



NATHÁLIA APARECIDA BRAGANÇA FÁVARIS

**CORRESPONDÊNCIA ENTRE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO
PERFIL PROTEICO E BIOQUÍMICO EM SEMENTES DE CAFÉ COM
DIFERENTES TEORES DE ÁGUA**

**LAVRAS-MG
2019**

NATHÁLIA APARECIDA BRAGANÇA FÁVARIS

**CORRESPONDÊNCIA ENTRE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO PERFIL
PROTEICO E BIOQUÍMICO EM SEMENTES DE CAFÉ COM DIFERENTES
TEORES DE ÁGUA**

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

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Pesq. Dra. Tatiana Botelho Fantazzini
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2019**

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

Fávaris, Nathália Aparecida Bragança.

Correspondência entre métodos de avaliação do perfil proteico
e bioquímico em sementes de café com diferentes teores de água /
Nathália Aparecida Bragança Fávaris. - 2019.

57 p. : il.

Orientador(a): Stella Dellyzete Veiga Franco Da Rosa.

Coorientador(a): Tatiana Botelho Fantazzini.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica* L. 2. Liofilização. 3. Isoenzimas. I. Da Rosa,
Stella Dellyzete Veiga Franco. II. Fantazzini, Tatiana Botelho. III.
Título.

NATHÁLIA APARECIDA BRAGANÇA FÁVARIS

**CORRESPONDÊNCIA ENTRE MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DO PERFIL
PROTEICO E BIOQUÍMICO EM SEMENTES DE CAFÉ COM DIFERENTES
TEORES DE ÁGUA**

**CORRESPONDENCE BETWEEN PROTEIN AND BIOCHEMICAL PROFILE
EVALUATION METHODS IN COFFEE SEEDS WITH DIFFERENT WATER
CONTENT**

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

APROVADA em 20 de setembro de 2019.

Dra. Lilian Padilha EMBRAPA CAFÉ

Dra. Heloísa Oliveira dos Santos UFLA

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Pesq. Dra. Tatiana Botelho Fantazzini
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2019**

*À minha amada avó Jovelina, e ao meu bisavô Sebastião Rosa (In memoriam).
Aos meus pais Eli e Sebastiana, pelo exemplo de amor, raiz e por me apresentar a Deus.
Ao meu amor Elton, pelo companheirismo, cumplicidade e amor.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido o espírito da vida. Sem o Seu sustento, nada sou.

Aos meus pais Sebastiana e Eli, minhas raízes. Meu eterno amor, carinho e gratidão. Sem vocês não seria nada. A conquista é nossa.

A toda a minha família, cada um da sua forma e maneira, demonstrando seu carinho, amor e atenção.

Ao meu amor Elton, por tudo que representa em minha vida. Obrigada por ser acima de tudo o meu melhor amigo.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade e suporte de estudo.

A minha querida orientadora pesquisadora Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pela acolhida na família mineira das sementes. Obrigada pela dedicação, paciência, ensinamentos, carinho, um abraço apertado e o prazer de ser sua orientada. Obrigada por me ensinar o verdadeiro significado da palavra 'orientar'.

A minha coorientadora, Dra. Tatiana Botelho Fantazzini, pelo apoio na condução dos trabalhos.

Obrigada a cada membro do grupo de orientados da pesquisadora Sttela, por todos os trabalhos, estudos, amizade e todo sucesso. Em especial, à Madeleine, Tatiana, Stefânia e Júlia, pelos ensinamentos, condução e paciência na arte de ensinar.

Aos professores e pesquisadores do Setor de Sementes, pelos conhecimentos transmitidos. Sementeiros, obrigada por toda a ajuda e incentivo.

Ao Dartagnan, do Departamento de Fisiologia Vegetal e ao colega Souza Diego, pela imprescindível ajuda.

A Edlânia, pelo apoio, pelo abraço apertado na vontade de ir embora, conversas sem compromisso. Sem você, Lavras teria sido mais difícil.

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

À EPAMIG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais), pelo fornecimento das sementes de café.

À Marli, secretária da pós-graduação do Departamento de Agricultura, pela ajuda, paciência, atenção e colaboração.

Aos meus amigos Aixelhe, Allan, Eduardo e Marcus Vinícius, que mesmo com a distância se fizeram presentes.

Em memória à minha amada avó Jovelina e ao meu bisavô Sebastião Rosa. O suporte de vocês, os gestos de carinho e o amor, estarão sempre em meu coração e jamais serão esquecidos. Obrigada por serem meus espíritos de luz.

A todos que diretamente ou indiretamente fizeram parte deste momento.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

A produção de mudas vigorosas de café depende da semeadura de sementes de qualidade, a qual é afetada pelas operações durante o cultivo e a pós-colheita. A avaliação da qualidade destas sementes é realizada por testes fisiológicos e pode ser complementada pela determinação do perfil proteico, por meio de eletroforese ou quantificação por espectrofotometria. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência da qualidade fisiológica e o teor de água das sementes no perfil proteico de sementes de café. Foram utilizados dois lotes de sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Topázio MG 1190, sendo um da safra de 2017 e outro de 2018, submetidos à secagem em sílica em gel até atingirem os teores de água de, aproximadamente, 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40% bu. Após a secagem, as sementes foram submetidas à avaliação da qualidade, por meio do teste de condutividade elétrica, de germinação, de tetrazólio, associando os resultados das análises proteômicas e quantificação por espectrometria de placas em sementes liofilizadas e não liofilizadas. A redução do teor de água não afeta a germinação e a viabilidade de sementes de café recém-colhidas, mas propicia a redução do vigor e da armazenabilidade. Teores de água acima de 30% bu influenciam no perfil proteico e enzimático das sementes de café não liofilizadas. O processo de liofilização das sementes de café permite melhor resolução na determinação do perfil proteico e enzimático. A eletroforese de isoenzimas e a quantificação por espectrofotometria são técnicas complementares.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Liofilização. Isoenzimas. Eletroforese. Espectrofotometria.

ABSTRACT

The production of vigorous seedlings that guarantee the successful establishment of a coffee field depends on the use of high-quality seeds, which is affected by operations during cultivation and postharvest. The quality evaluation of these seeds is performed by physiological tests and can be complemented by the determination of the protein profile by electrophoresis or quantification by spectrophotometry. This study aimed to evaluate the influence of the physiological quality and the seed water content on vigorous seedlings that guarantee the successful establishment of a coffee field depends on the production of high-quality seeds. *Coffea arabica* L. seeds from the 2017 and 2018 crop, belonging to the cultivar Topázio MG 1190 were used. The seeds were dried in silica gel until reaching water contents of approximately 12, 15, 20, 25, 30, 35 and 40% bu. After drying, the seeds were subjected to quality evaluation by the following methods: tetrazolium electrical conductivity, germination test, proteomic analyzes and quantification by plaque spectrometry in lyophilized and non-lyophilized seeds. The reduction in the water contents did not affect the germination and viability of freshly harvested coffee seeds. However, it caused reductions in the vigor and storage. Water contents above 30% bu influenced the protein and enzymatic profile of non-lyophilized coffee seeds. The lyophilization process of the coffee seeds allowed a better resolution in the determination of the protein and enzymatic profile. Moreover, isoenzyme electrophoresis and spectrophotometric quantification can be considered complementary techniques.

Keywords: *Coffea arabica* L. Lyophilization. Isoenzymes. Electrophoresis. Spectrophotometry.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Sementes de café	13
2.2	Danos no metabolismo de reserva das sementes.....	14
2.3	Processo oxidativo em sementes	15
2.4	Sistemas enzimáticos e proteínas resistentes ao calor	16
2.5	Métodos de determinação do perfil proteico e enzimático	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1	Local de realização dos experimentos	21
3.2	Obtenção, processamento e secagem do material vegetal.....	21
3.3	Determinação do teor de água e avaliação da qualidade fisiológica das sementes de café	22
3.3.1	Determinação do teor de água.....	22
3.3.2	Teste de condutividade elétrica	22
3.3.3	Teste de germinação	22
3.3.4	Peso seco de plântulas	23
3.3.5	Teste de tetrazólio.....	23
3.4	Liofilização das sementes de café	23
3.5	Expressão em eletroforese das análises proteômicas	24
3.6	Quantificação das enzimas e de proteínas resistentes ao calor em espectrofotômetro de placas	25
3.7	Delineamento experimental e análises estatísticas	26
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Resultados da avaliação fisiológica das sementes	27
4.2	Resultados da avaliação do perfil proteico das sementes	31
4.2.1	Enzimas avaliadas por expressão em gel de eletroforese e quantificadas por espectrofotometria.....	31
4.2.1.1	Enzima superóxido dismutase.....	31
4.2.1.2	Enzima catalase	33
4.2.1.3	Enzima polifenoloxidase	35
4.2.1.4	Proteínas resistentes ao calor	38
4.2.1.5	Endo-β-mananase	41

4.2.2	Expressão em gel de eletroforese	43
4.2.2.1	Peroxidase	43
4.2.2.2	Glutamato oxaloacetato transaminase	44
4.2.2.3	Malato desidrogenase.....	45
4.2.2.4	Esterase.....	47
5	CONCLUSÕES	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	56

1 INTRODUÇÃO

A cafeicultura brasileira tem destaque no cenário agrícola em razão da importância econômica e social. *Coffea arabica* L. apresenta um bom desenvolvimento em condições de clima ameno, sendo cultivada em regiões de altitude entre 600 a 1000 m, e é um arbusto perene pertencente à família *Rubiaceae*. Apresenta grande aceitação pelos cafeicultores e consumidores, principalmente pela qualidade da bebida. O Brasil destaca-se mundialmente como o principal produtor (CECAFÉ, 2019), com uma produção estimada de 48,99 milhões de sacas para safra de 2019, obtidas em uma área de 1.812 milhões de hectares (CONAB, 2019).

A obtenção de mudas na cafeicultura baseia-se na utilização de sementes. Um dos problemas enfrentados pelos produtores de café encontra-se na fase de propagação, sendo observados frequentes relatos pelas suas limitações quanto aos efeitos negativos no armazenamento para a conservação das sementes, com perdas no seu poder germinativo (ABREU et al., 2014) e no vigor (COELHO et al., 2015). De acordo com Ellis et al. (1990), as sementes de *Coffea arabica* L. são classificadas como intermediárias, devido a baixa tolerância ao armazenamento sob baixas temperaturas, e relativa tolerância à perda de água, até teores próximos de 10% de umidade.

A alta qualidade inicial das sementes é essencial para formação de mudas de qualidade, e essa pode ser afetada por fatores como teor de água das mesmas, condições ambientais, dentre outros, durante as fases da produção e da pós-colheita. Eles podem contribuir para o aumento dos processos deteriorativos que induzem a formação de radicais livres, degradação enzimática e inativação, redução da atividade respiratória e perda da atividade da membrana celular (VIDIGAL et al., 2009; SHARMA et al., 2012; COELHO et al., 2017a; ABREU et al., 2018).

A deterioração das sementes pode ser detectada por alterações em perfis enzimáticos, por meio de análise da expressão dos sistemas antioxidativos (DUSSERT et al., 2006; SHARMA et al., 2012; COELHO et al., 2015; COELHO et al., 2017a; ABREU et al., 2018). Enzimas como a catalase, a superóxido dismutase e a peroxidase, atuam como removedoras de radicais livres e estão envolvidas nos sistemas de proteção contra a deterioração. A glutamato oxaloacetato transaminase participa no metabolismo do nitrogênio, fundamental no metabolismo proteico, germinação e durante todo o ciclo de vida da planta. A endo- β -mananase está ligada à degradação das membranas, e em sementes de café, está envolvida na

degradação de mananas no processo da germinação, resultando no enfraquecimento das paredes celulares do endosperma e promovendo a protusão radicular (SILVA et al., 2004). As proteínas tipo LEA são acumuladas durante os estágios tardios de desenvolvimento das sementes (GRAETHER; BODDINGTON, 2014), e estão relacionadas aos mecanismos de proteção contra danos causados pela remoção de água, a partir de tecidos de plantas (TUNNACLIFFE et al., 2010), e indica tolerância á dessecação para alguns organismos (VIDIGAL et al., 2009).

Assim, a perda da qualidade das sementes em relação ao desempenho fisiológico pode ser identificada pelos sistemas enzimáticos, que podem funcionar como marcadores da qualidade ou da deterioração. No entanto, os resultados da avaliação do perfil proteico, ou determinação da atividade enzimática em sementes, nem sempre são consistentes com a qualidade fisiológica das sementes, quando realizados por meio da expressão em gel de eletroforese, da expressão gênica em PCR em tempo real, ou, por métodos de quantificação, havendo indícios de que o teor de água das sementes pode também influenciar nesta relação. Nesse contexto, o objetivo nesta pesquisa foi avaliar a influência da qualidade fisiológica e o teor de água das sementes no perfil proteico de sementes de café.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sementes de café

A espécie do gênero *Coffea* compreende um grupo de plantas caracterizado por frutos constituídos de uma dupla elipsoide, que possuem exocarpo (casca), mesocarpo (mucilagem) e o endocarpo coriáceo (pergaminho). O exocarpo tem a coloração variada em função da cultivar utilizada, podendo ser vermelho ou amarelo, na fase madura do fruto. Cada fruto contém dois *locus* e duas sementes.

Segundo Rena e Maestri (1986) as sementes são plano-convexas, elípticas ou ovais, sulcadas longitudinalmente na face plana, sendo constituída de embrião, endosperma e o espermoderma ou película prateada. As sementes de café arábica apresentam teores entre 55 a 65,5% de carboidratos; 8 a 11% de ácidos, entre os quais se destacam: ácido cítrico, málico, clorogênico, acético, butírico e valérico; 1 a 3% de lignina; 15 a 18% de lipídeos; 11 a 15% de compostos nitrogenados; 8,5 a 12% de proteína; 0,8 a 1,4% de cafeína; 3 a 5,4% de minerais (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2009).

De forma geral, as sementes de café inicialmente foram classificadas como recalitrantes (KING; ROBERTS, 1979), posteriormente, ortodoxas (ROBERTS; KING; ELLIS, 1984). Atualmente, as sementes são classificadas como intermediárias (ELLIS et al., 1990) por apresentarem uma relativa tolerância a secagem em comparação as recalitrantes, mas não resistem a uma extrema perda de água e são sensíveis a baixas temperaturas.

As sementes de café apresentam perda da qualidade em um curto período de tempo, não mantendo qualidade fisiológica após seis meses após o armazenamento, com redução do poder germinativo e vigor (ARAÚJO et al., 2008; COELHO et al., 2015). Coelho et al. (2015), ao avaliarem alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secadas em sílica gel e soluções salinas saturadas, verificaram efeito prejudicial no vigor das sementes de café após quatro meses de armazenamento em câmara fria. Resultados semelhantes foram encontrados por Nasiro et al. (2017), ao analisarem o tempo de armazenamento em sementes de *Coffea arabica* L., nos quais verificaram diminuição na germinação das sementes após cinco ou seis meses de armazenamento.

Dessa forma, a formação de mudas do cafeeiro é afetada pela deterioração das sementes. Diante desse contexto, estudos visando a determinação do perfil proteico em

sementes de café são de grande importância para o conhecimento dos processos metabólicos atuantes nessas sementes associadas com o desempenho fisiológico.

2.2 Danos no metabolismo de reserva das sementes

Para a germinação das sementes, os lipídeos são fontes de energia eficiente, assim como possuem também, função de reserva e estrutural. As lipases hidrolisam os triglicerídeos, formando glicerol e ácidos graxos, parte transformada posteriormente em açúcar, liberando energia para a germinação. Os lipídeos são constituintes essenciais de membranas celulares e sua organização afeta diretamente os processos fisiológicos das sementes (MARCOS-FILHO, 2015).

Um dos fatores da predisposição à deterioração das sementes se relaciona aos lipídeos, devido a sua instabilidade química, como a hidrólise enzimática, peroxidação e a autooxidação. Essas alterações promovem além da decomposição dos lipídeos, a ocorrência de uma série de reações que originam produtos potencialmente tóxicos, degeneração dos componentes de membranas com alterações em lipídeos de reserva (SANTOS et al., 2013; ABREU et al., 2018).

A principal causa da deterioração das sementes é a peroxidação de lipídeos, que consiste na produção de radicais livres, hidroperóxidos e produtos secundários mediante a ação de enzimas oxidativas como as lipoxigenases. Este processo atua em fosfolipídeos componentes de membrana e em lipídeos armazenados, causando danos em membranas celulares e outros compostos celulares. A autooxidação lipídica ocorre em todas as células, mas predomina em sementes com teores de água baixos, próximos a 6%. O mecanismo de peroxidação lipídica também é dependente do teor de água das sementes. Em sementes com teor de água entre 6 a 14% a peroxidação lipídica é mínima, enquanto que com teores de água próximos ou acima de 14% tem-se maior peroxidação lipídica, estimulada pelas enzimas hidrolíticas, como lipoxigenases (McDONALD, 1999; MARCOS-FILHO, 2015).

A peroxidação lipídica é danosa para as sementes devido à formação dos radicais livres, hidroperóxidos e vários produtos secundários. Por outro lado, as sementes podem ser protegidas pela ação de mecanismos enzimáticos, assim como a ação de antioxidantes. Portanto, os mecanismos enzimáticos promovem a diminuição desses efeitos danosos ou até sua anulação em sementes.

2.3 Processo oxidativo em sementes

A deterioração das sementes conduz a um processo irreversível iniciado por eventos bioquímicos, redução da velocidade de germinação, danos de membrana, reações de biossíntese, aumento de plântulas anormais e morte das sementes (MARCOS-FILHO, 2015). Neste sentido, é de fundamental importância o conhecimento sobre essas alterações que constituem a perda de algumas funções de membranas e enzimas (BILAL; ABIDI, 2015).

Em geral, a perda da qualidade das sementes pela deterioração inicia-se com ocorrências no campo como, decréscimo da porcentagem, velocidade e uniformidade da emergência das plântulas e durante os processos na pós-colheita, como processamento, secagem e armazenamento. As sementes deterioradas apresentam elevada relação da taxa respiratória, e eventualmente perda do poder germinativo (BILAL; ABIDI, 2015).

Análises bioquímicas podem ser realizadas para avaliar a qualidade das sementes permitindo identificar os sistemas enzimáticos, atuando como marcadores de qualidade ou de deterioração. A partir de resultados destas análises é possível avaliar as alterações proporcionadas pela deterioração e as relacionar com os perfis enzimáticos atuantes no processo respiratório, peroxidação de lipídeos e remoção de radicais livres (TIMÓTEO, 2011). Pesquisas têm sido desenvolvidas objetivando estudar a deterioração de sementes de café por meio dos perfis enzimáticos da superóxido dismutase (SANTOS et al., 2014), da endo- β -mananase (FREITAS et al., 2017), da catalase e da álcool desidrogenase (ABREU et al., 2018).

Os sistemas enzimáticos removedores de radicais livres e espécies reativas de oxigênio podem se constituir como marcadores de qualidade das sementes para melhor entendimento da perda da qualidade delas. Os radicais livres são átomos ou grupos de átomos com um ou mais elétrons não pareados, altamente reativos e causam danos profundos em várias atividades celulares. As espécies reativas de oxigênio têm capacidade em danificar as células vegetais devido às formas mais comuns altamente reativas como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e ânion superóxido (O_2^-) (MITTLER, 2002; GILL; TUTEJA, 2010; TATONE et al., 2010).

2.4 Sistemas enzimáticos e proteínas resistentes ao calor

Durante os processos de pós-colheita, como o processamento, secagem e armazenamento, as sementes podem ser submetidas a diversas condições de estresse, que proporcionam a formação de oxigênio singleto e outros radicais livres, fazendo-se necessário a remoção desses radicais presentes nas células pela ação das enzimas antioxidantes (BERJAK, 2006; DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

Os radicais livres em concentrações elevadas nas células, comprometem a funcionalidade das membranas, provoca a peroxidação de lipídeos e a degradação de ácidos nucleicos (GREGGAINS et al., 2000), promovendo o aumento da deterioração das sementes e, conseqüente perda da qualidade. As enzimas antioxidantes asseguram o controle da ação desses radicais livres.

As principais enzimas que atuam em conjunto neste processo antioxidante são a catalase (CAT), a superóxido dismutase (SOD) e a peroxidase (PO) (BARBOSA et al., 2014). A enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é a primeira a exercer controle das espécies reativas de oxigênio, convertendo o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (FOYER; NOCTOR, 2005; GILL et al., 2015). A SOD é uma metaloproteína, apresentando três grupos de acordo com o componente metálico de seu ativo (cofatores): Fe-SOD (cloroplasto), Mn-SOD (mitocôndria e peroxissomo) e Cu/Zn-SOD (cloroplasto e citosol) (GILL; TUJETA, 2010).

A catalase (CAT, EC 1.11.1.6), enzima encontrada em peroxissomos, é responsável por consumir e produzir o peróxido de hidrogênio produzido em condições de estresse e remoção de radicais livres (DUBEY, 2011), decompondo o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. A CAT atua em conjunto com a SOD, e sua ausência pode inativar a função enzimática da superóxido dismutase (FRIDOVICH, 1995).

Peroxidase (PO, EC 1.11.1.7), outra enzima importante para remoção de radicais livres, se localiza na parede celular e no vacúolo, apresentando função de redução e exposição dos efeitos do O_2 nos mecanismos de defesa das sementes (DUSSERT et al., 2006). A PO também atua no metabolismo do ácido indolacético, no mecanismo de resistência as doenças, formação de paredes celulares e no controle de dormência pelo controle da entrada de oxigênio.

A glutamato oxaloacetato transaminase (GOT, EC 2.6.1.1), atua na germinação das sementes, no processo de degradação e síntese de proteínas (CONN; STUMPF, 1990).

Catalisa a reação de transferência do grupo amino de um aminoácido (aspartato) para o α -cetoglutarato para formar o glutamato + oxaloacetato. A reação é catalisada no citoplasma e o glutamato, no qual a membrana mitocondrial é permeável, entra na matriz, onde pode ser novamente transaminado ou ser desaminado pela glutamato desidrogenase.

Outra enzima importante é a polifenoloxidase (PPO, EC 1.14.18.1) que se relaciona à qualidade da bebida de café e em função das operações do cultivo, processamento e armazenamento, podem ter sua ação diminuída (CARVALHO, 1997). A PPO é uma enzima cúprica (ROBINSON; ESKIN, 1991), detectada em diversas partes no fruto e se encontra ligada às membranas. Quando ocorrem danos às membranas, essas enzimas são liberadas e ativadas, podendo reagir com substratos fenólicos intra e extracelulares, oxidando as quinonas (AMORIN, 1978). Os polifenóis exercem funções nas plantas de: mecanismos de defesa, ação antioxidante e proteção dos aldeídos. Assim, quando ocorre algum dano ao grão ou à semente, a enzima PPO é ativada e age sobre os polifenóis, diminuindo a ação oxidante dos aldeídos. A oxidação desses compostos, ao mesmo tempo em que produzem as quinonas, atuam como inibir da PPO. Devido à oxidação os cafés irão apresentar alterações no sabor, pior qualidade e baixa atividade da PPO (AMORIN; SILVA, 1968).

A respiração das células é outro fator importante para a atividade das enzimas, influenciando na mobilização de reservas e no metabolismo de síntese. A respiração celular atua na atividade da enzima malato desidrogenase (MDH, EC 1.1.1.37), a qual desempenha importante função no ciclo de Krebs, participando de reações fundamentais para produção de ATP e de compostos intermediários essenciais para o funcionamento das células. Nas mitocôndrias, essa enzima catalisa a conversão de malato a oxaloacetato produzindo NADH para o ciclo de Krebs (TUNES et al., 2011). No citoplasma, catalisa a reação de oxaloacetato em malato e produz NAD⁺, necessário para a glicólise. No citosol, a MDH oxida o malato, transportado da mitocôndria à oxaloacetato que será convertido a fosfoenolpiruvato e produzirá sacarose pela gliconeogênese. Também desempenha função no ciclo do glioxilato ao oxidar o malato em oxaloacetato, que se ligará a acetil-CoA nos glioxissomos para produzir citrato (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Enzimas, como esterase (EST, EC 3.1.1.1) presentes nas membranas celulares, participam das reações de hidrólise de ésteres podendo ter ação sobre o metabolismo de lipídeos (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005; COELHO et al., 2015). O aumento da atividade desta enzima resulta em maior grau de prevenção da peroxidação lipídica,

promovendo a liberação de ácidos graxos para o processo respiratório. Saath et al. (2014) concluíram que esta enzima é indicativa de deterioração em grãos de café.

Outra enzima importante relacionada no processo de germinação e durante a deterioração das sementes é a endo- β -mananase. A endo- β -1,4-mananase (EC 3.2.1.78) é uma das principais enzimas responsáveis pela hidrólise das mananas presentes no endosperma durante a germinação de sementes, atuando na degradação hidrolíticas das paredes celulares e no processo de enfraquecimento das estruturas do endosperma que rodeiam o embrião, permitindo assim, a emergência da raiz primária (SILVA et al., 2004; JOET et al., 2013). O estudo da atividade desta enzima é importante para conhecimento dos efeitos de processamento e secagem em sementes de café (FERREIRA et al., 2018).

Além dos sistemas enzimáticos de suma importância na identificação dos processos deteriorativos em sementes, as proteínas resistentes ao calor, como as LEA (*Late Embryogenic Abundant*) são essenciais e podem estar relacionadas à tolerância à seca e ao resfriamento quando expostas a fatores de estresse (BATTAGLIA; COVARRUBIAS, 2013; AMARA et al., 2014). Exerce papel estrutural como protetoras à dessecação, contra danos causados pela remoção de água a partir de tecidos de plantas, assim como seu acúmulo indica tolerância à dessecação (TUNNACLIFFE et al., 2010; VIDIGAL et al., 2009). Essas proteínas são capazes de proteger estruturas celulares ou amenizar o efeito do estresse causado pela dessecação, pois, possuem alta característica hidrolítica, além de sua composição rica em aminoácidos.

Processos de deterioração das sementes são identificados por meio das manifestações fisiológicas como redução da velocidade de germinação, declínio da velocidade de crescimento, assim como manifestações metabólicas ou bioquímicas mediante a respiração, alterações em sistemas enzimáticos, alterações no metabolismo de reservas, alterações em taxas de síntese, danos aos ácidos nucleicos (McDONALD, 1999; MARCOS-FILHO, 2015).

2.5 Métodos de determinação do perfil proteico e enzimático

A análise da atividade enzimática para detecção de reações metabólicas, utilizando a eletroforese de isoenzimas ou a quantificação por espectrometria são técnicas fundamentais em laboratórios de pesquisa para complementar a determinação da qualidade de sementes.

A técnica de eletroforese de isoenzimas consiste na identificação das alterações na expressão dessas proteínas, podendo ser um método de acompanhamento da qualidade das

sementes pela análise do polimorfismo isoenzimático (SAATH et al., 2014; COELHO et al., 2015; COELHO et al., 2017b; ABREU et al., 2018). Segundo Cheliak e Pitel (1984), as sementes são materiais utilizados para análise do polimorfismo isoenzimático devido a seu fácil armazenamento, são ricas em proteínas e enzimas de elevada atividade, geralmente livres de metabólitos secundários que interferem na resolução e atividade enzimática.

A eletroforese representa a migração de íons submetidos à corrente elétrica (ALFENAS, 2006). Assim, os extratos proteicos, obtidos por maceração da amostra, são aplicados ao gel, submetidos à corrente elétrica e os seus componentes ionizados migrarão com velocidades individuais. Os extratos proteicos são obtidos por maceração da amostra, a qual é aplicada no gel e submetida à eletroforese. Uma determinada enzima, em virtude da posição no gel após a corrida, pode ser revelada, permitindo identificações qualitativas (por sua posição) e quantitativas (pela intensidade das bandas).

Durante a eletroforese ocorre reação enzimática, em que o substrato sobre o qual a enzima atua gera o produto formado. As bandas reveladas nos géis, ilustradas por fotografias ou esquemas, constituem os zimogramas, na qual a intensidade das bandas é função da atividade enzimática. Logo, esta técnica visa a detecção de proteínas totais ou de enzimas específicas e sua intensidade de bandas é função da atividade enzimática e da distribuição polinomial das combinações de monômeros formadores da enzima na sua estrutura quaternária, bem como a sobreposição de moléculas de mesma mobilidade (ALFENAS, 2006).

Outra técnica utilizada para detecção de reações enzimáticas é a quantificação por espectrofotometria. O espectrofotômetro é um instrumento capaz de medir e comparar a quantidade de luz (radiação eletromagnética) absorvida, transmitida ou refletida por uma determinada amostra (VINADÉ; VINADÉ, 2005). Essa amostra pode ser solução, sólido transparente ou sólido opaco, de modo que a faixa de comprimentos de onda da radiação eletromagnética para leitura da quantificação enzimática varia de acordo com o protocolo de cada enzima estudada.

A espectrofotometria permite quantificar as reações catalisadas por enzimas. No espectrofotômetro permite-se a seleção de radiações monocromáticas, o que possibilita inúmeras determinações quantitativas regidas pela Lei de Beer (VINADÉ; VINADÉ, 2005). Para a realização da análise é utilizada a leitura da absorbância na região do espectro eletromagnético da luz ultravioleta para enzimas cuja quantificação da atividade é realizada em intervalos de tempo (Ex.: CAT, APX, ADH), enquanto que, na região da luz visível,

comumente são realizadas leituras únicas (Ex.: SOD), bem como na determinação de proteínas totais. Essas determinações ocorrem em tempo real quando a enzima ou proteína total atua sobre o substrato, gerando um produto.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de realização dos experimentos

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Sementes, do Departamento de Agricultura, e a liofilização das sementes foi realizada no Setor de Fisiologia Vegetal, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras-MG.

3.2 Obtenção, processamento e secagem do material vegetal

Foram utilizados frutos de café, da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Topázio MG 1190, das safras 2017 e 2018, colhidos no Campo Experimental da EPAMIG, em Três Pontas, localizada, aproximadamente a 85 Km de Lavras. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação cereja, por meio de coleta seletiva e lavados para a separação de frutos chochos, malformados, brocados e de impurezas. Em sequência, os frutos foram descascados e as sementes foram desmuciladas por meio da fermentação em água por 24 horas, e foram mantidas sobre telado, à sombra, para a retirada da água superficial, antes de serem submetidas à secagem.

As sementes foram secadas utilizando-se sílica gel como agente dessecante, em caixas plásticas munidas de telas, contendo 60 gramas de sílica gel ativada, mantidas em câmaras tipo B.O.D, reguladas em temperatura de 25 °C, na ausência de luz. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g, até que os teores de água de interesse (12, 15, 20, 25, 30, 35 e 40%) fossem atingidos.

Após secagem, as sementes foram submetidas às análises fisiológicas e bioquímicas para avaliação da influência dos diferentes teores de água nas sementes do lote armazenado (safra 2017) e lote recém-colhido (safra 2018).

3.3 Determinação do teor de água e avaliação da qualidade fisiológica das sementes de café

3.3.1 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa a 105 °C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 10 sementes para cada tratamento. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido (bu) das sementes.

3.3.2 Teste de condutividade elétrica

Foi realizado o teste de condutividade elétrica de massa, com quatro repetições de 25 sementes. As amostras de sementes de todos os tratamentos foram pesadas em balança de precisão de três casas decimais, e colocadas para embeber em recipientes de 200 mL, contendo 37,5 mL de água deionizada (KRZYZANOWSKY; FRANÇA NETO; HENNING, 1991). Em seguida, foram mantidas em BOD, em temperatura constante de 25 °C, onde permaneceram por 24 horas. Após o período de condicionamento, as soluções foram levemente agitadas para uniformização dos lixiviados e foi medida a condutividade elétrica da solução por meio da leitura em um aparelho condutivímetro da marca MS Tecnoyon Instrumentação, modelo mCA-150, sendo os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

3.3.3 Teste de germinação

Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento, semeadas papel de germinação, umedecidas em água destilada em quantidade equivalente a duas vezes e meia a massa do papel seco. Posteriormente, os rolos foram mantidos em germinador, em temperatura constante de 30 °C na presença de luz, por 30 dias (BRASIL, 2009).

Foi determinada a porcentagem de protusão radicular aos 15 e de plântulas normais aos 15 e aos 30 dias após a semeadura (BRASIL, 2009). Após o término do teste de germinação, as plântulas normais foram mantidas e foi determinada a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas após 45 dias de semeadura.

3.3.4 Peso seco de plântulas

O peso seco de plântulas foi realizado aos 45 dias após a semeadura. A parte aérea foi separada das raízes, com auxílio de bisturi e o material vegetal foi colocado em sacos de papel, os quais foram submetidos à secagem em estufa de circulação forçada de ar a 60 °C por 4 a 5 dias ou até massa constante. O peso seco foi determinado em balança de precisão (0,0001 g), com os resultados expressos em mg plântula⁻¹.

3.3.5 Teste de tetrazólio

Foram utilizadas quatro repetições de 25 sementes de cada tratamento, as quais foram embebidas em água destilada por 36 horas, em temperatura de 30 °C (CLEMENTE et al., 2011), para a extração dos embriões, que foram mantidos em solução antioxidante polivinilpirrolidona (PVP). Após esta etapa, os embriões foram lavados em água destilada, embebidos em solução de tetrazólio 0,5 % e mantidos em frascos escuros, em temperatura de 30 °C por três horas. Após este período, os embriões foram avaliados quanto à viabilidade, com auxílio de lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para visualização interna e externa de suas estruturas, após corte longitudinal dos embriões. Os embriões foram classificados em viáveis e não viáveis, considerando-se a localização e a extensão de danos visíveis (BRASIL, 2009).

3.4 Liofilização das sementes de café

As análises proteômicas foram realizadas nas sementes de café liofilizadas e não liofilizadas. Para a liofilização, as sementes sem pergaminhos foram congeladas a -86 °C, e submetidas à secagem a vácuo por 120 horas em liofizador (*Integrated SpeedVac System* modelo L101, marca Liobras). Após a liofilização, as sementes foram trituradas em moinho refrigerado a 4° C, em 22.500 RPM, na presença de nitrogênio e PVP (polivinilpirrolidona), e armazenadas em geladeira em temperatura de 6 e 10 °C, até a realização das análises de eletroforese de isoenzimas e da quantificação em espectrofotometria.

3.5 Expressão em eletroforese das análises proteômicas

Para cada tratamento, foram amostradas duas repetições de 25 sementes sem pergaminho, que foram mantidas em ultra freezer a $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o seu preparo para análises. As amostras congeladas foram trituradas em moinho refrigerado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, em 22.500 rpm, na presença de nitrogênio e PVP (polivinilpirrolidona) e armazenadas em temperatura de $-86\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises das proteínas.

Para a extração foi utilizado o tampão adequado para cada enzima, na proporção de 320 μL por 100 mg de pó das sementes. A solução foi homogeneizada em vórtex e mantida em geladeira por uma hora, seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 60 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Foram aplicados 50 μL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética ocorreu em um sistema de géis de poliacrilamida (4,5% gel de concentrador e 7,5% gel separador) a 150V durante seis horas. O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi Tris-glicina pH 8,9. Como descrito por Alfenas (2006), ao término da corrida, os géis foram revelados para as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PO), glutamato oxaloacetato transaminase (GOT), polifenoloxidase (PPO), malato desidrogenase (MDH) e esterase (EST).

Para a avaliação da enzima endo- β -mananase, 300 μL do tampão de extração (0,1 M Hepes; 0,5 M de NaCl; ácido ascórbico na proporção de 5 mg do ácido para cada mL de tampão, pH 8,0) foram adicionados a 100 mg do macerado de cada amostra. Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram agitados em vortex por 1 minuto e centrifugados, em 14.000 rpm por 30 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O sobrenadante foi aplicado em gel contendo 6 mL LBG (*locust bean gum*), 0,24 g de agarose e 24 mL de tampão pH 5,0 (11 mL de ácido cítrico 1M, 50 mL de Na_2HPO_4 e 149 mL de água destilada). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel com auxílio de um furador. O gel foi incubado por 21h e revelado segundo metodologia proposta de Silva et al. (2004). A atividade da enzima endo- β -mananase foi calculada de acordo com Downie (1994).

As proteínas resistentes ao calor foram analisadas em amostras de 100 mg de sementes moídas, pesadas em microtubos, com tampão de extração na proporção de dez partes de tampão para uma de amostra. As amostras foram centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante foi separado e incubado em banho-maria a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e 70 μL do sobrenadante foram vertidos em microtubos, aplicando-se 40 μL do tampão de extração da *lea*

proteína. Em sequência, foram levados ao banho-maria em ebulição por 5 minutos e foram aplicados 50µL de cada amostra, em cada canaleta do gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador). A corrida eletroforética foi realizada a 150 V por quatro horas, e os géis foram corados em *Coomassie Blue* (0,5g *Coomassie Blue* R-250; 250 mL de etanol; 50 mL de ácido acético glacial, completando o volume até 500 mL com água destilada). A coloração dos géis foi feita utilizando-se solução de *Coomassie Blue* 0,05% por 12 horas e solução de ácido acético 10% e etanol 5% para descoloração conforme metodologia descrita por Alfenas e Brune (1998).

3.6 Quantificação das enzimas e de proteínas resistentes ao calor em espectrofotômetro de placas

Para a quantificação foram amostradas 25 sementes liofilizadas e não liofilizadas de cada tratamento, as quais foram acondicionadas, identificadas e armazenadas em ultra freezer a -86 °C. Os materiais foram macerados separadamente na presença de nitrogênio e PVP (polivinilpirrolidona), armazenados em temperatura de -86 °C até a realização das análises. A quantificação foi realizada para as seguintes enzimas e proteínas resistentes ao calor.

- a) Superóxido dismutase (SOD): foi avaliada a capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), conforme proposto por Giannopolitis e Ries (1977), com modificações. Foram adicionados 5µL do extrato enzimático a 200µL do meio de incubação composto por: tampão de fosfato de potássio 100 µM (pH 7,8), metionina 40 µM, EDTA 3µM, água 35 µM, NBT 15µM e riboflavina 2µM incubado a 28 °C. A microplaca, contendo o meio de incubação mais a amostra, foi iluminada em espectro visível com lâmpada fluorescente de 20W por 7 minutos. As leituras foram realizadas a 560nm em espectrofotômetro. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio, sendo os resultados expressos em U.SOD.g⁻¹MF.
- b) Catalase (CAT): foi avaliada segundo Havir e McHale (1987), com modificações. Uma alíquota de 5µL do extrato enzimático foi adicionada a 200µL do meio de incubação contendo 100µL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e 10µL de peróxido de hidrogênio 250 mM e 85µL de água destilada incubado a 28 °C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio por meio do espectrofotômetro. O coeficiente de extinção molar utilizado foi corrigido

de $36 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ para $18 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ uma vez que os poços da microplaca tipo ultravioleta possuem 0,5 cm de comprimento, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2.\text{mg}^{-1}\text{MF}.\text{min}^{-1}$.

- c) Polifenoloxidase (PPO): foram adicionados 20 μL do extrato enzimático a 200 μL do meio de incubação composto por tampão de fosfato de potássio 140 μM (pH 7) e catecol 40 μM incubado a 30 °C. A atividade dessa enzima foi determinada pelo decréscimo na absorvância a 410nm, a cada 30 segundos, por 3 minutos. O coeficiente de extinção molar utilizado foi $1,235\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, sendo os resultados expressos em $\mu\text{mol catecol}.\text{mg}^{-1}\text{MF}.\text{min}^{-1}$.
- d) Proteínas resistentes ao calor: foram utilizados 100mg das amostras trituradas nas quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. As amostras foram homogeneizadas e submetidas ao aquecimento a 40 °C por 30 minutos em banho-maria. Após esse período, foi realizada a centrifugação a 11000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. Foi adicionada uma alíquota de 30 μL do extrato enzimático e foram adicionados 170 μL do meio de incubação contendo Comassie-blue G-250, solução de Bradford incubado a 30 °C, e mantido em repouso por 5 minutos a 30 °C antes de proceder a leitura. A concentração de proteínas resistentes ao calor foi determinada pelo método de Bradford (1976), sendo os resultados expressos em $\text{mg PT g}^{-1}\text{MF}$.

3.7 Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado para todas as análises. Os resultados das avaliações fisiológicas foram analisados em esquema fatorial 2 (lote de sementes armazenadas e lote de sementes recém-colhidas) X 7 (teores de água), com quatro repetições. Os resultados das quantificações de enzimas e proteínas resistentes ao calor foram analisados em esquema fatorial 2 (lote de sementes armazenadas e lote de sementes recém-colhidas) X 7 (teores de água), em sementes que foram ou não liofilizadas. Já os resultados da expressão eletroforética de isoenzimas e proteínas não foram submetidos à análise estatística, mas analisados por interpretação visual. Para a análise de variância, todos os dados foram submetidos ao teste de normalidade, sendo as médias qualitativas comparadas pelo teste de *Scott-Knott* e os dados quantitativos submetidos à análise de regressão, em nível de 5% de probabilidade, com auxílio do software R (*R Development Core Team*, 2018).

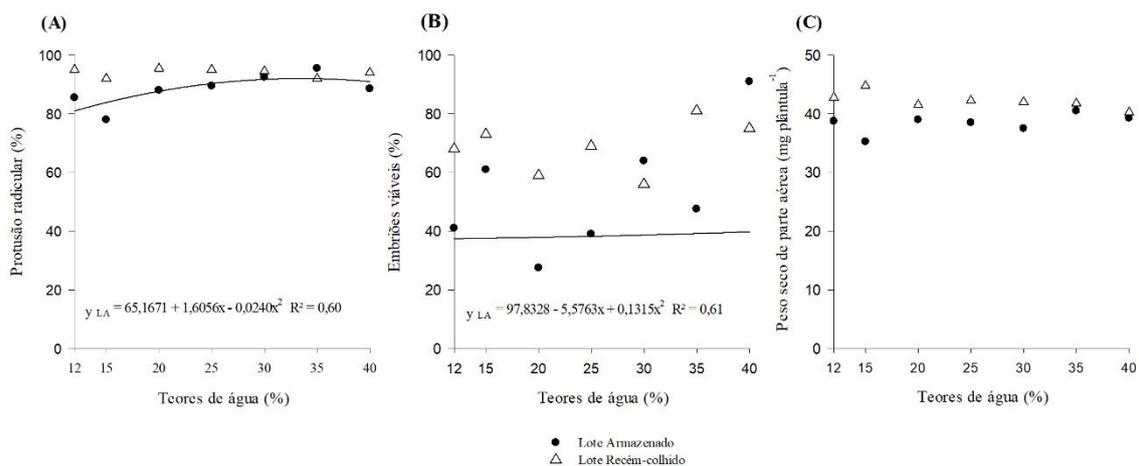
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados da avaliação fisiológica das sementes

Pelos resultados das análises de variância dos dados fisiológicos, foi constatada interação significativa entre os lotes estudados e teores de água das sementes, para as variáveis protrusão radicular, peso seco de parte aérea e viabilidade no teste de tetrazólio (TABELA 1A, do anexo).

Na Figura 1 estão representados os efeitos do teor de água sobre o desempenho fisiológico das sementes, dentro de cada lote utilizado.

Figura 1 - Porcentagem de protrusão radicular (A), de viabilidade (B) e peso seco de parte aérea (C), de sementes de *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água.



Fonte: Da autora (2019).

Embora pouco acentuada, foi observada uma tendência de redução dos percentuais de protrusão radicular (FIGURA 1A) e peso seco de parte aérea de plântulas (1C), à medida que ocorreu o decréscimo nos teores de água, principalmente nas sementes do lote armazenado por um ano, indicando que nestas sementes a secagem propiciou uma maior queda no vigor (FIGURA 1). Já as sementes recém-colhidas apresentaram desempenho fisiológico mais estável, indicando melhor vigor quando submetidas à secagem até menores teores de água. Para a variável peso seco de raízes, não foram observados resultados significativos, então os mesmos não foram apresentados.

Para a porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio, foi possível observar o efeito dos teores de água dentro de cada lote estudado, sendo que as sementes recém-colhidas apresentaram as maiores médias (FIGURA 1B).

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da qualidade fisiológica das sementes de lote dentro de cada teor de água. Observa-se melhor desempenho das sementes recém-colhidas, em relação às armazenadas, para as variáveis viabilidade no teste de tetrazólio e peso seco de parte aérea de plântulas. Já para porcentagem de protrusão radicular, uma variável menos sensível para detectar diferenças em qualidade de sementes de café, houve diferenças significativas apenas abaixo de 20% de umidade.

Tabela 1 - Porcentagem de protrusão radicular, viabilidade e peso seco de parte aérea de sementes de *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água.

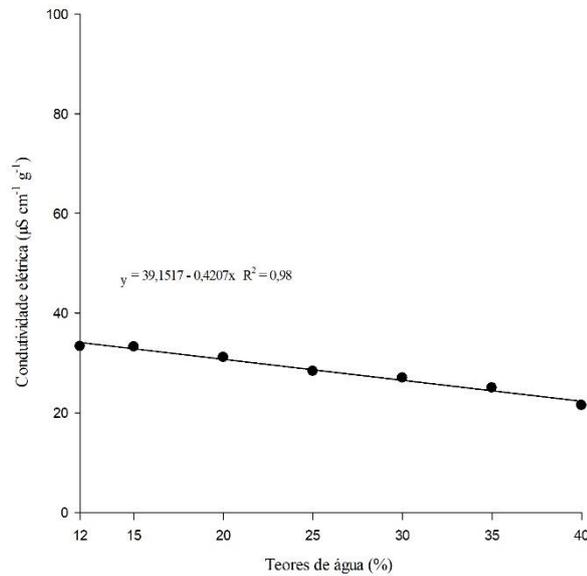
Teores de água (%)	Lote de Sementes	PR (%)	EV (%)	PSPA (mg plântula ⁻¹)
12	Armazenado	86 b	41 b	38,75 b
	Recém-colhido	95 a	68 a	42,75 a
15	Armazenado	78 b	61 a	35,25 b
	Recém-colhido	92 a	73 a	44,75 a
20	Armazenado	88 b	28 b	39,00 a
	Recém-colhido	96 a	59 a	41,50 a
25	Armazenado	90 a	39 b	38,50 b
	Recém-colhido	95 a	69 a	42,25 a
30	Armazenado	93 a	64 a	37,50 b
	Recém-colhido	95 a	56 a	42,00 a
35	Armazenado	96 a	48 b	40,50 a
	Recém-colhido	92 a	81 a	41,75 a
40	Armazenado	89 a	91 a	39,25 a
	Recém-colhido	94 a	75 a	40,25 a
CV (%)		4,54	19,30	6,41

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2019).

Para a variável condutividade elétrica, houve efeito isolado de teor de água e de lote de semente (TABELA 1A, do anexo), conforme pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Condutividade elétrica de sementes de *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água.



Fonte: Do autor (2019).

Considerando os dados de condutividade elétrica, em função dos teores de água, verificou-se efeito linear decrescente das médias dos tratamentos, à medida que ocorre aumento no teor de água das sementes (FIGURA 2).

Tabela 2 - Porcentagem de plântulas normais, de plântulas com folhas cotiledonares expandidas e condutividade elétrica de sementes de *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água.

Lote de sementes	Plântulas normais (%)	Plântulas com folhas cotiledonares		Condutividade elétrica (µS cm⁻¹ g⁻¹)
		(%)	(%)	
Armazenado	62 b	58 b		26,45 a
Recém-colhido	78 a	73 a		30,58 a
CV (%)	11,47	13,39		12,54

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2019).

O lote de sementes recém-colhidas apresentou médias superiores em relação ao lote de sementes armazenadas para as variáveis plântulas normais, plântulas com folhas cotiledonares expandidas, contudo, para condutividade elétrica não houve diferença significativa em função dos lotes (TABELA 2). Para estas variáveis, houve efeito isolado do fator lote de sementes (TABELA 1A, do anexo).

4.2 Resultados da avaliação do perfil proteico das sementes

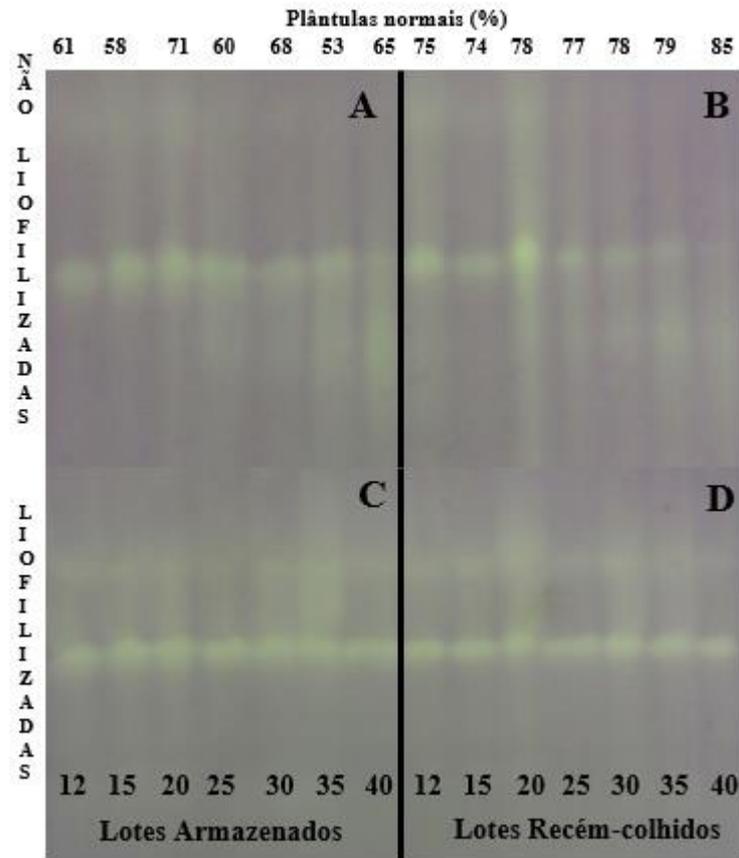
4.2.1 Enzimas avaliadas por expressão em gel de eletroforese e quantificadas por espectrofotometria

4.2.1.1 Enzima superóxido dismutase

Em sementes de café armazenadas ou recém-colhidas não liofilizadas observa-se nos geis, expressão da enzima superóxido dismutase em todos os teores de água estudados (FIGURA 3A e 3B), assim como padrões semelhantes em intensidade de bandas, nestas unidades. Nestas sementes observou-se uma isoforma com maior expressão no teor de 20% bu para as sementes do lote recém-colhido (FIGURA 3B e 3D). Já nas sementes liofilizadas (FIGURA 3C e 3D), muito embora a expressão da SOD tenha ocorrido em todos os teores de água, nos dois lotes, esta expressão foi mais intensa do que nas sementes não liofilizadas. Em outros trabalhos de pesquisa com sementes de café não foram observadas diferenças nos perfis da SOD, independentemente das diferenças em desempenho fisiológico (BRANDÃO JÚNIOR et al., 2000; COELHO et al., 2017b; FANTAZZINI et al., 2018).

A atividade desta enzima é relacionada com resposta antioxidante para neutralizar o oxigênio singleto e outros radicais livres envolvidos na perda da qualidade fisiológica das sementes (BERJAK, 2006). A superóxido dismutase completa a eliminação dos radicais livres formados sob condições de estresse, quando acoplada a rotas de eventos metabólicos.

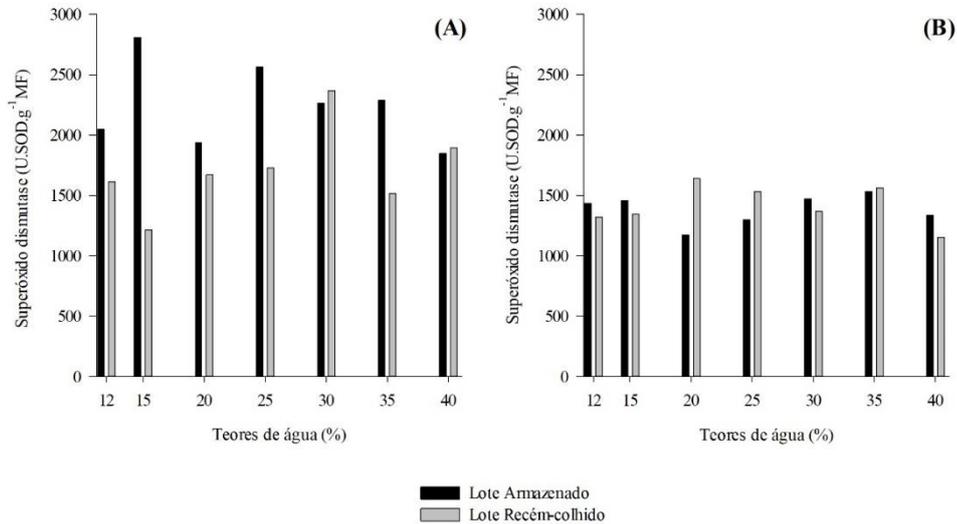
Figura 3 – Expressão da enzima superóxido dismutase (SOD) em *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água: sementes não liofilizadas do lote armazenado (A) ou recém-colhido (B); sementes liofilizadas do lote armazenado (C) ou recém-colhido (D).



Fonte: Da autora (2019).

Analisando a atividade da enzima superóxido dismutase, quantificada por espectrofotometria, observa-se que em sementes de café não liofilizadas (FIGURA 4A) ocorreram maiores médias, em relação as sementes liofilizadas (FIGURA 4B), todavia, não diferiram significativamente entre os diferentes teores de água (TABELA 2A, do anexo). O crescente aumento na atividade das enzimas antioxidantes está associado à função de neutralizar o efeito deletério das EROs, uma vez que atuam como sinalizadoras das respostas das plantas, desde o crescimento até a resposta a estresses (SHARMA et al., 2012; ALVES et al., 2012; EL-ENANY et al., 2013; VERMA et al., 2014).

Figura 4 - Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em sementes de *Coffea arabica* L. não liofilizadas (A) e liofilizadas (B), com diferentes lotes e teores de água.



Fonte: Da autora (2019).

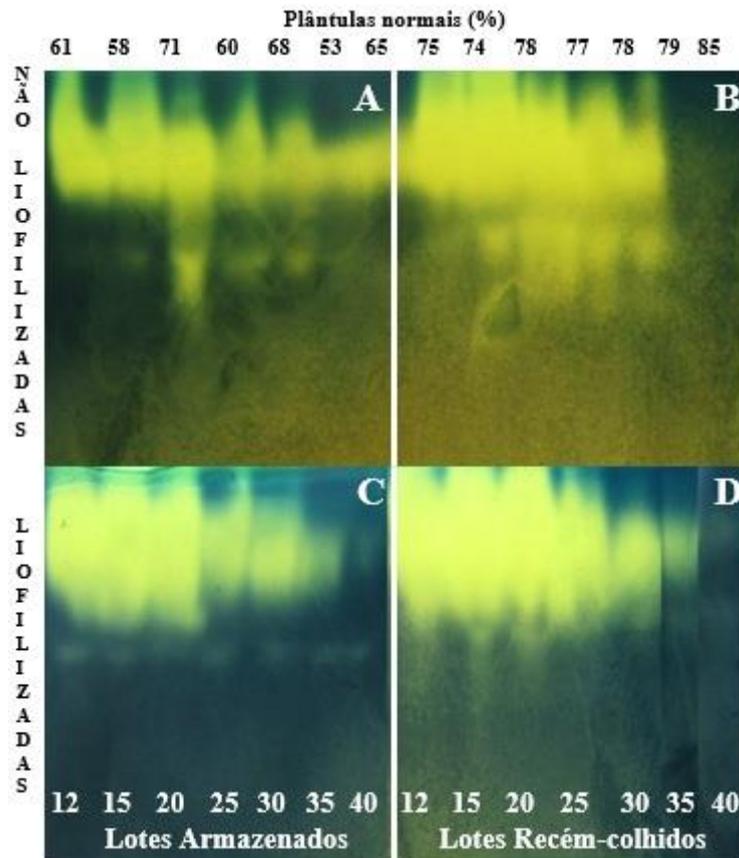
4.2.1.2 Enzima catalase

De acordo com os resultados apresentados na Figura 5, verifica-se padrões eletroforéticos diferentes quando se utiliza sementes liofilizadas ou não liofilizadas, tanto em sementes armazenadas quanto recém-colhidas. Observa-se que as sementes de café armazenadas não liofilizadas apresentam menor intensidade de bandas em relação às sementes recém-colhidas (FIGURA 5A e 5B), com ausência de algumas isoformas. Estes resultados corroboram com os testes fisiológicos, em que as sementes do lote armazenado no teor de água de 12% bu, apresentaram mais baixa viabilidade e vigor. Já nas sementes recém-colhidas não liofilizadas observa-se maior expressão da CAT à medida que os teores de água reduzem de 30 até 12%, assim como a presença de diferentes isoformas nos teores de 30 a 15% bu (FIGURA 5B). Verifica-se que a expressão da enzima catalase em sementes de café liofilizadas apresentou padrão semelhante entre os lotes estudados, com aumento da expressão enzimática à medida que ocorre diminuição dos teores de água (FIGURA 5C e 5D).

A catalase é responsável por decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (DUBEY, 2011), atuando como protetora das células contra a deterioração. A maior atividade

pode estar associada à diminuição ou aumento de mecanismo de prevenção contra danos oxidativos.

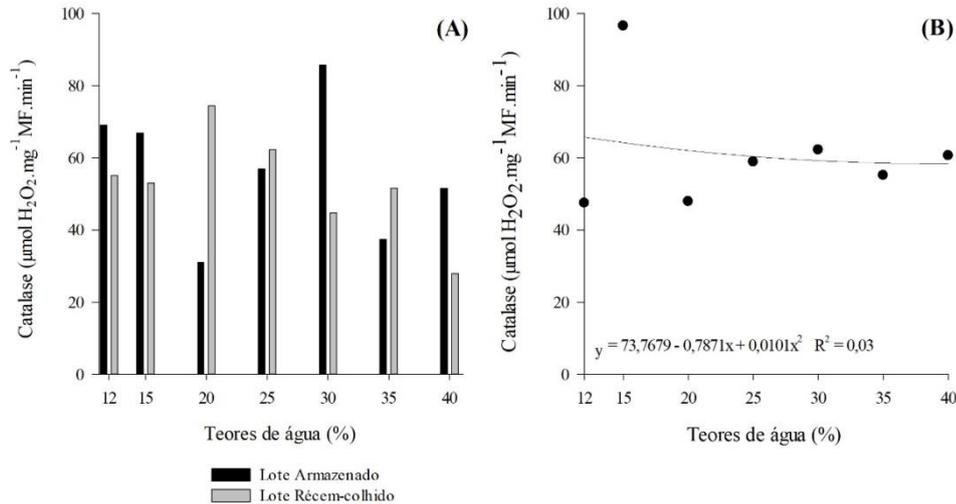
Figura 5 – Expressão da enzima catalase (CAT) em *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água: sementes não liofilizadas do lote armazenado (A) ou recém-colhido (B); sementes liofilizadas do lote armazenado (C) ou recém-colhido (D).



Fonte: Da autora (2019).

Na quantificação por espectrofotometria da CAT, verifica-se que maiores atividades da enzima são observadas nas sementes de café armazenadas não liofilizadas (FIGURA 6A), no entanto, não houve efeito significativo dos fatores teores de água e lotes estudados (TABELA 2A, do anexo). Para as sementes de café liofilizadas, observa-se efeito significativo do fator teor de água (TABELA 2A, do anexo), com menor atividade enzimática as sementes no teor de água de 12% bu (FIGURA 6B).

Figura 6 - Atividade da enzima catalase (CAT) em sementes de *Coffea arabica* L. não liofilizadas (A) e liofilizadas (B), com diferentes lotes e teores de água.



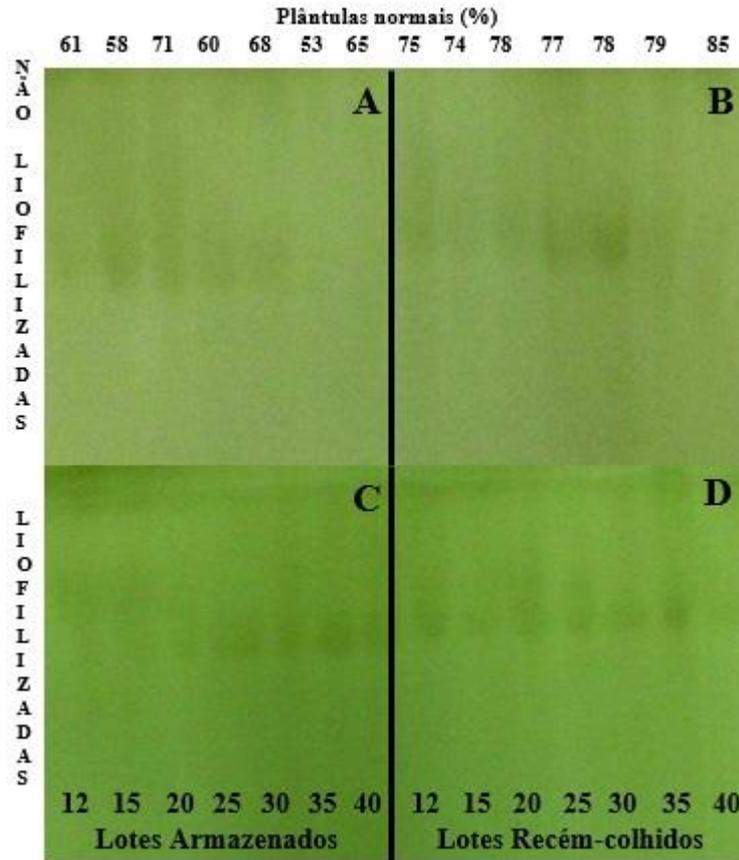
Fontes: Da autora (2019).

4.2.1.3 Enzima polifenoloxidase

Maior expressão eletroforética foi observada nos teores de água intermediários de 15, 20, 25 e 30% bu, em sementes armazenadas não liofilizadas (FIGURA 7A), do mesmo modo que em sementes recém-colhidas, no teor de água de 30% bu (FIGURA 7B). Observa-se, de maneira geral, uma maior atividade da enzima em sementes liofilizadas, em comparação com as não liofilizadas. Na avaliação fisiológica as sementes do lote armazenado, no teor de água de 20% bu, apresentaram maior viabilidade e vigor. Observou-se também ausência de isoformas da enzima polifenoloxidase em sementes armazenadas não liofilizadas, nos teores de água de 35 e 40% bu (FIGURA 7A), assim como, baixa expressão nas sementes recém-colhidas (FIGURA 7B).

Segundo Sperotto et al. (2015) maior atividade da enzima polifenoloxidase está relacionado as alterações na qualidade dos grãos de café, atribuídos aos danos nas estruturas das paredes celulares.

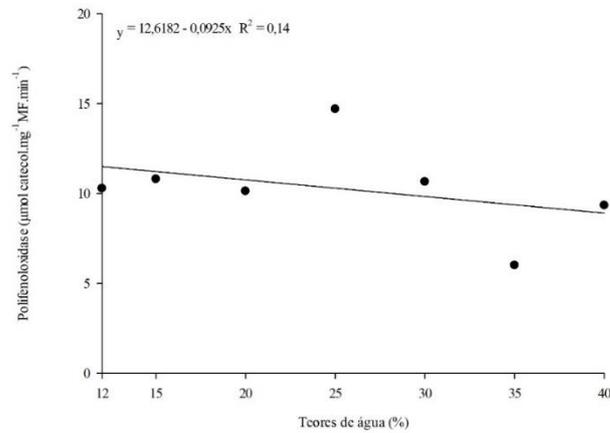
Figura 7 – Expressão da enzima polifenoloxidase (PPO) em *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água: sementes não liofilizadas do lote armazenado (A) ou recém-colhido (B); sementes liofilizadas do lote armazenado (C) ou recém-colhido (D).



Fonte: Da autora (2019)

Na quantificação da enzima polifenoloxidase observa-se efeito significativo dos fatores teor de água e lotes de sementes (TABELA 2A, do anexo), onde se verifica em sementes liofilizadas, aumento da atividade em função do decréscimo nos teores de água (FIGURA 8).

Figura 8 - Atividade da polifenoloxidase (PPO) em sementes de *Coffea arabica* L. liofilizadas, com diferentes lotes e teores de água.



Fonte: Da autora (2019).

Quanto ao efeito dos lotes, verifica-se que as sementes de café recém-colhidas apresentaram médias superiores em relação as sementes armazenadas, independentemente do processo de liofilização (Tabela 3). A PPO se relaciona qualidade da bebida de café e é influenciada pelo cultivo, processamento e armazenamento que diminuem sua atividade (CARVALHO, 1997). Uma alta atividade da PPO é indicativo da qualidade da bebida de café.

Tabela 3 - Atividade da enzima polifenoloxidase em sementes de *Coffea arabica* L. não liofilizadas e liofilizadas de lote armazenado ou recém-colhido.

Lote de sementes	Polifenoloxidase sem liofilização (μmol catecol.mg ⁻¹ .MF.min ⁻¹)	Polifenoloxidase com liofilização (μmol catecol.mg ⁻¹ .MF.min ⁻¹)
Armazenado	5,55 b	5,89 b
Recém-colhido	14,62 a	14,67 a
CV (%)	43,62	44,55

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade.

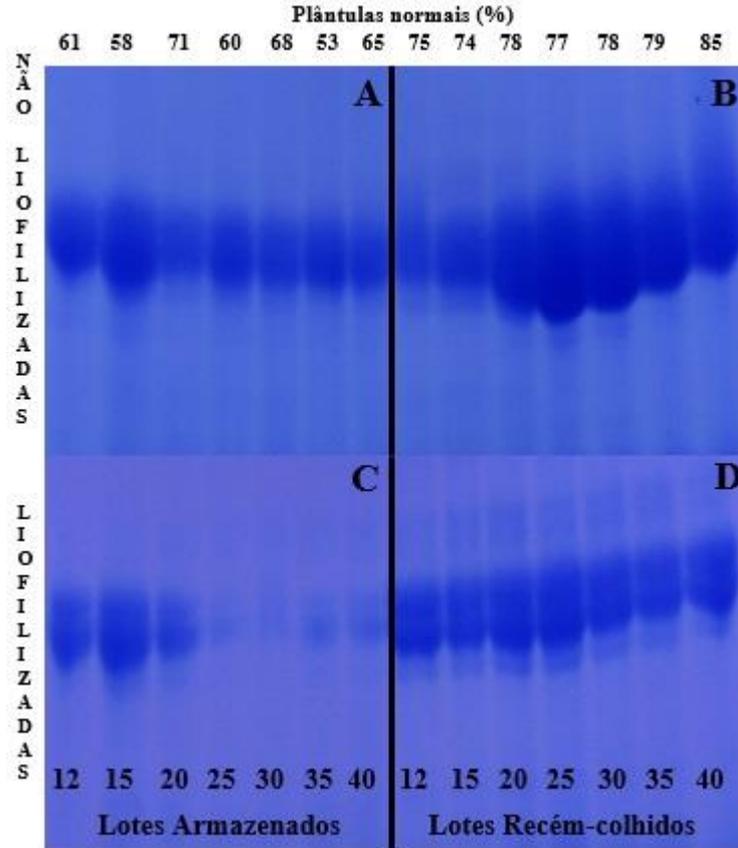
Fonte: Da autora (2019).

4.2.1.4 Proteínas resistentes ao calor

Na expressão em gel de eletroforese desta enzima observa-se uma redução na atividade enzimática, quando as sementes não foram liofilizadas (FIGURA 9A e 9B), com padrão diferenciado nos lotes recém-colhido e armazenado. Em sementes armazenadas não liofilizadas, a maior expressão das proteínas foi obtida em menores teores de água de 12 e 15% bu (FIGURA 9A). Já em sementes recém-colhidas a maior expressão foi observada nos teores de água de 25 e 20% bu (FIGURA 9B). Em sementes armazenadas liofilizadas, uma maior expressão foi observada no teor de água de 15% bu, com pouca variação nos demais teores de água (FIGURA 9C). Todavia, em sementes recém-colhidas, maior intensidade da expressão desta proteína foi verificada em teores de água acima de 20% bu (FIGURA 9D).

Em sementes, as proteínas resistentes ao calor têm função protetora contra danos da dessecação (TUNNACLIFFE et al., 2010; VIDIGAL et al., 2009). Assim, sua expressão pode indicar avanço do processo deteriorativo em sementes. Neste trabalho, foram constatadas diferenças no padrão da enzima de sementes liofilizadas e não liofilizadas. No entanto, uma vez que os lotes de sementes não apresentaram grandes diferenças em vigor, torna-se menos efetiva a análise das relações entre a atividade enzimática das proteínas resistentes ao calor com o desempenho fisiológico das sementes.

Figura 9 – Expressão das proteínas resistentes ao calor *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água: sementes não liofilizadas do lote armazenado (A) ou recém-colhido (B); sementes liofilizadas do lote armazenado (C) ou recém-colhido (D).

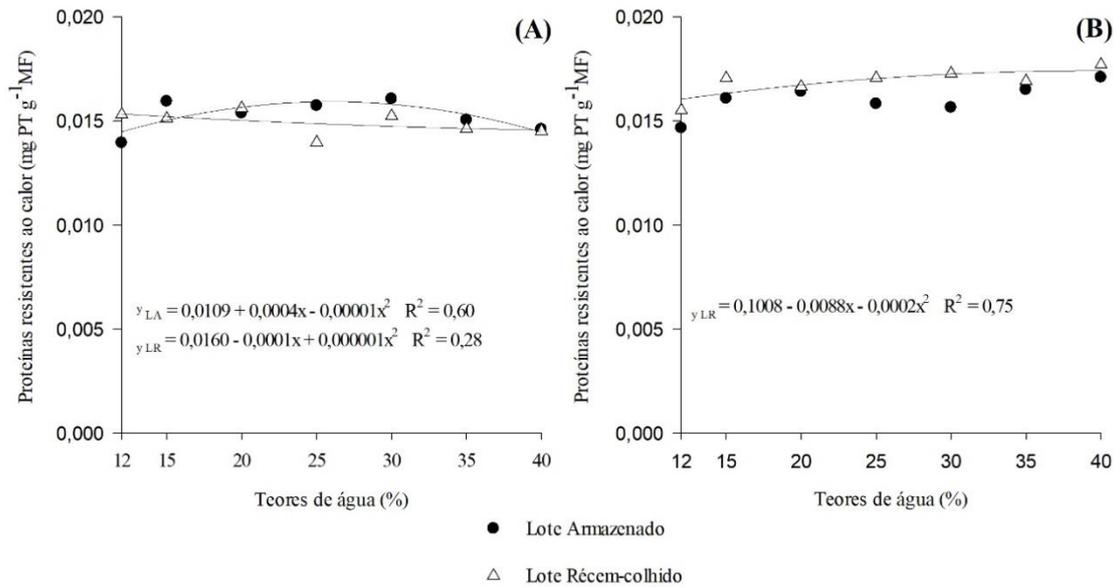


Fonte: Da autora (2019).

Pelos resultados da análise de variância dos dados de proteínas resistentes ao calor quantificadas por espectrofotometria, houve interação significativa dos fatores lote e teor de água das sementes liofilizadas e não liofilizadas (TABELA 2A, do anexo). Observa-se comportamento semelhante entre os dois lotes de sementes de café não liofilizadas (FIGURA 10A). Em sementes de café liofilizadas observa-se tendência de redução dos valores das médias com a redução do teor de água (FIGURA 10B).

Proteínas resistentes ao calor são mais flexíveis estruturalmente em condições aquosas e mais estáveis em menor teor de água e podem apresentar várias isoformas em um organismo, capazes de executar diversas funções tais como, atuar na estabilidade de membranas, no balanço redox e na homeostase de proteínas e ácidos nucleicos (HAND et al., 2011; TUNNACLIFFE et al., 2010).

Figura 10 - Proteínas resistentes ao calor em sementes de *Coffea arabica* L. não liofilizadas (A) e liofilizadas (B), com diferentes lotes e teores de água.



Fonte: Da autora (2019).

Não houve diferenças significativas entre os dados de quantificação de proteínas resistentes ao calor, em diferentes lotes, para as sementes de café não liofilizadas nos teores de água de 15, 20, 30, 35 e 40% bu (TABELA 4). Já nas sementes liofilizadas, maior atividade foi detectada em sementes recém-colhidas e com teor de água de 40% bu (TABELA 4).

Tabela 4 - Proteínas resistentes ao calor em sementes de *Coffea arabica* L. não liofilizadas e liofilizadas, com diferentes lotes e teores de água.

Teor de água (%)	Lote de sementes	PTNNLIO (mg PT g ⁻¹ MF)	PTNLIO (mg PT g ⁻¹ MF)
12	Armazenado	0,0139 b	0,0146 a
	Recém-colhido	0,0153 a	0,0155 a
15	Armazenado	0,0159 a	0,0161 a
	Recém-colhido	0,0151 a	0,0171 a
20	Armazenado	0,0154 a	0,0165 a
	Recém-colhido	0,0156 a	0,0167 a
25	Armazenado	0,0157 a	0,0159 a
	Recém-colhido	0,0140 b	0,0173 a
30	Armazenado	0,0161 a	0,157 a
	Recém-colhido	0,0152 a	0,0171 a
35	Armazenado	0,0151 a	0,0547 a
	Recém-colhido	0,0146 a	0,0169 a
40	Armazenado	0,0146 a	0,0171 b
	Recém-colhido	0,0145 a	0,0924 a
CV (%)		4,25	125,04

Médias seguidas pela mesma letra na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2019).

4.2.1.5 Endo- β -mananase

Na análise de variância dos dados da enzima endo- β -mananase quantificada por espectrofotometria, houve interação significativa dos fatores lote e teor de água, tanto em sementes liofilizadas como em sementes não liofilizadas (TABELA 2A, do anexo). Quando quantificada sem liofilização, a atividade da enzima endo- β -mananase foi maior em sementes de café armazenadas, comparada às sementes recém-colhidas (TABELA 5). Esta mesma tendência foi observada nos resultados da quantificação desta enzima em sementes liofilizadas, conforme dados da tabela 6.

Observa-se também, que tanto na determinação com liofilização, como sem liofilização, não houve diferenças significativas entre a atividade da endo- β -mananase nos diferentes teores de água, para as sementes recém-colhidas (TABELA 5). No entanto, quando se analisa os resultados para as sementes do lote armazenado, houve picos de atividade da enzima, nas sementes com teor de água de 12 e 30% bu (TABELA 5) sem liofilização, bem como nas sementes com teores de água de 20, 25 e 30% bu (TABELA 6).

Tabela 5 – Endo- β -mananase em sementes de *Coffea arabica* L. não liofilizadas, com diferentes lotes e teores de água.

	Lote	Teores de água (%)							CV (%)
		12	15	20	25	30	35	40	
ENDONLIO	Armazenado	618,505 Ba	4,150 Ca	7,1620 Ca	6,615 Ca	2046,540 Aa	0,970 Ca	1,060 Ca	38,57
(pmol/min/g)	Recém-colhido	0,380 Ab	0,435 Aa	0,330 Aa	0,140 Aa	0,275 Ab	0,285 Aa	0,175 Aa	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha (teores de água) e minúscula na coluna (lotes) não diferem entre si pelo teste de pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2019).

Tabela 6 – Endo- β -mananase em sementes de *Coffea arabica* L. liofilizadas, com diferentes lotes e teores de água.

	Lote	Teores de água (%)							CV (%)
		12	15	20	25	30	35	40	
ENDOLIO	Armazenado	30,335 Ba	148,760 Ba	908,710 Ba	3083,545 Aa	87,590 Ba	2,070 Ba	30,415 Ba	114,8
(pmol/min/g)	Recém-colhido	0,245 Aa	0,485 Aa	0,500 Ab	0,425 Ab	41,215 Aa	218,800 Aa	1,230 Aa	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na linha (teores de água) e minúscula na coluna (lotes) não diferem entre si pelo teste de pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% de probabilidade.

Fonte: Da autora (2019).

Farias (2012) verificou maior atividade da enzima endo- β -mananase em sementes com maiores teores de água, com o aumento do tempo de embebição em água. Resultado divergente foi encontrado por Santos (2010) onde observou menor atividade da enzima endo- β -mananase em sementes de café submetidas à secagem rápida nos teores de água de 12 e 30% bu. Ferreira et al. (2018) verificaram que a atividade da enzima endo- β -mananase é indicativa de danos, em estudos dos efeitos de processamento e secagem de sementes de *Coffea arabica* L. podendo ser avaliado sementes inteiras, endospermas ou embriões. Em sementes de café, a atividade dessa enzima está relacionada ao processo de deterioração (FREITAS et al., 2017).

Freitas et al. (2017) observaram uma maior expressão da endo- β -mananase em sementes embebidas em relação as sementes secas de café. Os autores ressaltam que a atividade da enzima endo- β -mananase pode estar relacionada tanto ao processo germinativo quanto ao processo de deterioração em sementes de café, considerando que ao longo do armazenamento as sementes perdem a qualidade fisiológica aumentando a atividade dessa enzima (VEIGA, et al., 2007; FREITAS et al., 2017).

4.2.2 Expressão em gel de eletroforese

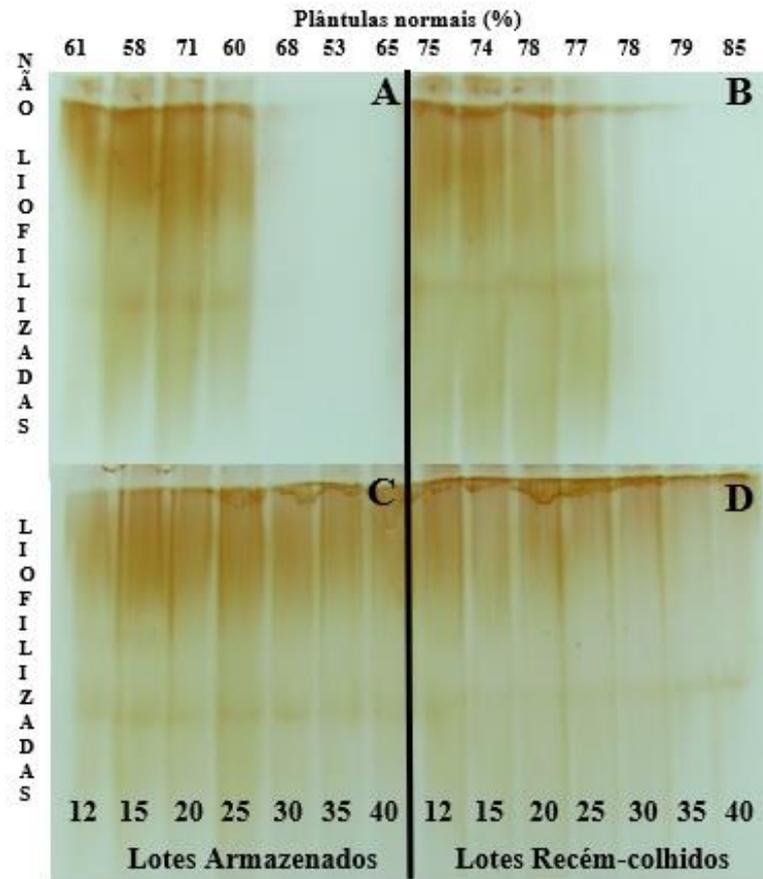
4.2.2.1 Peroxidase

A atividade desta enzima foi maior e ocorreu em todos os teores de água, nas sementes liofilizadas (FIGURA 11C e 11D), enquanto não liofilizadas, não houve expressão acima de 30% de umidade (FIGURA 11A e 11B). A qualidade fisiológica em sementes recém-colhidas, nos teores de água de 35 e 40% bu, apresentou os melhores resultados para o teste de germinação. As sementes armazenadas apresentam maior intensidade de bandas, comparadas às recém-colhidas, independentemente da liofilização (FIGURA 11A e 11C), sendo que houve expressão enzimática da PO em todos os teores de água estudados e lotes em sementes de café liofilizadas (FIGURA 11C e 11D).

Coelho et al. (2017b) verificaram ausência ou baixa atividade dessa enzima em sementes de café úmidas em comparação com as sementes submetidas a secagem. Segundo Nireesha et al. (2013), o processo de liofilização é um método de desidratação em que a água é congelada e depois eliminada por sublimação e por dessorção. Desse modo, a liofilização é indicada quando existem compostos sensíveis a degradação térmica, como compostos

fenólicos e antioxidantes do tipo ácido ascórbico, carotenoides, tocoferóis (RUDY et al., 2015).

Figura 11 - Expressão da enzima peroxidase (PO) em *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água: sementes não liofilizadas do lote armazenado (A) ou recém-colhido (B); sementes liofilizadas do lote armazenado (C) ou recém-colhido (D).



Fonte: Da autora (2019).

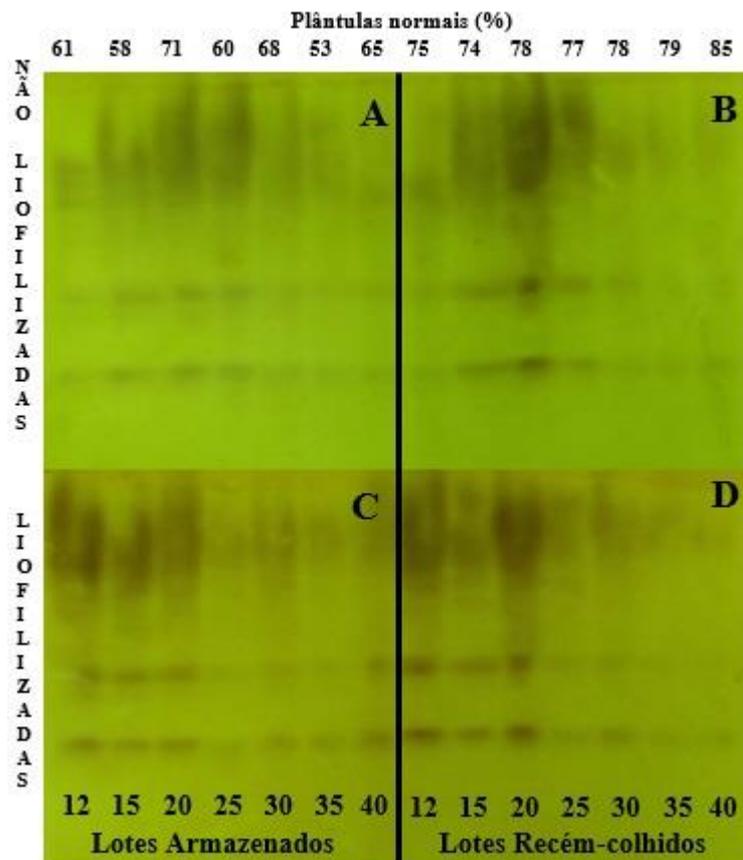
4.2.2.2 Glutamato oxaloacetato transaminase

Pela expressão da enzima observou-se três isoformas distintas em ambos os lotes estudados e um padrão variado de intensidade de ausência ou presença de isoformas nos teores de água em sementes de café liofilizadas ou não (FIGURA 12). De maneira geral, em sementes armazenadas ou recém-colhidas ocorre redução de atividade em maiores teores de água, independentemente do processo de liofilização.

As alterações no perfil eletroforético da enzima GOT é influenciada pelo processo de deterioração (TUNES et al., 2010; TUNES et al., 2011). Esta enzima apresenta papel importante na germinação das sementes, uma vez que atua na oxidação de aminoácidos

fornecendo energia para o ciclo de Krebs ou para a redução do alfa-cetoglutarato para novos aminoácidos destinados ao crescimento do embrião e também a síntese proteica (MALONE et al., 2007; VIEIRA et al., 2009; TUNES et al., 2010). Dessa forma, uma alta expressão da enzima glutamato oxaloacetato transaminase em sementes do lote recém-colhido indica alto vigor em relação ao lote armazenado.

Figura 12 – Expressão da enzima glutamato oxaloacetato transaminase (GOT) em *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água: sementes não liofilizadas do lote armazenado (A) ou recém-colhido (B); sementes liofilizadas do lote armazenado (C) ou recém-colhido (D).



Fonte: Da autora (2019).

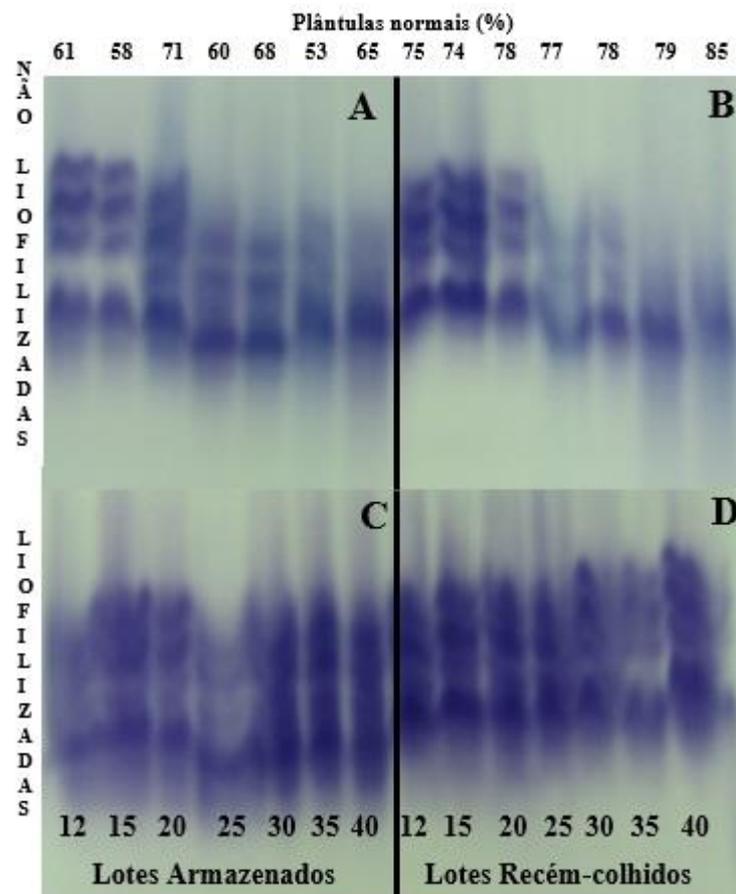
4.2.2.3 Malato desidrogenase

Em sementes de café liofilizadas (FIGURA 13C e 13D), observa-se expressão enzimática mais intensa do que em sementes não liofilizadas (FIGURA 13A e 13B), com maior expressão nos teores de água de 12 e 15% bu, principalmente com a liofilização. Nos

testes fisiológicos, as sementes recém-colhidas apresentaram resultados superiores em relação às armazenadas.

Fantazzini et al. (2018), estudando o teste de tetrazólio em café, relataram alta atividade da enzima MDH em sementes de café armazenadas por oito meses. Esta enzima está associada ao processo de respiração das sementes e alta atividade respiratória está relacionada com a maior deterioração, com conseqüente maior atividade da malato desidrogenase. Assim, em sementes com o potencial fisiológico reduzido as enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas ocorrendo aumento na expressão da MDH em diferentes locais das células (SHATTERS et al., 1994).

Figura 13 – Expressão da enzima malato desidrogenase (MDH) em *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água: sementes não liofilizadas do lote armazenado (A) ou recém-colhido (B); sementes liofilizadas do lote armazenado (C) ou recém-colhido (D).



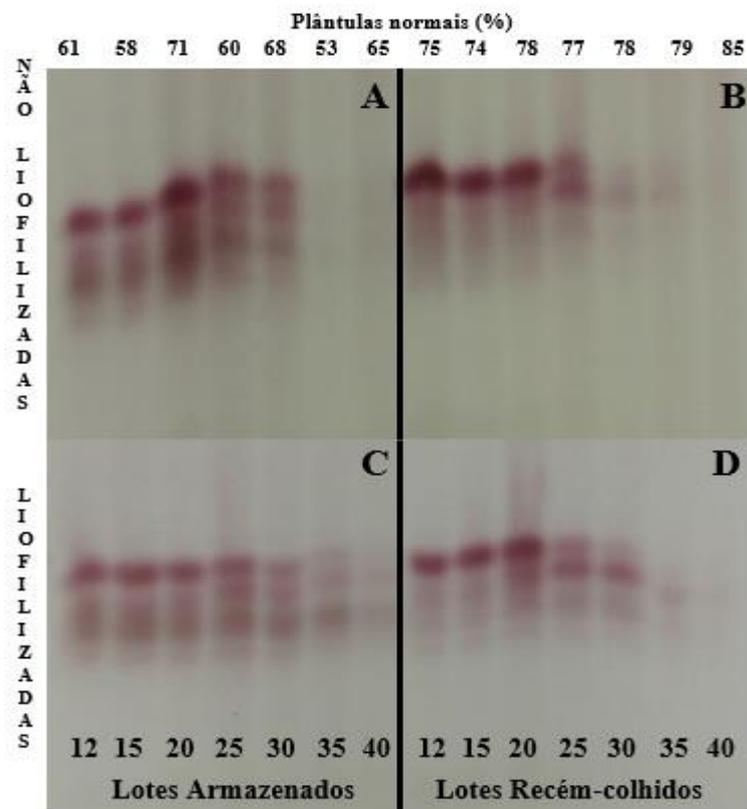
Fonte: Da autora (2019).

4.2.2.4 Esterase

Maior expressão desta enzima foi observada em sementes armazenadas, independentemente da liofilização (FIGURA 14A e 14C). Em sementes armazenadas e recém-colhidas, independente da liofilização ocorre baixa expressão de isoformas a partir do teor de água de 35% ou ausência de isoforma a partir do mesmo teor de água (FIGURA 14). Ressalta-se que em sementes recém-colhidas liofilizadas, houve maior expressão no teor de água de 20% bu (FIGURA 14D).

A esterase é um bom indicador da deterioração das sementes, com importante função catalítica na desintoxicação celular, atuando na hidrólise de éster e no metabolismo de lipídeo (NAKADA et al., 2010; RUSSEL et al., 2011). Resultados semelhantes foram obtidos por Coelho et al. (2017b), ao verificarem aumento da atividade da EST em sementes secas de café.

Figura 14 - Expressão da enzima esterase (EST) em *Coffea arabica* L., com diferentes lotes e teores de água: sementes não liofilizadas do lote armazenado (A) ou recém-colhido (B); sementes liofilizadas do lote armazenado (C) ou recém-colhido (D).



Fonte: Da autora (2019).

Conforme descrito, a expressão das enzimas do processo antioxidativo, CAT, SOD, PO, PPO e GOT, revelada nos géis de eletroforese, apresentaram padrões diferenciados, quando foram utilizadas sementes de café liofilizadas ou não liofilizadas. A associação da expressão destas enzimas com o desempenho fisiológico das sementes recém-colhidas ou armazenadas não resultou em grandes variações tendo em vista que os lotes tinham qualidade semelhante, sem diferenças significativas na germinação e pequenas diferenças em vigor.

As enzimas do processo antioxidativo atuam na proteção das sementes, contra danos causados por diferentes estresses e há muitos relatos na literatura da relação entre a atividade enzimática e o desempenho fisiológico das sementes, com grandes discrepâncias dos resultados.

A liofilização das sementes propiciou uma desidratação em baixa temperatura, retirando toda a água presente nas sementes, e isso refletiu diretamente nos resultados da expressão das isoenzimas nos géis de eletroforese. O resultado da atividade enzimática sobre os substratos específicos a cada enzima foi, de maneira geral, mais intenso para sementes liofilizadas do que ocorreu na expressão eletroforética das mesmas enzimas utilizando-se sementes nos teores de água originais, não liofilizadas. A extração das enzimas a partir de sementes liofilizadas, para a expressão nos géis, resulta em melhor resultado, tendo em vista a menor influência da água no sistema.

5 CONCLUSÕES

A redução do teor de água não afeta a germinação e a viabilidade de sementes de café recém-colhidas, mas propicia a redução do vigor e da armazenabilidade.

Teores de água acima de 30% bu influenciam no perfil proteico e enzimático das sementes de café não liofilizadas.

O processo de liofilização das sementes de café permite melhor resolução na determinação do perfil proteico e enzimático.

A eletroforese de isoenzimas e a quantificação por espectrofotometria são técnicas complementares.

REFERÊNCIAS

- ABREU, G.F. et al. Antioxidant enzymes preserving coffee quality in refrigerate environment. **Biotecnología Vegetal**, Cuba, v. 18, n. 3, p. 151-159, 2018.
- ABREU, L.A.S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399-406, 2014.
- ALFENAS, A.C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.
- ALFENAS, A.C; BRUNE, W. Identificações específicas de enzimas em géis. In: ALFENAS, A.C. (Ed.). **Eletroforese de Isoenzimas e Proteínas Afins: Fundamentos e Aplicações em Plantas e Microorganismos**. Viçosa, MG: UFV, 1998. p. 201-328.
- ALVES, J.D. et al. Antioxidative responses and morpho-anatomical adaptations to atterlogging in *Sesbania virgata*. **Trees**, Berlin, v. 27, n. 3, p. 717-728, 2012.
- AMARA, I. et al. Insights into late embryogenesis abundant (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. **American Journal of Plant Sciences**, Washington, v. 5, n. 22, p. 3440-3455, 2014.
- AMORIN, H.V. **Aspectos bioquímicos e histoquímicos do grão de café verde relacionados com a determinação da qualidade**. 1978. 85 p. Tese (Livre Docente em Bioquímica) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, SP, 1978.
- AMORIN, H.V.; SILVA, D.M. Relationship between the polyphenoloxidase activity of coffee beans and the quality of the beverage. **Nature**, Londres, v. 219, n. 5152, p. 381-382, 1968.
- ARAÚJO, R.F. et al. Conservação de café (*Coffea arabica* L.) despulpado e não despulpado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 71-78, 2008.
- BARBOSA, M.R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, p. 453-460, 2014.
- BATTAGLIA, M.; COVARRUBIAS, A.A. Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in legumes. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 190, p. 1-11, 2013.
- BELITZ, H.D.; GROSCHE, W.; SCHIEBERLE, P. Coffee, tea, cocoa. **Food Chemistry**, Berlin, p. 938-970, 2009.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 16, n. 1, p. 1-15, 2006.
- BILAL, M.S.; ABIDI, A.B. Physiological and biochemical changes during seed deterioration: a review. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 6, n. 4, p. 3416-3422, 2015.

- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 7, p. 248-254, 1976.
- BRANDÃO JÚNIOR, S. **Eletroforese de proteína e isoenzimas na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavra, Lavras, MG, 1990.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Departamento Nacional de Produção Vegetal. **Regras para análises de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 399 p.
- CARVALHO, V.D. **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1997. V. 2. 73 p.
- CHELIAK, W.M.; PITEL, J.A. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. **Information report PI-X**, v. 42, p. 1-13, 1984.
- CLEMENTE, A.C.S. et al. Preparo das sementes de café para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n.1, p. 38-44, 2011.
- COELHO, S.V.B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, 2015.
- COELHO, S. V. B.; ROSA, S. D. V. F.; FERNANDES, J. S. Cryopreservation of coffee seeds: a simplified method. *Seed Science and Technology*, Londrina, v. 45, n. 3, p. 1-12, 2017b.
- _____. Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to sub zero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, p. 312-321, 2017a.
- CONAB. Companhia Nacional De Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira – café: Terceiro levantamento, setembro 2019 – safra 2019**. Brasília: Companhia Nacional de Abastecimento. 2019. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe>>. Acesso em: 01 out. 2019.
- CONN, E.E.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1990. p. 383-385.
- DOWNIE, B.; HILHORST, H.W.M.; BEWLEY, J.D. A new assay for quantifying endo- β -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, New York, v. 36, n. 4, p. 829-835, 1994.
- DUBEY, R.S. Metal toxicity, oxidative stress and antioxidative defense system in plants. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. **Science Publishers**, Chap. 9, p.178-203, 2011.

DUSSERT, S. et al. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 127, n. 2, p. 192-204, 2006.

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 169-178, 2006.

EL-ENANY, A.E. et al. Role of antioxidant enzymes in amelioration of water deficit and waterlogging stresses on *Vigna sinensis* plants. **Journal of Biology and Earth Sciences**, Suchy Las, v. 3, n. 1, p. B144-B153, 2013.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behavior? **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, set. 1990.

FANTAZZINI, T.B. **Teste de tetrazólio em café: fisiologia e biquímica na estimação da germinação das sementes**. 2018. 145f. Tese (Doutorado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2018.

FARIAS, E.T. **Expressão gênica no embrião e no endosperma micropilar de sementes de café (*Coffea arabica* L.) durante a germinação**. 2012. 71p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, SP, 2012.

FERREIRA, V.F. et al. Endo- β -mannanase enzyme activity in the structures of *Coffea arabica* L. seeds under different types of processing and drying. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 48, n. 12, p. 1-7, 2018.

FOYER, C.H. NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in physiological context. **Plant, Cell, and Environment**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 1056-1071, 2005.

FREITAS, M. N. et al. Relevance of endo- β -mannanase enzyme in coffee seed deterioration process. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 15, p. 1253-1258, 2017.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 64, p. 97-112, 1995.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, n. 2, p. 309-314, 1977.

GILL, S.S. et al. Superoxide dismutase - mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 22, n. 14, p. 10375-10394, 2015.

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GRAETHER, S.P.; BODDINGTON, K.F. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 576, p. 1-12, 2014.

- GREGGAINS, V. et al. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, v.148, p.267-276, 2000.
- HAND, S.C. et al. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 73, p. 115-134, 2011.
- CECAFÉ. Conselho dos Exportadores de Café do Brasil. **Produção**. Disponível em: <<https://www.cecafe.com.br/sobre-o-cafe/producao/>>. Acesso em: 25 set. 2019.
- HAVIR, E.A.; MCHALE, N.A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, n. 2, p. 450-455, 1987.
- JOET, T. et al. Regulation of galactomannan biosynthesis in coffee seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 1, p. 380-380, 2013.
- KING, M.W.; ROBERTS, E. H. The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches. **International Board for Plant Genetic Resources**, Rome, 1979.
- KRZYZANOWSKY, F.C.; FRANÇA NETO, J.B.; HENNING, A.A. Relatos dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 15-50, 1991.
- MALONE, G. et al. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p. 61-67, 2007.
- MARCOS-FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. 2. ed. Londrina, PR: ABRATES, 2015. 660 p.
- McDONALD, M.B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Wageningen, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, Cambridge, v. 7, n. 9, p. 405-410, 2002.
- NAKADA, P.G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 2, p. 42-51, 2010.
- NASIRO, K.; SHIMBER, T.; MOHAMMED, A. Germination and seedling growth rate of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds as influenced by initial seed moisture content, storage time and storage condition. **International Journal of Agriculture and Biosciences**, Nigéria, v. 6, n. 6, p. 304-310, 2017.
- NIREESHA, G.R. et al. Lyophilization/Freeze Drying – An review. **International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n.4, p. 87-98, 2015.

- R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2018.
- RENA, A.B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A.B.; MALAVOLTA, E.; ROCHA, M.; YAMADA, T. **Cultura do cafeeiro: fatores que afetam a produtividade**. Piracicaba: Potafos, 1986. p. 13-85.
- ROBERTS, E.H; KING, M.W.; ELLIS, R.H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In: **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. (Eds.). HOLDEN, J.H.W.; WILLIAMS, J.T. London: George Allen and Unwim, 1984. p. 38-52.
- ROBINSON, D.S.; ESKIN, N.A.M. **Oxidative enzymes in food**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. 314 p.
- RUDY, S. et al. Influence of pre-treatments and freeze-drying temperature the process kinetics and selected physico-chemical properties of cranberries (*Vaccinium macrocarpon Ait*). **Food Science and Technology**, v. 63, p. 497-503, 2015.
- RUSSEL, R.J. et al. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. **Evolutionary Applications**, v. 4, n. 2, p. 225-248, 2011.
- SAATH, R. et al. Activity of some isoenzymatic systems in stored coffee grains. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 1, p. 15-24, 2014.
- SANTOS, C.M.R.; MENEZES, N.L.; VILLELA, F.A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.
- SANTOS, F.C. et al. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 025-031, 2014.
- SANTOS, G.C. **Expressão de genes relacionados ao processo oxidativo durante a secagem de sementes de café**. 2010. 89 p. Dissertação (Mestrado Biotecnologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2010.
- SANTOS, G.C.; VON PINHO, E.V.R.; ROSA, S.D.V.F. Gene expression of coffee seed oxidation and germination processes during drying. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 6968-6982, 2013.
- SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, Oxford, v. 2, n. 1, p. 1-26, 2012.
- SHATTERS, R.G.JR. et al. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 4, p. 33-41, 1994.

- SILVA, E.A.A. et al. ABA regulates embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 220, n. 2, p. 251-261, 2004.
- SPEROTTO, F.C.S. et al. Qualidade de grãos e da bebida do café armazenados em dois tipos de embalagens e dois tipos de processamento. **Energia na Agricultura**, Botucatu, v. 30, n. 2, p. 210-216, 2015.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 2013. 934 p.
- TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, London, v. 26, n. 8, p. 563-567, 2010.
- TIMÓTEO, T.S. **Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de sementes em diferentes genótipos de milho**. 2011. 89 p. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2011.
- TUNES, L.M. et al. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 2, p. 178-184, 2011.
- TUNES, L.M. et al. Perfil enzimático em sementes de cevada em reposta a diferentes concentrações salinas. **Interciência**, v. 35, n. 5, p. 369-373, 2010.
- TUNNACLIFFE, A. et al. LEA proteins: versatility of form and function. In: LUBZENS, E.; CERDA, J.; CLARK, M. **Dormancy and resistance in harsh environments**. Heidelberg: Springer, 2010. p. 91-108.
- VEIGA, A.D. et al. Armazenabilidade de sementes de café colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 29, n. 1, p. 83-91, 2007.
- VERMA, K.K. et al. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes, and growth responses of *Jatropha curcas* during soil flooding. **Turkish Journal of Botany**, Ankara, v. 38, p. 130-140, 2014.
- VIDIGAL, D.S. et al. Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 129-136, 2009.
- VIEIRA, E.S.N. et al. Caracterização de cultivares de soja por descritores morfológicos e marcadores bioquímicos de proteínas e isoenzimas. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, p. 86-94, 2009.
- VINADÉ, M.E.C.; VINADÉ, E.R.C. **Métodos Espectroscópicos de Análise Quantitativa**. 1. ed. Santa Maria: UFSM, 2005. 272 p.

ANEXOS

Tabela 1A - Resumo da análise de variância dos dados da avaliação da protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de peso seco de parte aérea (PSPA), de embriões viáveis (EV) e de condutividade elétrica (CE) de sementes de café de diferentes lotes e teores de água.

FV	GL	Quadrados médios					
		PR	PN	FC	PSPA	EV	CE
Lotes (L)	1	468,64*	3363,50*	3210,30*	200,643*	3457,10*	239,58*
Teores de água (T)	6	69,98*	131,20 ^{ns}	93,50 ^{ns}	2,113 ^{ns}	1250,3*	154,943*
L x T	6	61,64*	81,70 ^{ns}	64,60 ^{ns}	16,351*	826,3*	8,648 ^{ns}
Erro	42	17,07	64,50	77,70	6,67	137,9	12,780
CV (%)	—	4,54	11,47	13,39	6,41	19,30	12,54

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade, pelo teste *Scott-Knott* ($p < 0,05$). ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da autora (2019).

Tabela 2A - Resumo da análise de variância dos dados das enzimas catalase sem liofilização (CATSLIO), catalase com liofilização (CATCLIO), superóxido dismutase sem liofilização (SODSLIO), superóxido dismutase com liofilização (SODCLIO), polifenoloxidase sem liofilização (PPOSLIO), polifenoloxidase com liofilização (PPOCLIO), proteínas resistente ao calor sem liofilização (PTNSLIO), proteínas resistente ao calor com liofilização (PTNCLIO), endo- β -mananase sem liofilização (ENDOSLIO) e endo- β -mananase com liofilização (ENDOCLIO) de sementes de café de diferentes lotes e teores de água.

FV	GL	<i>Quadrados médios</i>									
		CATSLIO	CATCLIO	SODSLIO	SODCLIO	PPOSLIO	PPOCLIO	PTNSLIO	PTNCLIO	ENDOSLIO	ENDOCLIO
Lotes (L)	1	339,93 ^{ns}	1671,25 ^{ns}	4008220,00 ^{ns}	14081,00 ^{ns}	1152,63*	1080,34*	0,015445 ^{ns}	0,00050761 ^{ns}	1028616,00 *	2318431,00*
Teores de água (T)	6	836,67 ^{ns}	2209,41*	283848,00 ^{ns}	64231,00 ^{ns}	36,16 ^{ns}	52,18*	0,016723*	0,0018 ^{ns}	590148,00*	1243999,00*
L x T	6	1607,26 ^{ns}	1342,01 ^{ns}	698752,00 ^{ns}	111958,00 ^{ns}	37,55 ^{ns}	33,74 ^{ns}	0,019707*	0,0023*	590129,00*	1347485,00*
Erro	42	833,63	793,23	1146104	497479	19,34	20,97	0,0041	0,0009	5483,00	139467,00
CV (%)	—	52,99	45,98	53,99	50,31	43,62	44,55	4,25	125,04	38,57	114,8

*: Significativo em nível de 5% de probabilidade, pelo teste *Scott-Knott* ($p < 0,05$). ^{ns}: não significativo.

Fonte: Da autora (2019).