidez, corpo, finalização (sabor residual), equilíbrio e impressão global. Uniformidade, ausência de defeitos (xícara limpa) e doçura, foram avaliados quantitativamente, atribuindo-se 2 pontos para cada um desses atributos quando cada xícara se apresenta uniforme, sem defeitos e com doçura mínima equivalente à concentração de 0,5% m/v de sacarose. As notas totais da análise sensorial foram constituídas pela soma das notas médias de todos os atributos, sendo considerados cafés especiais, aqueles com notas iguais ou acima de 80 pontos. As nuances de sabor e aroma percebidas pelos juízes também foram descritas, permitindo uma melhor caracterização das bebidas provenientes de cada tratamento.

## 2.6. Análise dos dados

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software Genes,<sup>31</sup> obtendo-se as análises de variância para todas as variáveis avaliadas de acordo com o modelo estatístico  $Y_{ijk} = \mu + R_i + A_j + e_1 + B_k + AB_{kj} + e_2$ , em que  $Y_{ijk}$  é o valor fenotípico;  $\mu$  é a constante inerente a todas as observações;  $R_i$  é o efeito da repetição  $i$ ;  $A_j$  efeito do genótipo (G)  $j$ ;  $e_1$  é o erro associado à parcela;  $B_k$  é o efeito do tratamento para em controle de ferrugem (C)  $k$ ;  $AB_{jk}$  é o efeito da interação GxC e  $e_2$  é o erro associado à subparcela, sendo  $e_1 = e_2 \sim N(0, \sigma_e^2)$ . A precisão experimental foi aferida por meio da estimativa do coeficiente de variação experimental (CV%). O agrupamento de médias foi realizado pelo teste de Scott-Knott<sup>32</sup> ( $p < 0.05$ ) quando identificado efeito significativo do fator pela análise de variância.

Foram obtidas as correlações entre incidência e severidade de ferrugem e as demais variáveis quando as plantas receberam tratamento químico para controle da ferrugem ou não, visando identificar possíveis associações entre a expressão da doença e a composição química dos grãos bem como com os atributos avaliados na análise sensorial. Também foram obtidas as correlações das variáveis químicas e físico-químicas com as características gerais da análise sensorial, visando verificar quais componentes do grão têm maior influência nas características da bebida. Por fim, foram estimadas as correlações entre as características gerais da análise sensorial e a nota total, com o objetivo de identificar quais desses atributos tem maior interferência na nota total. A significância das correlações foi avaliada pelos testes  $t$  e de Mantel ( $p < 0.05$ ).

Para complementação da avaliação sensorial da bebida por escala de notas, o perfil sensorial da bebida foi analisado descritivamente considerando as notas sensoriais de cada tratamento em um único diagrama em radar (escala gráfica única), denominado 'sensoriograma'. Também foi empregada a análise de conteúdo, segundo a adaptação proposta por Sobreira et al.,<sup>12</sup> para a caracterização sensorial de cafés especiais quanto à qualidade e intensidade das nuances de sabor e aroma percebidas pelos juízes na análise sensorial. As nuances atribuídas a cada tratamento foram agrupadas nas categorias frutados (frutado, frutas amarelas, frutas tropicais, melão, papaia, maracujá e uva), caramelados (caramelo, mascavo, mel e melado), achocolatados (leve chocolate, chocolate ao leite e chocolate) e outros (herbal e amêndoas).

## 3. RESULTADOS

As análises químicas e físico-químicas dos grãos de café, bem como a análise sensorial e classificação granulométrica, foram realizadas visando identificar possíveis alterações no metabolismo do cafeeiro causadas pela adoção do controle genético ou químico da ferrugem, bem como correlacioná-las com a expressão da doença no campo. Foi verificado efeito significativo de genótipos (G), controle (C) e interação GxC na incidência e a severidade da ferrugem. O estudo do efeito dessas fontes de variação sobre a expressão da doença já foi discutido em outro trabalho (PEREIRA, não publicado) sendo que aqui, deseja-se relacionar a ocorrência e intensidade da doença em função do tipo de controle adotado com a qualidade dos grãos e da bebida do café.

Com relação às análises químicas e físico-químicas dos grãos, foi observado pela análise de variância, efeito significativo de genótipos para os teores de açúcares totais, proteínas, lipídios, compostos fenólicos, trigonelina e cafeína, indicando que o teor destes metabólitos é variável, dependendo do genótipo adotado (Dados não apresentados). O teor de açúcares foi superior no genótipo MG0277, único que apresentou resistência genética

à ferrugem, podendo ser indício da existência de uma relação entre esses compostos e a resistência à ferrugem (TABELA 1). Os teores de trigonelina e cafeína, apesar da significância na análise de variância, não tiveram suas médias agrupadas pelo teste utilizado. Porém, verifica-se que seus valores foram inferiores no genótipo resistente (MG0277), o que também pode ter relação com a sua resistência.

Tabela 1 – Médias para os teores de metabólitos nos grãos, considerando genótipos e a adoção de controle químico para ferrugem do cafeeiro.

Genótipos	<sup>a</sup> LK	<sup>b</sup> CE	<sup>c</sup> PFO	<sup>d</sup> açú.	<sup>e</sup> prot.	<sup>f</sup> lip.	<sup>g</sup> CF	<sup>h</sup> trig.	<sup>i</sup> AC.	<sup>j</sup> caf.
<b>MG0277</b>	43.10 a	69.75 a	47.40 a	9.45 a	14.38 a	11.05 a	7.22 a	0.92 a	4.71 a	1.15 a
<b>MG0313</b>	45.22 a	91.31 a	46.51 a	8.48 b	14.31 a	11.52 a	6.77 b	0.97 a	4.51 a	1.37 a
<b>MG0006</b>	46.58 a	87.12 a	48.07 a	8.25 b	14.71 a	9.89 b	6.57 c	1.09 a	3.42 a	1.23 a
<b>MG0012</b>	46.48 a	89.38 a	45.94 a	8.14 b	15.14 a	9.74 b	7.32 a	1.24 a	3.74 a	1.38 a
Controle químico	<sup>a</sup> LK	<sup>b</sup> CE	<sup>c</sup> PFO	<sup>d</sup> açú.	<sup>e</sup> prot.	<sup>f</sup> lip.	<sup>g</sup> CF	<sup>h</sup> trig.	<sup>i</sup> AC.	<sup>j</sup> caf.
<b>Com controle</b>	44.76 a	85.11 a	46.83 a	8.94 a	14.68 a	10.42 a	6.60 b	1.03 a	4.06 a	1.29 a
<b>Sem controle</b>	45.93 a	83.67 a	47.13 a	8.22 b	14.59 a	10.68 a	7.34 a	1.08 a	4.13 a	1.28 a
<b>CVa (%)</b>	7.173	22.697	2.664	1.722	1.288	3.884	1.018	5.870	13.051	5.285
<b>CVb (%)</b>	3.337	3.688	2.895	1.543	2.207	4.142	3.417	5.988	6.197	4.367

<sup>a</sup>lixiviação de potássio (ppm); <sup>b</sup>condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ ); <sup>c</sup>atividade da polifenoloxidase ( $\text{u min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ); <sup>d</sup>açúcares totais; <sup>e</sup>proteínas totais; <sup>f</sup>lipídios; <sup>g</sup>compostos fenólicos; <sup>h</sup>trigonelina; <sup>i</sup>ácidos clorogênicos; <sup>j</sup>cafeína (%MS). Médias seguidas pela mesma letra na coluna, considerando cada fonte de variação, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ).

As médias para teor de proteínas também não foram agrupadas pelo teste adotado, apesar do efeito significativo do fator genótipos. Verifica-se, entretanto, que os genótipos do grupo Bourbon (MG0006 e MG0012) tendem a apresentar maior teor de proteínas que os HT (MG0277 e MG0313). De forma contrária, o teor de lipídios nos grãos é maior nos genótipos HT que nos Bourbons, demonstrando uma tendência na composição dos grãos devido a sua origem genética. O teor de compostos fenólicos nos grãos não parece ter relação direta com o grupo genético ou com a resistência à ferrugem, sendo maior nos genótipos MG0277 e MG0012, mediano no MG0313 e inferior no MG0006 (TABELA 1).

O uso ou não de controle químico para controle da ferrugem teve efeito significativo apenas sobre os teores de açúcares e compostos fenólicos (Dados não apresentados). O teor de açúcares dos grãos foi maior quando foi realizado o controle químico (TABELA 1). Ou seja, tanto na adoção do controle genético, quanto do químico, a quantidade de açúcares nos grãos é favorecida pela menor ocorrência de sintomas da ferrugem. Já o teor de compostos fenólicos foi maior quando não foi adotado o controle químico (TABELA 1).

O teor de açúcares nos grãos foi o único influenciado pela interação GxC (Dados não apresentados). Isso indica que os genótipos respondem diferentemente ao uso de controle químico quanto ao teor de açúcares. Na Figura 1 observa-se que todos os genótipos apresentaram maior conteúdo de açúcares nos grãos quando receberam tratamento químico para controle da ferrugem. Já considerando separadamente os tratamentos de controle de ferrugem (com e sem controle químico), observa-se que nas parcelas tratadas com fungicida, os Bourbons apresentaram menor teor de açúcares. No entanto, nas parcelas não tratadas, não existe uma separação de acordo com o grupo genético: apenas o genótipo resistente apresentou maior concentração de açúcares nos grãos. A expressão da ferrugem também apresentada na Figura 1, pode ser associada a este resultado, de forma que, quanto

menor a expressão da ferrugem, maior a concentração de açúcares nos grãos, independentemente de ser adotado o controle genético ou químico.

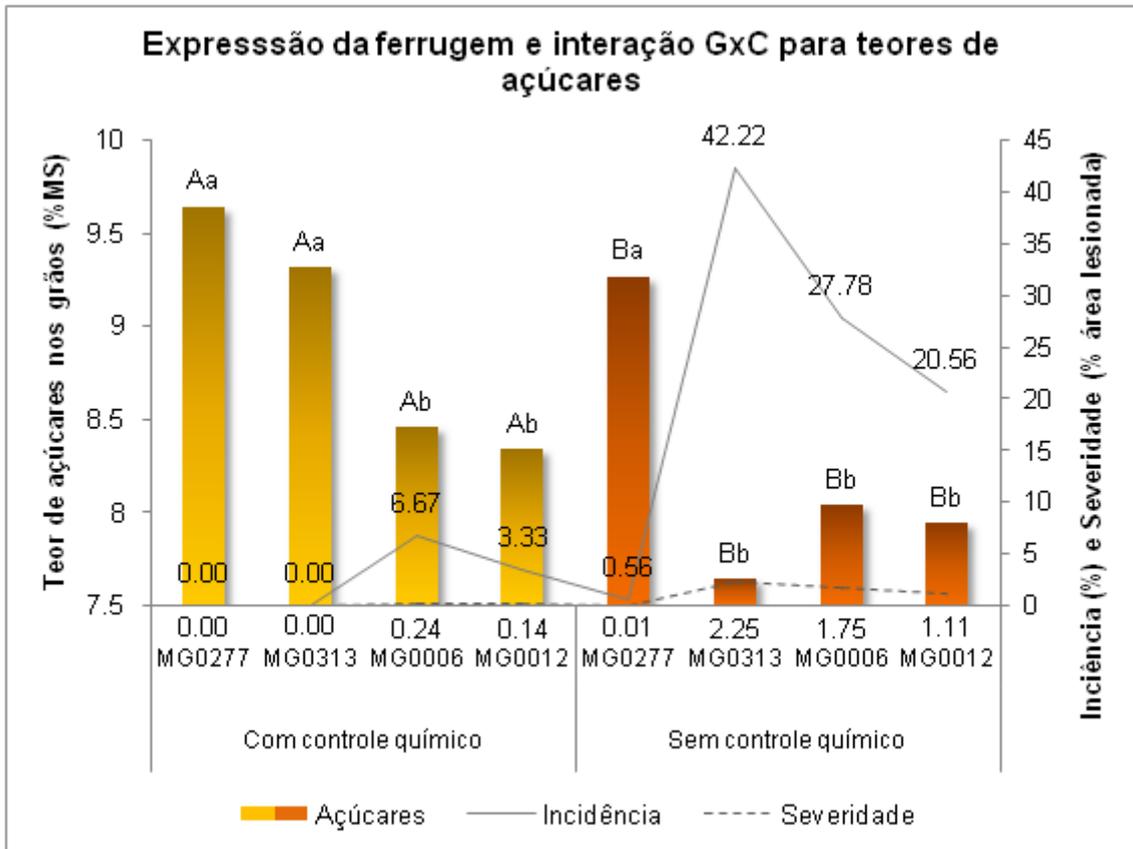


Figura 1. Interação GxC para o teor de açúcares nos grãos (%MS) e incidência (%) e severidade (% de área lesionada) médias de ferrugem para os diferentes tratamentos. Letras minúsculas indicam a comparação entre genótipos dentro de um mesmo tipo de tratamento químico para ferrugem (com ou sem controle químico) e letras maiúsculas correspondem à comparação do mesmo genótipo em diferentes tratamentos para controle da doença. Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ).

Na Tabela 2 são apresentadas as médias das características avaliadas na análise sensorial, nota total e classificação granulométrica (peneira 16+). Com relação à análise sensorial, não foi realizada a análise de variância para as características uniformidade, ausência de defeitos e doçura, já que na avaliação dos três juízes todos os tratamentos apresentaram nota máxima. As características fragrância/aroma e impressão global também não foram consideradas, pois todos os tratamentos receberam dos juízes nota média 7,5. Foi observado, na análise de variância, efeito significativo de genótipos (G) para finalização e equilíbrio, bem como para a nota total (Dados não apresentados). Observa-se para o atributo finalização, nota superior apenas para o genótipo HT MG0313. Já para o atributo equilíbrio, somente para o Bourbon MG0012 apresentou média inferior.

Tabela 2 - Médias para atributos sensoriais, nota total e classificação granulométrica (peneira 16+) considerando genótipos e de adoção de controle químico para ferrugem do cafeeiro.

genótipos	<sup>a</sup> sabor		<sup>b</sup> acidez		<sup>c</sup> corpo		<sup>d</sup> finalização		<sup>e</sup> equilíbrio		<sup>f</sup> nota total		<sup>g</sup> peneira 16+	
<b>MG0277</b>	7.96	a	7.79	a	7.96	a	7.54	b	7.50	a	83.75	a	78.50	a
<b>MG0313</b>	8.00	a	7.79	a	7.92	a	7.83	a	7.54	a	84.08	a	71.50	a
<b>MG0006</b>	7.88	a	7.59	a	7.79	a	7.54	b	7.50	a	83.29	a	76.50	a
<b>MG0012</b>	7.58	a	7.50	a	7.63	a	7.46	b	7.29	b	82.46	a	74.25	a
controle químico	<sup>a</sup> sabor		<sup>b</sup> acidez		<sup>c</sup> corpo		<sup>d</sup> finalização		<sup>e</sup> equilíbrio		<sup>f</sup> nota total		<sup>g</sup> peneira 16+	
<b>com controle</b>	7.90	a	7.75	a	7.90	a	7.63	a	7.46	a	83.63	a	77.13	a
<b>sem controle</b>	7.81	a	7.58	a	7.75	a	7.56	a	7.46	a	83.17	a	73.25	a
<b>CVa (%)</b>	1.941		1.406		1.342		0.527		0.658		0.404		9.688	
<b>CVb (%)</b>	1.287		1.722		2.063		0.970		2.840		0.637		16.535	

Notas para as características <sup>a</sup>sabor, <sup>b</sup>acidez, <sup>c</sup>corpo, <sup>d</sup>finalização, <sup>e</sup>equilíbrio e <sup>f</sup>nota total obtidas na análise sensorial segundo protocolo da SCA e <sup>g</sup>porcentagem de grãos peneira 16 acima pela classificação granulométrica. Médias seguidas pela mesma letra na coluna, considerando cada fonte de variação, pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0.05$ ).

Apesar de significativo o efeito de genótipos na análise de variância para a nota total, o teste adotado não foi capaz de agrupar as médias. Observa-se que todos os genótipos apresentaram nota superior a 82,46 pontos, sendo então classificados como cafés especiais. Além disso, as maiores notas totais tendem a ser observadas nos genótipos do grupo HT. Verifica-se também que apesar de não ter sido observada diferença significativa pelo teste F na análise de variância para as características sabor, acidez e corpo, os genótipos HT apresentaram avaliação superior para esses caracteres em relação aos Bourbons (TABELA 2). Constata-se então, que apesar de os Bourbons serem mundialmente reconhecidos pela sua qualidade de bebida, os HT têm potencial para produzir cafés de qualidade igual ou superior. Isso pode ser melhor evidenciado pelo perfil sensorial dos cafés (FIGURA 2), em que, no geral, os genótipos do grupo HT apresentam maior pontuação para os diferentes atributos sensoriais avaliados, independentemente de ser adotado o controle genético ou químico.

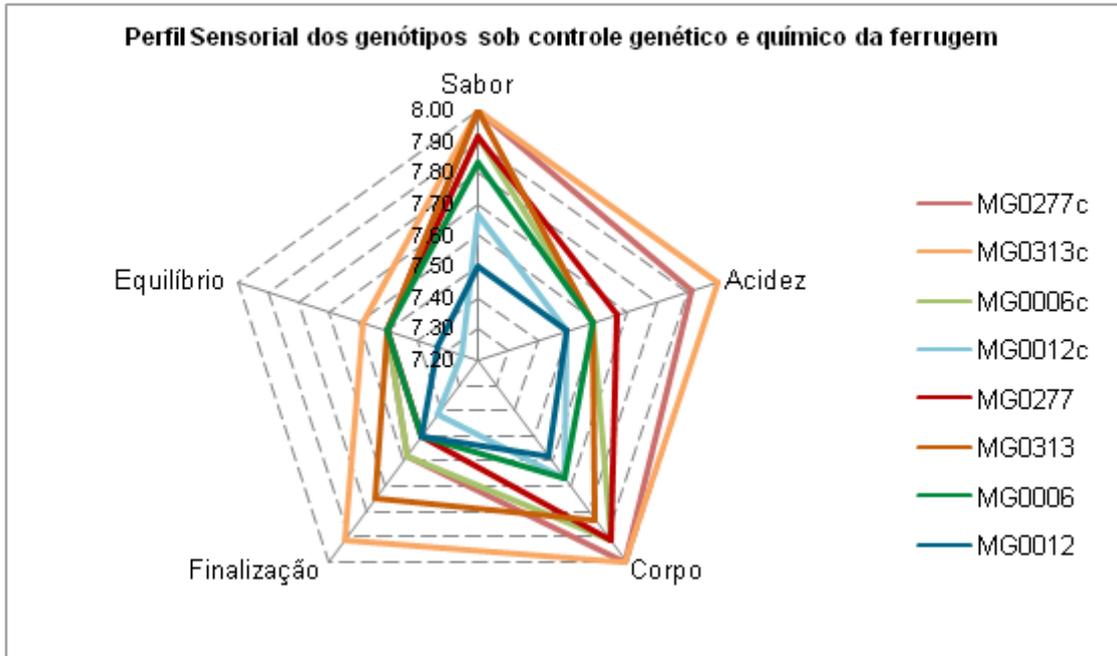


Figura 2. Perfil sensorial (Sensoriograma) dos genótipos avaliados com e sem controle químico da ferrugem considerando as características sabor, acidez, corpo, finalização e equilíbrio. Tratamentos: MG0006c; MG0012c; MG0277c; MG0313c: com controle químico de ferrugem; MG0006; MG0012; MG0277; MG0313: sem controle químico de ferrugem.

Nenhuma das variáveis relacionadas à avaliação sensorial ou classificação granulométrica foi influenciada pelos fatores controle (C) ou pela interação GxC na análise de variância (Dados não apresentados). Porém, observa-se que todos os atributos da análise sensorial, a nota total e a classificação por tamanho (peneira 16+) tendem a apresentar valor superior quando é adotado o controle químico, exceto para equilíbrio, que foi igual nos dois tipos de tratamento (TABELA 2).

As estimativas de correlação entre incidência e severidade de ferrugem e as demais variáveis analisadas no grão e na análise sensorial, considerando os tratamentos com e sem adoção de controle químico, são apresentadas na Tabela 3. Com relação aos tratamentos com controle químico, observa-se correlação negativa da incidência e severidade da doença com os teores de lipídios e ácidos clorogênicos nos grãos, indicando que, quanto maior a expressão da doença no campo, menor os teores desses compostos no grão. Também é observada uma correlação negativa entre a severidade da doença e o atributo acidez, indicando que, quanto maior a intensidade da infecção, menor a acidez da bebida.

Tabela 3 – Estimativas de correlação da incidência e severidade de ferrugem com as variáveis analisadas nos grãos e na análise sensorial, considerando os tratamentos com e sem aplicação de produto químico para controle da ferrugem do cafeeiro.

	com controle químico				sem controle químico			
	incidência		severidade		incidência		severidade	
<b>severidade</b>	0.99824	**	++		0.99601	**	++	
<sup>a</sup> LK	0.45594			0.45073	0.50708			0.53397
<sup>b</sup> CE	0.51726			0.54188	0.98973	**	++	0.97314 * ++
<sup>c</sup> PFO	0.75026			0.71384	-0.47541			-0.44051
<sup>d</sup> açú.	-0.86545			-0.89092	-0.98386	*	++	-0.96945 * ++
<sup>e</sup> prot.	0.70783			0.74835	0.11264			0.10921
<sup>f</sup> lip.	-0.94254		++	-0.95976 * ++	0.05249			-0.00281
<sup>g</sup> CF	-0.52396			-0.49009	-0.02027			-0.07104
<sup>h</sup> trig.	0.66987			0.71261	0.50136			0.49985
<sup>i</sup> AC	-0.9995	**	++	-0.9992 ** ++	-0.56159			-0.60102
<sup>j</sup> caf.	0.00786			0.04137	0.76619			0.71244
<sup>k</sup> nota total	-0.58822			-0.633	-0.1101			-0.11523
<sup>l</sup> sabor	-0.44559			-0.4979	-0.03214			-0.02447
<sup>m</sup> acidez	-0.84653			-0.87552 +	-0.64086			-0.62063
<sup>n</sup> corpo	-0.44559			-0.4979	-0.49373			-0.51191
<sup>o</sup> finalização	-0.50462			-0.5375	0.57616			0.52792
<sup>p</sup> equilíbrio	-0.33386			-0.3874	-0.09162			-0.05703
<sup>q</sup> peneira 16+	-0.09856			-0.12579	-0.61773		+	-0.56133

<sup>a</sup>lixiviação de potássio (ppm); <sup>b</sup>condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ ); <sup>c</sup>atividade da polifenoloxidase ( $\text{u min}^{-1}\text{g}^{-1}$ ); <sup>d</sup>açúcares totais; <sup>e</sup>proteínas totais; <sup>f</sup>lipídios; <sup>g</sup>compostos fenólicos; <sup>h</sup>trigonelina; <sup>i</sup>ácidos clorogênicos; <sup>j</sup>cafeína (%MS), <sup>k</sup>nota total e as características <sup>l</sup>sabor, <sup>m</sup>acidez, <sup>n</sup>corpo, <sup>o</sup>finalização, <sup>p</sup>equilíbrio obtidas na análise sensorial segundo protocolo da SCA e <sup>q</sup>porcentagem de grãos peneira 16 acima pela classificação física.

\*\*/\* Significativo ( $p < 0.01$  e  $0.05$ ) pelo teste t.

++/+ Significativo ( $p < 0.01$  e  $0.05$ ) pelo teste de Mantel.

Já nos tratamentos em que se avaliou o controle genético, sem a adoção de fungicida, observa-se correlação positiva da condutividade elétrica nos grãos com a incidência e severidade de ferrugem. Ou seja, quanto maior a expressão da doença no campo, maior a quantidade de danos provocados no sistema de membranas das células do grão, o que é evidenciado pelos maiores valores de condutividade elétrica. Também nesses tratamentos é observada correlação negativa entre o teor de açúcares do grão e as duas variáveis utilizadas para acompanhar o progresso da doença, confirmando a tendência indicada pelo efeito significativo da interação GxC na Figura 1, em que, quanto maior a expressão da ferrugem, menor o teor de açúcares nos grãos. De forma semelhante, é constatada correlação negativa entre a incidência de ferrugem e a porcentagem de grãos peneira 16 acima, podendo-se inferir que, quanto maior a incidência da doença, menor é o tamanho dos grãos (TABELA 3).

Esses resultados demonstram que independentemente da forma de controle adotada, a ocorrência de ferrugem traz prejuízos para a qualidade do grão e, conseqüentemente, da bebida, já que os atributos sensoriais são dependentes da composição do grão. Esse comportamento pode ser evidenciado na Tabela 4, onde são apresentadas as estimativas de correlação das características químicas e físico-químicas que sofrem influência

direta da ferrugem (TABELA 3), com os atributos sensoriais da bebida e a qualidade física do grão. O teor de açúcares dos grãos está positivamente correlacionado com os atributos sabor, corpo e equilíbrio, avaliados na análise sensorial, além da classificação por tamanho (peneira 16+). O teor de lipídios também está diretamente relacionado com o sabor e nota total, assim como o teor de ácidos clorogênicos está relacionado com o corpo da bebida. Já a condutividade elétrica se relaciona negativamente com o tamanho do grão (peneira 16+) (TABELA 4).

Tabela 4 – Estimativas de correlação das variáveis químicas e físico-químicas dos grãos com as características avaliadas na análise sensorial, nota total e classificação granulométrica, considerando os tratamentos com e sem aplicação de produto químico para controle da ferrugem do cafeeiro.

com controle químico										
	<sup>a</sup> nota total	<sup>b</sup> sabor		<sup>c</sup> acidez	<sup>d</sup> corpo		<sup>e</sup> finaliz.	<sup>f</sup> equil.		<sup>g</sup> peneira 16+
<sup>h</sup> CE	-0.46	-0.62		-0.56	-0.62		-0.03	-0.39		-0.90
<sup>i</sup> açú.	0.81	0.79	++	0.94	0.79	++	0.56	0.66	+	0.48
<sup>j</sup> lip.	0.78	0.70		0.95	0.70		0.59	0.58		0.33
<sup>k</sup> AC	0.61	0.47		0.86	0.47		0.53	0.36		0.09
sem controle químico										
	<sup>a</sup> nota total	<sup>b</sup> sabor		<sup>c</sup> acidez	<sup>d</sup> corpo		<sup>e</sup> finaliz.	<sup>f</sup> equil.		<sup>g</sup> peneira 16+
<sup>h</sup> CE	-0.12	-0.06		-0.68	-0.47		0.63	-0.16		-0.69
<sup>i</sup> açú.	0.23	0.18		0.75	0.57		-0.54	0.26		0.61
<sup>j</sup> lip.	0.81	++	0.73	++	0.43	0.77	0.85	0.48		-0.80
<sup>k</sup> AC	0.77	0.66		0.77	0.96	* ++	0.35	0.50		-0.28

<sup>a</sup>nota total e notas para as características <sup>b</sup>sabor, <sup>c</sup>acidez, <sup>d</sup>corpo, <sup>e</sup>finalização, <sup>f</sup>equilíbrio obtidas na análise sensorial segundo protocolo da SCA, <sup>g</sup>porcentagem de grãos peneira 16 acima pela classificação granulométrica, <sup>h</sup>condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$ ); <sup>i</sup>açúcares totais; <sup>j</sup>lipídios, <sup>k</sup>ácidos clorogênicos (%MS)

\*\*/\* Significativo ( $p < 0.01$  e  $0.05$ ) pelo teste t.

++/+ Significativo ( $p < 0.01$  e  $0.05$ ) pelo teste de Mantel.

Na Tabela 5, são apresentadas as estimativas de correlação entre as características avaliadas na análise sensorial com a nota total. Observa-se que o sabor é a característica que mais tem influência na nota total da bebida, independente de ser adotado o controle genético ou químico. Considerando essa importância do sabor na classificação final da bebida e sabendo-se que o sabor está associado ao teor de açúcares no grão (TABELA 4) o qual, por sua vez, tem forte correlação com a expressão da ferrugem (FIGURA 1 e TABELA 3), faz-se necessário o estudo detalhado dos sabores percebidos no café em função do controle da doença, bem como sua relação com a nota total. Com essa finalidade, foi realizada a análise de conteúdo para descrição de sabores de cada tratamento, fornecida pelos juízes na análise sensorial, visando diferenciar os tratamentos quanto a qualidade e intensidade das nuances e compará-las com a nota total (FIGURA 3). Constata-se que as maiores notas totais coincidem com os tratamentos que apresentam maior variedade e frequência de nuances agrupadas na categoria ‘frutados’ e menor frequência de nuances do grupo ‘achocolatados’. Essas maiores notas correspondem aos genótipos do grupo HT, nos quais, além das nuances comuns, como caramelo, mascavo e chocolate, foram percebidas nuances não encontradas no grupo dos Bourbons, como amêndoas, melado, uva, papaia, melão e frutas tropicais (FIGURA 3).

Tabela 5 – Estimativas de correlação das características avaliadas na análise sensorial com a nota total, considerando os tratamentos com e sem aplicação de produto químico para controle da ferrugem do cafeeiro.

	com controle químico			sem controle químico		
	<i><b>a</b></i> nota total					
<i><b>b</b></i> sabor	0.95	*	++	0.99	*	++
<i><b>c</b></i> acidez	0.93		++	0.79		
<i><b>d</b></i> corpo	0.95	*	++	0.90		++
<i><b>e</b></i> finaliz.	0.89		++	0.60		++
<i><b>f</b></i> equil.	0.96	*	++	0.90		++

*a*nota total e de *b*sabor, *c*acidez, *d*corpo, *e*finalização e *f*equilíbrio obtidas na análise sensorial segundo protocolo da SCA.

\*\*/\* Significativo ( $p < 0.01$  e  $0.05$ ) pelo teste t.

++/+ Significativo ( $p < 0.01$  e  $0.05$ ) pelo teste de Mantel.

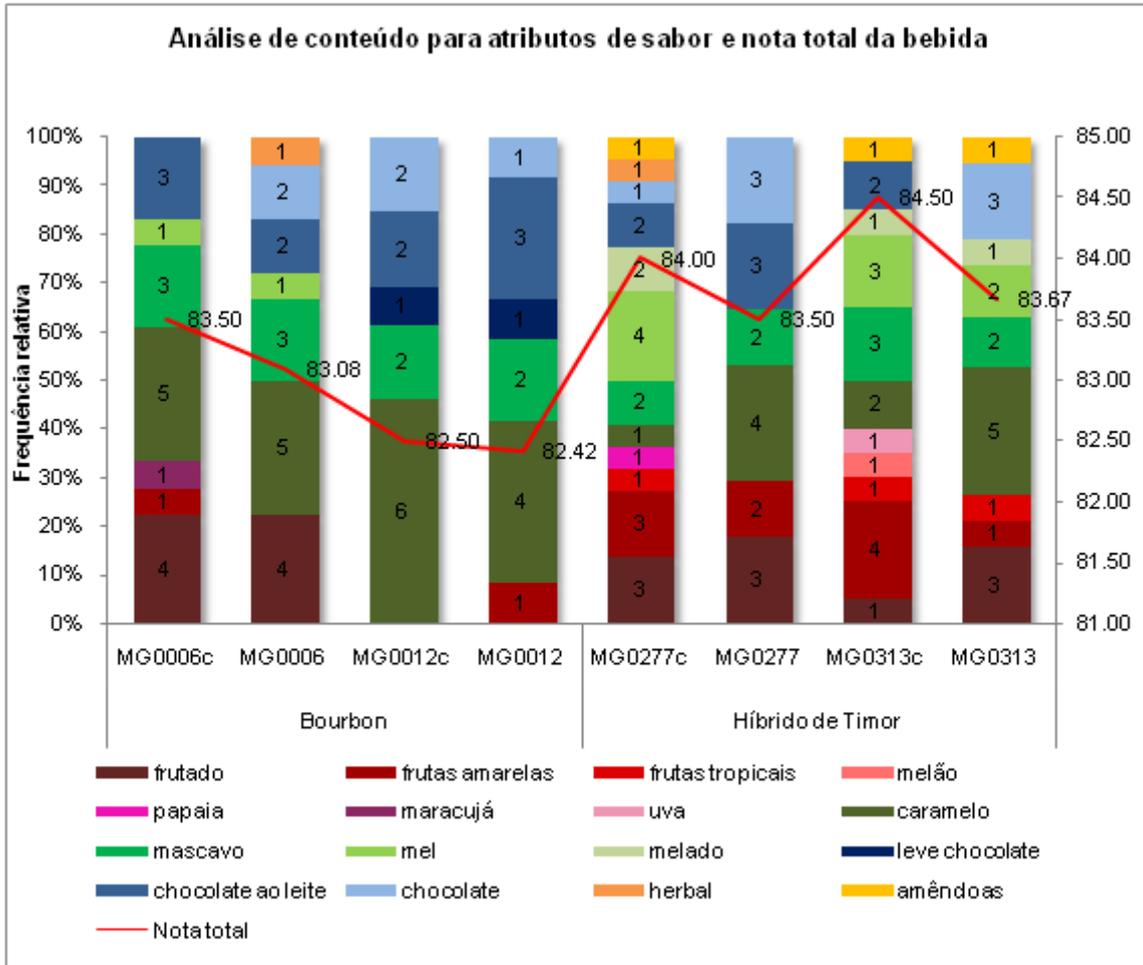


Figura 3. Notas totais e análise de conteúdo com a descrição de nuances de sabor e aroma da bebida para cada tratamento. As barras são distribuídas de acordo com frequência relativa que cada nuance foi citada pelos juízes na análise sensorial para cada tratamento. As nuances podem ser agrupadas nas categorias frutados (frutado, frutas amarelas, frutas tropicais, melão, papaia, maracujá e uva) caramelados (caramelo, mascavo, mel e melado), achocolatados (leve chocolate, chocolate ao leite e chocolate) e outros (herbal e amêndoas). Tratamentos: MG0006c; MG0012c; MG0277c; MG0313c: com controle químico de ferrugem; MG0006; MG0012; MG0277; MG0313: sem controle químico de ferrugem.

Percebe-se também nos genótipos HT, que existe maior variedade de nuances e maior nota total quando o controle químico é adotado. Isso indica que a anulação da expressão da ferrugem através da combinação do controle genético e químico, além de favorecer o maior teor de açúcares nos grãos (FIGURA 1) também influencia positivamente a nota total e a riqueza de sabores percebidos pelos juízes nesses tratamentos (FIGURA 3).

Constata-se, além disso, que a nota total foi aumentada pelo uso do produto químico em todos os genótipos, porém, a classificação dos genótipos quanto a esse quesito foi mantida, independentemente do uso ou não de fungicida, evidenciando a ausência de interação GxC para a nota total e o potencial dos genótipos HT para a produção de cafés diferenciados no ambiente avaliado (FIGURA 3).

#### 4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, investigou-se como as principais formas de controle da ferrugem afetam a qualidade dos grãos e da bebida café. Os resultados encontrados demonstraram que apesar da eficiência dos métodos, a ocorrência de ferrugem desde seus níveis mais baixos traz consequências negativas para a qualidade, independentemente da forma de controle adotada. Desta forma, a escolha correta da cultivar e do manejo da doença é fundamental, quando se deseja agregar valor ao café, pela qualidade.

Uma das formas de avaliação da qualidade do café se dá por meio da composição química dos grãos. O teor de açúcares nos grãos crus tem sido considerado como um precursor importante do sabor e aroma do café, pois contribui para a formação de açúcares redutores, que estão envolvidos nas reações de fragmentação, caramelização, e nas reações de Maillard durante a torração.<sup>2</sup> Alguns autores relatam que genótipos do grupo HT apresentam menor teor de açúcares que genótipos tradicionais de café arábica, característica que pode ter sido herdada do *C. canephora*, a qual apresenta menores teores desse constituinte.<sup>10,33,34</sup> Segundo Ribeiro et al.,<sup>35</sup> variações no teor de sacarose entre cultivares distintas de café arábica podem estar relacionadas com diferenças na expressão gênica, tanto na síntese como na degradação deste composto. No entanto, no presente trabalho, maior teor de açúcares totais foi encontrado apenas para o genótipo resistente a ferrugem, o HT MG0277, indicando relação desse composto com a expressão da doença.

Nas plantas, os fotoassimilados necessários para o desenvolvimento dos frutos, ou seja, os carboidratos exportados principalmente na forma de sacarose, são fornecidos a partir das folhas<sup>36</sup>. Os carboidratos são normalmente utilizados durante a formação de grãos e no crescimento vegetativo das plantas. Contudo, sob condições adversas, eles podem ser desviados do seu principal caminho metabólico para o mecanismo de defesa das plantas, participando da produção de compostos fenólicos, os quais, devido às propriedades antioxidantes e antibióticas, estão envolvidos em funções biológicas como a resistência a pragas e doenças.<sup>37</sup> Além disso, doenças de folha como a ferrugem podem causar desfolha ou redução da área fotossinteticamente ativa devido à formação de lesões, reduzindo o fornecimento de fotoassimilados para os frutos.<sup>13</sup> Desta forma, qualquer estresse durante a frutificação pode prejudicar o acúmulo destas moléculas nos grãos.<sup>13</sup> Isso explica por que o genótipo resistente foi o único com maior teor de açúcares totais.

Observa-se também, que os teores de cafeína e trigonelina foram inferiores no genótipo MG0277, único que apresentou resistência genética, podendo indicar uma relação desses componentes com sua resposta de defesa ao patógeno, e não necessariamente com sua ancestralidade genética. Diversos autores<sup>10,33,34,38</sup>, também não encontraram maiores teores de cafeína nos genótipos obtidos a partir de introgressão de genes de resistência em comparação às cultivares tradicionais, apesar da espécie *C. canephora* apresentar quase o dobro da cafeína presente em *C. arabica*. Alguns autores relatam que a cafeína, juntamente com outros alcalóides, trigonelina e outros compostos, contribuem para suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas.<sup>38,39</sup> Além disso, segundo Dessalegn et al.,<sup>40</sup> a biossíntese da cafeína, bem como seu acúmulo, são mais acentuados em situações de estresse. Isso explicaria as maiores concentrações de cafeína em plantas suscetíveis.

Os teores de proteínas parecem estar associados ao grupo genético, sendo observado menores teores nos HT, o que pode ter relação com a sua ascendência resistente. Porém, considerando-se que o único genótipo que expressou resistência completa foi o HT MG0277, não há indício de relação direta desses compostos com a resistência genética. Kitzberger et al.,<sup>41</sup> por outro lado, não encontraram relação entre o teor de proteínas no grão

e a origem genética, de forma que, dentre as cultivares avaliadas, uma cultivar tradicional (Bourbon) e uma moderna (IPR99) apresentaram os menores teores de proteínas.

Com relação ao teor de lipídios, assim como no presente trabalho, Kitzberger et al.<sup>41</sup> e Bertrand et al.<sup>33</sup> também verificaram maior teor de lipídios totais nas cultivares modernas. Segundo Mazzafera,<sup>42</sup> a concentração de lipídios depende de vários fatores, particularmente da espécie e cultivar. Kitzberger, Scholz e Benassi<sup>38</sup> verificaram que genótipos provenientes de cruzamentos com *C. canephora*, visando a indução de resistência, apresentaram melhor perfil de diterpenos do que cultivares tradicionais de café arábica. Esses dados indicam que existe relação entre os teores desses compostos e sua ascendência genética, mas não com a expressão da resistência, propriamente dita.

Já os resultados para os teores de compostos fenólicos nos grãos não parecem estar associados a origem do genótipo ou a resistência à ferrugem. É relatado que genótipos derivados de HT apresentam maiores teores de compostos fenólicos devido a participação de *C. canephora* nos cruzamentos.<sup>10</sup> Entretanto, assim como no presente trabalho, Kitzberger et al.<sup>41</sup> não encontraram indícios de que cultivares derivadas de HT tenham necessariamente comportamento diferenciado quanto aos compostos fenólicos, de forma que os mecanismos para o acúmulo destes compostos aparentam ser similares entre cultivares modernas e tradicionais.

Considerando a adoção ou não de controle químico, observou-se efeito significativo da aplicação de fungicida nos teores de açúcares e compostos fenólicos dos grãos. Abrahão<sup>11</sup> por outro lado, ao avaliar a qualidade dos grãos de café por meio de análises físicas e químicas, verificaram que os tratamentos com fungicidas sistêmicos não afetaram as variáveis relacionadas à qualidade quando comparados a uma testemunha suscetível e sem aplicação de controle químico.

O teor de compostos fenólicos foi maior nos grãos que não receberam controle químico. Isso pode indicar uma alteração no processo de maturação provocada pela maior expressão da doença nesses tratamentos. Segundo Scholz et al.<sup>43</sup>, maiores concentrações de compostos fenólicos podem estar associadas à maturação incompleta dos grãos de café. Estudos demonstram que o tempo de maturação está fortemente relacionado com a evolução da síntese de etileno na planta, a qual acelera o metabolismo do fruto.<sup>36</sup> Sabe-se também, que a ferrugem causa desfolha do cafeeiro devido à grande produção de etileno.<sup>44</sup> Já o tratamento com triazóis promove a inibição da atividade da enzima sintase ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico), a qual tem a função de converter o ACC em etileno,<sup>45</sup> o que poderia estar associado a uma maturação mais lenta nesses tratamentos. Desta forma, a maior produção de etileno nas plantas com maior expressão da ferrugem pode estar associada à maturação incompleta dos grãos, os quais apresentam maior concentração de compostos fenólicos. Alguns autores comentam que a ferrugem do cafeeiro causa amadurecimento prematuro dos frutos, o que resulta em grãos de baixa qualidade.<sup>9</sup>

Já para o teor de açúcares totais, os maiores valores encontrados nos tratamentos com controle químico pode ser explicado de forma semelhante ao que foi realizado para o genótipo resistente: os métodos de controle de pragas e doenças, incluindo pesticidas químicos, ajudam a manter a qualidade do café, pois impedem ou reduzem a proliferação desses organismos, os quais afetam a produção de fotoassimilados, refletindo então, na qualidade do grão.<sup>13</sup> Além disso, com a inibição do desenvolvimento da doença, os fotoassimilados podem ser translocados para os frutos, a exemplo dos açúcares, e não serem utilizados pela planta para a formação de compostos de defesa, como os compostos fenólicos. É relatado também, que o uso de fungicidas do grupo dos triazóis favorece uma

maior capacidade fotossintética por meio do incremento nos teores de clorofila total e maior taxa de assimilação líquida, aumentando a massa seca total.<sup>46</sup>

O efeito significativo da interação GxC para o teor de açúcares confirma o que foi verificado para esses fatores individualmente. Ou seja, independentemente da adoção do controle genético ou químico, o maior teor de açúcares nos grãos está relacionado à menor expressão da doença no campo. Além disso, o manejo combinado, adotando o controle químico juntamente com genótipos de ascendência resistente, como os derivados de HT, pode favorecer o maior acúmulo de açúcares nos grãos.

Apesar da resistência genética sozinha ser capaz de quase zerar a expressão da doença nas folhas, como no caso do MG0277, mesmo níveis baixos de infecção pela doença afetam o metabolismo de carboidratos da planta e, conseqüentemente, a composição dos grãos. Desta forma, o teor de açúcares desse genótipo é favorecido significativamente quando a expressão da doença é anulada pelo uso de fungicida, ainda que esses teores já fossem relativamente altos em comparação aos encontrados nos genótipos suscetíveis.

Já o genótipo HT MG0313, apesar de expressar a maior incidência e severidade da doença no tratamento sem controle químico, indicando uma quebra de resistência, teve seu comportamento completamente alterado quando foi adotado o uso de fungicida: os sintomas da doença foram anulados e foi observado incremento expressivo no teor de açúcares dos grãos, indicando a presença de genes de resistência parcial, não encontrados nos Bourbons. De fato, alguns autores relatam que a maioria dos genótipos derivados de HT apresenta resistência parcial quando a resistência completa é quebrada.<sup>47</sup> Esse resultado demonstra o potencial das cultivares derivadas do HT, as quais, mesmo quando ocorre a quebra de resistência, apresentam resposta ao controle químico mais eficiente que cultivares totalmente suscetíveis, por meio de uma possível ação sinérgica entre esses genes de resistência parcial e mecanismos de defesa induzidos pela aplicação do fungicida, favorecendo a defesa da planta ao patógeno e, conseqüentemente, a qualidade do produto final.

Quanto à análise sensorial, assim como no presente trabalho, Barbosa et al.<sup>1</sup> verificaram efeito significativo de genótipos para finalização, equilíbrio e nota total. A finalização é avaliada de acordo com a persistência do sabor do café e a agradabilidade de sua sensação.<sup>30</sup> Neste trabalho, foi observada nota superior neste quesito apenas para o genótipo HT MG0313. Já o equilíbrio se refere à complementação e contraste entre os demais atributos.<sup>30</sup> Neste atributo, somente o Bourbon MG0012 apresentou média inferior. Assim, infere-se que o grupo genético ou a resistência à ferrugem não têm influência direta predominante sobre esses atributos.

A nota total é resultante do somatório das notas dos atributos avaliados, subtraída a nota dos defeitos presentes na amostra, sendo ela que classifica de fato o café.<sup>30</sup> No presente trabalho verificou-se que todos os genótipos avaliados apresentaram nota total acima de 80 pontos, sendo classificados como especiais 'Premium' pela metodologia da SCA.<sup>30</sup> Além disso, foi verificado efeito significativo de genótipos para a nota total, e apesar do teste não ter sido capaz de agrupar as médias, os HT tendem a apresentar maiores valores. Diversos autores, considerando diferentes condições de cultivo, também relatam a superioridade<sup>1,12</sup> ou pelo menos similaridade<sup>4,33,34</sup> dos genótipos do grupo HT quanto à avaliação sensorial em comparação a cultivares tradicionalmente utilizadas, como Catuaí, ou referências em qualidade, como os Bourbons.<sup>2</sup> Isso demonstra que derivados de HT, comumente adotados como fonte de resistência a ferrugem, podem também contribuir no melhoramento de outros fenótipos de interesse, como a qualidade de bebida.

Uma forma de aprimorar a diferenciação de cafés especiais, principalmente daqueles com notas totais muito próximas, consiste em avaliar o equilíbrio entre as notas referentes a cada atributo que compõe sua qualidade

global. Assim, é possível identificar perfis sensoriais distintos evidenciados por estas características, os quais podem atender diferentes nichos de mercado.<sup>12</sup> Independentemente da adoção de controle genético ou químico, de acordo com o sensoriógrama apresentado, observa-se a superioridade, ou pelo menos similaridade, dos genótipos HT, em comparação aos Bourbons, considerando os atributos que apresentaram variação entre tratamentos (sabor, corpo e acidez, finalização e equilíbrio). Resultados semelhantes foram encontrados por Sobreira et al.,<sup>12</sup> que verificaram também para essas características, pelo menos igualdade entre genótipos HT não melhorados e Bourbons, bem como superioridade de cultivares derivadas de HT para esses quesitos, indicando que o melhoramento pode ainda, refinar a expressão de qualidade desses genótipos.

Não houve, por outro lado, efeito significativo da adoção ou não de controle químico ou da interação GxC nos atributos avaliados na análise sensorial, nota total ou porcentagem de grãos peneira 16 acima. Abraão<sup>11</sup> ao avaliar o efeito do uso de fungicidas no controle da ferrugem em cultivar de café suscetível, também não verificou diferença significativa na classificação física dos grãos por tamanho. Já Echeverria-Beirute et al.<sup>9</sup> constataram efeito significativo do uso de fungicida para controle da ferrugem nos atributos xícara limpa (-0.2 pontos) e impressão global (+0.3 pontos), mas ainda assim, todos os tratamentos apresentaram nota total acima de 82,46 pontos. Esses autores também identificaram diferença nas concentrações de quatro entre 154 compostos voláteis de grãos torrados, em função da adoção do controle químico. No presente trabalho, apesar da ausência de significância, todos os atributos da análise sensorial, a nota total e a classificação por tamanho (peneira 16+) foram aumentadas quando foi adotado o controle químico, exceto equilíbrio, que apresentou a mesma nota média nos dois tratamentos. Segundo Ribeyre e Avelino,<sup>13</sup> o uso de defensivos tende a reduzir defeitos físicos e a melhorar a qualidade organoléptica do café, já que reduz os danos causados por pragas e doenças na nutrição dos frutos e grãos e, conseqüentemente, na qualidade da bebida. Isso pode ser confirmado pelos resultados do presente trabalho, em que menor e maior teor médio de açúcares e compostos fenólicos, respectivamente, foram encontrados nos tratamentos sem controle químico, já que três, das quatro cultivares avaliadas, são suscetíveis, apresentando maior expressão média da doença que quando considerado os tratamentos com fungicida.

As estimativas de correlação dos caracteres avaliados nos grãos e na bebida do café com a expressão da ferrugem, auxiliam no entendimento das conseqüências da doença na qualidade do produto final quando se opta por adotar o controle genético ou químico. Quando se considera apenas o controle genético, ou seja, sem aplicação de fungicida, percebe-se danos mais diretos em componentes fundamentais da qualidade, como a integridade das membranas dos grãos (avaliada por meio da análise de condutividade elétrica), o teor de açúcares, e o tamanho do grão (peneira 16+). Isso porque, as plantas suscetíveis sofreram todos os prejuízos causados pela doença, sem ter seus danos amenizados por nenhum tipo de controle.

A condutividade elétrica é um indicativo de qualidade, pois representa a concentração de íons exsudados dos grãos, de forma que quanto menor esse valor, mais íntegras se encontram as membranas.<sup>48</sup> A degeneração das membranas e perda de controle da permeabilidade, causada por qualquer fator estressante, incluindo ataque de patógenos, é um dos primeiros eventos que caracterizam a deterioração do grão, provocando reações que alteram sua composição química e, conseqüentemente, suas propriedades sensoriais.<sup>25</sup> Isso explica a correlação positiva observada no presente trabalho, em que, quanto maior a incidência e severidade da ferrugem, maior a condutividade elétrica.

Como citado anteriormente, o acúmulo de açúcares nos grãos se relaciona com a intensidade do ataque pela ferrugem, a qual afeta a produção de fotoassimilados na planta. A correlação negativa da expressão da doença

com esses compostos, confirma os resultados observados anteriormente para efeito do genótipo, controle químico e interação GxC no teor de açúcares do grão. O suprimento de fotoassimilados também é um passo limitante para o crescimento de tecidos drenos, como frutos e grãos,<sup>36</sup> o que justifica a correlação negativa da incidência de ferrugem com a porcentagem de grãos peneira 16 acima.

Já nos tratamentos com controle químico, as correlações são observadas com características que, em um primeiro momento, não são tão evidentemente ligadas aos danos da doença, como o teor de lipídios, ácidos clorogênicos e a acidez da bebida. Isso provavelmente ocorre porque os prejuízos causados pela ferrugem foram amenizados em todos os genótipos pelo uso do fungicida. Quanto à correlação negativa com o teor de lipídios, sabe-se que a ocorrência de ferrugem desencadeia a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na planta, não restrita ao local de infecção,<sup>49</sup> e que níveis aumentados dessas EROs são capazes de reagir com biomoléculas, causando a peroxidação de lipídios e ruptura de membranas,<sup>50</sup> explicando os menores teores desses componentes nas plantas com maior expressão da doença. Além disso, a sacarose é um precursor da biossíntese de lipídios e proteínas,<sup>51</sup> de forma que a redução na produção de fotoassimilados pela maior expressão da ferrugem pode também refletir em menor teor de lipídios nos grãos.

Os ácidos clorogênicos são conhecidos por seu envolvimento na defesa das plantas contra estresses, incluindo ataque de patógenos, além de atuar na neutralização de EROs.<sup>52</sup> Isso implica que, em plantas com maiores teores desses compostos, há uma menor expressão da doença, justificando a correlação negativa encontrada.

Quanto à acidez da bebida, sabe-se que esta pode contribuir positiva ou negativamente para a qualidade sensorial, dependendo do ácido predominantemente encontrado na amostra.<sup>2</sup> Assim, a acidez considerada agradável contribui para a vivacidade do café, permitindo notar com clareza, a característica de doçura. Já quando é excessiva e causa sensação desagradável ('azedada'), esse atributo reflete um resultado negativo quanto a qualidade.<sup>30</sup> A correlação negativa da acidez com a severidade da doença pode indicar que, quando é adotado o controle químico da ferrugem, a maior severidade observada nos genótipos que respondem de forma menos eficiente a esse tipo de controle, pode favorecer a formação de ácidos indesejáveis ou reduzir a formação de ácidos desejáveis, o que tem como consequência a redução da nota atribuída a essa característica na análise sensorial. O estudo do perfil dos ácidos encontrados em amostras de café provenientes de plantas com diferentes níveis de ataque da doença, bem como sob diferentes formas de controle, deve ser realizado para confirmar essa hipótese.

São escassos na literatura trabalhos que relacionem a expressão da ferrugem do cafeeiro com a qualidade de bebida, principalmente considerando diferentes formas de controle. Echeverria-Beirute et al.<sup>9</sup> encontraram correlação negativa entre o atributo impressão global e a incidência e severidade da ferrugem ao avaliarem o efeito do controle químico da doença na qualidade da bebida, confirmando o resultado do presente trabalho sobre a possibilidade de existir influência da doença em atributos sensoriais.

No entanto, percebe-se que os componentes do grão cru sofrem maior ação direta da ferrugem que os atributos sensoriais. Sabe-se, por outro lado, que todos os compostos do grão têm participação no perfil sensorial após a torração, de forma que diversas associações entre esses fatores são citadas na literatura.<sup>2,6,53</sup> Assim, espera-se que a expressão da ferrugem, que influencia diretamente a composição do grão, tenha também influência indireta nos atributos de qualidade valorizados pelo mercado.

Destacando-se os compostos diretamente afetados pela ferrugem, é relatado que maiores teores de lipídios estão associados a melhores características sensoriais, por participarem formação de compostos aromáticos

importantes, além de auxiliarem na retenção de compostos voláteis no grão e do aroma da bebida, e contribuírem para a textura e sensação da bebida na boca,<sup>3,6,43</sup> o que confirma sua correlação positiva com sabor e nota total encontrada no presente trabalho e por Gichimu et al.<sup>53</sup>

Os ácidos clorogênicos são um grupo de compostos fenólicos que durante a torra, participa de reações, resultando no aumento do amargor, adstringência, sabor e aroma,<sup>3,24</sup> porém, pouco tem sido relatado sobre sua associação com o corpo da bebida. Neste trabalho, verificou-se correlação positiva entre esses caracteres, resultado também encontrado por Gichimu et al.,<sup>53</sup> os quais também observaram correlação negativa, dependendo do local de avaliação.

A condutividade elétrica, que representa a integridade das membranas dos grãos, se correlacionou com tamanho dos grãos, de forma que, quanto menor a porcentagem de grãos peneira 16 acima, maior a condutividade elétrica. Tanto o menor tamanho do grão, quanto a maior desorganização das membranas, são reflexos de situações de estresse enfrentadas durante o desenvolvimento do grão, conforme demonstrado anteriormente, o que justifica a associação negativa entre esses caracteres num contexto onde se considera a ocorrência de ferrugem.

Os açúcares são os compostos que têm influência sobre o maior número de atributos da análise sensorial, bem como também está relacionado ao tamanho dos grãos. Apesar de grãos maiores serem valorizados por seu aspecto visual, eles não necessariamente apresentam melhor qualidade sensorial,<sup>3</sup> porém, são indício de sua boa formação no campo, o que está relacionado com a menor ocorrência de ferrugem. Dal Molin et al.<sup>6</sup> também verificaram correlação positiva entre o tamanho do grão e sua concentração de açúcares. Existe também influência do teor de açúcares no corpo da bebida. Nunes e Coimbra<sup>54</sup> citam que os carboidratos presentes no grão de café cru contribuem significativamente para as características de corpo, corroborando a correlação encontrada no presente trabalho. O atributo equilíbrio, por sua vez, avalia como os aspectos de sabor, finalização, acidez e corpo da amostra interagem se complementando ou contrastando. Considerando que os açúcares são os principais contribuintes para a qualidade,<sup>2</sup> espera-se que um grão bem formado, com menor interferência de estresses durante seu desenvolvimento, produza bebidas mais equilibradas, justificando a correlação encontrada. Por fim, observa-se que o teor de açúcares se correlaciona positivamente com sabor. Gimase et al.<sup>34</sup> também encontraram correlação positiva entre teor de açúcares e sabor. Isso se explica, já que quanto maior a concentração de açúcares no grão cru, maior sua participação nas reações que ocorrem no processo de torração, no qual são formadas substâncias voláteis e não-voláteis responsáveis pelo aroma e sabor do café. Assim, o teor de açúcares é considerado um bom marcador para discriminar a qualidade da bebida.<sup>2</sup>

É relatado que o sabor é o atributo que mais se correlaciona com a nota total,<sup>7,12</sup> sendo um dos principais critérios para obtenção de ganhos em qualidade.<sup>12</sup> No presente trabalho, esse resultado também foi observado, independentemente de ser adotado o controle químico ou genético. Essa correlação se justifica, já que a nota atribuída ao sabor considera a intensidade, qualidade e complexidade da interação entre gosto e aroma, envolvendo todas as sensações do paladar.<sup>30</sup> O sabor caracteriza o que o café apresenta em seu potencial, e a complexidade da bebida é o principal diferencial de um café especial, de forma que, quanto mais raras e exóticas forem as sensações proporcionadas, maior será sua valorização comercial.<sup>1</sup> Considerando que o sabor é altamente influenciado pelo teor de açúcares, e este, por sua vez, está fortemente correlacionado com a expressão da ferrugem, faz-se necessário o estudo detalhado dos sabores percebidos no café, em função do controle da doença, bem como sua relação com a nota total.

Na descrição sensorial dos cafés, os juízes utilizam termos relativos às suas experiências anteriores para caracterizar as amostras. Apesar desses termos raramente serem avaliados metodologicamente,<sup>4,12</sup> as nuances detectadas nos cafés classificados como especiais podem representar a qualidade de uma forma mais específica.<sup>12</sup> Assim, deve-se explorar a sensibilidade olfativa e gustativa dos juízes, visando identificar com precisão, a singularidade das amostras, que podem ser destinadas a diferentes nichos de mercado. Com este objetivo, a análise de conteúdo pode complementar a atual escala por notas.<sup>12</sup>

Constatou-se que as notas ‘carameladas’ e ‘achocoladas’ aparecem em todas as combinações de tratamentos de genótipo e controle de ferrugem, porém, em diferentes níveis. As nuances de caramelo são esperadas nos cafés em geral, já que durante o processo de torração, uma das reações mais importantes é a caramelização dos açúcares, a qual confere aroma, sabor e cor ao café.<sup>55</sup> Fassio et al.<sup>4</sup> e Sobreira et al.<sup>12</sup> também encontraram notas carameladas e achocoladas na descrição de sabor de todos os genótipos e grupos genealógicos de café arábica avaliados, evidenciando que estes não são atributos raros.

Considerando os tratamentos avaliados no presente trabalho, foi observada maior variação de nuances e maiores notas totais nos HT, principalmente quando foi realizado o controle químico. Enquanto nos genótipos tradicionais foram percebidas notas de sabor comumente encontradas no mercado, nos genótipos HT identificou-se nuances mais complexas que não aparecem nos Bourbons, como amêndoas, melado, uva, papaia, melão e frutas tropicais. Esse resultado também foi encontrado por Sobreira et al.<sup>7</sup> ao comparar diferentes grupos genealógicos de café arábica. Consta-se então que, apesar da eficiência do controle genético no controle da doença, a anulação dos sintomas pela combinação do controle genético e químico pode ser recomendada em cultivos nobres, destinados a concursos de qualidade.

Percebe-se também, que as maiores notas totais, referentes aos HT, coincidem com os tratamentos que apresentam maior frequência de notas ‘frutadas’ associada à menor frequência de notas ‘achocoladas’. Sobreira et al.<sup>12</sup> verificaram que 70% das nuances percebidas em genótipos HT pertencem à categoria ‘frutados’, indicando ser uma característica inerente ao genótipo. Fassio et al.<sup>4</sup>, ao agrupar genótipos de café arábica pela pontuação total da análise sensorial, constataram que no grupo com as maiores pontuações existe maior frequência de nuances frutadas, sendo esta, uma característica importante para a classificação sensorial do café.

Além disso, observa-se que a adoção do controle químico favoreceu a nota total em todos os genótipos, porém, não mudou seu ranqueamento nos tratamentos com ou sem controle químico, evidenciando o potencial do grupo HT mesmo quando comparado a um grupo reconhecido por sua qualidade, como os Bourbons.

Os resultados aqui discutidos demonstram que os diversos aspectos da qualidade sensorial dependem do genótipo, manejo e interação desses fatores em um mesmo ambiente. Ou seja, apesar de tanto o controle genético quanto o químico, serem eficazes na redução dos prejuízos da doença quanto à composição química dos grãos, o potencial para qualidade dos genótipos HT associado à anulação da expressão da ferrugem por meio da ação conjunta do controle genético e químico, favorece a composição dos grãos e, conseqüentemente, a avaliação quantitativa dos atributos sensoriais, bem como as nuances percebidas, agregando valor ao produto final. Essa é mais uma característica que destaca esses genótipos, além de possuírem como vantagem a resistência à ferrugem, que mesmo quando quebrada pelo surgimento de novas raças, apresentam melhor resposta ao controle químico da doença, que genótipos totalmente suscetíveis.

## 5. CONCLUSÕES

Os controles genético e químico são eficazes na redução dos prejuízos da doença quanto à composição química dos grãos, principalmente em relação ao teor de açúcares totais.

Genótipos com ascendência resistente, mesmo que apresentem quebra de resistência, respondem melhor ao controle químico, refletindo positivamente na qualidade do grão e da bebida.

A nota atribuída ao sabor é a que mais se correlaciona com a nota total, e cafés com maior frequência de nuances ‘frutadas’ associadas à menor frequência de nuances ‘achocolatadas’, como os HT, apresentam melhor desempenho na análise sensorial, independentemente do uso de controle químico.

A anulação da expressão da ferrugem pela combinação do controle genético e químico favorece o teor de açúcares nos grãos, bem como a nota total e riqueza de sabores percebidos na análise sensorial.

## ABREVIACÕES USADAS

HT, Híbrido de Timor; GxC, interação genótipos por controle; EROs, espécies reativas de oxigênio; %MS: porcentagem de massa seca; SCA, Associação de Cafés Especiais; ACC, ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à EPAMIG pela disponibilização da infraestrutura e equipamentos, ao CNPq pelas bolsas de produtividade (CARVALHO, G.R.) e doutorado (PEREIRA, D.R.) e pelo apoio financeiro (número de concessão 425088/2018-9), ao INCT Café pela bolsa desenvolvimento tecnológico Industrial do CNPq (NADALETI, D. H. S.) e à Fapemig e Consórcio Pesquisa Café, pelo apoio financeiro ao projeto.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

## REFERÊNCIAS

- (1) Barbosa, I. de P.; Oliveira, A. C. B. de; Rosado, R. D. S.; Sakiyama, N. S.; Cruz, C. D.; Pereira, A. A. Sensory Quality of *Coffea Arabica* L. Genotypes Influenced by Postharvest Processing. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* **2019**, *19* (4), 428–435. <https://doi.org/10.1590/1984-70332019v19n4a60>.
- (2) Borém, F. M.; Figueiredo, L. P.; Ribeiro, F. C.; Taveira, J. H. S.; Giomo, G. S.; Salva, T. J. G. The Relationship between Organic Acids, Sucrose and the Quality of Specialty Coffees. *Afr. J. Agric. Res.* **2016**, *11* (8), 709–717. <https://doi.org/10.5897/AJAR2015.10569>.
- (3) Cheng, B.; Furtado, A.; Smyth, H. E.; Henry, R. J. Influence of Genotype and Environment on Coffee Quality. *Trends in Food Science & Technology* **2016**, *57*, 20–30. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.003>.
- (4) Fassio, L. D. O.; Pereira, R. G. F. A.; Malta, M. R.; Liska, G. R.; Sousa, M. M. M.; Carvalho, G. R.; Pereira, A. A. SENSORY PROFILE OF ARABICA COFFEE ACCESSES OF THE GERMPLASM COLLECTION OF MINAS GERAIS – BRAZIL. *C.Sci.* **2019**, *14* (3), 382. <https://doi.org/10.25186/cs.v14i3.1597>.
- (5) Lingle, T. R. *The Coffee Cupper's Handbook: A Systematic Guide to the Sensory Evaluation of Coffee's Flavor*, 4th.ed.; Handbook series; Speciality Coffee Association of America: Long Beach, Calif, 2011.
- (6) Dal Molin, R. N., Scholz, M. B. S., Scarmínio, I. S., Andreotti, M., Braga, G. C., Oliveira, M. C., Silva, R. S. S. F., Guyot, B., Ribeyre, F., Davrieux, F. Composição química do café produzido nas condições topoclimáticas de jesuitas, paraná. Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, **2007**, Águas de Lindóia – SP, Brazil, 2007. URL ([http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb\\_anais/simposio5/p275.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio5/p275.pdf)) (May 21, 2020).

- (7) Sobreira, F. M., Oliveira, A. C. B., Pereira, A. A., Sakiyama, N. S. Potential of Híbrido de Timor germplasm and its derived progênies for coffee quality improvement. *Aust. J. Crop Sci.* **2015a**, (9), 289-295. URL ([https://www.researchgate.net/publication/275521765\\_Potential\\_of\\_Hibrido\\_de\\_Timor\\_germplasm\\_and\\_its\\_derived\\_progenies\\_for\\_coffee\\_quality\\_improvement](https://www.researchgate.net/publication/275521765_Potential_of_Hibrido_de_Timor_germplasm_and_its_derived_progenies_for_coffee_quality_improvement)) (May 21, 2020).
- (8) Malta, M. R.; Fassio, L. de O.; Liska, G. R.; Carvalho, G. R.; Pereira, A. A.; Botelho, C. E.; Ferraz, V. P.; Silva, A. D.; Pedrosa, A. W.; Alvaro, L. N.; Pereira, R. G. F. A. Discrimination of Genotypes Coffee by Chemical Composition of the Beans: Potential Markers in Natural Coffees. *Food Research International* **2020**, *134*, 109219. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109219>.
- (9) Echeverria-Beirute, F.; Murray, S. C.; Klein, P.; Kerth, C.; Miller, R.; Bertrand, B. Rust and Thinning Management Effect on Cup Quality and Plant Performance for Two Cultivars of *Coffea Arabica* L. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66* (21), 5281–5292. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03180>.
- (10) Mendonça, L. M. V. L.; Pereira, R. G. F. A.; Mendes, A. N. G.; Borém, F. M.; Marques, E. R. Composição Química de Grãos Crus de Cultivares de *Coffea Arabica* L. Suscetíveis e Resistentes à Hemileia Vastatrix Berg et Br. *Ciênc. agrotec.* **2007**, *31* (2), 413–419. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000200022>.
- (11) Abraão, A. A. Influência de diferentes métodos de controle de doenças fúngicas do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) na qualidade dos grãos. Dissertação (Mestrado), Programa de Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, 75 p., **2006**, Brazil. URL ([http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/2655/2/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Influ%C3%Aancia%20de%20diferentes%20m%C3%A9todos%20de%20controle%20de%20doen%C3%A7as%20f%C3%Bngicas%20o%20cafeeiro.pdf](http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/2655/2/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Influ%C3%Aancia%20de%20diferentes%20m%C3%A9todos%20de%20controle%20de%20doen%C3%A7as%20f%C3%Bngicas%20o%20cafeeiro.pdf)) (May 21, 2020).
- (12) Sobreira, F. M., Oliveira, A. C. B., Pereira, A. A., Sobreira, M. F. C., Sakiyama, N. S. Sensory quality of arabica coffee (*Coffea arabica*) genealogic groups using the sensogram and content analysis. *Aust. J. Crop Sci.* **2015b** (9), 486-493. URL ([https://www.researchgate.net/publication/278024585\\_Sensory\\_quality\\_of\\_arabica\\_coffee\\_Coffea\\_arabica\\_genealogic\\_groups\\_using\\_the\\_sensogram\\_and\\_content\\_analysis](https://www.researchgate.net/publication/278024585_Sensory_quality_of_arabica_coffee_Coffea_arabica_genealogic_groups_using_the_sensogram_and_content_analysis)) (May 21, 2020).
- (13) Ribeyre, F.; Avelino, J. Impact of field pests and diseases on coffee quality. In *Specialty coffee : managing quality*. Oberthür, T., Läderach, P., Cock, J. H., Eds. Publisher: IPNI, Southeast Asia, **2012**, pp. 151-176.
- (14) Carvalho, A. M.; Cardoso, D. A.; Carvalho, G. R.; Carvalho, V. L.; Pereira, A. A.; Ferreira, A. D.; Carneiro, L. F. Comportamento de Cultivares de Cafeeiro Sob a Incidência Das Doenças Da Ferrugem e Cercosporiose Em Dois Ambientes de Cultivo. *C.Sci.* **2017**, *12* (1), 100. <https://doi.org/10.25186/cs.v12i1.1248>.
- (15) Geoinfo. 2004. Mapa de solos do estado de Minas Gerais. URL ([http://geoinfo.cnps.embrapa.br/layers/geonode%3Alev\\_mg\\_estado\\_solos\\_lat\\_long\\_wgs84\\_vt#category-more](http://geoinfo.cnps.embrapa.br/layers/geonode%3Alev_mg_estado_solos_lat_long_wgs84_vt#category-more)) (May 21, 2020).
- (16) Martins, F. B.; Gonzaga, G.; Dos Santos, D. F.; Reboita, M. S. Classificação climática de köppen e de thornthwaite para minas gerais: cenário atual e projeções futuras. *ABClima* **2018**, *1*. <https://doi.org/10.5380/abclima.v1i0.60896>.
- (17) Capucho, A. S.; Zambolim, L.; Duarte, H. S. S.; Vaz, G. R. O. Development and Validation of a Standard Area Diagram Set to Estimate Severity of Leaf Rust in *Coffea Arabica* and *C. Canephora*: Estimation of Coffee Leaf Rust Severity. *Plant Pathology* **2011**, *60* (6), 1144–1150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02472.x>.
- (18) Borém, F. M.; Isquierdo, E. P.; Taveira, J. H. S. Coffee drying. In *Handbook of coffee post-harvest technology*; Borém, F. M. Eds.; Norcross: Gin Press, **2014**. 49-68.
- (19) Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 8, de 11 de junho de 2003. República Federativa do Brasil, Brasília, **2003**, Brazil. URL ([http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/legislacao/Instrucao\\_Normativa\\_n\\_8.pdf](http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/legislacao/Instrucao_Normativa_n_8.pdf)) (May 21, 2020).
- (20) Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regras para análise de sementes. Brasília: CLAV/DNDV/SAND/MA, **2009**. 398p, Brazil. URL ([https://www.abrates.org.br/files/regras\\_analise\\_de\\_sementes.pdf](https://www.abrates.org.br/files/regras_analise_de_sementes.pdf)) (May 21, 2020).
- (21) Food Composition, Additives, Natural Contaminants, 17th ed.; Association of Official Analytical Chemists, Horwitz, W., Eds.; Official methods of analysis of AOAC International; AOAC International: Arlington, Va, **2000**.
- (22) Dische, Z. General color reactions. In *Carbohydrate chemistry*, Whistler, R.L., Wolfram, M. L., Eds.; New York: Academic Press, **1962**, 512p.
- (23) Vitorino, M. D., França, A. S., Oliveira, L. S. Metodologia de obtenção de extrato de café visando a dosagem de compostos não voláteis, *Rev. Bras. Armaz. Esp. Café*, 2001, *26* (3), 17-24.
- (24) Malta, M. R.; Chagas, S. J. D. R. Avaliação de Compostos Não-Voláteis Em Diferentes Cultivares de Cafeeiro Produzidas Na Região Sul de Minas Gerais. *Acta Sci. Agron.* **2009**, *31* (1), 57–61. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v31i1.6629>.
- (25) Malta, M. R.; Pereira, R. G. F. A.; Chagas, S. J. de R. Condutividade Elétrica e Lixiviação de Potássio Do Exsudato de Grãos de Café: Alguns Fatores Que Podem Influenciar Essas Avaliações. *Ciênc. agrotec.* **2005**, *29*

- (5), 1015–1020. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542005000500015>.
- (26) Prete, C. E. C. Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 125 p. **1992**. Brazil. URL (<http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/392/101376f.pdf?sequence=1&isAllowed=y>) (May 21, 2020).
- (27) Draetta, I.S.; Lima, D.C. Isolamento e caracterização das polifenoloxidasas do café. Coletâneas do Instituto de Tecnologia de Alimentos; Brazil **1976**; 7, 13-28.
- (28) Ponting, J. D.; Joslyn, M. A. Ascorbic Acid Oxidation and Browning in Apple Tissue Extracts. *Arch Biochem* **1948**, 19 (1), 47–63.
- (29) Carvalho, V. D. De; Chagas, S. J. De R.; Botrel, N.; Juste Júnior, E. S. G. Relação entre a composição físico-química e química do grão beneficiado e a qualidade da bebida do café. *Pesq Agropec Bras* **1994**, 29(3), 449-454.
- (30) SCA - Specialty Coffee Association of America. URL (<https://sca.coffee/research/protocols-best-practices/>) (May 21, 2020).
- (31) Cruz, C. D. Genes Software – Extended and Integrated with the R, Matlab and Selegen. *Acta Sci. Agron.* **2016**, 38 (4), 547. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i3.32629>.
- (32) Scott, A. J.; Knott, M. A Cluster Analysis Method for Grouping Means in the Analysis of Variance. *Biometrics* **1974**, 30 (3), 507. <https://doi.org/10.2307/2529204>.
- (33) Bertrand, B.; Vaast, P.; Alpizar, E.; Etienne, H.; Davrieux, F.; Charmetant, P. Comparison of Bean Biochemical Composition and Beverage Quality of Arabica Hybrids Involving Sudanese-Ethiopian Origins with Traditional Varieties at Various Elevations in Central America. *Tree Physiology* **2006**, 26 (9), 1239–1248. <https://doi.org/10.1093/treephys/26.9.1239>.
- (34) Gimase, J. M.; Thagana, W. M.; Kirubi, D. T.; Gichuru, E. K.; Kathurima, C. W. Beverage Quality and Biochemical Attributes of Arabusta Coffee (C. Arabica L. x C. Canephora Pierre) and Their Parental Genotypes. *Afr. J. Food Sci.* **2014**, 8 (9), 456–464. <https://doi.org/10.5897/AJFS2014.1132>.
- (35) Ribeiro, D. E.; Borém, F. M.; Cirillo, M. A.; Prado, M. V. B.; Ferraz, V. P.; Alves, H. M. R.; Taveira, J. H. S. Interaction of Genotype, Environment and Processing in the Chemical Composition Expression and Sensorial Quality of Arabica Coffee. *Afr. J. Agric. Res.* **2016**, 11 (27), 2412–2422. <https://doi.org/10.5897/AJAR2016.10832>.
- (36) Geromel, C. Metabolismo da sacarose em frutos de café. Tese de Doutorado, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 101 p., **2006**, Brazil. URL ([http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/315479/1/Geromel\\_Clara\\_D.pdf](http://repositorio.unicamp.br/jspui/bitstream/REPOSIP/315479/1/Geromel_Clara_D.pdf)) (May 21, 2020).
- (37) Salgado, P. R.; Favarin, J. L.; Leandro, R. A.; Lima Filho, O. F. de. Total Phenol Concentrations in Coffee Tree Leaves during Fruit Development. *Sci. agric. (Piracicaba, Braz.)* **2008**, 65 (4), 354–359. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162008000400005>.
- (38) Kitzberger, C. S. G.; Scholz, M. B. dos S.; Benassi, M. de T. Bioactive Compounds Content in Roasted Coffee from Traditional and Modern *Coffea Arabica* Cultivars Grown under the Same Edapho-Climatic Conditions. *Food Research International* **2014**, 61, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.031>.
- (39) Green, P. W. C.; Davis, A. P.; Cossé, A. A.; Vega, F. E. Can Coffee Chemical Compounds and Insecticidal Plants Be Harnessed for Control of Major Coffee Pests? *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63 (43), 9427–9434. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03914>.
- (40) Dessalegn, Y.; Labuscagne, M. T.; Osthoff, G.; Herselman, L. Variation of Green Bean Caffeine, Chlorogenic Acid, Sucrose and Trigolline Contents among Ethiopian *Arabica Coffee* Accessories. *SEJS* **2008**, 30 (1), 77–82. <https://doi.org/10.4314/sinet.v30i1.18286>.
- (41) Kitzberger, C. S. G.; Scholz, M. B. dos S.; Pereira, L. F. P.; Benassi, M. de T. Composição Química de Cafés Árabica de Cultivares Tradicionais e Modernas. *Pesq. agropec. bras.* **2013**, 48 (11), 1498–1506. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2013001100011>.
- (42) Mazzafera, P. Chemical Composition of Defective Coffee Beans. *Food Chemistry* **1999**, 64 (4), 547–554. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(98\)00167-8](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(98)00167-8).
- (43) Scholz, M. B. S., Figueiredo, V. R. G., Silva, J. V. N., Kitzberger, C. S. G. Características físico-químicas de grãos verdes e torrados de cultivares de café (*Coffea arabica* L.) do IAPAR. *Coffee Sci.* **2011**, 6(3), 245-255. <https://doi.org/10.25186/cs.v6i3.298>
- (44) Vieira Júnior, J. R., Fernandes, C. F., Rodrigues, V. G. S., Bentes-Gama, M. M., Silva, D. S. G., Fernandes, S. R., Diocleciano, J. M. Avaliação da severidade da ferrugem (*Hemileia vastatrix*) em cafeeiros (*Coffea canephora*) cultivados em condições de sombreamento. Circular Técnica ISSN 0103-9334, 4 p. **2008**. URL ([http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/9200/circular\\_tecnica\\_103.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/9200/circular_tecnica_103.pdf?sequence=1&isAllowed=y)) (May 21, 2020).

- (45) Rademacher, W. G. ROWTH RETARDANTS : Effects on Gibberellin Biosynthesis and Other Metabolic Pathways. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **2000**, 51 (1), 501–531. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.51.1.501>.
- (46) Herzog, T. T.; E Silva, B. S. O.; Da Silva, M. B.; Partelli, F. L.; De Souza, A. F. Efeito de fungicidas no cafeeiro conilon. *NAT* **2018**, 6 (5), 435. <https://doi.org/10.31413/nativa.v6i5.5664>.
- (47) Silva, M. do C.; Várzea, V.; Guerra-Guimarães, L.; Azinheira, H. G.; Fernandez, D.; Petitot, A.-S.; Bertrand, B.; Lashermes, P.; Nicole, M. Coffee Resistance to the Main Diseases: Leaf Rust and Coffee Berry Disease. *Braz. J. Plant Physiol.* **2006**, 18 (1), 119–147. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100010>.
- (48) Borém, F. M.; Reinato, C. H. R.; Chagas, S. J. R.; Oliveira, E. C.; Silva, P. J. Características química e físico-química do café (*Coffea arabica* L.) secado em diferentes pavimentações e espessuras de camadas. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, **2007**, Águas de Lindóia – SP, Brazil. URL ([http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2452/179995\\_Art130f.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://www.sbicafe.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2452/179995_Art130f.pdf?sequence=1&isAllowed=y)) (May 21, 2020).
- (49) Resende, M. L. V.; Salgado, S. M. L.; Chaves, Z. M. Espécies Ativas de Oxigênio Na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. *Fitopatol. bras.* **2003**, 28 (2), 123–130. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582003000200001>.
- (50) Monteiro, A. C. A.; de Resende, M. L. V.; Valente, T. C. T.; Ribeiro Junior, P. M.; Pereira, V. F.; da Costa, J. R.; da Silva, J. A. G. Manganese Phosphite in Coffee Defence against *Hemileia Vastatrix*, the Coffee Rust Fungus: Biochemical and Molecular Analyses. *J Phytopathol* **2016**, 164 (11–12), 1043–1053. <https://doi.org/10.1111/jph.12525>.
- (51) Ruan, Y.-L. Sucrose Metabolism: Gateway to Diverse Carbon Use and Sugar Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2014**, 65 (1), 33–67. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040251>.
- (52) Abrahão, S. A.; Pereira, R. G. F. A.; Duarte, S. M. da S.; Lima, A. R.; Alvarenga, D. J.; Ferreira, E. B. Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante Do Café (*Coffea Arabica* L.). *Ciênc. agrotec.* **2010**, 34 (2), 414–420. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542010000200020>.
- (53) Gichimu, B. M.; Gichuru, E. K.; Mamati, G. E.; Nyende, A. B. Biochemical Composition Within *Coffea Arabica* Cv. Ruiru 11 and Its Relationship With Cup Quality. *JFR* **2014**, 3 (3), 31. <https://doi.org/10.5539/jfr.v3n3p31>.
- (54) Nunes, F. M.; Coimbra, M. A. Influence of Polysaccharide Composition in Foam Stability of Espresso Coffee. *Carbohydrate Polymers* **1998**, 37 (3), 283–285. [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(98\)00072-1](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(98)00072-1).
- (55) Illy, A.; Viani, R. *Espresso Coffee: The Science of Quality*; Elsevier Academic: Amsterdam; Boston, 2005.