



Hinc patriam sustinet

**Instituto Superior de Agronomia
Universidade Técnica de Lisboa**

Determinação do salicilato de metilo como composto envolvido nos processos de sinalização/defesa do cafeeiro à ferrugem alaranjada – *Hemileia vastatrix*



Alexandra Sofia Matias Duarte António

**Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica**

Orientadora: Doutora Maria Helena Guimarães de Almeida

Co-Orientadoras: Doutora Leonor C.E. Guerra Guimarães e Doutora Maria do Rosário Bronze

Júri:

Presidente: Doutor Bernardo Manuel Teles de Sousa Pacheco de Carvalho, Professor Associado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais: Doutora Maria do Rosário Beja Figueiredo Gonzaga Bronze, Professora Auxiliar da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Doutora Maria Helena Guimarães de Almeida, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa

Doutora Leonor de Castro Esteves Guerra Guimarães, Investigadora Auxiliar do Instituto de Investigação Científica Tropical

Lisboa, 2009

Agradecimentos

Agradeço às seguintes pessoas que contribuíram para a realização deste trabalho:

- Professora Maria Helena Almeida do Instituto Superior de Agronomia pelo seu entusiasmo e apoio;
- Doutora Leonor Guimarães pela sua determinação perante os problemas deparados durante o estudo da ferrugem do cafeeiro;
- Doutora Maria do Céu Silva, responsável pelo Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro, pelo apoio nos estudos citológicos;
- Professora Doutora Maria do Rosário Bronze e professor Doutor Luís Vilas Boas do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica pela orientação nos estudos analíticos de determinação do salicilato de metilo;
- Doutora Cláudia Antunes do Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica, o meu reconhecido agradecimento pelo apoio na análise por cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa;

Resumo

O salicilato de metilo tem sido referido como sendo um composto importante na sinalização das respostas de defesa de várias plantas aos agentes patogénicos. Este trabalho teve como objectivo o estudo do método de determinação do salicilato de metilo por Microextração em Fase Sólida (SPME) e Cromatografia Gás-Líquido acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) em folhas de *Coffea arabica* sãs e infectadas com a ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*).

A primeira parte do trabalho consistiu no estudo do processo de infecção do fungo, ao microscópio óptico, o que permitiu identificar as diferentes fases de diferenciação de *H. vastatrix*, pré- e pós-penetração no interior dos tecidos foliares.

Após implementação do método de análise, que envolveu o estudo da metodologia de preparação das amostras e a optimização das condições de extração e cromatográficas, efectuaram-se alguns testes com vista à sua validação.

O método foi, finalmente, aplicado à quantificação do salicilato de metilo em diferentes amostras de folhas de *C. arabica* das variedades Caturra e S4 Agaro (jovens e adultas, sãs e inoculadas).

Discute-se as dificuldades de utilização do método de determinação do salicilato de metilo por SPME-GC-MS na análise das folhas do cafeeiro, nomeadamente na estabilização das amostras (matriz complexa).

Palavras-chave: *Coffea arabica*; cromatografia gás-líquido/espectrometria de massa; *Hemileia vastatrix*; salicilato de metilo; microextração em fase sólida;

Abstract

The methyl salicylate has been refer as being an important compound in the signalling of the defense plants to the pathogen agents.

The objective of this reactors work is to study the method of determination of the methyl salicylate, by solid-phase microextraction and gas chromatography coupled to mass spectrometry, in *Coffea arabica* healthy leaves and infected with the orange rust (*Hemileia vastatrix*).

The first part of the work consisted in the study of infection process of the fungus, der optical microscope, which allowed to identify the different phases of differentiation of *H. vastatrix*, before and after penetrations in foliaceous tissue.

After implementation method of analysis, which included the study of methodologies for preparation of the samples and optimization of the conditions for extraction and chromatographic separation, some test took place with the aim of its validation.

The method was, finally applied to the quantification of the methyl salicylate in different samples of leaves of *C. arabica* Caturra and S4 Agaro (young and adult, healthy and inoculated).

We discussed the difficulties on the method of methyl salicylate determination by SPME-GC-MS in *C. arabica* leaves, concerning to the stability of the samples (complex matrix).

Keywords: *Coffea arabica*; gas chromatography – mass spectrometry; *Hemileia vastatrix*; methyl salicylate; solid phase microextraction;

Extended abstract

During evolution, plants have developed a multitude of defence mechanisms against adverse biotic and abiotic impacts. To overcome the fact of being sessile organisms, plants use volatile compounds as signals for long-distance interactions. Airborne volatile methyl salicylate (MeSA), corresponding to non-volatile endogenous molecule salicylic acid, is produced by plants such as cucumber, tobacco and tomato. MeSA might function as an airborne signal involved in the inter- and intra-communication during plant pathogen infection.

The first part of the work was the study of the coffee rust (*Hemileia vastatrix*) infection process, in compatible and incompatible *Coffea arabica*- *H. vastatrix* interactions. The different stages of the coffee rust differentiation, pre- and post-penetration inside the leaf tissues, were observed using a light microscope.

In this work solid-phase microextraction (SPME) was used as sample preparation technique for subsequent analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of MeSA in *C. arabica* leaves, healthy and inoculated with coffee rust.

The determination of MeSA by SPME-GC-MS was optimized and some parameters were validated. The quantification of MeSA by SPME-GC-MS was assayed in young (healthy and inoculated) and old leaves of two different *C. arabica* varieties (Caturra and S4 Agaro). From chromatographic analysis, it was possible to confirm the presence of MeSA in all the samples studied, particularly in young leaves. Although GC-MS-SPME methodology for MeSA quantification seems suitable, some problems found concerning sample stabilization need to be solved for subsequent analysis.

This work was performed in the context of the project "An interdisciplinary approach to characterize sources of potential durable resistance in coffee (*Coffea* spp.) to orange rust (*Hemileia vastatrix*)" (PTDC/AGR-AAM/71866/2006) and related with task 4. Evaluation of the levels of salicylic acid (SA) and jasmonates (JAs) in host and nonhost plants.

Índice geral

Capítulo I	Pág.
Introdução Geral.....	1
1. O Cafeeiro.....	2
1.1. A origem e distribuição geográfica da espécie <i>Coffea arabica</i> L.....	2
1.2. Classificação sistemática da espécie <i>Coffea arabica</i> L.....	2
1.3. <i>Coffea arabica</i> vs <i>Coffea canephora</i>	3
1.4. Produção mundial do café e principais países produtores.....	4
2. A Ferrugem Alaranjada – <i>Hemileia vastatrix</i>	5
2.1. Origem e distribuição geográfica.....	5
2.2. Importância económica da ferrugem alaranjada.....	5
2.3. Classificação sistemática.....	6
2.4. Sintomatologia.....	6
2.5. Ciclo de vida.....	6
2.6. Processo de infecção.....	7
2.7. Meios de luta.....	8
3. Interação cafeeiro – ferrugem alaranjada.....	9
3.1. Raças fisiológicas de <i>H. vastatrix</i>	10
3.2. Grupos fisiológicos de <i>Coffea</i> spp.....	11
3.3. Hereditariedade da resistência à <i>H. vastatrix</i> em <i>Coffea</i> spp.....	11
4. Consideração geral sobre as interações planta – agente patogénico.....	13
4.1. Compostos sinalizadores – Ácido salicílico.....	14
4.2. Interação cafeeiro – ferrugem alaranjada.....	16
5. Determinação do salicilato de metilo.....	17
5.1. A microextração em fase sólida.....	17
5.2. Cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).....	18
5.2.1. Breve descrição do sistema.....	18
5.2.2. Identificação e quantificação dos compostos.....	22
5.2.2.1. Método do padrão externo.....	23
5.2.2.2. Método do padrão interno.....	23
5.2.3. Validação do método.....	23

Capítulo II

Parte Experimental.....	26
1. Material e Métodos.....	27
1.1. Material biológico.....	27
1.1.1. Cafeeiros.....	27
1.1.2. Ferrugem alaranjada.....	27
1.1.3. Inoculação dos cafeeiros e tipos de reacção.....	28
1.2. Preparação dos tecidos para observação ao microscópio óptico.....	28
1.2.1. Germinação de uredósporos e formação de apressórios <i>in vivo</i>	28
1.2.2. Processo de colonização do fungo.....	29
1.3. Determinação do salicilato de metilopor SPME-GC-MS.....	29
1.3.1. Preparação das amostras a partir de tecido fresco.....	29
1.3.2. Equipamentos e reagentes.....	30
1.3.2.1. Equipamento e utensílios.....	30
1.3.2.2. Reagentes.....	30
1.3.3. Procedimento experimental.....	30
1.3.3.1. Preparação das soluções dos padrões externo (salicilato de metilo) e interno (salicilato de etilo).....	30
1.3.3.2. Microextracção em fase sólida (SPME).....	30
1.3.3.2.1. Optimização das condições de extracção.....	30
1.3.3.2.2. Condições de extracção adoptadas.....	31
1.3.3.3. Análise por cromatografia gás-líquido acoplado à espectrometria de massa (GC-MS).....	31
1.3.3.3.1. Condições cromatográficas.....	31
1.3.3.3.2. Condições de espectrometria de massa.....	31
1.3.3.4. Análise quantitativa das amostras.....	31
1.3.4. Validação do método.....	32
1.3.5. Tratamento dos resultados.....	32
2. Resultados e Discussão.....	33
2.1. Processo de infecção.....	33
2.2. Determinação do salicilato de metilo.....	35
2.2.1. Identificação do MeSA e do EtSA.....	35

2.2.2. Escolha do modo de injeção a utilizar nos ensaios de optimização.....	38
2.2.3. Optimização das condições de SPME.....	39
2.2.3.1. Temperatura de extracção.....	39
2.2.3.2. Tempo de extracção.....	40
2.2.3.3. Volume do <i>vial</i>	41
2.2.4. Validação do método.....	42
2.2.4.1. Especificidade.....	42
2.2.4.2. Limite de detecção.....	42
2.2.4.3. Linearidade da curva de calibração.....	43
2.2.4.3.1. Método do padrão externo.....	43
2.2.4.3.2. Método do padrão interno.....	44
2.2.4.4. Repetibilidade.....	45
2.2.4.4.1. Método do padrão externo.....	45
2.2.4.4.2. Método do padrão interno.....	46
2.2.4.5. Exactidão.....	47
2.2.4.5.1. Método do padrão externo.....	47
2.2.5. Quantificação do salicilato de metilo em folhas de <i>C. arabica</i>	48
2.2.5.1. Estudo da metodologia de preparação das amostras.....	48
2.2.5.2. Efeito da variedade e da idade da folha.....	48
2.2.5.3. Quantificação do MeSA ao longo do processo de infecção por <i>H. vastatrix</i>	49
3. Conclusões.....	51
4. Bibliografia.....	52
5. Anexos.....	62

Lista de figuras

Figura 1. Produção mundial de café (2002 – 2007).....	4
Figura 2. Principais países produtores de café (2005 – 2007).....	4
Figura 3. Ciclo de vida da ferrugem alaranjada.....	7
Figura 4. Primeiras fases do processo de infecção de <i>Hemileia vastatrix</i>	8
Figura 5. Coleção de <i>Hemileia vastatrix</i> no CIFC.....	10
Figura 6. Esquema geral dos mecanismos de transmissão de sinal como resposta da planta ao ataque de patógenos.....	15
Figura 7. Componentes básicos de um sistema cromatográfico gás - líquido.....	19
Figura 8. Componentes básicos dum espectrómetro de massa.....	21
Figura 9. Uredósforo germinado com apressório formado 24 horas após a inoculação.....	33
Figura 10. Apressório vazio com hifa de penetração 24 horas após a inoculação.....	34
Figura 11. Fase de âncora 24 horas após a inoculação.....	34
Figura 12. Haustório na célula subsidiária do estoma 48 horas após a inoculação.....	34
Figura 13. Hifas intercelulares, haustórios e formação de soros uredospóricos 21 dias após a inoculação.....	34
Figura 14. Tipos de reacção observados nas interacções <i>C. arabica</i> – <i>H. vastatrix</i> de acordo com a escala de classificação qualitativa de D'Oliveira (1954 -57).....	35
Figura 15. Cromatograma do padrão salicilato de metilo (padrão externo).....	36
Figura 16. Espectro de massas obtido com o padrão salicilato de metilo.....	36
Figura 17. Cromatograma do salicilato de etilo (padrão interno).....	37
Figura 18. Espectro de massas obtido com o padrão salicilato de etilo.....	37
Figura 19. Cromatograma do padrão MeSA injectado no modo <i>split</i> 1:5.....	38
Figura 20. Cromatograma do padrão MeSA injectado no modo <i>splitless</i>	38
Figura 21. Efeito da temperatura na área do pico ($m/z = 120$) obtido na análise de uma solução padrão MeSA a 1 ppb.....	39
Figura 22. Efeito da temperatura na área do pico ($m/z = 120$) obtido na análise de amostras de folhas de <i>C. arabica</i> S4 Agaro fortificadas com solução padrão MeSA a 50 ppb.....	39
Figura 23. Efeito do tempo de extracção na área do pico ($m/z = 120$) do padrão de MeSA a 1 ppb.....	40
Figura 24. Efeito do tempo de extracção na área do pico ($m/z = 120$) das amostras <i>C. arabica</i> S4 Agaro fortificadas com 50 ppb de MeSA.....	40
Figura 25. Cromatograma do padrão de MeSA com um <i>vial</i> de 10 ml.....	41
Figura 26. Cromatograma do padrão de MeSA com um <i>vial</i> de 20 ml.....	41
Figura 27. Cromatograma da matriz da amostra <i>C. arabica</i> Caturra fortificada com os padrões MeSA e EtSA a 800 ppb.....	42

Figura 28. Cromatograma com o limite de detecção do padrão de MeSA (50 ppt) para a massa de aquisição 120 <i>m/z</i>	43
Figura 29. Cromatograma com o limite de detecção do padrão de MeSA (100 ppt) para a massa aquisição 120 <i>m/z</i>	43
Figura 30. Área correspondente ao pico do MeSA (<i>m/z</i> = 120) presente nas folhas jovens e adultas de plantas das variedades <i>C. arabica</i> S4 Agaro e <i>C. arabica</i> Caturra.....	49
Figura 31. Detecção da massa 120 <i>m/z</i> do salicilato de metilo nas amostras de <i>C. arabica</i> S4 Agaro inoculadas e controlo.....	50

Lista de quadros

Quadro 1. Escala dos tipos de reacção dos cafeeiros à <i>Hemileia vastatrix</i> adoptado no CIFC.....	9
Quadro 2. Origem, grupo fisiológico e genótipos dos cafeeiros <i>C. arabica</i> L. estudados.....	27
Quadro 3. Origem, raça fisiológica e genes de virulência de cada um dos isolados de <i>H. vastatrix</i> usados.....	27
Quadro 4. Tipos de reacção da variedade <i>C. arabica</i> S4 Agaro, 21 dias após a inoculação com os diferentes isolados da ferrugem.....	28
Quadro 5. Curva de calibração de salicilato de metilo (<i>m/z</i> 65, 92, 120, 152).....	44
Quadro 6. Curva de calibração de salicilato de metilo (<i>m/z</i> 65, 92, 120, 152).....	44
Quadro 7. Curva de calibração de salicilato de metilo em amostras de <i>C. arabica</i> Caturra (<i>m/z</i> 65, 92, 120, 152).....	44
Quadro 8. Curvas de calibração de salicilato de metilo (<i>m/z</i> 65, 92, 120, 152) utilizando o salicilato de etilo (<i>m/z</i> 166) como padrão interno.....	45
Quadro 9. Curva de calibração de salicilato de metilo em amostras de <i>C. arabica</i> Caturra (<i>m/z</i> 65, 92, 120, 152) utilizando o salicilato de etilo (<i>m/z</i> 166) como padrão interno.....	45
Quadro 10. Repetibilidade com soluções de padrão MeSA.....	46
Quadro 11. Repetibilidade em amostras fortificadas.....	46
Quadro 12. Repetibilidade com soluções de padrão de MeSA e EtSA.....	47
Quadro 13. Repetibilidade com amostras fortificadas.....	47
Quadro 14. Percentagem de recuperação do salicilato de metilo (<i>m/z</i> 65, 92, 120, 152).....	47
Quadro 15. Percentagem de recuperação do salicilato de metilo (<i>m/z</i> 65, 92, 120, 152).....	48

Lista de abreviaturas e siglas

avr - avirulência

CIFC – Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro

CMHs – células-mãe dos haútorios

DP - desvio padrão

DPR - desvio padrão relativo

IE - impacto de electrões

EtSA - ethyl salicylate (salicilato de etilo)

fl - “flecks” reacção de hipersensibilidade

GC-MS - gas chromatography – mass spectrometry (cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa)

HDT – híbrido de Timor

HR - hypersensitive reaction (reacção de hipersensibilidade)

MeSA - methyl salicylate (salicilato de metilo)

MR – reacções de resistência moderada

MS – reacções de susceptibilidade moderada

m/z – mass peak (razão massa/carga)

PAL – phenylalanine ammonia-lyase (fenilalanina amónio liase)

PCD – programmed cell death (morte celular programada)

PDMS – polyimethylsiloxane (polidimetilsiloxane)

PR - pathogenesis – related proteins (proteínas relacionadas com o patogénio)

PI – padrão interno

R – coeficiente de correlação

R^2 - coeficiente de determinação

ROS – reactive oxygen species (formas reactivas de oxigénio)

S – reacções de susceptibilidade

SA - salicylic acid (ácido salicílico)

SAR - systemic acquired resistance (resistência sistémica adquirida)

SIM – single ion monitoring (monitorização do ião seleccionado)

SPME - solid phase microextraction (microextracção em fase sólida)

TMV - tobacco mosaic virus (vírus do mosaico do tabaco)

Nota prévia

O presente trabalho foi realizado no âmbito do projecto PTDC/AGR-AAM/71866/2006 intitulado “Abordagem interdisciplinar para a caracterização de potenciais fontes de resistência durável do cafeeiro (*Coffea* spp.) à ferrugem alaranjada (*Hemileia vastatrix*)”. Integrou-se na tarefa “Avaliação dos níveis de ácido salicílico e jasmonatos em plantas infectadas e não infectadas”.

O trabalho envolveu dois estudos. O primeiro, desenvolvido no Centro de investigação das Ferrugens do Cafeeiro/ Instituto Investigação Científica Tropical, incidiu na observação do processo de infecção da ferrugem alaranjada nas folhas do cafeeiro e preparação das amostras destinadas à determinação do salicilato de metilo nas folhas do cafeeiro.

O segundo estudo visou a determinação do salicilato de metilo por Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gás-Líquido acoplada à Espectrometria de Massa e foi realizada no Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica. Constatou-se no desenvolvimento do método, sua respectiva validação e aplicação a amostras de folhas de *C. arabica* saudáveis e inoculadas.

Capítulo I

Introdução Geral

1. O Cafeeiro

1.1. A origem e distribuição geográfica da espécie *Coffea arabica* L.

O Continente Africano, mais precisamente a Etiópia, foi o território de origem da *C. arabica* L. (Purseglove, 1974; Ferrão, 1992).

Por volta de 1600 o comércio europeu era controlado pelos holandeses e, como tal, foram estes a obter as primeiras plantas, tendo em 1658 introduzido o café em Java e depois no Ceilão, actual Sri Lanka. Em 1699 levaram mais plantas para a colónia Indonésia, Sumatra, Bali, Malabar e Celebes. Em 1706 o Jardim Botânico de Amesterdão recebia os primeiros cafeeiros que foram mantidos em condições de estufa, e daí prosseguiram a expansão para a colónia holandesa na América do Sul, o Suriname, onde chegaram em 1718. Em 1722 os cafeeiros foram introduzidos em Cayenne pelos franceses. A partir daqui foi introduzido no Brasil em 1727, na Jamaica em 1730 e por toda a zona das Caraíbas, América Central e América do Sul. Mais tarde, no final do século XIX, missionários católicos levaram o café para a Tanzânia e Quênia, chegando ao Uganda por volta de 1900 (Ferrão, 1992; Martins, 2008).

1.2. Classificação sistemática da espécie *Coffea arabica* L.

O género *Coffea* foi descrito pela primeira vez em 1737 pelo botânico sueco Carl von Linné, tendo sido integrado na família da *Rubiaceae* (Charrier & Berthaud, 1985).

Em 1947, Chevalier, baseando os seus estudos em características morfológicas e na origem geográfica das espécies, propôs uma divisão do género *Coffea* em 4 secções: *Eucoffea*, *Mascarocoffea*, *Argocoffea*, e *Paracoffea*. A secção *Eucoffea* era a mais importante por conter as espécies mais cultivadas *Coffea arabica* e *Coffea canephora*.

A taxonomia do género *Coffea* tem sofrido alterações desde que se começaram a utilizar técnicas de marcadores moleculares (ADN nuclear, ADN nuclear ribossomal e do ADN plastidial), aplicadas ao estudo da sistemática (Orozco-Castillo *et al.*, 1996; Lashermes *et al.*, 1996, 2001; Cros *et al.*, 1998). Actualmente o género *Coffea*, pertence à família *Rubiaceae*, sub-família *Ixoroideae* (Robbrecht, 1988), tribo *Coffeae*, que compreende dois sub-géneros (Bridson & Verdcourt, 2003; Davis, 2003; Davis *et al.*, 2005): o sub-género *Coffea* e o sub-género *Baracoffea*. A maior parte das espécies do género *Coffea* pertencem ao sub-género *Coffea* incluindo *C. arabica*. Os cafeeiros do sub-género *Coffea* ocorrem naturalmente em África, Madagáscar e nas Ilhas Mascarenhas, sendo que os pertencentes ao sub-género *Baracoffea* estão restritos às florestas ocidentais do Madagáscar (Davis *et al.*, 2006).

Em síntese, apresenta-se a nova classificação sistemática da espécie *Coffea arabica*:

DIVISÃO – *Angiospermeae*

CLASSE – *Dicotyledoneae*

ORDEM - *Gentianales*

FAMÍLIA – *Rubiaceae*

SUB – FAMÍLIA – *Ixoroideae*

TRIBO – *Coffeae*

GÉNERO – *Coffea* spp.

SUB – GÉNERO – *Coffea* L.

ESPÉCIE - *Coffea arabica* L.

1.3. *Coffea arabica* vs *Coffea canephora*

A espécie *Coffea arabica* distingue-se da *Coffea canephora*, a outra espécie com que partilha actualmente quase toda a produção mundial de café, nomeadamente na sua susceptibilidade a *H. vastatrix*.

A espécie *Coffea arabica* contém 44 cromossomas (tetraplóide), gosta de zonas montanhosas (900-2000m), está adaptada a clima húmido com temperaturas médias entre 15°C e 22°C. Produz cafés aromáticos, suaves e com inúmeras variações de corpo e acidez.

A espécie *Coffea canephora* originária da África, contém 22 cromossomas (diplóide), dá-se bem a 200-300m de altitude, com temperaturas médias entre 24°C e 29°C. Produz cafés com sabor adstringente e amargo e acidez baixa. Em contrapartida, é um cafeeiro mais produtivo e mais resistente às pragas e factores abióticos comparado com o cafeeiro Arábica (ICO, 2008).

1.4. Produção mundial do café e principais países produtores

De acordo com a Organização Internacional do Café (International Coffee Organization, ICO) a produção mundial de café no ano 2007 diminuiu para 118.074 milhões de sacas (60kg) comparativamente com a produção do ano anterior que foi de 127.028 milhões de sacas (Figura 1). No ano de 2007 o maior produtor de café continua a ser o Brasil, seguido pelo Vietname e a Colômbia (Figura 2). A produção mundial de *Coffea arabica* representou cerca de 61,29% e a de *Coffea canephora*, 38,71% da produção mundial de café de 2007 (ICO, 2008).

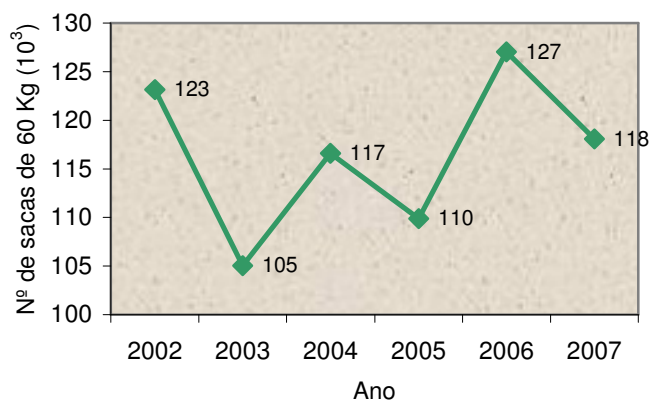


Figura 1. Produção mundial de café (2002 – 2007)

(www.ico.org).

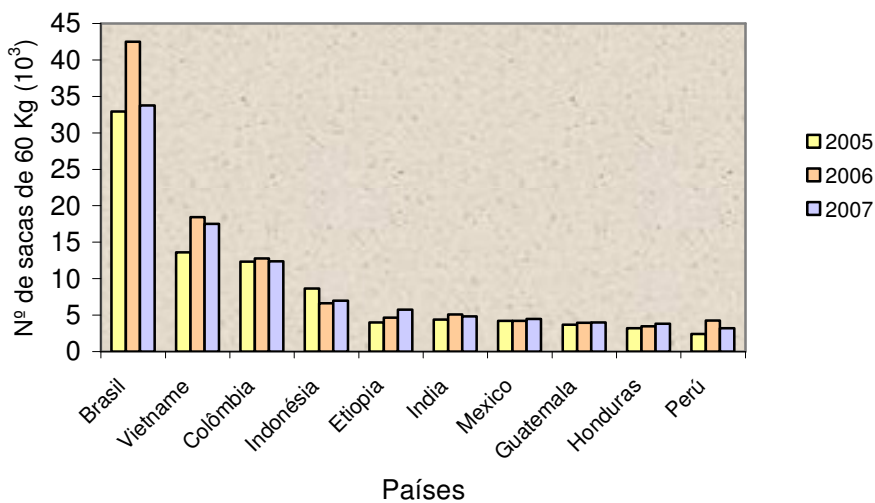


Figura 2. Principais países produtores de café (2005 – 2007)

(www.ico.org).

2. A Ferrugem Alaranjada – *Hemileia vastatrix*

2.1. Origem e distribuição geográfica

A ferrugem alaranjada foi provavelmente observada pela primeira vez, em 1861, próximo do Lago Vitória, no Quênia (Wellman, 1952). No entanto, foi só em 1869 que se assinalou em Ceilão, actual Sri Lanka, os primeiros grandes prejuízos económicos. Mais tarde apareceu na Índia, depois em Sumatra, em 1876, e em 1978 em Java. Em 1878 chegou ao Continente Africano e na década seguinte prosseguiu para algumas áreas da zona Este de África. Progressivamente começou a invadir outros países mas só em 1966 foi detectada na zona Oeste de África em Angola. Chegou ao Continente Americano em 1970, ao Brasil, de seguida detectou-se para a Argentina e Paraguai, em 1972, Nicarágua, em 1976, Bolívia, em 1978 e El Salvador e Peru em 1979. Em 1980 apareceu na Guatemala e Honduras, Equador. Chegou ao México em 1981, Costa Rica e Colômbia em 1983 e por fim, na Venezuela em 1984 (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988). Actualmente, *H. vastatrix* é endémica em todos os países produtores de café (Rodrigues Jr., 1990; Van der Vossen, 2001)

2.2. Importância económica da ferrugem alaranjada

A ferrugem alaranjada do cafeeiro, causada pelo fungo *Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome, continua a ser a principal doença do cafeeiro Arábica a nível mundial, com perdas que rondam os 15%-20% da produção mundial de café (Van der Vossen, 2001). Os estragos causados por esta doença foram aumentando pelo facto de, entre 1970 e 1986, a doença se ter espalhado por praticamente toda a América Central e do Sul, onde se encontram os principais países produtores de cafeeiro Arábica (Eskes, 1989). As perdas causadas por esta doença resultam da reduzida capacidade fotossintética das folhas infectadas e na sua prematura queda, quando os níveis de infecção são elevados, enfraquecendo o cafeeiro (Bettencourt & Carvalho, 1968).

Em 1869, no Sri Lanka (antigo Ceilão), foram assinalados os primeiros grandes prejuízos económicos causados pela ferrugem alaranjada do cafeeiro. Nessa altura cerca de 90% da área plantada com café foi abandonada e gradualmente substituída pela plantação do chá (Bettencourt & Rodrigues, 1988). Esta doença foi considerada, por H. David Thurston (1998), no Livro *Tropical Plant Diseases*, uma das sete maiores doenças do último século, tendo devastado a indústria do café no Sri Lanka, Indonésia e Filipinas.

2.3. Classificação sistemática

O género *Hemileia* foi pela primeira vez descrito por Berkeley & Broom, em 1869. Existem actualmente cerca de 60 espécies diferentes, atacando em monocotiledóneas como em dicotiledóneas, sendo *H. vastatrix* a mais importante. É actualmente, classificada da seguinte forma (CABI Database, 2008):

REINO - *Fungi*

FILO - *Basidiomycota*

CLASSE - *Pucciniomycetes*

SUB – CLASSE - *Incertae sedis*

ORDEM - *Pucciniales*

FAMÍLIA - (*Incertae sedis*)

GÉNERO - *Hemileia* Berk. & Br.

ESPÉCIE - *H. vastatrix* Berk. & Br.

2.4. Sintomatologia

Os cafeeiros susceptíveis começam por apresentar na página inferior das folhas, 10 a 15 dias após a infecção, pequenas pontuações ou manchas cloróticas de aproximadamente 1mm de diâmetro, translúcidas quando observadas em contra luz. A partir dessas manchas, desenvolvem-se pústulas de soros uredóspóricos de cor alaranjada ou vermelho alaranjado, mais ou menos circulares que podem atingir 1cm ou mais de diâmetro. As folhas com estes sintomas têm tendência a cair (Nutman & Roberts, 1963; Rodrigues Jr., 1985).

2.5. Ciclo de vida

Em geral o ciclo de vida completo das ferrugens apresenta cinco tipos de esporos, designadamente basidiósporos, picnidiósporos, ecidiósporos, uredósporos e teleutósporos. No entanto, no caso da ferrugem *H. vastatrix*, conhecem-se apenas três tipos de esporos: uredósporos, teleutósporos e basidiósporos (Rodrigues Jr., 1985, 1990) (Figura 3).

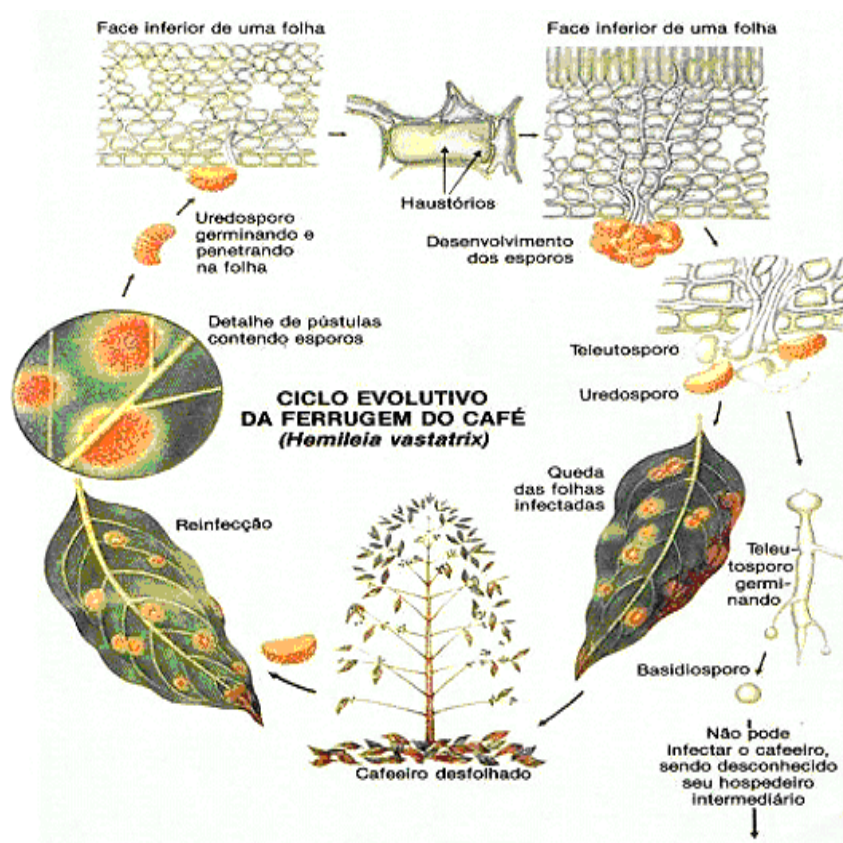


Figura 3. Ciclo de vida da ferrugem alaranjada (www.apsnet.org).

Os uredósporos são dicarióticos e formam a fase assexuada do ciclo, a fase em que a doença se propaga. Os teleutósporos são produzidos nos mesmos soros dos uredósporos, aparecem em determinadas condições de seca e após a meiose originam os basidiósporos. Os basidiósporos são monocarióticos e representam a fase sexuada, mas apesar de apresentarem capacidade germinativa, não infectam as folhas do café, desconhecendo-se a existência de algum hospedeiro alternante (Rodrigues Jr., 1985).

2.6. Processo de infecção

O processo de infecção de *H. vastatrix* tem início com a germinação dos uredósporos na presença de água líquida e embora temperaturas entre 15-30°C permitam a germinação, o valor ótimo situa-se nos 24°C (Nutman & Roberts, 1963). A infecção começa na página inferior da folha com a formação do tubo germinativo e do apressório. O apressório emite uma hifa que penetra pelo estoma (hifa de penetração), cresce para a cavidade subestomática local onde se ramifica em duas hifas laterais, adquirindo uma estrutura em forma de âncora. De cada uma das hifas laterais

emergem as células-mãe dos haustórios (CMHs) que ao penetrarem nas células subsidiárias do estoma, formam os haustórios (Figura 4).

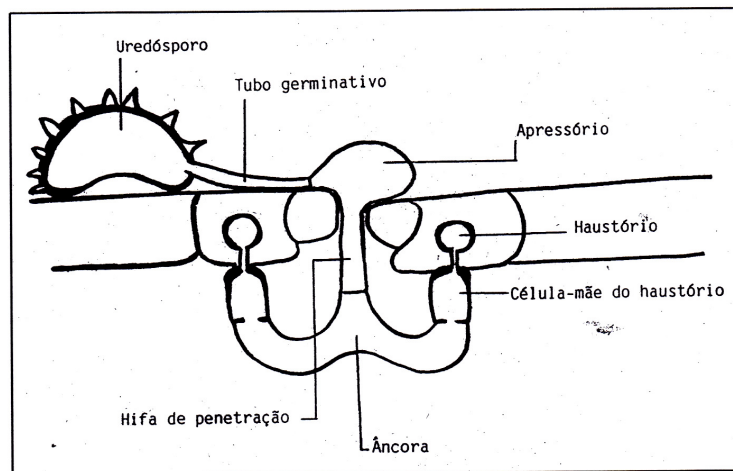


Figura 4. Primeiras fases do processo de infecção de *Hemileia vastatrix* (imagem cedida pelo CIFC).

Em plantas susceptíveis a colonização do fungo pode atingir o parênquima empalçado formando um micélio com muitas hifas intercelulares e muitos haustórios, que poderá culminar em soros uredospóricos que saem em forma de “bouquet” pelos estomas (Rijo & Rodrigues Jr., 1978).

2.7. Meios de luta

Os fungicidas cúpricos são os mais utilizados no combate à ferrugem alaranjada, mas uma utilização excessiva pode provocar toxicidade na camada superficial do solo, onde se acumula a matéria orgânica e o cobre que não foi adsorvido, ser lixiviado pela água das chuvas e drenado para os rios (Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988). Os fungicidas sistêmicos também têm vindo a ser utilizados mas conduzem à queda das folhas e após o uso contínuo as ferrugens adquirem resistência (Kushalappa & Eskes, 1989). Os custos crescentes da aplicação dos fungicidas e por vezes as dificuldades da sua aplicação devido à difícil topografia das plantações levaram os centros de investigação de café a dar prioridade à produção de variedades resistentes às principais doenças com uma boa produtividade e características agronómicas favoráveis (Rodrigues Jr., 1985; Bettencourt & Rodrigues Jr., 1988; Varzea *et al.*, 2002).

3. Interação cafeeiro – ferrugem alaranjada

O quadro 1 apresenta a escala de tipos de reações da interação cafeeiro – ferrugem alaranjada adoptada pelo CIFC (D'Oliveira, 1954–57). A leitura das expressões fenotípicas com base nesta escala tem permitido caracterizar grupos fisiológicos de cafeeiros e diferenciar raças fisiológicas da ferrugem.

Quadro 1. Escala dos tipos de reação dos cafeeiros à *Hemileia vastatrix* adoptado no CIFC (D'Oliveira, 1954–57).

-
- i - imune, sem quaisquer sinais que indiquem que se deu a infecção
 - fl - “flecks” reação de hipersensibilidade (pontuação clorótica), às vezes difícil de observar macroscopicamente, mas visível à lupa
 - ; - Pontuações necróticas, visíveis macroscopicamente, situadas no ponto de penetração da ferrugem ou dispersas pela área de infecção
 - T - Pequena tumefacção no ponto de penetração da ferrugem, bem visível à lupa
 - 0 - clorose, mais ou menos intensa, na área de infecção, às vezes acompanhada de pequenas necroses, mas sem formação de soros uredospóricos
 - 1 - Raros soros uredospóricos, sempre muito pequenos, por vezes só distinguíveis à lupa, em áreas predominantemente cloróticas, por vezes acompanhadas de necroses.
 - 2 - Pústulas uredospóricas pequenas ou médias, difusas, mas bem visíveis macroscopicamente, em áreas intensamente cloróticas.
 - 3 - Pústulas uredospóricas médias ou grandes, rodeadas de clorose
 - 4 - Grandes pústulas uredospóricas sem verdadeira hipersensibilidade, mas podendo apresentar uma leve clorose na margem das infecções (altamente susceptível).
 - X - Reação heterogénea, pústulas uredospóricas de tamanho muito variável, incluindo na aparência diversos tipos ou graus de infecção com expressões de congenialidade e incogenialidade.
-

Os tipos de reação *i*, *fl*, *;*, *T*, *0* correspondem a expressões de resistência completa sendo a expressão mais comum de resistência, os “flecks” (*fl*) associados à tumefacção (*T*).

As reações *1* e *2* são designadas, respectivamente, de moderadamente resistente (MR) e moderadamente susceptível (MS) e as reações *3* e *4* de susceptível (S).

3.1. Raças fisiológicas de *H. vastatrix*

Mayne (1932, 1935), na Índia, foi o primeiro a constatar que a aparente perda de resistência de cultivares de cafeeiro à ferrugem, era devida à existência de raças fisiológicas. A 29 de Abril de 1955 foi criado o Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro (CIFC) em Oeiras, sendo Dr. Branquinho D' Oliveira o seu fundador, com o objectivo de centralizar a nível internacional os trabalhos de investigação relacionados com a especialização fisiológica de *H. vastatrix* (D'Oliveira, 1954-57).

A partir de amostras de esporos de *H. vastatrix* (Figura 5) provenientes das mais diversas regiões de cafeeiros do mundo, foi possível até ao presente, a identificação de mais de 45 raças fisiológicas que se distinguem pelo seu espectro de infecção em relação a 18 cafeeiros diferenciadores (D'Oliveira, 1954-57; D'Oliveira & Rodrigues Jr., 1961; Rodrigues *et al.*, 1975; Lopes *et al.*, 1976; Várzea *et al.*, 1989; Rodrigues Jr. *et al.*, 1993; Várzea e Marques, 2005).

Estes diferenciadores são clones de cinco plantas da espécie tetraplóide ($2n = 44$) *C. arabica*, de sete plantas de híbridos interespecíficos tetraplóides *C. arabica* x *C. canephora* e *C. arabica* x *C. liberica*, e de seis plantas das espécies diplóides ($2n = 22$) *C. canephora*, *C. congensis*, *C. excelsa* e *C. racemosa* (Rodrigues Jr. *et al.*, 1975; Bettencourt, 1981; Bettencourt & Rodrigues, 1988; Várzea e Marques, 2005). Actualmente este conjunto de cafeeiros diferenciadores mostra-se insuficiente para caracterizar algumas novas raças virulentas em derivados de híbrido de Timor (HDT) (Eskes, 1989; Várzea e Marques, 2005).



Figura 5. Colecção de *Hemileia vastatrix* no CIFC, única no mundo
(www2.iict.pt/?idc=33&idi=11090).

3.2. Grupos fisiológicos de *Coffea* spp.

Os grupos fisiológicos de cafeeiros distinguem-se uns dos outros pelo espectro de reacção fenotípica que apresentam em relação às diferentes raças fisiológicas de *H. vastatrix* segundo estudos realizados na Índia (Mayne, 1932, 1935) e em Portugal (D' Oliveira, 1954-57; Bettencourt *et al.*, 1980).

Actualmente existem 40 grupos fisiológicos de cafeeiro designados por letras ou números (Rodrigues *et al.*, 1975; Bettencourt, 1981).

No grupo A onde estão incluídas algumas espécies de *Coffea*, híbridos espontâneos como o híbrido de Timor (HDT) e híbridos artificiais, entre *C. arabica* e HDT (Catimor, Cavimor, Sarchimor, etc), produzidos no CIFC e caracterizada pela resistência à maior parte das raças do fungo conhecidas. No grupo E incluem-se a maioria dos cafeeiros arábica cultivados (Typica, Bourbon, Caturra, etc), sendo susceptíveis a quase todas as raças de fungo identificadas (D'Oliveira e Rodrigues, 1961; Bettencourt, 1981).

3.3. Hereditariedade da resistência a *H. vastatrix* em *Coffea* spp.

Os primeiros trabalhos de hereditariedade da resistência de cafeeiros às raças fisiológicas de ferrugem foram realizados por Mayne (1935, 1936) na Índia e continuados no CIFC (Noronha-Wager & Bettencourt, 1967; Bettencourt & Noronha-Wager, 1971; Bettencourt & Rodrigues, 1988, Bettencourt *et al.*, 1992), permitindo identificar nove genes dominantes que condicionam, simples ou associados, a resistência de *Coffea* spp. a um certo número de raças de *H. vastatrix*. Estes genes receberam a sigla S_H que representa susceptibilidade a *H. vastatrix* e são designados por S_{H1} a S_{H9} .

Os genes S_{H1} , S_{H2} , S_{H4} e S_{H5} são originários da espécie *C. arabica*, da espécie *C. liberica* é originário o gene S_{H3} e a espécie *C. canephora* conferiu ao Híbrido de Timor (híbrido natural *C. arabica* x *C. canephora*) os genes S_{H6} , S_{H7} , S_{H8} e S_{H9} (Noronha-Wager & Bettencourt, 1967; Bettencourt & Rodrigues, 1988). A existência de outros genes de resistência em derivados do HDT (híbrido de Timor) e outros híbridos interespecíficos, tem sido confirmada pela quebra de resistência de alguns desses cafeeiros em relação a novas raças de ferrugem (Bettencourt & Rodrigues, 1988).

Noronha-Wagner & Bettencourt (1967) verificaram que o conceito de Flor (1942) se aplicava à interacção cafeeiro-ferrugem alaranjada ao identificarem quatro genes dominantes (SH_1 , SH_2 , SH_3 , SH_4) que condicionavam as reacções de *C. arabica* a diferentes raças de *H. vastatrix*.

A teoria gene-a-gene proposta por Flor (1942) descreve que, "para cada gene que condiciona a resistência (*R*) no hospedeiro existe um gene correspondente que condiciona a avirulência (*avr*) no agente patogénico".

Com base nesta teoria para além da identificação dos 9 genes de resistência no cafeeiro foi possível inferir os respectivos genes de virulência das ferrugens ($v_1 - v_9$) (Bettencourt, 1981; Bettencourt *et al.*, 1992).

4. Consideração geral sobre as interações planta – agente patogénico

Geralmente as plantas são capazes de resistir à maioria dos agentes patogénicos, sendo a situação de doença uma excepção. Para isso as plantas têm que ter a capacidade de reconhecer os agentes patogénicos potencialmente invasores, e desenvolver uma série de mecanismos de transmissão de sinal que vão reprogramar todo o metabolismo celular activando uma complexa resposta de defesa (Staskawicz, 2001).

Os mecanismos de defesa das plantas podem ser classificados em constitutivos ou induzidos após a infecção. As defesas constitutivas podem ainda ser classificadas em estruturais, quando se baseiam numa característica anatómica (tais como espinhos, tricomas, ceras) ou químicas quando estão relacionadas com determinado composto biologicamente activo (por ex. alcalóides, fenóis) (Margis-Pinheiro *et al.*, 1997). Os mecanismos de defesa induzidos após a infecção são vários: a produção de formas reactivas de oxigénio (ROS), a reacção de hipersensibilidade (HR), as alterações estruturais ao nível da parede celular, produção de um grande número de proteínas solúveis, que são conhecidas como proteínas relacionadas com a patogénicidade, PR-Proteínas, destacando-se as peroxidases, quitinases e as glucanases, etc. (Dixon & Lamb, 1990; Heath, 2000; Soares & Machado, 2007). A capacidade da planta em reconhecer a presença do agente patogénico e a velocidade com que ela é capaz de responder à sua invasão (através da indução de uma série de modificações no metabolismo celular da planta), vai determinar o sucesso da resistência da planta ao ataque pelos parasitas (Silva *et al.*, 2002). O reconhecimento envolve a detecção por parte da planta de moléculas do agente patogénico, que podem ser de natureza não-específica (que são reconhecidas por várias espécies de plantas) ou específica. As específicas são os produtos dos genes *avr*, geralmente proteínas que são excretadas para o espaço intercelular durante o crescimento do fungo na planta e que são reconhecidos pelos produtos do gene R da planta hospedeira, dando início aos processos de sinalização e activação das respostas de defesa da planta (Ebel & Scheel, 1997, Vander *et al.*, 1998).

Uma das respostas mais comuns, de resistência das plantas contra agentes patogénicos como fungos, vírus, bactérias e nematodes é a reacção de hipersensibilidade. A reacção de hipersensibilidade (HR) é caracterizada pela morte rápida das células no local de infecção após a penetração do agente patogénico, limitando o crescimento do parasita. Considera-se como uma forma de morte celular programada (PCD) (Silva *et al.*, 2002). Associada à HR existem outras respostas fisiológicas que podem incluir o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, acumulação de ROS, a perda de iões potássio (K⁺) e ganho de iões hidrogénio (H⁺) pelas células, o espessamento das paredes celulares com deposição de linhina, a síntese de toxinas (fitoalexinas), o aumento da expressão de proteínas PR (peroxidases, quitinases e as glucanases) e da enzima fenilalanina amóniaco liase (PAL), o aumento dos níveis de ácido salicílico, etc (Soares & Machado, 2007). No caso de interações com agentes patogénicos biotróficos (que requerem células vivas para a sua sobrevivência) como é o caso das ferrugens, a HR pode por si só, ser um

mecanismo eficiente de resistência uma vez que impede o parasita de ter acesso aos nutrientes da planta levando-o à morte (Heath, 2000).

A HR envolve uma cascata de eventos e sinais que vão desde o reconhecimento entre o agente patogénico e o hospedeiro até ao colapso celular vegetal localizado, esses sinais podem ainda estender-se a toda a planta, aumentando a capacidade de resposta do hospedeiro a subseqüentes infecções por outros parasitas – resistência sistémica adquirida – SAR (Goodman & Novacky, 1994; Hammerschmidt, 1999; Heath, 2000).

Entender estes mecanismos de defesa das plantas facilita o desenvolvimento de cultivares mais resistentes a diversas doenças (Soares & Machado, 2007).

4.1. Compostos sinalizadores – Ácido salicílico

O ácido salicílico (SA) é uma hormona vegetal que tem um papel importante nos mecanismos de defesa da planta. Tem sido referido como um componente central nas vias de transmissão de sinal que irá activar e regular através de um complexo sistema em rede, as respostas de defesa das plantas (Engelberth *et al.*, 2003). Os mecanismos de resistência que envolvem o SA como molécula sinal incluem: a HR, a resistência sistémica adquirida (SAR), a expressão de genes das proteínas PR, o choque oxidativo e morte celular programada (PCD) (Rozhon *et al.*, 2005).

O SA pode não só ligar-se a uma série de moléculas da planta afectando a sua actividade/expressão (proteínas e genes) como pode ainda influenciar outros mecanismos de sinalização de defesa das plantas. A síntese e a sinalização do ácido salicílico podem também ser influenciada por factores ambientais e do desenvolvimento vegetal (Shah, 2003).

O SA pode ser sintetizado a partir da fenilalanina através da via fenilpropanóide ou a partir do ácido corismático pela via do ácido xiquímico (Dixon *et al.*, 2002).

Uma parte do SA presente nas plantas não está livre mas está conjugado com glucose. Durante o processo de infecção dá-se o aumento simultâneo de SA livre e da forma conjugada (SA glicosilado). Tem sido sugerido que a forma conjugada de SA não tem actividade biológica, nem mobilidade podendo funcionar como uma forma de armazenamento de SA, sequestrado nos vacuolos da célula (Dean *et al.*, 2005).

O salicilato de metilo (MeSA) nas plantas, sintetizado a partir do SA pela acção da enzima SA carboxil metiltransferase (SAMT), parece funcionar como um sinal volátil que vai activar a resposta de resistência e induzir a expressão dos genes de defesa em tecido são de plantas infectadas e em plantas vizinhas não infectadas (Shulaev *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 2004). Em folhas de tabaco infectadas com TMV (vírus do mosaico do tabaco) foi detectado o aumento do SA e do MeSA; no entanto, durante o período pós-inoculação dá-se a reconversão do MeSA em SA (aumentando a quantidade de SA e diminuindo a de MeSA) à medida que se vai desenvolvendo a HR (Seskar *et al.*, 1998). Por outro lado o MeSA pode funcionar como uma forma de SA facilmente transportável pelo floema para o local de destino, onde será posteriormente convertido em SA, funcionando

4.2. Interação cafeeiro-ferrugem alaranjada

No caso da interação cafeeiro-ferrugem alaranjada têm sido efectuados diversos estudos com o objectivo de esclarecer quais os mecanismos do cafeeiro envolvidos na resposta de resistência a *H. vastatrix*. A reacção de hipersensibilidade no cafeeiro está associada ao encapsulamento dos haustórios com calose e celulose, à deposição de fenóis, à acumulação de material de composição heterogénea (pectinas, polissacáridos e fenóis) nos espaços intercelulares, e à lenhificação das paredes e hipertrofia das células da planta (Martins *et al.*, 1985; Rijo *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2002). O aumento de actividade de enzimas oxidativas, tais como a, lipoxigenase, peroxidase e superóxido dismutase, da enzima da via fenilpropanóide PAL e proteínas relacionadas com a patogenicidade (β -glucanases e quitinases), tem sido também associado à expressão de resistência do cafeeiro à ferrugem (Maxemiuc-Naccache *et al.*, 1992; Rojas *et al.*, 1993; Silva *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008; Guerra-Guimarães *et al.*, 2008a e 2008b). Foram identificados diversos genes do cafeeiro envolvidos na resposta de resistência a *H. vastatrix*, dos quais se destacam as homologias obtidas com, quitinases, metalotioninas, proteínas de choque térmico e factores de transcrição, nomeadamente o WRKY¹ (Fernandez *et al.*, 2004, Santos *et al.* 2004). Este último é importante pelo facto de ser induzido por agentes patogénicos ou após o tratamento com ácido salicílico (Klessig *et al.*, 2000). Uma vez que a enzima PAL está implicada numa das vias biossintéticas do SA (Dixon *et al.*, 2002), é de admitir que o aumento de actividade da PAL, observado em interações incompatíveis cafeeiro-ferrugem antes do início da HR (Silva *et al.*, 2002), possa também estar relacionado com a síntese de SA. Assim, a quantificação do SA ou/e dos seus conjugados bioactivos poderá vir a esclarecer qual o papel desta molécula sinal na resposta de resistência do cafeeiro à ferrugem.

¹factor de transcrição que se liga à sequência-W-TTGAC(C/T) de promotores de um grande número de genes envolvidos nas reacções de defesa

5. A determinação do salicilato de metilo

A análise do salicilato de metilo em matrizes complexas, de acordo com Deng *et al.* (2004), recomenda a utilização de técnicas separativas, nomeadamente cromatografia líquida ou cromatografia gasosa. Dependendo da metodologia a usar, deverá ser feito o tratamento adequado da amostra para a análise do composto. No caso da análise ser efectuada por cromatografia líquida (HPLC) será necessário preparar um extracto a partir da amostra em estudo. Se a escolha recair na cromatografia gasosa, embora a análise possa ser efectuada após a preparação de um extracto, deve-se ter em conta que injectar este tipo de matriz num cromatógrafo de fase gasosa não será a metodologia mais adequada pela sua complexidade e possibilidade de causar problemas na análise (sujar a coluna, o injector e o detector). Nesse sentido surgiram técnicas que podem ser usadas para simplificar as amostras e uma delas é a microextracção em fase sólida, a qual foi aplicada neste trabalho e, por isso, vai ser desenvolvida nesta parte introdutória.

5.1. A microextracção em fase sólida

A microextracção em fase sólida conhecida por SPME (Solid Phase Micro-Extraction), é uma técnica em que os processos de extracção e pré-concentração de compostos se fazem para concentrações muito baixas do composto presente na amostra (Valente & Augusto, 1999). Esta técnica consiste em duas etapas básicas, a sorção (adsorção ou absorção) e a dessorção dos compostos numa fibra de sílica fundida recoberta com material polimérico. A sorção é realizada expondo a fibra directamente à amostra ou à sua fase gasosa em equilíbrio com a amostra (*headspace*) e a dessorção ocorre no próprio injector do cromatógrafo. O modo *headspace* é utilizado principalmente na análise de compostos de média e alta volatilidade em amostras sólidas ou líquidas em que a fibra é exposta acima do composto sem entrar em contacto directo com ela (Lasmar, 2007).

A optimização das condições de microextracção em fase sólida tem como objectivo conhecer as condições de trabalho que maximizem a extracção do(s) composto(s) em estudo.

A quantidade máxima de uma amostra extraída é obtida quando o equilíbrio de partição da amostra entre a fibra e o meio que o envolve for estabelecido. Com esse objectivo fazem-se ensaios de extracção com agitação, fazendo variar o tipo de fibra, as temperaturas de extracção, a duração (tempo) da extracção e os volumes do *vial* a usar (frascos de uso geral) (Valente & Augusto, 1999).

1) Tipo de fibra

As fibras disponíveis comercialmente para cromatografia gás-líquido (GC) são: apolares, polares e bipolares. A escolha do tipo de fibra está relacionada com a polaridade dos compostos a estudar. Assim utilizam-se fibras de características polares para concentrar compostos polares (Supelco,

1998). A fibra que vamos usar no presente trabalho, é uma fibra apolar com uma composição química de polidimetilsiloxano (PDMS) que é usada para compostos apolares.

2) Temperatura de extracção

A temperatura de extracção é definida como a temperatura óptima, que permite a extracção de uma maior quantidade de compostos ou de um único composto para a fibra. Deve ter-se em conta a estabilidade da amostra para as temperaturas ensaiadas (Valente & Augusto, 2000).

3) Tempo de extracção

O tempo de extracção é definido como o tempo necessário para que o equilíbrio entre as fases seja estabelecido. O tempo ideal de extracção é determinado construindo uma curva, relacionando o tempo com a quantidade de composto que foi extraído, obtendo-se informação a respeito da cinética da extracção. O tempo de extracção deve ser rigorosamente controlado para que os resultados sejam precisos (Fernandes, 2006).

4) Volume do *vial*

O volume do *vial* é um parâmetro que se testa com base na quantidade da amostra. Amostras de pequenas quantidades e com baixa concentração do composto a ser estudado devem ser analisadas em *vials* (frascos) pequenos, para que a adsorção do composto na fibra seja mais eficiente (Valente & Augusto, 2000).

5.2. Cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massa é o acoplamento de dois instrumentos num único instrumento integrado, que se designa por técnica hifenada (Neves & Freitas, 1996).

5.2.1. Breve descrição do sistema

⇒ Cromatografia gás-líquido

A cromatografia gás-líquido é uma forma particular dentro do processo geral de separação conhecido por cromatografia, que é utilizada na análise de vários tipos de produtos, naturais ou sintéticos (Neves & Freitas, 1996). A técnica visa a separação e análise de misturas de compostos voláteis. Esta técnica tem um poder de resolução excelente, possibilitando a análise de vários compostos em uma mesma amostra. Dependendo do tipo de composto a ser

analisado e do detector empregue, conseguem-se detectar quantidades muito baixas que podem atingir a ordem dos nano a picogramas (10^{-9} - 10^{-12}) (Peres, 2002).

Após adsorção dos compostos da amostra, a fibra de SPME é inserida no injector do cromatógrafo de fase gasosa onde os compostos são termicamente dessorvidos sob fluxo de gás de arraste (fase móvel) e atravessam a coluna cromatográfica, composta por um líquido de elevado peso molecular (fase estacionária) ligada às paredes de um tubo fino aberto (colunas capilares) onde ocorre a separação da mistura (Neves & Freitas, 1996).

Os constituintes básicos de um sistema cromatográfico estão esquematizados na Figura 7 e são:

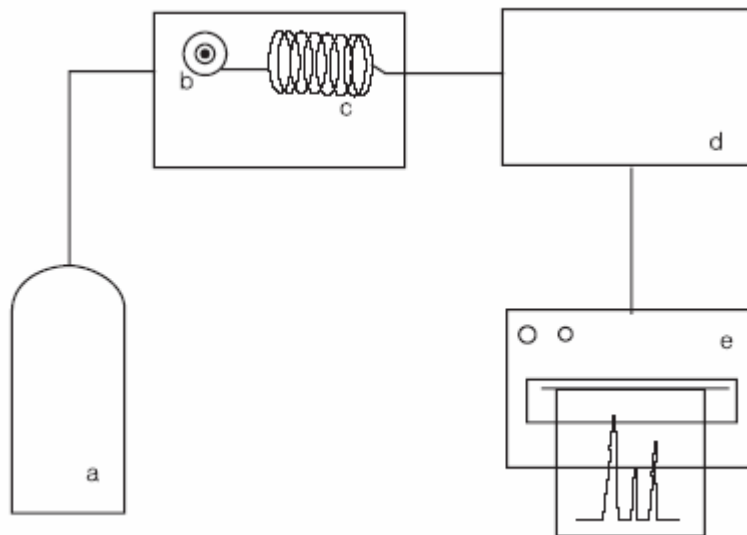


Figura 7. Componentes básicos de um sistema cromatográfico gás - líquido (Degani *et al.*, 1998).

a) cilindro do gás de arraste sob alta pressão; b) injetor; c) coluna; d) detector; e) sistema de registo (registador/integrador) e tratamento de dados (software próprio associado a um computador que pode controlar o equipamento).;

a) Sistema que fornece o gás de arraste (pode ser uma garrafa de gás) acoplado a um sistema de controlo/regulador do fluxo gasoso

O reservatório de gás de arraste é controlado por reguladores de pressão e válvulas de medição. O gás de arrastamento actua como eluente da amostra através da coluna. Os gases mais utilizados são o hidrogénio, o hélio, o azoto, o argón e o dióxido de carbono e arrastam os analitos através da coluna cromatográfica (Coimbra, 1991).

b) Um sistema de injeção capaz de permitir a introdução da amostra de uma forma repetível e representativa da sua composição real.

O injector é o componente do equipamento que permite a introdução da amostra na corrente do gás de arraste e, posteriormente na coluna. Os compostos adsorvidos na fibra são injectados por meio de um suporte manual ou automático para a fibra no injector. Os volumes injectados são geralmente muito pequenos (na ordem de 1-2 μl quando se trabalha com colunas capilares). O injector deve estar aquecido a uma temperatura acima do ponto de ebulição dos compostos da amostra para que a amostra se volatilize completamente e instantaneamente e seja encaminhada para a coluna. O cromatógrafo utilizado neste trabalho possui um injector de *split/splitless* que permite os dois tipos de injeção.

A injeção em *split* (injeção com repartição), em que parte da amostra introduzida não entra na coluna e é dirigida para o exterior por meio de um divisor de fluxo (válvula de *split*), sendo a quantidade da amostra injectada para a coluna representativa da composição inicial da amostra. O mecanismo de *split* é um mecanismo de divisão. Assim se injectarmos 5 μl de amostra e tivermos uma razão de *split* 1:5 significa que apenas a quantidade correspondente a 1 μl de amostra entrará na coluna e os outros 4 μl serão eliminados.

A injeção em *splitless* (injeção sem repartição), corresponde à introdução de toda a amostra na coluna, e este modo de injeção é usada sempre que o teor dos compostos em análise é baixo (Silva, 1995).

c) Coluna cromatográfica

Existem dois tipos de colunas em cromatografia gás-líquido: colunas de enchimento e colunas capilares. No presente trabalho só usamos colunas capilares. As colunas capilares possuem maior capacidade de resolução, quer isto dizer que têm maior capacidade de separar dois compostos com tempos de retenção muito próximos. Pode considerar-se que uma coluna capilar é semelhante a uma “sandwich” com três camadas de diferentes materiais: uma cobertura de políimida que envolve um tubo de sílica fundida, no interior do qual se encontra um filme muito fino de material que constitui a fase estacionária. As colunas capilares têm diâmetros que variam entre 0,25 e 0,32 mm e comprimentos de 10 a 100 m (Silva, 1995).

d) Um detector adequado ao tipo de análise a efectuar.

O detector está localizado à saída da coluna e produz um sinal eléctrico que deverá ser proporcional à concentração ou quantidade de composto que atravessa a célula do detector.

Os detectores mais utilizados em cromatografia gás-líquido de alta resolução são: o detector de ionização em chama, o detector por condutividade térmica, o detector por captura de electrões e o detector espectrométrico de massas (Degani *et al.*, 1998).

e) Um sistema de controlo de equipamento e de aquisição e tratamento de dados.

A alta eficiência conseguida em cromatografia gás-líquido de alta resolução resulta em picos cromatográficos com elevada velocidade de eluição. Sendo assim é indispensável que o sistema de aquisição de dados seja capaz de medir os sinais do detector à velocidade a que são gerados. Os dados podem ser registados por um registador potenciométrico, um integrador ou um microcomputador, sendo os analitos presentes nas amostras identificados pelos seus tempos de retenção (Degani *et al.*, 1998).

⇒ Espectrometria de massa

O espectrómetro de massa (Figura 8) é composto por (Neves & Freitas, 1996):

- 1) Câmara de ionização para produzir iões a partir da amostra;
- 2) Analisador, onde os iões são separados de acordo com a razão massa/carga (m/z);
- 3) Detector de iões emergentes do analisador que determina a sua massa e abundância;
- 4) Computador que processa os dados e controla o instrumento;

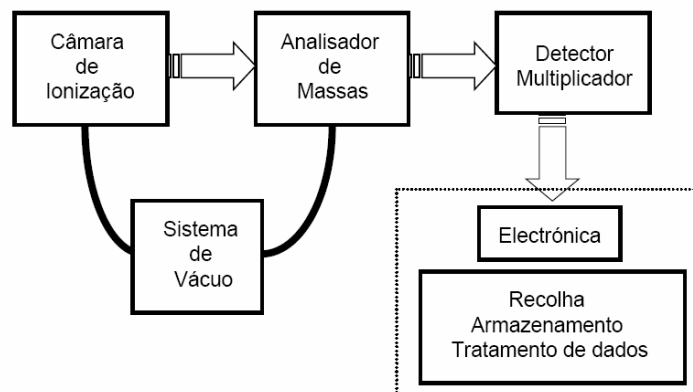
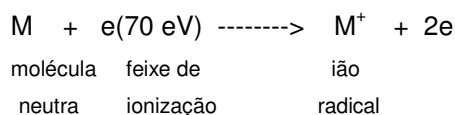


Figura 8. Componentes básicos dum espectrómetro de massa (Noronha, 2006).

Na câmara de ionização processa-se a ionização e fragmentação das moléculas da amostra. Uma das formas de ionização é por impacto de electrões (IE), onde é transferida energia dos electrões por colisões sucessivas para os analitos da amostra.



Os átomos e moléculas neutras da amostra, após serem ionizados e fragmentados, passam para o analisador de massas, onde são separados de acordo com a relação massa /carga (m/z). O quadropolo é um dos analisadores de maior uso, devido à sua facilidade de utilização, gama de massas a estudar, faixa linear de trabalho para determinações quantitativas, resolução e qualidade do espectro de massas. De seguida, no detector é determinada a intensidade da massa e por fim, num sistema de aquisição de dados, é construído o espectro de massas da amostra (Pizzutti, 2006).

5.2.2. Identificação e quantificação dos compostos

A identificação dos compostos presentes na amostra é feita a partir de uma biblioteca espectral que vem com o próprio equipamento. Deve-se proceder à injeção de uma solução padrão do composto em análise, para estudar as principais características desse composto, como por exemplo, o tempo que o composto tem tendência a aparecer no cromatograma (tempo de retenção).

Outro parâmetro a ter em conta na identificação de compostos é a escolha do modo a que o analisador do espectrómetro de massa opera. Existem dois modos, o modo *Full Scan* e o modo *SIM*. No modo *Full Scan* o analisador de massas monitoriza uma faixa de razões m/z .

O modo *Full Scan* é normalmente utilizado em análises qualitativas ou quantitativas quando a informação espectral completa da amostra é considerada importante.

No modo *SIM* o analisador de massas monitoriza somente poucos iões que são indicativos de um composto específico, ou seja monitoriza razões m/z específicas.

O modo *SIM* é consideravelmente mais sensível do que o modo *Full Scan*, mas só fornece informação sobre os iões monitorizados, pelo que se perde informação para a identificação. Normalmente o modo *SIM* é usado para a quantificação de um composto alvo, que existe em baixa concentração (Pizzutti, 2006).

A quantificação dos compostos é feita a partir da determinação das áreas ou alturas dos picos cromatográficos. Teoricamente, o cálculo da área do pico cromatográfico num equipamento automático como GC-MS processa-se através da seguinte equação:

$$A_a = K_a \times m_a$$

em que A_a – área do pico

K_a – factor de resposta

m_a – massa do composto que chega ao detector

O factor de resposta de um determinado composto depende das condições operacionais e o seu cálculo é efectuado pela injeção de quantidades exactas do composto e determinação da área do respectivo pico cromatográfico.

A conversão das áreas dos picos cromatográficos de um composto, para concentrações é feita, geralmente, através do método do padrão externo ou do método do padrão interno (Lourenço & Moreira, 1997).

5.2.2.1. Método do padrão externo

Neste método injectam-se quantidades exactas da solução-padrão do composto a analisar e traça-se a curva de calibração correspondente (Lourenço & Moreira, 1997).

5.2.2.2. Método do padrão interno

O método do padrão interno consiste na adição à amostra (matriz) de uma quantidade conhecida, de um composto diferente do que se pretende quantificar (Silva, 1995).

Para a obtenção da curva de calibração, preparam-se soluções padrão com diferentes concentrações do padrão do composto em análise, às quais se adiciona sempre a mesma quantidade de padrão interno. Após análise dessas soluções, constrói-se um gráfico relacionando a razão de áreas (área do composto a ser analisado / área do padrão interno que tem concentração constante) com a concentração variada do composto.

Idealmente a substância usada como padrão interno deve ser similar ao composto a ser quantificado, ter um tempo de retenção próximo a esse composto, não reagir com o composto ou outro componente da matriz, ter um grau elevado de pureza, ser estável antes e durante a análise e solúvel no solvente usado para a preparação do extracto e por fim originar um bom pico cromatográfico (Lourenço & Moreira, 1997).

Este método é extremamente útil, por permitir pequenas mudanças ao longo da análise em variáveis experimentais, como por exemplo na temperatura da coluna e volume da amostra injectada, sem interferir no resultado final (Ribeiro *et al.*, 2008).

Quando possível será vantajoso utilizar-se como padrão interno o composto que se pretende analisar mas em que um dos átomos de carbono esteja marcado. Deste modo assegura-se que as características do padrão interno sejam exactamente iguais às do analito.

5.2.3. Validação do método

A validação do método consiste na avaliação da capacidade do método analítico em produzir resultados de confiança (Ribeiro *et al.*, 2008). Os parâmetros analisados neste trabalho foram: a especificidade, o limite de detecção, a linearidade, a precisão com base na repetibilidade e a exactidão com base na percentagem de recuperação do padrão.

1) Especificidade

A especificidade é a capacidade de um método identificar um composto no meio de outros presentes na matriz (Lourenço & Moreira, 1997). O uso de um padrão do analito, caso esteja disponível, permite conhecer o tempo de retenção (minutos) que corresponde ao tempo que decorre desde que o composto é introduzido no sistema cromatográfico até que ocorra a eluição máxima correspondente a esse pico.

Num equipamento de GC-MS, a identificação do analito poderá ser feita utilizando a biblioteca de espectros, que é uma base de dados com vários compostos e o seu respectivo espectro de massa. A biblioteca espectral pode ser utilizada para comparar o tempo de retenção do analito com o tempo correspondente ao padrão analisado, ou, em alternativa, utilizando o valor do índice de retenção (Lasmar, 2007).

2) Limite de detecção

O limite de detecção de um método analítico corresponde, à menor concentração do analito que produz um sinal que é possível de distinguir do ruído de fundo. Na prática os dois modos mais utilizados têm como base a determinação da relação sinal-ruído ou em parâmetros de curva de calibração. O método usado, neste trabalho para detectar o limite de detecção foi o método da relação sinal – ruído.

Este baseia-se na medição do sinal correspondente ao ruído (linha de base quando se analisa o solvente ao tempo de retenção do composto em estudo). A relação sinal-ruído aceite é de 3:1 (Lourenço & Moreira, 1997).

3) Linearidade

A linearidade de um método é a sua capacidade para produzir um sinal directamente proporcional à concentração do composto em análise, dentro de uma gama de concentrações (Chasin *et al.*, 1998; Ribani *et al.*, 2004).

A linearidade é expressa por uma gama na qual o sinal analítico, denominado variável dependente y_i , é linearmente proporcional à sua concentração, denominada variável independente x_i . A equação matemática ($y = mx + b$) que descreve esta dependência é conhecida como curva analítica ou curva de calibração.

A equação da recta é obtida, a partir da regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e a qualidade da recta é testada pelo coeficiente de correlação (r) ou coeficiente de determinação (R^2). O coeficiente de correlação é a razão da covariância entre a concentração (x) e o sinal analítico (y) com o produto dos desvios padrão (Ribeiro, 2008). O coeficiente de determinação é o coeficiente de correlação ao quadrado.

Esses parâmetros permitem uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1 for R^2 , menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais relativamente ao modelo explicado pela equação e menor a incerteza dos coeficientes de determinação

estimados. Os valores dos coeficientes de determinação são tidos como satisfatórios a partir de 0,98 (Pizzutti, 2006).

4) Precisão

A precisão é o termo geral, utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos nas mesmas condições. A precisão pode ser determinada em termos de repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade.

No presente trabalho, a repetibilidade foi o parâmetro testado, que define a precisão dos resultados obtidos dentro do próprio laboratório, por um mesmo analista e com os mesmos instrumentos.

O seu valor numérico é estimado pelo desvio padrão relativo, ou DPR, para análises de amostras iguais ou idênticas. O seu cálculo é realizado da seguinte forma:

$$\text{DPR} = \frac{s}{x_m} \times 100$$

s = estimativa do desvio padrão absoluto

x_m = média das medidas repetidas

Valores de desvio padrão relativo até 20% são tomados como aceitáveis (Pizzutti, 2006).

5) Exactidão

A exactidão é uma medida de avaliação, da concordância existente entre os dados obtidos em uma determinada medida e um valor de referência assumido como sendo o verdadeiro. A exactidão representa a existência de erros sistemáticos e é um dos critérios mais importantes para o julgamento do desempenho de um método analítico. A exactidão através dos ensaios de fortificação e recuperação do padrão pode ser calculada através da seguinte equação:

$$\text{R\%} = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

Onde:

C_1 = concentração do composto determinado na amostra fortificada (amostra com padrão)

C_2 = concentração do composto determinado na amostra não fortificada

C_3 = concentração do composto usado para fortificação (padrão)

Em geral são aceites intervalos de 70 a 100% (Pizzutti, 2006).

Capítulo II

Parte Experimental

1. Material e Métodos

1.1. Material biológico

1.1.1. Cafeeiros

Os cafeeiros *Coffea arabica* L. das variedades Caturra Vermelho e S4 Agaro propagadas no CIFC, cresceram em vasos contendo uma mistura de terra vegetal, turfa e areia na proporção de 4:1:1 (v/v/v) em estufas com uma temperatura média anual de 24°C (Quadro 2).

Quadro 2. Origem, grupo fisiológico e genótipos dos cafeeiros *C. arabica* L. estudados.

Variedade	Origem	Grupo fisiológico	Genótipos
Caturra Vermelho	Angola	E	S _H 5
S4 Agaro	Etiópia	J	S _H 4,5

1.1.2. Ferrugem alaranjada

Utilizaram-se uredósporos frescos de dois isolados de ferrugem *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. (Quadro 3).

Quadro 3. Origem, raça fisiológica e genes de virulência de cada um dos isolados de *H. vastatrix* usados.

Isolados	Origem	Raça fisiológica	Genes de virulência
1427	Etiópia	II	V ₅
70	Quênia	XV	V _{4,5}

1.1.3. Inoculação dos cafeeiros e tipos de reacção

A inoculação foi feita em folhas jovens de *C. arabica* S4 Agaro ainda em crescimento ou próximas do seu tamanho definitivo, de acordo com a técnica utilizada no CIFC (D'Oliveira 1954-57).

Uredósporos frescos de *H. vastatrix* foram colocados na página inferior das folhas, com a ajuda de um escalpelo e espalhados com um pincel. Em seguida pulverizou-se com água destilada as folhas inoculadas e todo o cafeeiro. Após ser abundantemente regado o cafeeiro foi colocado numa câmara húmida e escura durante 24 horas. Após este período foi transferido para a estufa, tendo-se acompanhado o evoluir da infecção até ao aparecimento dos sintomas.

O Quadro 4 mostra os tipos de reacção observados em *C. arabica* S4 Agaro, 21 dias após a inoculação com os dois isolados de *H. vastatrix*. Na interacção compatível os cafeeiros apresentaram esporulação abundante (reacção 4) e na incompatível apresentaram pontuações cloróticas com tumefacção (reacção *flt*).

Quadro 4. Tipos de reacção da variedade *C. arabica* S4 Agaro, 21 dias após a inoculação com os diferentes isolados da ferrugem.

<i>C. arabica</i> (var.)	Isolados de <i>H. vastatrix</i>	Interacção	Tipos de reacção*
S4 Agaro	70	Compatível	4
	1427	Incompatível	<i>flt</i>

*Tipos de reacção das interacções *C. arabica*-*H. vastatrix* de acordo com a escala de classificação qualitativa de D'Oliveira (1954-57).

1.2. Preparação dos tecidos para observação ao microscópio óptico

1.2.1. Germinação de uredósporos e formação de apressórios *in vivo*

Seguindo a técnica descrita por Silva *et al.* (1985), foram cortados fragmentos com cerca de 5 cm² em cada folha inoculada de *C. arabica* S4 Agaro, 24 horas após a inoculação. Estes fragmentos depois de secos foram pincelados com uma camada de verniz transparente de modo a que todo o fragmento ficasse coberto. Depois de seco o verniz foi destacado com a ajuda de uma pinça o que permitiu obter um molde da superfície do fragmento da folha. Os moldes de verniz foram então mergulhados numa mistura de azul de algodão em lactofenol (que cora de azul as estruturas do fungo) na qual foram também montados.

1.2.2. Processo de colonização do fungo

Para observar o processo de colonização do fungo no hospedeiro seleccionaram-se fragmentos de folhas infectadas de *C. arabica* S4 Agaro e efectuaram-se cortes com uma espessura de 20-25 µm, com um micrótomo de congelação. Os cortes foram corados com uma mistura clara de azul de algodão em lactofenol (Rijo & Rodrigues Jr., 1978). Acompanhou-se o evoluir da infecção no interior dos tecidos foliares até ao aparecimento dos sintomas.

1.3. Determinação do salicilato de metilo por SPME-GC-MS

A parte prática deste trabalho consta do estudo do método, respectiva validação, de determinação do MeSA. Seguiu-se a aplicação do método à análise de amostras sãs e inoculadas. O método foi desenvolvido, tendo como referência a metodologia SPME-GC-MS utilizada por Deng *et al.* (2004) para o estudo das folhas do tomateiro infectadas por vírus do mosaico do tabaco. Este foi o único método localizado na bibliografia actualmente disponível que utiliza a microextracção em fase sólida para o estudo do MeSA em plantas.

1.3.1. Preparação das amostras a partir de tecido fresco

➤ “Pós de azoto”

As amostras *C. arabica* S4 Agaro e Caturra foram preparadas a partir de tecido foliar fresco, em média cerca de 2 pares de folhas por amostra (2-3 g de massa fresca) de acordo com o método descrito por Deng *et al.* (2004). Às folhas colhidas foi-lhes retirada a nervura central com auxílio de uma lâmina. Em seguida foram congeladas em azoto líquido, colocadas num almofariz de porcelana e maceradas até obtenção de um pó. Quando não foram analisadas de imediato pelo equipamento GC-MS, as amostras (cerca de 0,5g ou 2g de pó de azoto), foram guardadas a - 80°C até serem utilizadas.

1.3.2. Equipamento e reagentes

1.3.2.1. Equipamento e utensílios

- Balança Analítica *Sartorius Analytic AC 210 P*
- Sistema de GC-MS constituído por cromatógrafo de fase gasosa *Shimadzu* modelo GC-2010 e espectrómetro de Massa *Shimadzu* modelo GCMS-QP 2010, equipado com amostrador automático: AOC – 5000. Sistema de aquisição e tratamento de dados *GCMS solution da*

Shimadzu. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida *DB – 5MS* da *J&W scientific*, com 30,0 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura do filme.

- Fibra de PDMS (100 µm, 23 gauge needle) da *Supelco*
- Vials de rosca de 20 ml e 10 ml da *La-Pha-Pack*
- Septos de silicone branco e PTFE vermelho, dureza 35º, 1,3 mm de espessura, da *Gerstel*
- Micropipetas: Eppendorf P20, P100 e P1000 e Finnpiquette P5000

1.3.2.2. Reagentes

Salicilato de metilo (Sigma M6757), salicilato de etilo (Sigma 84220) fornecidos pela Sigma Aldrich (Anexo 2), etanol absoluto (PA 121086.1212) da Panreac. A água utilizada foi de qualidade ultrapura, obtida por sistema Milli-Q.

1.3.3. Procedimento experimental

1.3.3.1. Preparação das soluções dos padrões externo (salicilato de metilo) e interno (salicilato de etilo)

A solução-mãe dos padrões de MeSA e EtSA, foi preparada com concentrações entre 1,0 e 100 mg/ml numa mistura água:etanol (90:10). A partir da solução-mãe, foram feitas as diluições para testar concentrações menores. O volume de solução injectado para o *vial* foi de 40 µl.

1.3.3.2. Microextração em fase sólida (SPME)

1.3.3.2.1. Optimização das condições de extração

Utilizaram-se soluções de MeSA e amostras de *C. arabica* S4 Agaro e Caturra, fortificadas com soluções de MeSA com concentrações entre 1 e 50 ppb. Foram estudados os seguintes parâmetros:

- a) Temperatura de extração: entre 20 e 70°C
- b) Tempo de extração: entre 20 e 90 min
- c) Volume do *vial*: 10 e 20 ml

1.3.3.2.2. Condições de extração adoptadas

As condições de extração adoptadas neste trabalho, em consequência do respectivo estudo de optimização, foram as seguintes:

- a) Temperatura de extracção: 30°C para o padrão de MeSA, 60°C para as amostras
- b) Tempo de extracção: 40 minutos para o padrão de MeSA, 60 minutos para as amostras
- c) Volume do *vial*: 20 ml

1.3.3.3. Análise por cromatografia gás-líquido acoplado à espectrometria de massa (GC-MS)

1.3.3.3.1. Condições cromatográficas

- Temperatura do injector: 270°C
- Programação do forno: 40 °C durante 2 min, rampa de temperatura a 15 °C.min⁻¹ até 270 °C e manteve-se a temperatura mais 20 min.
- Temperatura da fonte de iões: 250°C
- Modo de injeção: *split* ou *splitless*
- Tempo de dessorção: 3 min.
- Caudal do fluxo de purga: 3,0 ml.min⁻¹
- Gás de arraste: Hélio (He)
- Velocidade linear do gás de arraste: 51 cm.s⁻¹
- Pressão de gás de arraste: 28,8 KPa

1.3.3.3.2. Condições de espectrometria de massa

A ionização foi efectuada pelo modo do impacto electrónico (IE), com electrões de energia 70 eV e os iões foram detectados na gama de m/z 40 a 450. Tendo em conta o espectro de massa obtido em modo *SCAN*, foram seleccionados os valores de m/z mais importantes.

Para a análise no modo *SIM* utilizaram-se os seguintes iões respectivos para salicilato de metilo (MeSA): m/z 65, 92, 120 e 152 e para o salicilato de etilo (EtSA): m/z 65, 92, 120 e 166.

1.3.3.4. Análise quantitativa das amostras

A quantificação de MeSA foi efectuada em uma única amostra inoculada com ferrugem alaranjada. Utilizou-se o método do padrão externo aplicado a uma curva de calibração do MeSA com seis níveis de concentração em duplicado utilizando as seguintes concentrações: 1,5; 3; 5; 10; 30 e 50 ppb MeSA (Quadro 7).

1.3.4. Validação do método

A validação do método foi efectuada pelo método do padrão externo, utilizando o salicilato de metilo (MeSA) e pelo método do padrão interno, utilizando o salicilato de etilo (EtSA). Foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Especificidade: estudo do tempo de retenção do padrão externo (MeSA) e padrão interno (EtSA) e características da matriz das amostras.
- Limite de detecção: estudo da quantidade mínima de padrão externo (MeSA) detectada pelo equipamento.
- Linearidade: estudo das curvas de calibração do padrão externo (MeSA) e com padrão interno (EtSA) e amostras fortificadas.
- Precisão: estudo da repetibilidade de padrões externo (MeSA) e interno (EtSA) ou amostras fortificadas.
- Exactidão: estudo da percentagem de recuperação do padrão externo (MeSA) em amostras fortificadas.

1.3.5. Tratamento dos resultados

O tratamento dos resultados foi realizado através do Software GCMS *solution* da *Shimadzu* e pelo programa Excel do Microsoft Office. As ferramentas estatísticas do Excel foram utilizadas para estudo da linearidade e da repetibilidade do método. Nos ensaios de linearidade aplicou-se a regressão linear pelo método dos mínimos quadrados para a equação da recta e obteve-se o coeficiente de determinação (R^2). Nos ensaios de repetibilidade estimou-se o desvio padrão relativo (DPR) para avaliar a dispersão de resultados entre amostras iguais.

2. Resultados e Discussão

2.1. Processo de infecção

Ao contactarem com a página inferior das folhas do cafeeiro, e na presença de água, os uredósporos germinaram emitindo o tubo germinativo na extremidade do qual se forma o apressório (1ª estrutura de infecção) sobre o estoma (Figura 9). Não foram encontradas diferenças na germinação de uredósporos e na formação de apressórios nas duas interações estudadas.

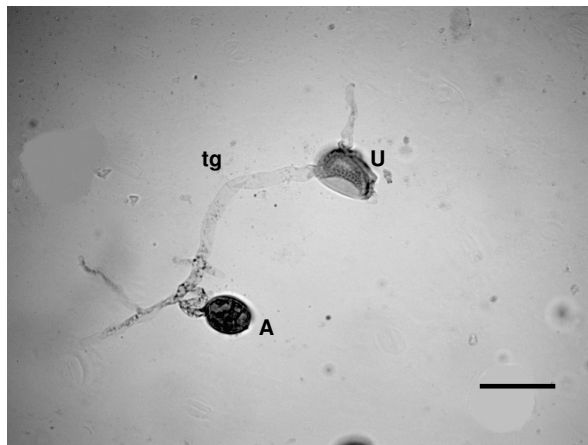


Figura 9. Uredósporo germinado com apressório formado 24 horas após a inoculação. Uredósporo (U); tubo germinativo (tg) e apressório (A). Barra = 80µm

Na interação incompatível o fungo cessou o seu crescimento nas primeiras fases do processo de infecção: apressório, hifa de penetração, âncora e com menor frequência na fase de célula- -mãe do haustório com formação de um a três haustórios (Figura 10 a 12).

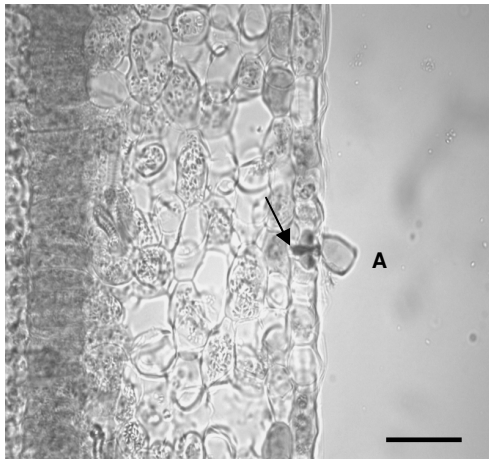


Figura 10. Apressório vazio (A) com hifa de penetração (seta), 24 horas após a inoculação. Barra = 120 μ m

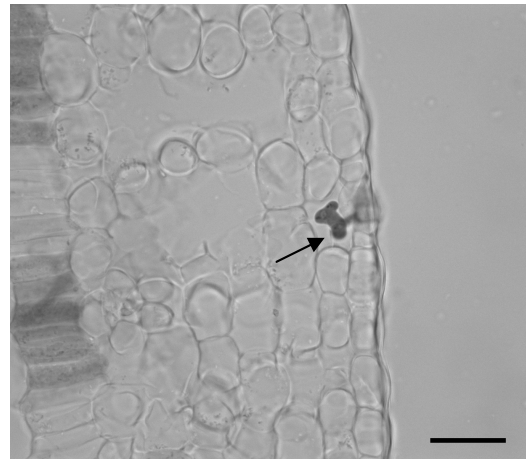


Figura 11. Fase de âncora (seta) 24 horas após a inoculação. Barra = 90 μ m

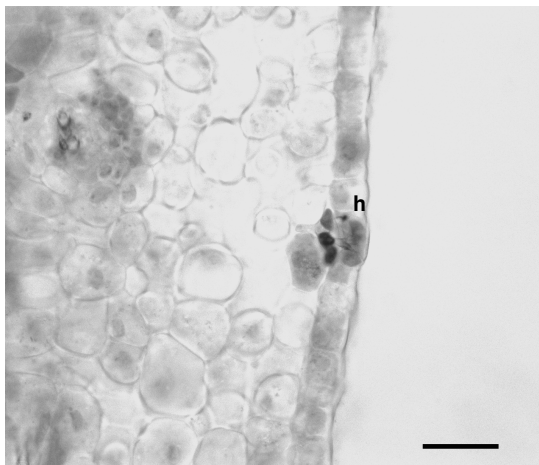


Figura 12. Haustório (h) na célula subsidiária do estoma, 48 horas após a inoculação. Barra = 100 μ m

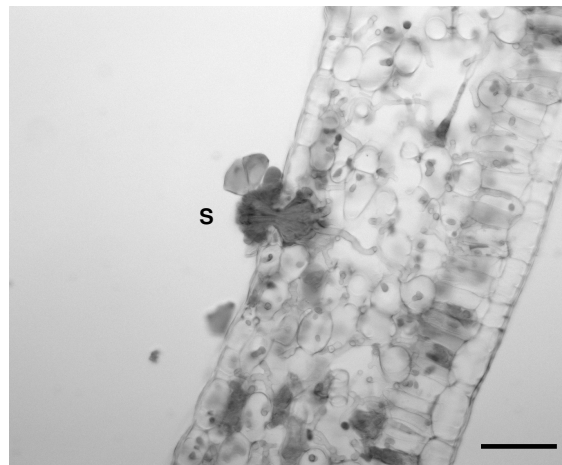


Figura 13. Hifas intercelulares, haustórios e formação de soro uredospórico (S), 21 dias após a inoculação. Barra = 180 μ m

Pelo contrário na interacção compatível na maioria das zonas de infecção o fungo cresceu sem aparente inibição, apresentando numerosas hifas intercelulares e haustórios em todo o mesofilo, acabando por originar esporulação cerca de 21 dias após a inoculação (Figura 13).

Com base na escala de classificação qualitativa de D' Oliveira (1954-57) o tipo de reacção observado na interacção compatível foi do tipo 4, esporulação abundante (Figura 14A), e na interacção incompatível os cafeeiros apresentaram o tipo de reacção *flt*, pontuações cloróticas com tumefacção (Figura 14B).



Figura 14. Tipos de reacção observados nas interacções *C. arabica* – *H. vastatrix* de acordo com a escala de classificação qualitativa de D'Oliveira (1954-57). (A) – Reacção 4 - Interacção compatível; (B) – Reacção *flt* - Interacção incompatível.

2.2. Determinação do salicilato de metilo

2.2.1. Identificação do MeSA e do EtSA

Numa fase inicial do trabalho, começou-se por injectar soluções dos padrões de MeSA e de EtSA de modo a obter espectros de massa destes compostos, e compará-los com a biblioteca de espectros.

➤ Identificação do padrão externo (MeSA)

O salicilato de metilo (MeSA) apresenta o tempo de retenção (t_r) de 7,813 min. (Figura 15) e as massas seleccionadas para aquisição no modo *SIM* foram: 65, 92, 120 e 152 m/z . A selecção das massas passa pela a sua intensidade (em percentagem) no espectro de massas (Figura 16).

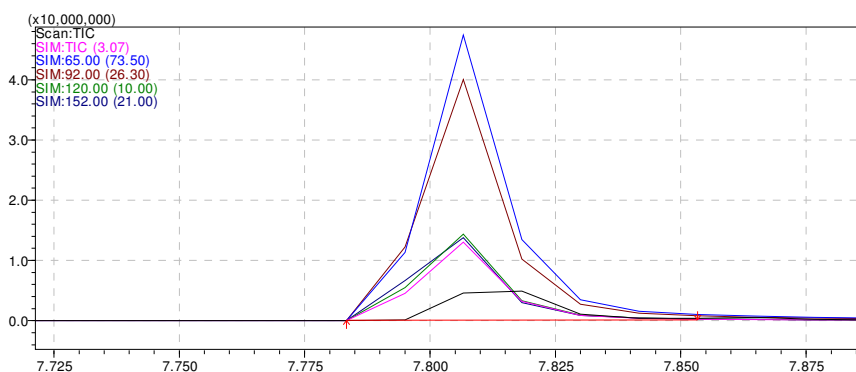


Figura 15. Cromatograma do padrão salicilato de metilo (padrão externo).

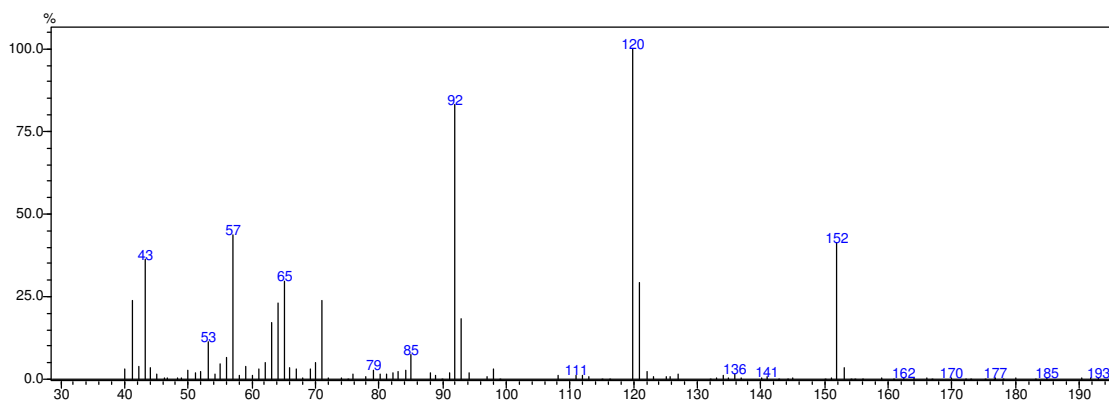


Figura 16. Espectro de massas obtido com o padrão salicilato de metilo.

As massas seleccionadas a partir do padrão foram as mesmas que as do trabalho de Deng *et al.* (2004). No nosso espectro de massas do padrão MeSA, não houve a identificação directa da massa 65 m/z , sendo esta a terceira massa mais importante. Este problema poderá ser justificado como um erro por parte da análise do equipamento. Para confirmar o resultado obtido, recorreremos à biblioteca espectral do equipamento (Anexo 3).

Neste trabalho, a análise dos resultados é feita, na maioria, apenas para a massa MeSA 120 m/z , uma vez que esta é a massa que apresenta o pico base e os resultados com as outras massas são idênticos.

➤ Identificação do padrão interno (EtSA)

O tempo de retenção do salicilato de etilo (EtSA) é 8,577 min. e as principais massas de aquisição são: 65, 92, 120 e 166 m/z (Figura 17 e 18).

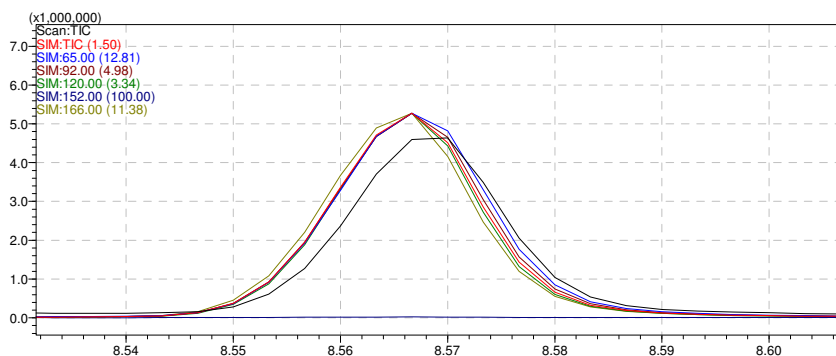


Figura 17. Cromatograma do salicilato de etilo (padrão interno).

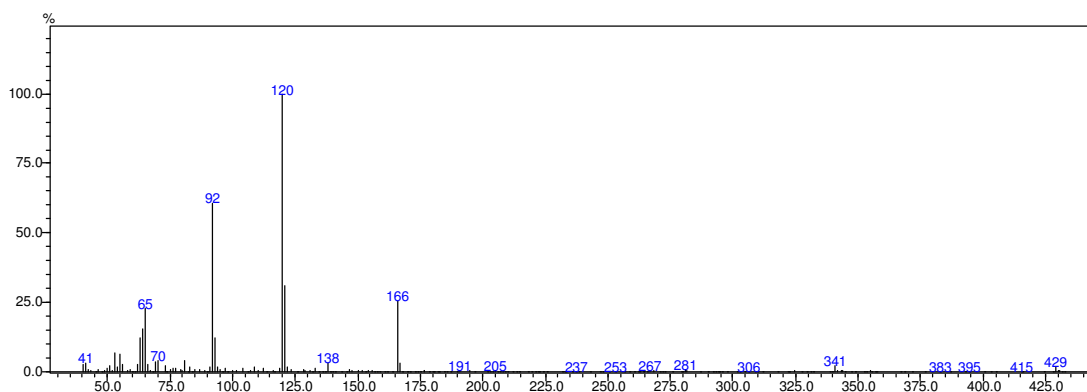


Figura 18. Espectro de massas obtido com o padrão salicilato de etilo.

As massas seleccionadas para o padrão EtSA foram confirmadas directamente pelo espectro de massa do padrão, sem ter de recorrer à biblioteca espectral do equipamento.

2.2.2. Escolha do modo de injeção a utilizar nos ensaios de optimização

No trabalho apresentado por Deng *et al.* (2004) foi utilizado o modo *splitless* devido às baixas concentrações do composto na amostra em estudo, já que para facilitar a sua identificação no cromatograma, seria importante ser uma injeção sem repartição. No presente trabalho, testaram-se os dois modos de injeção. Procedeu-se, assim à comparação dos resultados obtidos com injeções em modo *split* e *splitless* com padrão MeSA na concentração de 0,1 ppb a uma temperatura de extracção de 60°C e tempo de extracção de 30 minutos (Figuras 19 e 20).

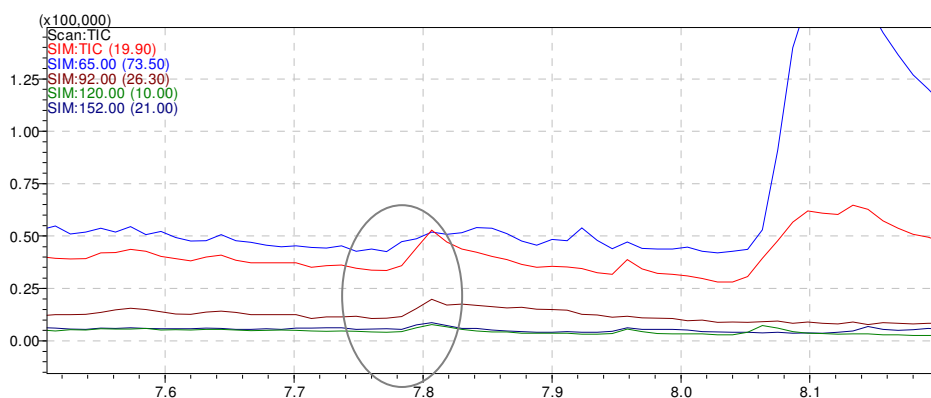


Figura 19. Cromatograma do padrão MeSA injectado no modo *split* 1:5.

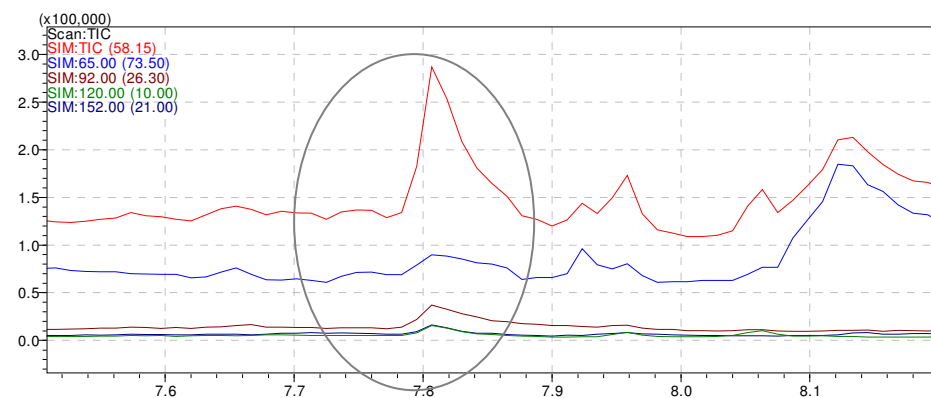


Figura 20. Cromatograma do padrão MeSA injectado no modo *splitless*.

Os resultados obtidos demonstraram que, no nosso trabalho, também era necessário a utilização do modo *splitless*, dada a baixa concentração do composto em estudo na amostra.

2.2.3. Optimização das condições de SPME

2.2.3.1. Temperatura de extracção

Avaliou-se o efeito da temperatura de extracção na análise do padrão MeSA e das amostras *C. arabica* S4 Agaro fortificadas (Figura 21 e 22).

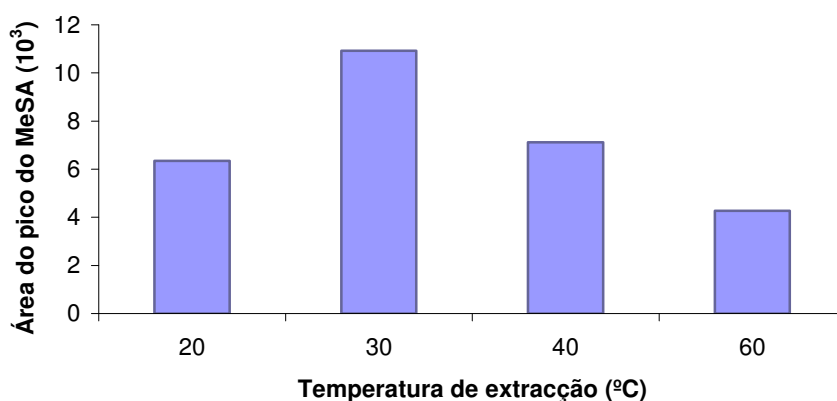


Figura 21. Efeito da temperatura na área do pico ($m/z = 120$) obtido na análise de uma solução padrão MeSA a 1 ppb.

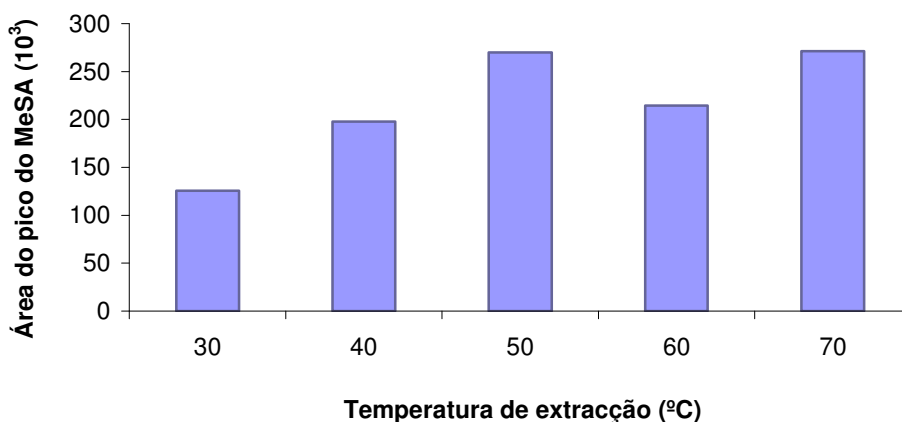


Figura 22. Efeito da temperatura na área do pico ($m/z = 120$) obtido na análise de amostras de folhas de *C. arabica* S4 Agaro fortificadas com solução padrão MeSA a 50 ppb.

Verificou-se que a temperatura óptima para a extracção do padrão é 30°C enquanto que para as amostras fortificadas é 70°C. Uma vez que as diferenças observadas nos resultados obtidos para as temperaturas, entre 50°C e 70°C, para as amostras fortificadas, são pequenas e se devem a variações do próprio método de análise, optou-se por realizar a extracção a 60°C, a temperatura usada no método desenvolvido por Deng *et al.* (2004).

2.2.3.2. Tempo de extracção

Estudou-se o efeito do tempo de extracção para uma solução do padrão MeSA e para amostras *C. arabica* S4 Agar fortificadas (Figura 23 e 24).

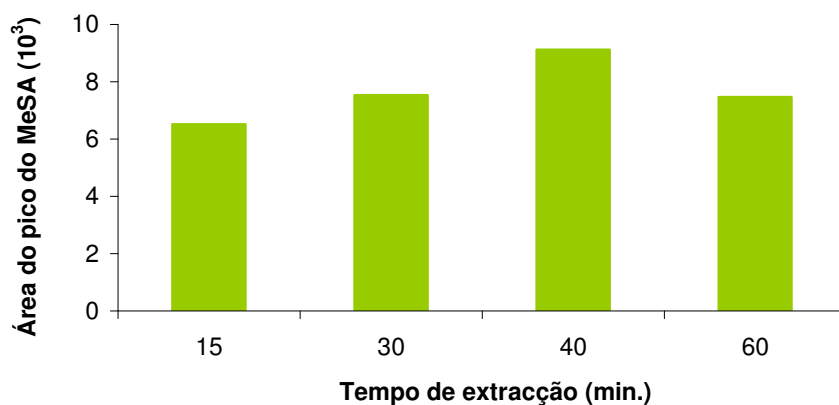


Figura 23. Efeito do tempo de extracção na área do pico ($m/z = 120$) do padrão de MeSA a 1 ppb.

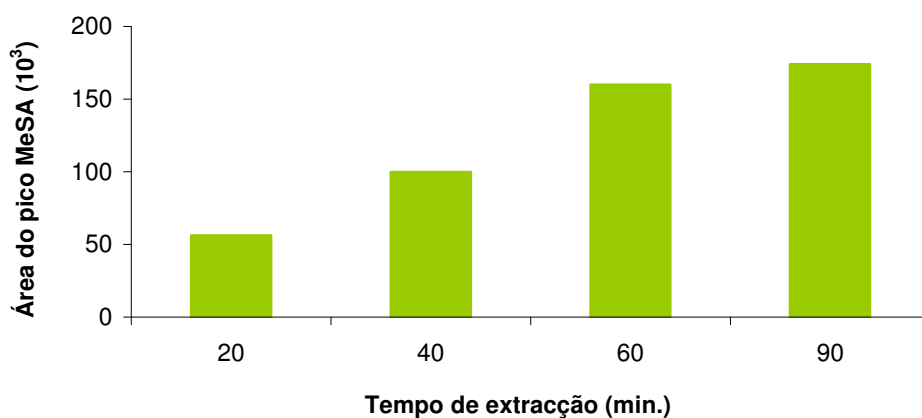


Figura 24. Efeito do tempo de extracção na área do pico ($m/z = 120$) das amostras *C. arabica* S4 Agar fortificadas com 50 ppb de MeSA.

Verificou-se que o tempo de extracção ideal para o padrão de MeSA é 40 minutos enquanto que para as amostras fortificadas o tempo de extracção ideal é de 90 minutos, tal como em Deng *et al.* (2004). No entanto, uma vez que a área do pico tende a estabilizar aos 60 minutos, optou-se por utilizar este tempo para a extracção.

2.2.3.3. Volume do *vial*

Como neste trabalho se analisam baixas concentrações de MeSA, testou-se o volume do *vial* para sabermos se, diminuindo o volume do *headspace* a que a fibra estava exposta se obtinham melhores resultados. Para o estudo do volume do *vial* utilizou-se uma solução do padrão de MeSA com a concentração de 2 ppb e *vials* com 10 e 20 ml de volume (Figura 25 e 26).

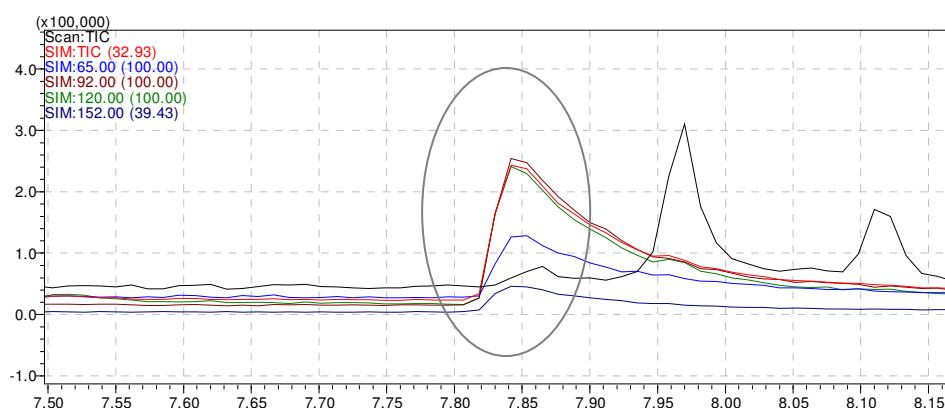


Figura 25. Cromatograma do padrão de MeSA com um *vial* de 10 ml.

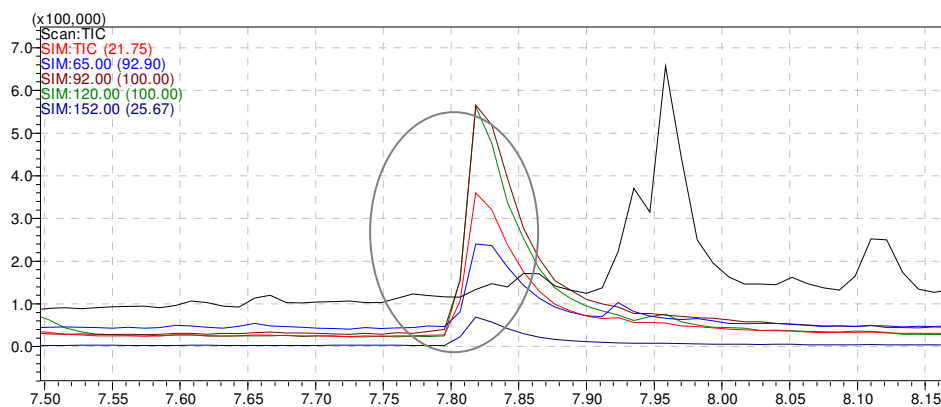


Figura 26. Cromatograma do padrão de MeSA com um *vial* de 20 ml.

Os resultados mostraram que com o *vial* de 20 ml se obtêm picos de MeSA no cromatograma mais intensos, com menos interferência e, por esse motivo, resolvemos usar os *vials* de 20 ml ao longo do trabalho.

2.2.4. Validação do método

2.2.4.1. Especificidade

Começou-se por identificar os principais compostos presentes nos cafeeiros *C. arabica* Caturra e S4 Agaro para caracterizar as amostras e tentar identificar quais os compostos que têm tempo de retenção próximo do MeSA e do EtSA (Anexo 4).

Fez-se a sobrecarga de uma amostra *C. arabica* Caturra com soluções a 800 ppb do padrão de MeSA e EtSA, obtendo-se o cromatograma apresentado na Figura 27.

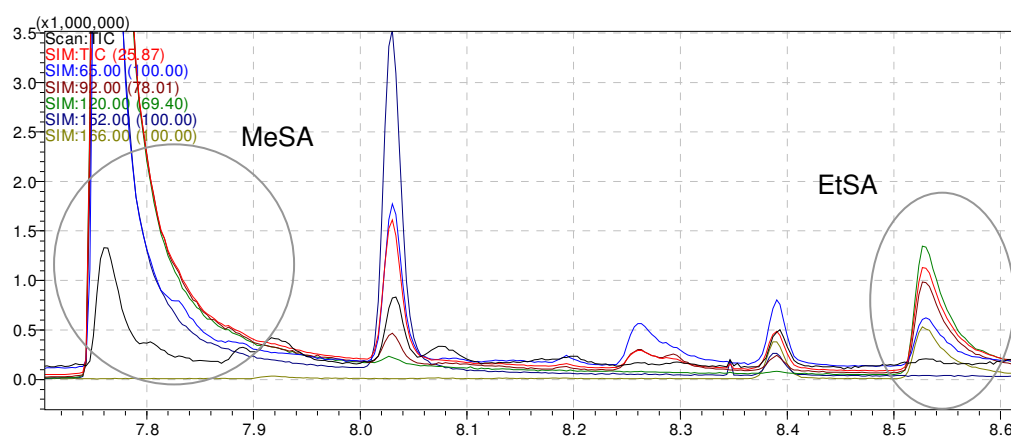


Figura 27. Cromatograma da matriz da amostra *C. arabica* Caturra fortificada com os padrões MeSA e EtSA a 800 ppb.

O cromatograma apresenta o tempo de retenção do padrão interno (EtSA) próximo do tempo de retenção do composto principal (MeSA), com um bom pico cromatográfico e sem compostos interferentes presentes na matriz.

2.2.4.2. Limite de detecção

A sensibilidade do método foi avaliada com base no limite de detecção. Foram testadas várias concentrações do padrão de MeSA. As figuras 28 e 29 representam os cromatogramas obtidos com as concentrações 50 e 100 ppt, respectivamente, em sobreposição com o branco da fibra.

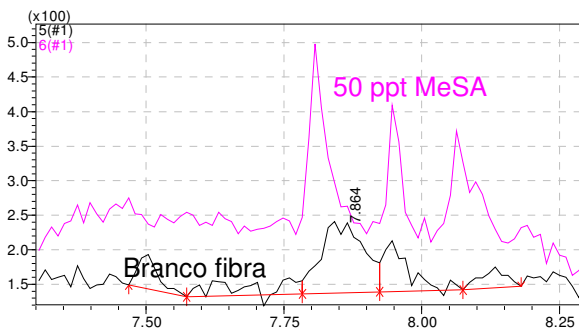


Figura 28. Cromatograma com o limite de detecção do padrão de MeSA (50 ppt) para a massa de aquisição 120 m/z .

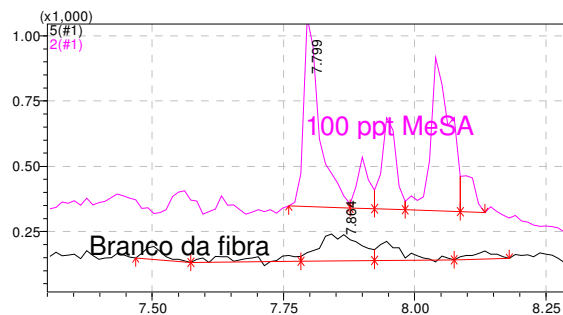


Figura 29. Cromatograma com o limite de detecção do padrão MeSA (100 ppt) para a massa de aquisição 120 m/z .

O estudo realizado, segundo o método da relação sinal-ruído de valores aceitáveis de 3:1, permitiu estimar o valor de 50 ppt como limite de detecção do método, inferior ao obtido por Deng *et al.* (2004), que foi de 10 ppm.

2.2.4.3. Linearidade da curva de calibração

2.2.4.3.1. Método do padrão externo

As concentrações do padrão externo (MeSA) foram escolhidas com base nas concentrações de MeSA observadas em folhas de tomateiro infectadas por vírus do mosaico do tabaco, no trabalho desenvolvido por Deng *et al.* (2004). Efectuaram-se as curvas de calibração para o padrão de MeSA com diferentes níveis de concentração: 0,1 ppb, 0,2 ppb, 0,4 ppb, 0,8 ppb, 1,5 ppb e 3 ppb MeSA (Quadro 5) e 1,5 ppb, 3 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 30 ppb e 50 ppb MeSA (Quadros 6). Para as amostras *C. arabica* Caturra fortificadas com o padrão de MeSA efectuou-se a curva de calibração com os seguintes níveis de concentração: 100 ppb, 150 ppb, 200 ppb, 300 ppb, 400 ppb e 500 ppb MeSA (Quadro 7).

Quadro 5. Curva de calibração de salicilato de metilo (m/z 65, 92, 120, 152)* .

Massas m/z	Equação	Coefficiente de determinação (R^2)
65	$y = 9521,4x - 1101,2$	0,985
92	$y = 21943x - 4093$	0,973
120	$y = 18799x - 3108,7$	0,964
152	$y = 9861,7x - 1847,7$	0,966

* Níveis de concentração: 0,1 ppb, 0,2 ppb, 0,4 ppb, 0,8 ppb, 1,5 ppb e 3 ppb

Quadro 6. Curva de calibração de salicilato de metilo (m/z 65, 92, 120, 152)* .

Massas m/z	Equação	Coefficiente de determinação (R^2)
65	$y = 10862x - 22017$	0,993
92	$y = 25372x - 52152$	0,992
120	$y = 23338x - 51136$	0,989
152	$y = 11350x - 25052$	0,989

* Níveis de concentração: 1,5 ppb, 3 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 30 ppb e 50 ppb

Quadro 7. Curva de calibração de salicilato de metilo em amostras de *C. arabica* Caturra (m/z 65, 92, 120, 152)*.

Massas m/z	Equação	Coefficiente de determinação (R^2)
65	$y = 325,98x + 48334$	0,521
92	$y = 717,96x + 124359$	0,502
120	$y = 619,3x + 104539$	0,508
152	$y = 289,69x + 44377$	0,521

* Níveis de fortificação: 100 ppb, 150 ppb, 200 ppb, 300 ppb, 400 ppb e 500 ppb

As curvas de calibração obtidas com o padrão apresentam um coeficiente de determinação superior a 0,98 muito próximo do valor ideal de 0,99. A recta de calibração obtida com a amostra apresenta um coeficiente de determinação baixo (cerca de 0,52), o que significa que o resultado obtido, para a quantificação do composto, apresenta uma margem de erro ou incerteza elevada, com uma dispersão no conjunto de pontos da recta de calibração.

2.2.4.3.2. Método do padrão interno

Para minimizar erros instrumentais utilizou-se o EtSA como padrão interno e considerou-se o valor intensidade m/z 166.

Efectuaram-se duas curvas de calibração para o MeSA, variando entre 1,5 e 120 ppb, em que a concentração de EtSA foi de 50 ppb (Quadro 8). Também foi feita uma curva de calibração de amostras de *C. arabica* Caturra fortificadas (Quadro 9) com MeSA, com concentração entre 400 e 1200 ppb e padrão interno (EtSA) a 800 ppb.

Quadro 8. Curvas de calibração de salicilato de metilo (m/z 65, 92, 120, 152) utilizando o salicilato de etilo (m/z 166) como padrão interno*.

Massas MeSA / Massas EtSA	Equação	Coefficiente de determinação (R^2)
65/166	$y = 0,0008x + 0,0059$	0,978
92/166	$y = 0,002x - 0,0024$	0,967
120/166	$y = 0,002x - 0,0029$	0,959
152/166	$y = 0,0009x - 0,0014$	0,953

* Níveis de fortificação: 1,5 ppb, 3 ppb, 3 ppb, 5 ppb, 10 ppb, 20 ppb, 30 ppb, 40 ppb, 50 ppb, 80 ppb, 120 ppb (MeSA) e 50 ppb (EtSA).

Quadro 9. Curva de calibração de salicilato de metilo em amostras de *C. arabica* Caturra (m/z 65, 92, 120, 152) utilizando o salicilato de etilo (m/z 166) como padrão interno*.

Massas MeSA / Massas EtSA	Equação	Coefficiente de determinação (R^2)
65/ 166	$y = 0,0174x + 0,6416$	0,945
92/166	$y = 0,0422x + 1,9486$	0,926
120/166	$y = 0,0476x + 2,1306$	0,924
152/166	$y = 0,0202x + 0,8209$	0,925

* Níveis de fortificação: 400 ppb, 800 ppb, 1200 ppb (MeSA) e 800 ppb (EtSA).

As curvas de calibração obtidas utilizando apenas soluções de padrões, apresentam um coeficiente de determinação de 0,96.

O efeito da utilização do padrão interno (PI) fez-se sentir nas amostras fortificadas, onde se obteve valores de R^2 superiores aos anteriormente obtidos com o padrão externo (Quadro 7).

2.2.4.4. Repetibilidade

2.2.4.4.1. Método do padrão externo

Efectuou-se o estudo da repetibilidade do método, utilizou-se soluções do padrão MeSA a 0,8 ppb e a 10 ppb bem como das amostras *C. arabica* S4 Agaro fortificadas com soluções de MeSA a 50 ppb e 1,14 ppm (Quadro 10 e 11).

Quadro 10. Repetibilidade com soluções de padrão MeSA.

Massas m/z	Concentração do padrão MeSA					
	0,8 ppb*			10 ppb*		
	Média	DP	DPR %	Média	DP	DPR %
65	7174	2084	29	68984	3521	5
92	16417	5218	32	158135	7804	5
120	14726	5081	35	141837	7457	5
152	7084	2305	33	70290	4252	6

* n = 10

Quadro 11. Repetibilidade em amostras fortificadas.

Massas m/z	Concentração do padrão MeSA								
	50 ppb*			1,14 ppm**			1,14 ppm***		
	Média	DP	DPR %	Média	DP	DPR %	Média	DP	DPR %
65	39133	20813	53	231932	86716	37	216533	53314	25
92	72674	19798	27	568388	213762	38	520545	130741	25
120	75495	23713	31	574681	225059	39	501367	146889	29
152	38056	17713	47	264433	102255	39	234164	66120	28

* *C. arabica* S4 Agaro, n=7; ** *C. arabica* Caturra, n=9; *** *C. arabica* S4 Agaro, n=5

Verificou-se que, para uma concentração de MeSA de 10 ppb, a repetibilidade apresenta um desvio padrão relativo inferior a 20%. No entanto, todos os outros ensaios apresentam um desvio padrão relativo superior a 20%, não sendo aceitáveis para a validação do método.

2.2.4.4.2. Método do padrão interno

Procedeu-se ao ensaio de repetibilidade utilizando uma solução de MeSA e EtSA (PI) a 50 ppb. Paralelamente fortificou-se uma amostra de *C. arabica* Caturra com MeSA a 1,14 ppm e EtSA a 1,01 ppm (PI) (Quadro 12 e 13).

Quadro 12. Repetibilidade com soluções de padrão de MeSA e EtSA.

Massas MeSA / Massas EtSA	Concentração do padrão MeSA		
	50 ppb*		
	Média	DP	DPR %
65/166	0,0195	0,0034	18
92/166	0,0588	0,0059	10
120/166	0,0627	0,007	11
152/166	0,0263	0,0036	14

* n = 10; EtSA a 50 ppb

Quadro 13. Repetibilidade com amostras fortificadas.

Massas MeSA / Massas EtSA	Concentração do padrão MeSA		
	1,14 ppm*		
	Média	DP	DPR %
65/65	2,38104	0,316491	13
92/92	2,31563	0,236293	10
120/120	1,63093	0,216777	13
65/92	0,92539	0,109456	12
65/120	0,64367	0,089774	14

* *C. arabica* Caturra n = 4

Os resultados apresentam desvios padrões relativos inferiores a 20%, tanto para as soluções de padrões como para as amostras fortificadas, para os gamas de concentrações estudadas.

2.2.4.5. Exactidão

2.2.4.5.1. Método do padrão externo

A percentagem de recuperação do padrão de MeSA foi testada para a concentração de 400 ppb e 800 ppb (Quadro 14 e 15).

Quadro 14. Percentagem de recuperação do salicilato de metilo (*m/z* 65, 92, 120, 152)*.

Massas <i>m/z</i>	% recuperação do padrão
65	52
92	39
120	16
152	21

* *C. arabica* Caturra fortificada com 400 ppb

Quadro 15. Percentagem de recuperação do salicilato de metilo (m/z 65, 92, 120, 152)*.

Massas m/z	% recuperação do padrão
65	17
92	15
120	14
152	14

* *C. arabica* Caturra fortificada com 800 ppb

A percentagem de recuperação é baixa, com valores para a massa 120 m/z MeSA de 16% e 14% na gama de concentrações estudadas (400 ppb e 800 ppb MeSA).

2.2.5. Quantificação do salicilato de metilo em folhas de *C. arabica*

2.2.5.1. Estudo da metodologia de preparação das amostras

Após a preparação da amostra “pós de azoto”, tal como utilizada por Deng *et al.* (2004), fizeram-se alguns ensaios que tinham como objectivo avaliar a estabilidade da amostra, já que dispondo o equipamento de um amostrador automático, seria possível deixar as amostras a serem analisadas, por exemplo durante a noite, o que implicaria a obtenção de uma amostra estável ao longo do tempo de permanência no amostrador.

Verificou-se que, quando se procedia à análise da mesma amostra ao longo do tempo, o sinal relativo ao analito aumentava, pelo que o processo de preparação da amostra não estava a permitir a obtenção de uma amostra estável (Anexo 1).

Por isso, experimentou-se outra metodologia utilizando acetona “pós de acetona” (Anexo 1).

Verificou-se, contudo que na zona do tempo de retenção do MeSA aparece outro composto identificado pela biblioteca espectral como dodecano, um composto que faz parte da composição da acetona utilizada, o que impossibilitou a utilização deste método.

As dificuldades encontradas na estabilização das amostras de folhas de cafeeiro mostram a não adequação do método de preparação de amostras de folhas de tomateiro de Deng *et al.* (2004).

Trata-se, de facto, de material com características distintas dadas as diferenças consideráveis entre as respectivas plantas: o tomateiro é uma planta anual, enquanto o cafeeiro se trata de uma planta perene.

2.2.5.2. Efeito da variedade e da idade da folha

Verificou-se que as amostras das variedades *C. arabica* Caturra e S4 Agaro estudadas apresentavam salicilato de metilo nas suas folhas jovens e adultas (Anexo 5).

A identificação do salicilato de metilo nas amostras foi confirmada pela biblioteca espectral com um índice de semelhança de 92%.

Comparando as variedades, a *C. arabica* Caturra é a que apresenta mais quantidade de MeSA.

Em relação à idade das folhas, as folhas jovens apresentaram valores mais elevados de salicilato de metilo (Figura 30).

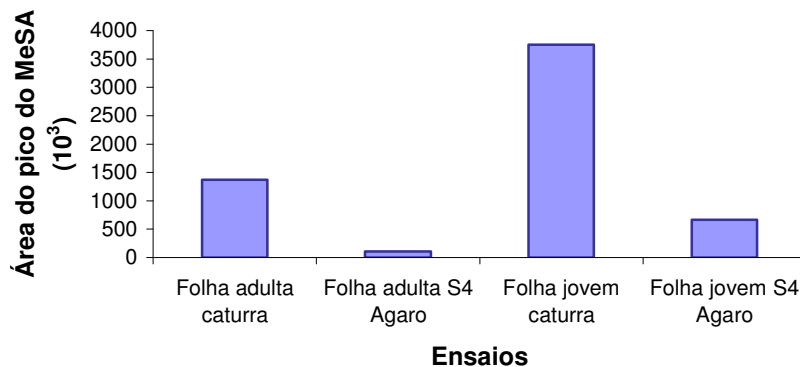


Figura 30. Área correspondente ao pico do MeSA ($m/z = 120$) presente nas folhas jovens e adultas de plantas das variedades *C. arabica* S4 Agaro e *C. arabica* Caturra.

A presença de MeSA em *C. arabica* já tinha sido referida anteriormente por Kaiser (2000). Até à data, o MeSA é indicado como um sinalizador volátil envolvido em comunicações interespecíficas e intraespecíficas nas plantas durante a infecção do patógeno ou antes da infecção se desenvolver (Seskar *et al.*, 1998). O MeSA é produzido pela metilação, mecanismo desenvolvido por ácido salicílico pela acção da enzima SA carboxil metiltransferase (SAMT), que pode convertê-lo de novo a ácido salicílico em tecidos específicos da planta (Seskar *et al.*, 1998; Shulaev *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 2004). No entanto o salicilato de metilo sozinho é ineficaz na indução de uma resposta de defesa, mas poderá ter a função de molécula sinalizadora volátil (Loake & Grant, 2007).

2.2.5.3. Quantificação do MeSA ao longo do processo de infecção por *H. vastatrix*

Foi feita a quantificação de MeSA em folhas de *C. arabica* S4 Agaro após inoculação com *H. vastatrix* (interacção incompatível). A colheita das amostras foi feita 0, 17, 24, 30, 42, 48 e 72 horas após a inoculação. Como testemunha foram utilizadas folhas não inoculadas (sãs) obtidas nos mesmos intervalos de tempo. Foram pulverizadas com água destilada e mantidas em câmara de incubação durante 24 horas, nas mesmas condições que as inoculadas.

Com o objectivo de testar o efeito da congelação a -80°C destas amostras, foi também feita a quantificação do MeSA em amostras congeladas após terem sido preparadas com azoto.

A quantificação do composto foi realizada a partir da área do pico MeSA $120\ m/z$ por conversão em unidades de concentração, utilizando a equação da curva de calibração de padrão externo MeSA da massa $120\ m/z$ (Quadro 6).

Verifica-se que não foi possível observar diferenças entre as folhas inoculadas e as folhas sãs, tendo os valores sido, quase sempre, sobrepostos (Figura 31, Anexo 6).

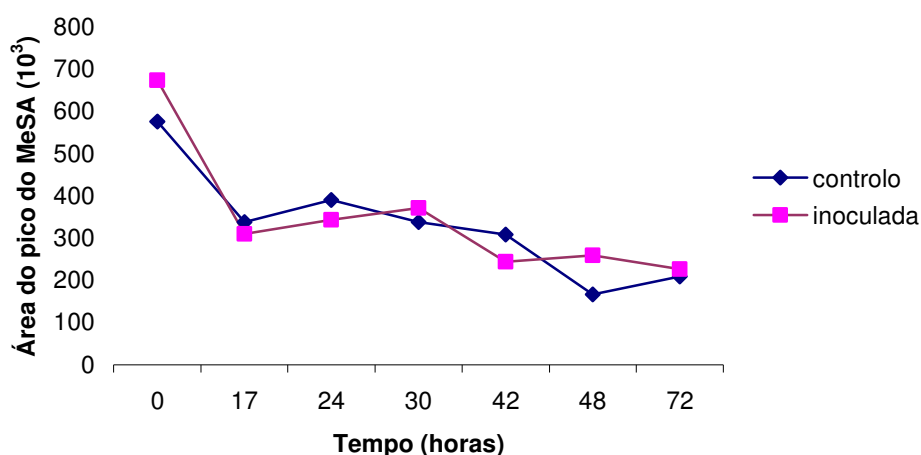


Figura 31. Detecção da massa $120\ m/z$ do salicilato de metilo nas amostras de *C. arabica* S4 Agaro inoculadas e controlo.

Foi observado uma certa variação da quantidade do MeSA ao longo da experiência, no entanto será necessário fazer mais inoculações e estudar outros tempos logo após a inoculação (12, 15, 18, 20 horas) para perceber o padrão de variação da quantidade de MeSA e a sua relação com a resistência ou não.

Comparando os resultados anteriores com os das amostras congeladas, verificamos que estes perderam salicilato de metilo tanto nas plantas controlo como nas folhas inoculadas (Anexo 6).

3. Conclusões

1) O método SPME-GC-MS proposto por Deng *et al.* (2004), utilizado no estudo de folhas do tomateiro, apresentou dificuldades para as amostras de cafeeiro. Uma das maiores dificuldades na aplicação do método foi a estabilização das amostras.

Em trabalhos futuros será essencial testar outros métodos de preparação da amostra que permitam a sua melhor estabilização.

2) Em consequência, os parâmetros de validação do método apresentam resultados menos bons. Foi evidenciado a especificidade do método e o seu baixo limite de detecção (50 ppt) mas os restantes parâmetros estudados necessitam de ser reavaliados depois de se resolver o problema da estabilidade das amostras. Contudo, os resultados apontam para uma considerável melhoria com a utilização do salicilato de etilo como padrão interno.

3) Outro aspecto importante a ter em conta neste trabalho, foi o facto de se ter aplicado um método desenvolvido em folhas de tomateiro (Deng *et al.*, 2004), planta anual, com características muito diferentes de uma planta perene, como o cafeeiro. A complexidade das folhas de cafeeiro relativamente às de tomateiro poderá ser a principal razão para as dificuldades encontradas na estabilização das amostras estudadas.

4) Devida às razões apontadas, os seguintes resultados obtidos nas análises realizadas com as folhas do cafeeiro devem ser entendidos como meramente indicativos:

- Presença de MeSA nas folhas de cafeeiro, em teores variáveis com as variedades (Caturra *versus* S4 Agaro) e a idade das folhas (jovens *versus* adultas).

- Dos resultados obtidos (embora muito preliminares), a quantidade de MeSA presente nas folhas infectadas parece não diferir consideravelmente do das folhas sãs. No entanto será necessário realizar mais repetições (inoculações) na interacção incompatível e estudar também a interacção compatível, para analisar o possível envolvimento do MeSA na resposta de defesa do cafeeiro à ferrugem alaranjada.

4. Bibliografia

⇒ Referências bibliográficas

Almeida, C. S. S R.. 2000. *Estudo da reacção de hipersensibilidade na interacção do cafeeiro com a ferrugem alaranjada*. Licenciatura em Engenharia Biotecnológica, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa. 1-18.

Andreasen, K. & Bremer, B., 2000. Combined phylogenetic analysis in the Rubiaceae-Ixoroideae: morphology, nuclear and chloroplast DNA data. *American Journal of Botany*, **87** (11): 1731-1748.

Bettencourt, A.J. & Carvalho, A., 1968. Melhoramento visando a resistência do cafeeiro às ferrugens. *Bragantia* 27: 35-68.

Bettencourt, A. J.,; Lopes, J.; Palma, S., 1992. Factores genéticos que condicionam a resistência às raças de *Hemileia vastatrix* Berk. Et Br. dos clones-tipo dos grupos 1, 2 e 3 de derivados de Híbrido de Timor. *Broteéria Genética XIII* (LXXX): 185-194.

Bettencourt, A.J. & Noronha-Wagner, M., 1971. Genetic factors conditioning resistance of *Coffea arabica* L. to *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Agronomia Lusitana* 31: 285-292.

Bettencourt, A.J.; Noronha-Wagner, M.; Lopes, J., 1980. Factor genético que condiciona a resistência do clone 1343/269 (Híbrido de Timor) à *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. *Broteria Genética* I: 53-58.

Bettencourt, A. J., 1981. *Melhoramento Genético do Cafeeiro*. Junta de Investigações Científicas do Ultramar, Lisboa. 93 pp.

Bettencourt, A. J.; Rodrigues, C. J. Jr., 1988. Principles and practice of coffee breeding for resistance to rust and other diseases. *In: Coffee*. Vol.4. Agronomy, R. J. Clark & R. Macrae Eds, Elsevier Applied Science Publishers LTD., London e New York. 199-234. (citado por Almeida, 2000)

Bridson, D.M. & Verdcourt, B., 2003. Rubiaceae. *In: G. V. Pope (ed.), Flora Zambesiaca*, Royal Botanic Gardens, Kew, UK, **5** (3): 379-720.

Buchanan, B.B.; Gruissem, W.; Jones, R. L., 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants Ed..Ac. Soc. Plant Physiology*.

Cardoso, A. D. S., 1994. *Café: Cultura e tecnologia primária*. Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa, 169 pp.

Charrier, A. & Berthaud, J., 1985. Botanical classification of coffee. *In*: Clifford MN & Wilson KC, Croom Helm, *Coffee: Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage*. London and Sydney. 13-47.

Chasin, A. A. ; Nascimento, E. S.; Ribeiro – Neto, L. M., 1998. *Rev. Brasil. Toxicol* 11: 1-6. (citado por Silva, 2005)

Chevalier, A., 1947. *Les Caféiers du Globe, Eyclopédie Biologique. XXVIII, Fascicule III-Systématique des caféiers et faux-caféieres maladies et insects nuisibles*. Paul Lechevalier editeur, Paris. 356 pp.

Coimbra, P.; 1990. *Curso básico de cromatografia em fase gasosa*. Dias de Sousa, Lda. Póvoa de Santa Iria. (citado por Silva, 1995)

Cros, J.; Trouslot, P.; Anthony, F.; Hamon, S.; Charrier, A., 1998. Phylogenetic analysis of chloroplast DNA variation in *Coffea* L.. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 9: 109-117.

Davis, A. P., 2003. A new combination in *Psilanthus* (Rubiaceae) for Australia, and nomenclatural notes on *Paracoffea*. *Novon* 13: 182-184.

Davis, A. P.; Bridson, D. M.; Rakotonasolo, F., 2005. A reexamination of *Coffea* subgenus *Baracoffea* and comments on the morphology and classification of *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae – Coffeae). *In*: R. C. Keating, V. C. Hollowell, and T. Croat (eds.), *Festschrift for William G. D'Arcy: the legacy of a taxonomist (Monograph in Systematic Botany 104)*. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, Missouri, USA. 394-420.

Davis, A. P.; Govaerts, R.; Bridson, D. M.; Stoffelen, P., 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152: 465-512.

Dean, JV.; Mohammed, L.A.; Fitzpatrick, T., 2005. The formation, vacuolar localization, and tonoplast transport of salicylic acid glucose conjugate in tobacco cell suspension cultures. *Planta* 221: 287-296.

Degani, A. L. G.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C., 1998. Cromatografia: Um breve ensaio. *Química Nova na Escola* 7: 21-25.

Deng, C.; Zhang, X.; Zhang, J.; Qian, J.; Zhu, W., 2003. Rapid determination of salicylic acid in plant materials by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 58: 225-229.

Deng, C.; Zhang, X.; Zhu, W.; Qian, J., 2004. Gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase microextraction method for determination of methyl salicylate and other volatile compounds in leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Anal Biochem* 378: 518-522.

Dickes, G. J.; Nicholas, P. V., 1976. *Chromatography in food analysis*. William Clowes & Sons Limited, London. (citado por Silva, 1995)

Dixon, R.A. & Lamb, C.J., 1990. Molecular communication in interactions between plant and microbial pathogens. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 41: 339-367.

Dixon, R.A.; Achnine, L.; Kota, P.; Liu, C.J.; Reddy, M.S.S.; Wang, L., 2002. The phenylpropanoid pathway and plant defence – a genomics perspective. *Molecular Plant Pathology* 3: 371-390.

D'Oliveira, B., 1954-57. As ferrugens do cafeeiro. *Revista do Café Português* 1 (4): 5-13.

D'Oliveira, B. & Rodrigues Jr., C.J., 1961. O problema das ferrugens do cafeeiro. *Revista do Café Português* 8: 5-50.

Ebel, J. & Scheel, D., 1997. Signals in host-parasite interactions. In: Carroll GC & Tudzynski P, *The Mycota*. Vol.V Part A., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 85-105.

Engelberth, J.; Schmelz, E. A.; Alborn, H. T.; Cardoza, Y. J.; Huang, J.; Tumlinson, J.H., 2002. Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapour-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 312: 242-250.

Eskes, A.B., 1989. Resistance. In: Kushalappa AC & Eskes AB, *Coffee Rust: Epidemiology, Resistance and Management*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 171-291.

Fernandes, C., 2006. *Otimização da extracção, separação cromatográfica, identificação e quantificação de fármacos em fluidos biológicos*. Tese de Doutoramento, São Carlos. 39 pp.

Fernandez, D.; Santos, P.; Agostini, C.; Bom, M.C.; Petitot, A.S.; Silva, M.C., Guerra-Guimarães, L.; Ribeiro, A.; Argout, X.; Nicole, M., 2004. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Molecular Plant Pathology* 5: 527-536.

Ferrão, J. E. M.; 1992. *A aventura das plantas e os Descobrimentos Portugueses*. Instituto de Investigação Científica Tropical, Lisboa.

Flor, H. H., 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology* 32: 653-669.

Goodman, R.N. & Novacky, A.J., 1994. *The Hypersensitive Reaction in Plant to Pathogen: a resistance phenomenon*. APS Press, St. Paul. 256 pp.

Guerra-Guimarães, L.; Silva, M.C.; Struck, C.; Loureiro, A.; Nicole, M.; Rodrigues Jr., C.J.; Ricardo, C.P.P., 2008a. Chitinases of *Coffea arabica* genotypes resistant to orange rust *Hemileia vastatrix*. *Biologia Plantarum* (em publicação)

Guerra-Guimarães, L.; Cardoso, S.; Martins, I.; Loureiro, A.; Bernardes da Silva, A.; Várzea, V.M.P. & Silva, M.C., 2008b. Differential induction of superoxide dismutase in *Coffea arabica* - *Hemileia vastatrix* interactions. Proceedings of the 22th International Conference on Coffee Science (ASIC), 14-19 Sept, Campinas, Brasil. (em publicação)

Hammerschmidt, R., 1999. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens?. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55: 77-84.

Heath, M.C., 2000. Hypersensitive response-related death. *Plant Molecular Biology* 44: 321-334.

Kaiser, R.; 1995. New and uncommon volatile compound in floral scents, 135-168.

Kaiser, R.; 2000. Scents from rain forests. *Chimia* 346-363.

Klessig, D.F.; Durner, J.; Noad, R.; Navarre, D.A.; Wendehenne, D.; Kumar, D.; Zhou, J.M.; Shah, J.; Zhang, S.Q.; Kachroo, P.; Trifa, Y.; Pontier, D.; Lam, E. & Silva, H., 2000. Nitric oxide and salicylic acid signalling in plant defence. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 97: 8849-8855.

Kushalappa, A. C.; Eskes, A. B., 1989. Advances in coffee rust research. *Annual Review of Phytopathology* 27: 503-531.

Lashermes, P.; Trouslot, P.; Anthony, F.; Combes, M.C. & Charrier, A., 1996. Genetic diversity of RAPD markers between cultivated and wild accessions of *Coffea arabica*. *Euphytica* 87: 59-64.

Lashermes, P.; Berthand, J.; Charrier, A.; Anthony, F.; Bertraud, B.; Quiros, O.; Wilches, A., 2001. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea Arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.

Lasmar, M.C., 2007. *Determinação de ecstasy e derivados anfetamínicos em amostras de urina utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta e em comprimidos utilizando-se cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama*. Tese de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Belo Horizonte. 64 pp.

Loake, G. & Grant, M., 2007. Salicylic acid in plant defence – the players and protagonists. *ScienceDirect* 10: 466-472.

Lopes, J.; Godinho, I.L. & Bettencourt, A.J., 1976. Physiologic specialisation of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br. Garcia de Orta, *Série de Estudos Agronômicos* 3: 13-16.

Lourenço, M. O. G. & Moreira, A. P., 1997. *Notas Elementares de Cromatografia Gás-Líquida*, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 1-28.

Mayne, W. W., 1932. Physiologic specialization of *Hemileia vastatrix* B. & Br. *Nature*. 129: 150. (citado por Almeida, 2000)

Mayne, W. W., 1935. Annual report of the coffee scientific officer. 1934-35- *Mysore Coffee Experimental Station Bulletin* 13: 28. (citado por Almeida, 2000)

Mayne, W. W., 1936. Annual Report of the Coffee Scientific Officer. 1935-36- *Mysore Coffee Experimental Station Bulletin* 14: 21. (citado por Almeida, 2000)

Margis-Pinheiro, M.; Sandroni, M. & Oliveira, D. E. D., 1999. A defesa das plantas contra as doenças, *Ciência hoje* 147: 1-11.

Martins, E.M.F.; Tiburzy, R. & Moraes, W.B.C., 1985. Histological studies of compatible and incompatible interactions of coffee leaves and *Hemileia vastatrix*. *Fitopatologia Brasileira* 10: 627-636.

Martins, A. L., 2008. *História do café*. Editora contexto 17-69.

- Maxemiuc-Naccache, V.; Braga, M.R. & Dietrich, S.M.C., 1992. Chitinase and β -1,3-glucanase changes in compatible and incompatible combinations between coffee leaf disks and coffee rust (*Hemileia vastatrix*). *Revista Brasileira de Botânica* 15: 145-150.
- Neves, H. J. C.; Costa Freitas, A. M., 1996. *Introdução à cromatografia gás-líquido de alta resolução*. Dias de Sousa, Lda, Póvoa de Santa Iria. 207 pp.
- Noronha, J. P., 2006. Técnicas hifenadas Parte I. Universidade Nova de Lisboa.
- Noronha-Wagner, M.; Bettencourt, A. J., 1967. Genetic study of the resistance of *Coffea* spp. To leaf rust I. Identification and behaviour of four factors conditioning disease reaction in *Coffea Arabica* to twelve physiologic races of *Hemileia vastatrix*. *Can. J. Bot.* 45: 2021-31.
- Nutman, F.J.; Roberts, F.M., 1963. Studies on the biology of *Hemileia vastatrix* Berk. & Br.. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 27-48. (citado por Almeida, 2000)
- Orozco-Castillo, C.; Chalmers, K.J.; Powell, W. & Waugh, R., 1996. RAPD and organelle specific PCR re-affirms taxonomic relationships within the genus *Coffea*. *The Plant Cell Report* 15: 337-341.
- Peres, T. B., 2002. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*, V (64): 227-229.
- Pizzutti, I. R.. 2006. *Validação de métodos multiresíduos de extração e desenvolvimento de método de purificação por GPC para análise de resíduos de pesticidas em soja utilizando GC-MS, GC-MS/MS e LC-MS/MS*. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria. 70 pp.
- Purseglove, J.W., 1974. *Tropical Crops Dicotyledons*. Longman. 719 pp.
- Rahe, J. E.; Kúc, J. & Chuang, C., 1970. Cinnamic acid production as a method of assay for phenylalanine ammonia-lyase in acetone powders of *Phaseolus vulgaris*. *Phytochemistry* 9: 1009-1015.
- Resende, M. L. V., Salgado, S. M. L., Chaves, Z. M., 2003. Espécies activas de oxigénio na resposta de defesa de plantas a patogénio. *Mil-folhas*.
- Ribani, M., Bottoli, C. B. G., Collius, C. H., 2004. *Quim. Nova* 27: 771-780. (citado por Silva, 2005)
- Ribeiro, F. A. D. L.; Ferreira, M. M. C.; Morano, S. C.; Silva, L. R.; Schneider, R. P., 2008. Planilha de validação: Uma nova Ferramenta para Estimar Figuras de Mérito na validação Analíticas Univariadas. *Química Nova* 31: 164-171.

Rijo, L.; Rodrigues Junior, C. J., 1978. Processo de infecção da *Hemileia vastatrix* Berk & Br. *Cultivares susceptíveis e resistentes de Coffea arabica L. Garcia de Orta, Ser. Est. Agron.* 5 (1-2): 23-24. (citado por Almeida, 2000)

Rijo, L.; Rodrigues Jr., C.J.; Silva, M.C. & Vasconcelos, M.I., 1991. Does gene SH₅ confer to certain coffee-rust associations a reaction near immunity? A histopathological study. *Café, Cacao & Thé XXXV*: 167-176.

Robbrecht, E., 1988. Tropical woody Rubiaceae. *Opera botânica Bélgica* 1: 1-1-271. (citado por Andreassen & Bremer, 2000; Daves *et al.*, 2006)

Rodrigues Jr., C. J.; Bettencourt, A. J. & Rijo, L., 1975. races of the pathogen and resistance to coffee rust. *Annual review of Phytopathology* 13: 49-70.

Rodrigues Jr., C. J., 1985. Ferrugens das plantas tropicais. *In: Curso de aperfeiçoamento da patologia das plantas tropicais e sub-tropicais*, 14-31 Outubro, Oeiras. 53-82.

Rodrigues Jr., C. J., 1989. Coffee Rusts: History, Taxonomy, Morphology, Distribution and host resistance. *Centro de Investigação das Ferrugens do Cafeeiro* 15: 5-8.

Rodrigues, Jr., C. J., 1990. Coffee rusts: history, taxonomy, morphology, distribution and host resistance. *Fitopatologia Brasileira* 15: 5-9.

Rodrigues Jr. C.J.; Várzea, V.M.P.; Godinho, I.L.; Palma, S. & Rato, R.C., 1993. New physiologic races of *Hemileia vastatrix*. Proceedings of the 15^o Colloque de Association Scientifique International du Café (ASIC), 6-11 Junho, Montpellier, França. 318-321.

Rojas, M.L.; Montes de Gómez, V. & Ocampo, C.A., 1993. Stimulation of lipoxygenase activity in cotyledonary leaves of coffee reacting hypersensitively to the coffee leaf rust. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 43: 209-219.

Rozhon, W.; Petutschnig, E.; Wrzaczek, M.; Jonak, C.; 2005. Quantification of free and total salicylic acid in plants by solid-phase extraction and isocratic high-performance anion-exchange chromatography *Anal Bional Chem* 382: 1620-1627.

Ryals, J.; Uknes, S.; Ward, E., 1994. Systemic Acquires Resistance. *Plant Physiol* 104: 1109-1112.

Santos, P.; Silva, M.C.; Guerra-Guimarães, L.; Ribeiro, A. & Fernandez, D., 2004. Identificação de genes envolvidos na resistência do cafeeiro (*Coffea arabica*) à ferrugem alaranjada (*Hemileia*

vastatrix). Actas do 4^o Congresso da Sociedade Portuguesa de Fitopatologia, 4-6 Fevereiro, Faro. (Resumo 19 pp, trabalho em publicação).

Seskar, M.; Shulaev, V.; Rastrin, I.; 1998. Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant Physiologists* 116: 387-392.

Shah, J; 2003. The salicylic acid loop in plant defense. *Kansas state university*.

Shulaev, V.; Silverman, P.; Raskin, I., 1997. Airborne signaling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385: 718-721.

Silva, M.C.; Nicole, M.; Guerra-Guimarães, L. & Rodrigues Jr., C.J., 2002. Hypersensitive cell death and post-haustorial defense responses arrest the orange rust (*Hemileia vastatrix*) growth in resistant coffee leaves. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 160: 169-183.

Silva, M. C., Rijo, L., Rodrigues, C. J., 1985. Differences in aggressiveness of two isolates of Race III of *Hemileia vastatrix* ou cultivar Caturra of *Coffea Arabica*. Proceedings of the 11th International Scientific Colloquium on Coffee. 635-645.

Silva, A. M. E. M. N., 1995. *Contribuição para o estudo das pirazinas no tabaco*, Licenciatura em Engenharia Agro-industrial, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 53-64.

Silva, R. C., 2005. *Comparação entre métodos cromatográficos, empregando GC-ECF, GC-FPD e GC-MS, e espectrofotométrico para determinação de ditiocarbamatos em alface*. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria. 48 pp.

Silva, M.C.; Guerra-Guimarães, L.; Loureiro, A.; Nicole, M., 2008. Involvement of peroxidases in the hypersensitive reaction of coffee (*Coffea arabica*) plants to orange rust (*Hemileia vastatrix*). *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 29-38

Soares, A. M. D. S.; Machado, O. L. T., 2007. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reactivas de oxigénio. *Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas* 1: 9-19.

Staskawicz, B., 2001. Genetics of plant-pathogen interactions specifying plant disease resistance. *Plant Physiology* 125: 73-76.

Supelco, 1998. Solid Phase Microextraction, Application Guide, *Sigma-Aldrich Co.*

Thurston H. D., 1998. Coffee Rust *In: Tropical Plant Diseases*, APS Press. 123-128.

Valente, A.L.P.; Augusto, F., 1999. Microextração por fase sólida. *Instituto de Química* 23 (4): 523-530.

Vander, P.; Varum, K.M.; Domard, A.; El Gueddari, N.E. & Moerschbacher, B.M., 1998. Comparison of the ability of partial N-acetylated chitosans and chitoologosaccharides to elicit resistance rescations in wheat laeves. *Plant Physiology* 118: 1353-1359.

Van der Vossen, A.M., 2001. Agonomy I: Coffee Breeding Practices. *In: Clarke RJ & Vitzthum OG, Coffee Recent Developments*. Blackwell Sciences. 184-201.

Várzea, V.M.P.; Rodrigues Jr., C.J.; Passo, J.E. & Palma, S., 1989. New rust genotypes and new coffee genotype in Catimor 45. *Proceedings of the 13^o Colloque de Association Scientifique International du Café (ASIC)*, 21-25 Outubro, Colombia. 745-748.

Várzea, V.M.P.; Rodrigues Jr., C.J.; Silva, M.C.; Gouveia, M., Marques, D.V.; Guerra-Guimarães, L. & Ribeiro, A., 2002. Resistência do cafeeiro à *Hemileia vastatrix*. *In: Zambolim L, O Estado da Arte de Tecnologias na Produção de Café*. Departamento de Fitopatologia, UFV, Viçosa, Brasil. 297-320.

Várzea, V.M.P.; M., Marques, D.V, 2005. Population variability of *Hemileia vastatrix* VS. Coffee Durable resistance. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 53-69.

Wellman, F.L., 1952. Peligro de introducción de la *Hemileia* del café a las Américas. *Turrialba* 2: 47-50.

⇒ *Web grafia*

American Phytopathological Society net. Disponível em: <http://www.apsnet.org>. Acesso em: 2008.

CABI DATAbases. Disponível em: <<http://www.indexfungorum.org/Names/fundic.asp?RecordID=Incertaesedis&Type=F>>. Acesso em: 2008.

Instituto de Investigação Científica tropical. Disponível em: <http://www2.iict.pt/?idc=33&idi=11090>>. Acesso em: 2008.

Internacional Coffee Organization. Disponível em: <<http://www.ico.org>>. Acesso em: 2008.

⇒ Bibliografia consultada mas não citada

Coelho, T. M. P. N.. 1994. *Identificação de raças fisiológicas e caracterização de agressividade de alguns isolamentos de Hemileia vastatrix Berk. & Br. em Coffea arabica L.*. Licenciatura em Engenharia Agronómica, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 1-39.

Coelho, D. L., 2001. *Caracterização citológica e Bioquímica da expressão de resistência de cafeeiros portadores dos genes SH3 SH5 à Hemileia vastatrix*. Licenciatura em química aplicada, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2-24.

Deng, C.; Zhang, X.; Zhang, J.; Quian, J.; Zhu, W., 2003. Rapid Determination of Salicylic Acid in Plant Materials by Gas chromatography – Mass spectrometry. *Cromatographia* 58: 225-229.

Hammand – Kosack, K. E.; Parker, J. E., 2003. Deciphering plant – pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding. *Current Opinion in Biotechnology* 14: 177-193.

Santos, P. C. F.. 2005. *Aspectos Moleculares da Resistência do Cafeeiro (Coffea arabica L.) à Ferrugem alaranjada (Hemileia vastatrix Berk & Br)*. Tese de Doutoramento em Biologia, Universidade da Madeira. 2-20.

Silva, M. C. M. L., 1996. *Estudos Histológicos e de Ultraestrutura em interações de coffea spp. e espécies não hospedeiras com Hemileia vastatrix, e de coffea arabica com ferrugens não patogénicas*. Tese de Doutoramento em Engenharia Agronómica, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa. 3-25.

Tomaz, I. L., 2002. Localização dos Fungos na Classificação dos Seres vivos e Sua Taxonomia. *In: Doenças das Plantas*. Publicações Europa – América, Mem Martins, 93-131.

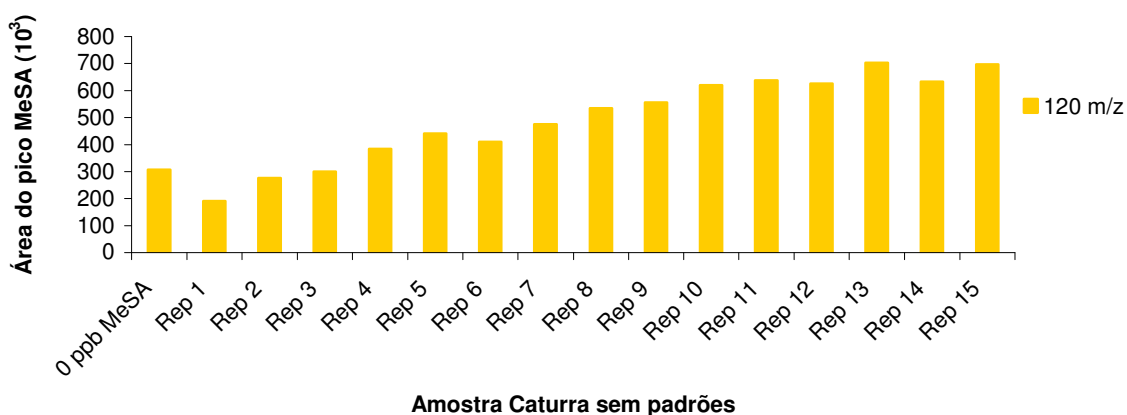
Verberne, M.C.; Bronwer, N.; Delbianco F.; Linthorst H. J. M.; Bol J. F.; Verpoorte R., 2002. Method for the Extraction of the Volatile Compound Salicylic Acid from Tobacco Leaf Material. *Phytochemical Analysis* 13: 45-50.

5. Anexos

Anexo 1

Estudo da estabilidade das amostras

Repicamos uma amostra *C. arabica* Caturra quinze vezes, sem a adição de padrões e observamos o sinal analítico correspondente ao composto em análise.



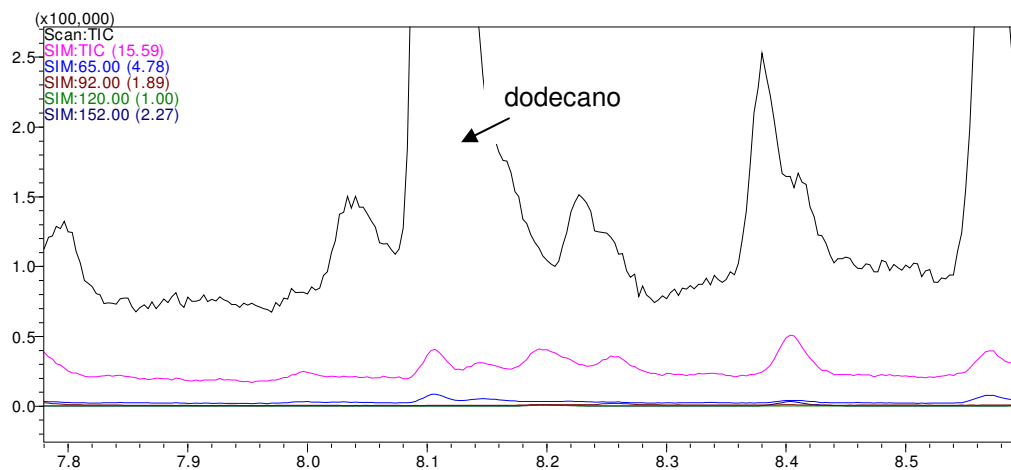
Método de preparação de amostras “pós de acetona”:

➤ “Pós de acetona”

Os pós de acetona foram preparados a partir de tecido foliar fresco de folhas jovens e adultas de *C. arabica* Caturra. Às folhas colhidas foi-lhes retirada a nervura central com o auxílio de uma lâmina. Em seguida, foram congeladas em azoto líquido, colocadas num almofariz de porcelana e maceradas até obtenção de um pó. Este pó foi homogeneizado com acetona -18°C, durante 2 minutos. O homogeneizado foi filtrado por sucção num funil de Büchner, através de um filtro Whatman nº 1, e lavado com acetona. O pó (cerca 1g de pó por 5-6g de massa fresca) foi seco no vácuo durante uma a duas horas antes de ser guardado em frascos e congelado a -18°C (Rahe *et al.*, 1970).

Resultados:

Pó de acetona repicado:



Cromatograma da amostra preparada com o método da acetona

Quadro com identificação do composto interferente (dodecano) no tempo de retenção do salicilato de metilo.

		Área das Massas MeSA		
Identificação	65	92	120	152
Pó de acetona 1	pico saturado			
Pó de acetona 2	pico saturado			
rep. pó de acetona 1	Pico saturado			
Rep. pó de acetona 2	Dodecano			

Anexo 2

Propriedades do salicilato de metilo da Sigma–Aldrich

Ref.: M6752 Methyl salicylate

Pureza \geq 99%

Formula molecular	2 – (HO)C ₆ H ₄ CO ₂ CH ₃
Peso molecular	152,15
Número CAS	119 – 36 – 8
Número de registo de Beilstein	971516
Número MDL	MFCD 00002214

Densidade do vapor	5,26 (vs air)
Pressão do vapor	1 mmHg (54°C)
Temp. de autoignição	847°C
Índice refrativo	n _{20/D} 1,536 (lit.)
Ponto de ebulição	222°C (lit.)
Ponto de fusão	-8 – -7°C (lit.)
Densidade	1,174 g/ ml at 25°C (lit.)

Propriedades do salicilato de etilo da Sigma-Aldrich

Ref.: 84220 Ethyl salicylate

Pureza \geq 99.0%

Formula molecular	2 – (HO)C ₆ H ₄ CO ₂ C ₂ H ₅
Peso molecular	166.17
Número CAS	118-61-6
Número de registo de Beilstein	907659
Número MDL	MFCD00002215

Pressão do vapor	0,05 mmHg (25°C)
Índice refrativo	n _{20/D} 1.522 (lit.)
Ponto de ebulição	234°C (lit.)
Ponto de fusão	1°C (lit.)
Densidade	1.131 g/ml at 25°C (lit.)

Anexo 3

Identificação do composto MeSA e EtSA a partir da biblioteca espectral

Espectro de massa do composto MeSA identificado pela biblioteca espectral:

[MS Spectrum]			
# of Peaks		26	
Raw Spectrum 0.000 (scan : 0)		Base Peak m/z 120.00 (Inten : 1,000)	
Background		No Background Spectrum	
m/z (x)	Absolute Intensity	Relative Intensity	relação de massas 120/x
50	64	6,4	15,6
51	44	4,4	22,7
53	176	17,6	5,7
61	40	4	25
62	80	8	12,5
63	264	26,4	3,8
64	260	26	3,8
65	384	38,4	2,6
66	44	4,4	22,7
76	24	2,4	41,7
81	20	2	50
92	828	82,8	1,2
93	172	17,2	5,8
94	12	1,2	83,3
120	1000	100	1
121	284	28,4	3,5
122	24	2,4	41,7
123	2	0,2	500
124	2	0,2	500
137	8	0,8	125
138	2	0,2	500
139	2	0,2	500
152	360	36	2,8
153	32	3,2	31,3
154	4	0,4	250
155	2	0,2	500

Espectro de massa do composto EtSA identificada pela biblioteca espectral:

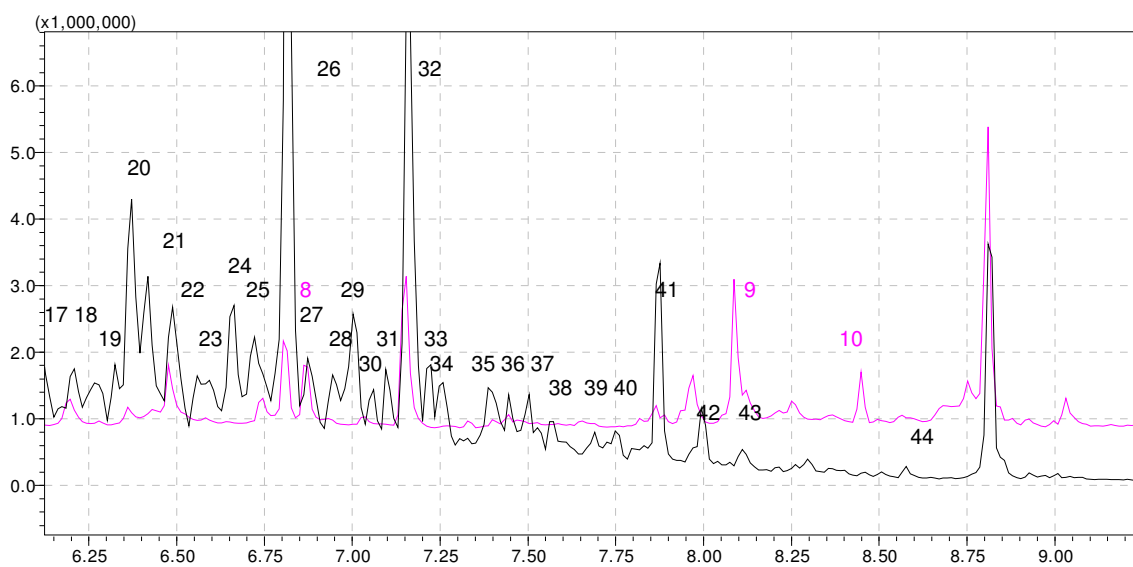
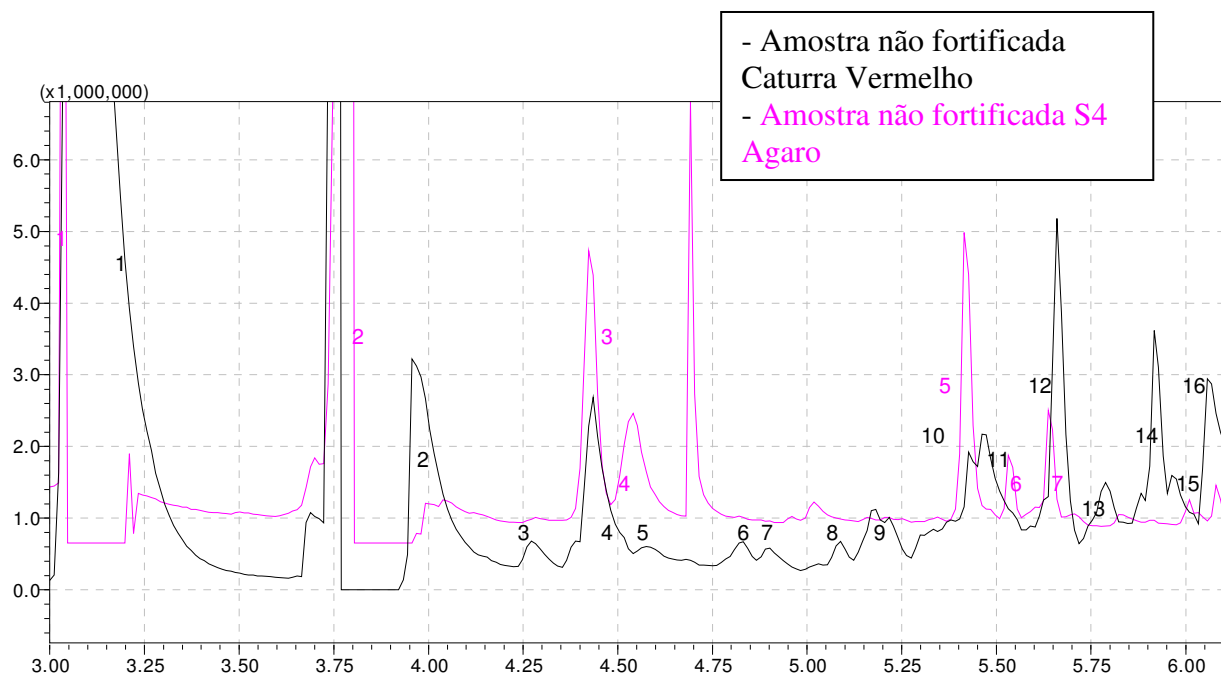
[MS Spectrum]				
# of Peaks		32		
Raw Spectrum		0.000 (scan : 0)	Base Peak m/z 120.00 (Inten : 1,000)	
Background		No Background Spectrum		
m/z (x)	Absolute Intensity	Relative Intensity	relação de massas 120 /x	
27	32	3,2	31,3	
29	132	13,2	7,6	
39	92	9,2	10,9	
45	32	3,2	31,3	
53	12	1,2	83,3	
63	32	3,2	31,3	
64	160	16	6,3	
65	312	31,2	3,2	
66	20	2	50	
71	172	17,2	5,9	
76	20	2	50	
77	12	1,2	83,3	
81	32	3,2	31,3	
87	60	6	16,7	
91	32	3,2	31,3	
92	788	78,8	1,3	
93	260	26	3,9	
94	20	2	50	
104	12	1,2	83,3	
109	12	1,2	83,3	
115	12	1,2	83,3	
119	12	1,2	83,3	
120	1000	100	1	
121	588	58,8	1,7	
122	60	6	16,7	
138	32	3,2	31,3	
139	4	0,4	250	
140	2	0,2	500	
166	508	50,8	2	
167	92	9,2	10,9	
168	4	0,4	250	
169	2	0,2	500	

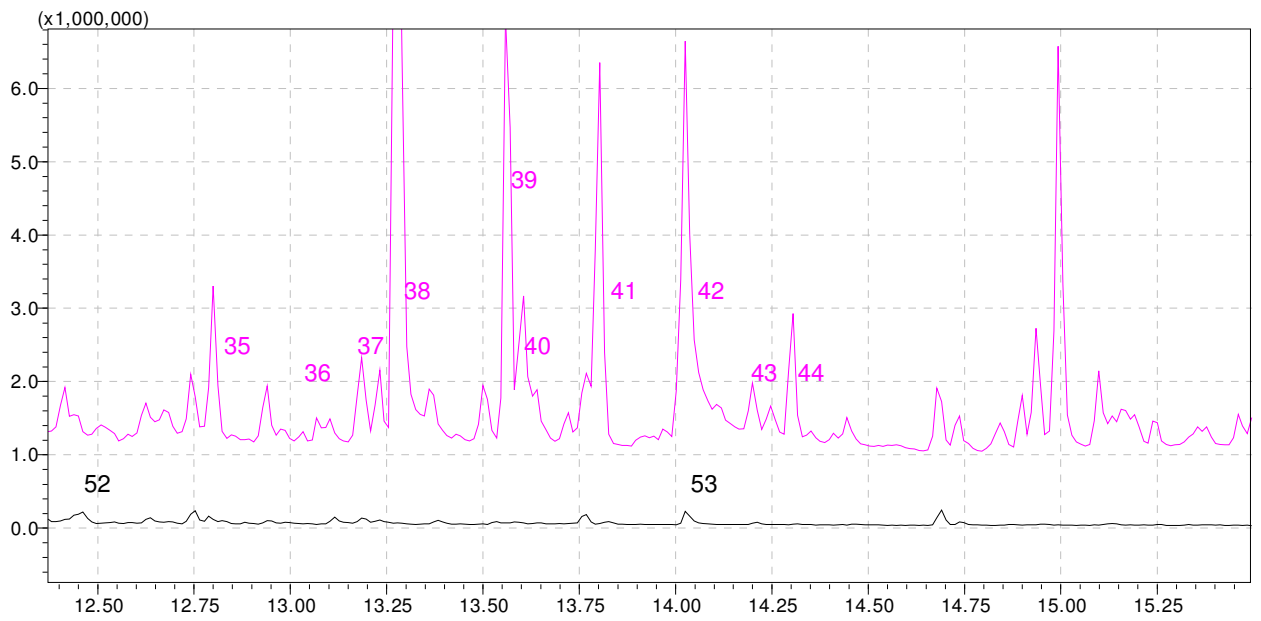
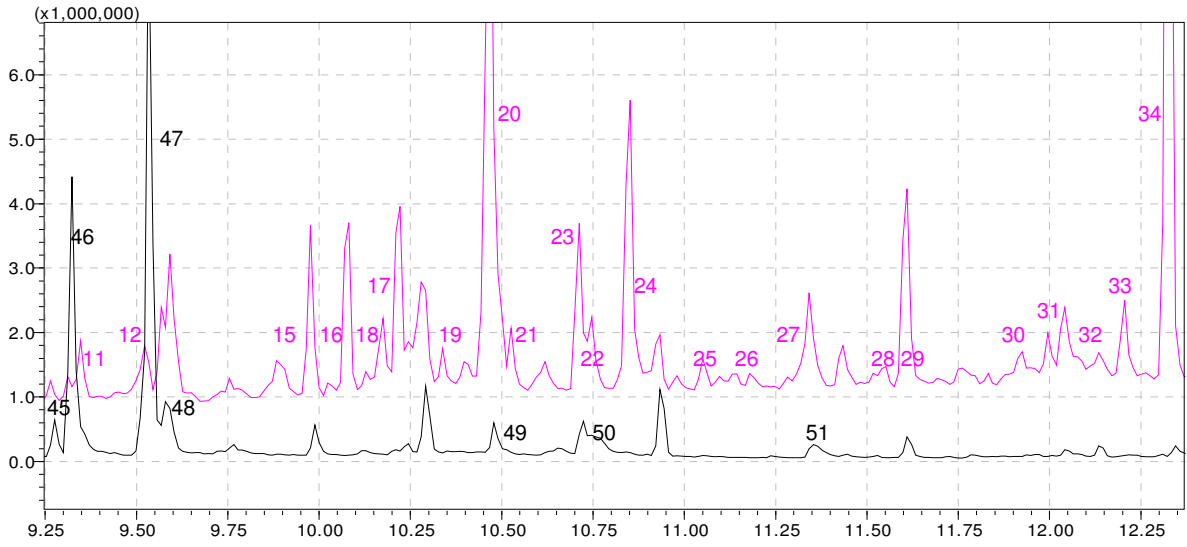
Anexo 4

Identificação dos compostos voláteis numa folha de cafeeiro *C. arabica* S4 Agaro e Caturra

Método SPME: 5 minutos de equilíbrio, 60 min de extracção, 70°C de temp. de extracção

TIC (total ionic chromatograms) obtidos pelo modo SCAN:





Folha *C. arabica* S4 Agaro:

Nº	Tempo de retenção (min)	Identificação	% Similar
1	3,035	Silane, fluorotrimethyl- (CAS) Trimethylfluorosilane	81
2	3,793	2-Hexenal, (E)- (CAS) (E)-2-Hexenal	95
3	4,424	2-Heptanol (CAS) 2-Hydroxyheptane	96
4	4,539	2,4-Hexadienal, (E,E)- (CAS) Sorbaldehyde, (E,E)-	95
5	5,417	7-Octen-4-ol (CAS) 1-OCTEN-5-OL	94
6	5,536	Furan, 2-pentyl- (CAS) 2-Amylfuran	94
7	5,637	7-Nonynoic acid (CAS)	82
8	6,868	Nonanal (CAS) n-Nonanal	90
9	8,087	Beta.-Cyclocitral	92
10	8,449	2,6,6-TRIMETHYL-1-CYCLOHEXENE-1- ACETALDEHYDE	93
11	9,265	p-Mentha-2,5-dien-7-ol, trans- (CAS)	78
12	9,522	Octadecanoic acid, 2-[(trimethylsilyl)oxy]-, methyl Ester	73
13	9,884	1H-3a,7-Methanoazulen-6-ol, octahydro-3,6,8,8- tetramethyl-,	88
14	9,976	3-Buten-2-one, 4-(2,6,6-trimethyl-2-cyclohexen-1- yl)-, (E)-	93
15	10.080	2,6-Dimethyl-6-(4-methyl-3- pentenyl)bicyclo[3.1.1]hept-2-ene	95
16	10.176	5,9-Undecadien-2-one, 6,10-dimethyl-, (Z)-	89
17	10.222	1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene	93
18	10.399	1-Octanol, 2-butyl-	89
19	10.466	4-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)- (CAS)	91
20	10.528	1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-, (E)-	89
21	10.615	8-Hydroxy-2,2,8-trimethyldeca-5,9-dien-3-one	72
22	10.712	Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene- 4-hexenyl)-, (S)-	90
23	10.848	2-Methyl-6-(4-Methylenecyclohex-2-Enyl)-2- Heptene	95
24	10.980	Cetylpyridinium Chloride	79
25	11.051	5.alpha.-Cholestan-2-one, oxime	62
26	11.342	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diethyl ester (CAS)	85

		Ethyl phthalate	
27	11.437	Heptadecane	95
28	11.607	Cholestan-7-ol, 8,9-epoxy-3-(phenylmethoxy)-	54
29	11.996	1-Hexadecanol, 2-methyl- (CAS) 2-METHYLHEXADECANOL-1	83
30	12.042	Octadecane, 1,1'-[1,3-propanediylbis(oxy)]bis-	59
31	12.136	4H-1-Benzopyran-4-one, 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-3,5-dihydroxy-7-methoxy-	60
32	12.205	1-Iodo-2-methylundecane	90
33	12.321	Hexadecanal	96
34	12.416	Cyclopropane, 1-(2-chloro-1-hexen-1-ylideno)-2,2,3,3-tetramethyl-	68
35	12.801	4,6,6-Trimethyl-2-(3-methylbuta-1,3-dienyl)-3-oxatricyclo[5.1.0.0(2,4)]octane	82
36	13.186	Benzeneacetic acid, .alpha.,3,4-tris(trimethylsilyl)oxy -, trimethylsilyl Ester	60
37	13.234	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-	90
38	13.280	Caffeine \$\$ 1H-Purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-1,3,7-trimethyl- (CAS) THEOPHYLLINE METHYL	95
39	13.565	9,17-Octadecadienal,	94
40	13.604	cis,cis,cis-7,10,13-Hexadecatrienal	93
41	13.803	Pentadecanoic acid, 14-methyl-, methyl ester	96
42	14.022	Hexadecanoic acid (CAS) Palmitic acid	86
43	14.248	Oleic Acid	79
44	14.303	Pentadecane	96

Folha *C. arabica* Caturra:

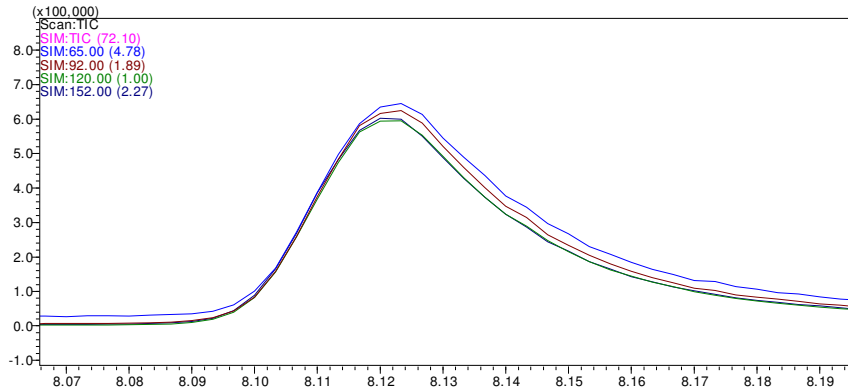
Nº	Tempo de retenção (min)	Identificação	% Similar	Ident. S4 Agaro
1	3,07	N-Hexanal	96	
2	3,957	Trans-2-Hexenal	82	
3	4,260	Benzene, 1,2-Dimethyl- (CAS) O-Xylene	95	
4	4,485	2-Heptanol (Cas) 2-Hydroxyheptane	91	3
5	4,576	2,4-Hexadienal, (E,E)- (Cas) Sorbaldehyde, (E,E)-	91	4
6	4,809	Cyclopentane, 1-Hexyl-3-Methyl- (CAS)	87	

7	4,902	Undecane, 2,6-Dimethyl- (Cas) 2,6-Dimethylundecane	91	
8	5,089	Hexadecane, 1-Chloro- (Cas) 1- Chlorohexadecane	89	
9	5,182	Octadecane, 1-Chloro- (Cas) 1- Chlorooctadecane	88	
10	5,427	3-Methylheneicosane	73	
11	5,463	Cyclopentane, 1-Methyl-3-(2- Methylpropyl)- (Cas) Cyclopentane, 3-Isobutyl-1- Methyl-	86	
12	5,650	Isooctane, (Ethenyloxy)- (Cas) Isooctyl Vinyl Ether	92	
13	5,778	9-Octadecen-1-Ol, (Z)- (Cas) Cis- 9-Octadecen-1-Ol	88	
14	5,907	Octadecane, 1-Chloro- (Cas) 1- Chlorooctadecane	91	
15	5,965	Nonadecanol (CAS)	90	
16	6,046	Cyclopentane, 1-Hexyl-3-Methyl- (Cas)	92	
17	6,198	Cyclododecane (CAS)	89	
18	6,268	9-Octadecene, (E)- (Cas)	90	
19	6,315	1-Octanol, 2-Butyl- (Cas) 2-Butyl- 1-Octanol	93	18
20	6,361	3-Decen-1-Ol, (Z)- (Cas) Cis-3- Decen-1-Ol	87	
21	6,408	Nonadecanol (CAS)	90	
22	6,478	1-Hexadecanol, 3,7,11,15- Tetramethyl- (Cas) Dihydrophytol	84	
23	6,560	1-Hydroxyisopropyl-2,3-Dimethyl- Cyclopentane	87	
24	6,653	3-Isobutyl-1-Methyl- Cyclopentanone	90	
25	6,712	3-Isobutyl-1-Methyl- Cyclopentanone	89	
26	6,805	1-Octanol, 2-Butyl- (Cas) 2-Butyl- 1-Octanol	94	
27	6,863	Octadecanal (Cas) Stearaldehyde	89	
28	6,945	Octadecanal (Cas) Stearaldehyde	88	
29	7,003	9-Octadecen-1-Ol, (Z)- (Cas) Cis- 9-Octadecen-1-Ol	89	
30	7,049	9-Octadecen-1-Ol, (Z)- (Cas) Cis- 9-Octadecen-1-Ol \$\$ Oleol	88	
31	7,096	1-Heptanol, 2-Propyl- (Cas) 2- Propyl-1-Heptanol	91	
32	7,154	2,6-Dihydroxybenzoic Acid 3tms	73	

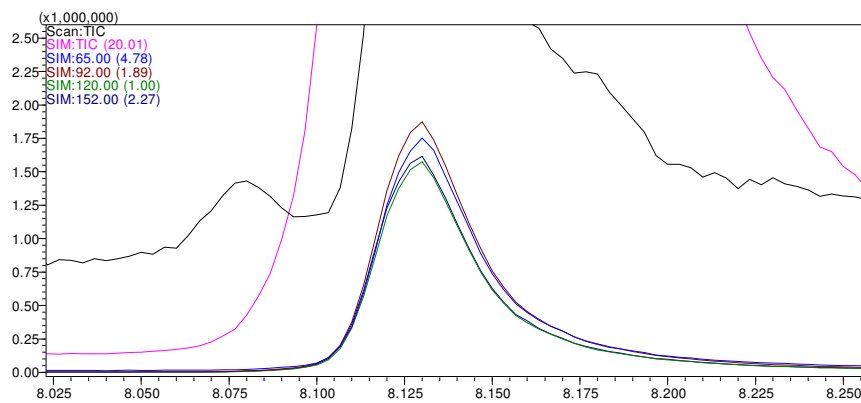
33	7,213	Cyclohexane, (1-Methylpropyl)- (Cas) Sec-Butylcyclohexane	87	
34	7,248	Cyclododecane (CAS)	91	
35	7,388	4-Undecanol, 7-Ethyl-2-Methyl- (Cas) 7-Ethyl-2-Methyl-4- Undecanol	90	
36	7,446	1-Heptanol, 2-Propyl- (Cas) 2- Propyl-1-Heptanol	91	
37	7,493	Octadecane, 1-Chloro- (Cas) 1- Chlorooctadecane	90	
38	7,560	Octadecane, 1-Chloro- (Cas) 1- Chlorooctadecane	90	
39	7,677	9-Octadecen-1-Ol, (Z)- (Cas) Cis- 9-Octadecen-1-Ol	89	
40	7,747	3-Isobutyl-1-Methyl- Cyclopentanone	88	
41	7,863	Dodecane (Cas) N-Dodecane	95	
42	7,992	1-Octanol, 2-Butyl- (Cas) 2-Butyl- 1-Octanol	88	
43	8,111	Acetaldehyde, (3,3- Dimethylcyclohexylidene)-	75	
44	8,575	Heptadecane, 2,6,10,14- Tetramethyl- (Cas) 2,6,10,14- Tetramethylheptadecane	91	
45	9,263	P-Mentha-2,5-Dien-7-Ol, Trans- (Cas) Trans-2,5-P-Menthadien-7- Ol	84	11
46	9,322	Pentan-1,3-Dioldiisobutyrate, 2,2,4-Trimethyl-	89	
47	9,532	Propanoic Acid, 2-Methyl-, 2- Ethyl-3-Hydroxyhexyl Ester	87	
48	9,537	1,5,7-Octatrien-3-Ol, 2,6- Dimethyl- (Cas) 2-Methylene-6- Methyl-5,7-Octadien-3-Ol	80	
49	10,467	3-Buten-2-One, 4-(2,6,6- Trimethyl-1-Cyclohexen-1-Yl)-	93	
50	10,724	4-Tridecen-6-Yne, (Z)- (Cas)	85	
51	11,352	Butane, 2-Bromo-2-Methyl- (Cas) 2-Bromo-2-Methylbutane	73	
52	12.344	Octadecanal (Cas) Stearaldehyde	94	
53	14.025	1,2-Benzenedicarboxylic Acid, Dibutyl Ester (Cas) Butyl Phthalate	94	

Anexo 5

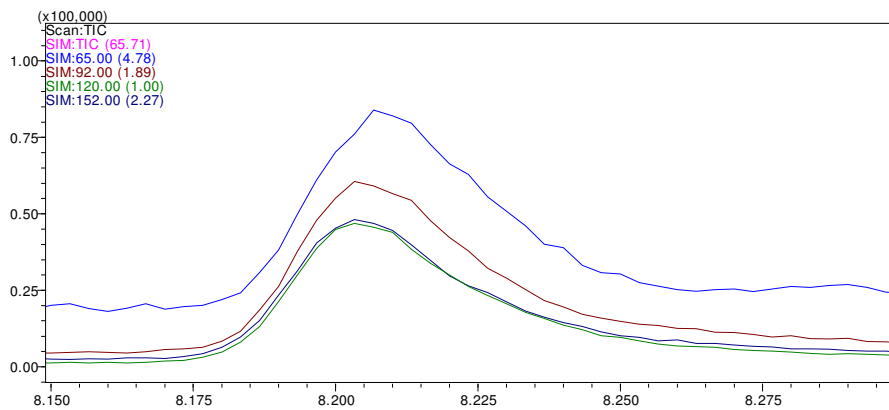
Nestes ensaios ocorreu uma alteração do tempo de retenção do MeSA devido a problemas na coluna que levaram ao corte do topo da coluna.



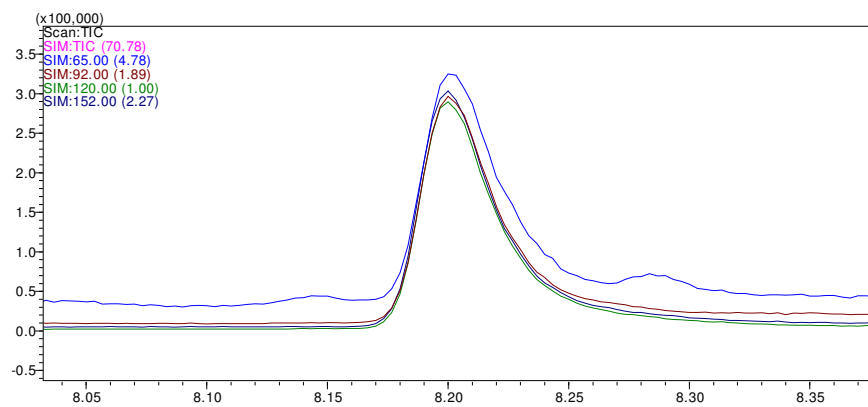
Cromatograma do MeSA na folha adulta da *C. arabica* Caturra.



Cromatograma do MeSA na folha jovem da *C. arabica* Caturra.



Cromatograma do MeSA na folha adulta da *C. arabica* S4 Agaro.



Cromatograma do MeSA na folha jovem da *C. arabica* S4 Agaro.

Anexo 6

Quadro com a quantificação em ppb do MeSA para a massa 120 m/z nas amostras inoculadas.

Tempo / horas	Concentração MeSA / ppb	
	Inoculadas	Controlo
0	31,04	26,87
17	15,46	16,66
24	15,55	27,2
30	18,11	16,66
42	12,66	15,39
48	13,28	9,33
72	11,9	11,15

Quadro com a quantificação em ppb do MeSA para a massa 120 m/z nas amostras congeladas.

Tempo / horas	Concentração MeSA / ppb	
	Inoculadas	Controlo
24	9,97	18,00
30	10,26	11,57
42	10,13	14,17
48	10,27	9,52

