



MADELEINE ALVES DE FIGUEIREDO

**SECAGEM E RESFRIAMENTO DE SEMENTES
DE *Coffea arabica* L. VISANDO À
CRIOPRESERVAÇÃO**

**LAVRAS - MG
2016**

MADELEINE ALVES DE FIGUEIREDO

**SECAGEM E RESFRIAMENTO DE SEMENTES DE
Coffea arabica L. VISANDO À CRIOPRESERVAÇÃO**

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

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dr. Luciano Coutinho Silva
Coorientador

**LAVRAS – MG
2016**

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

Figueiredo, Madeleine Alves de.

Secagem e resfriamento de sementes de *Coffea arabica* L.
visando à criopreservação / Madeleine Alves de Figueiredo. –
Lavras : UFLA, 2016.

198 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa.

Bibliografia.

1. Secagem. 2. Resfriamento. 3. Reaquecimento. 4. Água
catódica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MADELEINE ALVES DE FIGUEIREDO

**SECAGEM E RESFRIAMENTO DE SEMENTES DE
Coffea arabica L. VISANDO À CRIOPRESERVAÇÃO**

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

APROVADA em 11 de julho de 2016.

Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dr. Renato Paiva	UFLA
Dra. Lílian Padilha	Embrapa Café
Dra. Paula Cristina da Silva Ângelo	Embrapa Café

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

**LAVRAS – MG
2016**

*A Deus, por sempre me abençoar e iluminar o meu caminho.
À Santa Paulina, por sempre olhar por mim e atender minhas orações.
Aos meus amados pais, Heider e Marlene, pelo exemplo de dedicação, amor,
humildade e carinho, que sempre estiveram ao meu lado, mostrando o caminho
certo a seguir. Aos meus lindos irmãos Hedeilson, Milene e Marislaine, pelo
amor incondicional e pelo imenso incentivo, que me dão forças pra seguir
sempre em frente. Aos meus cunhados Jaqueline, Flavinho e Danilo, pelo apoio,
carinho e amizade. Aos amores da minha vida, meus sobrinhos lindos,
Henrique, Henzo e Giovana, simplesmente por existirem e por acrescentarem
amor e felicidade aos meus dias. Às minhas avós queridas, Terezinha e Maria
Augusta, pelo amor, ajuda, carinho, orações e pela família linda que tenho.
Aos meus demais familiares e amigos por torcerem pela minha vitória.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade e apoio durante a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À minha orientadora pesquisadora Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa pelo carinho, paciência, dedicação e brilhante orientação, que proporcionou imensas contribuições para minha formação profissional.

Ao meu coorientador, professor Dr. Luciano Coutinho Silva e aos professores Dr. Renato Mendes Guimarães e Dr. Renato Paiva pelo apoio na condução dos trabalhos.

Aos orientados da pesquisadora Sttela pela amizade, colaboração, respeito e ótima convivência. Cada um de vocês contribuiu de alguma forma para que este trabalho fosse finalizado e fico muito feliz por isso. Em especial, agradeço à Aline e ao Luis Filipe (Sid) pela amizade e grande ajuda.

Aos professores e pesquisadores do Setor de Sementes pelos conhecimentos transmitidos, que foram de grande valia para a realização deste trabalho.

Aos colegas do Setor de Sementes pela amizade e ensinamentos durante o curso.

Ao apoio financeiro da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

À Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira) pelo fornecimento das sementes de café.

Aos funcionários do Departamento de Agricultura e do Setor de sementes, pela ajuda na execução das atividades.

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

Aos meus pais, Heider e Marlene, aos meus irmãos Hedeilson, Milene e Marislaine, aos meus cunhados, Jaqueline, Flavinho e Danilo, as minhas avós Terezinha e Maria Augusta e aos meus sobrinhos Henrique, Henzo e Giovana pela paciência, dedicação, carinho, compreensão, amor e incentivo. Sou muito abençoada por ter pessoas tão maravilhosas na minha vida. Vocês são sempre fundamentais em tudo o que faço. Amo muito vocês.

Às minhas grandes amigas, Marcela e Cristiane, que Deus colocou no meu caminho e que fizeram a diferença nessa etapa da minha vida. Sou muito grata pela imensa ajuda e por todos os momentos felizes que passamos juntas. Apesar de estar finalizando essa fase, quero ter sempre a amizade de vocês na minha vida.

Às amigas Dayana, Luciana, Noêmia, Melina, Raquel, Luana e Lara pela imensa amizade, carinho, incentivo e por torcerem por mim.

Ao Luiz Gustavo pela disponibilidade, paciência e ajuda com os trabalhos realizados no Departamento de Medicina Veterinária.

E em especial, a Deus por me permitir conquistar um título tão batalhado e sonhado.

RESUMO

A criopreservação de sementes com características de recalcitrância intermediária, como as de café, é uma alternativa para garantir a conservação dos recursos por tempo indeterminado. Pesquisas sobre métodos de criopreservação clássicos e modernos contribuem para o entendimento do comportamento destas sementes em relação à sensibilidade à dessecação e ao congelamento. Neste contexto, quatro estudos foram realizados objetivando-se investigar os efeitos das etapas da criopreservação sobre a qualidade fisiológica, bioquímica e ultraestrutural de sementes de *Coffea arabica* L., e os efeitos da utilização da água catódica na recuperação de danos causados por estresses advindos destas etapas. No primeiro estudo foram investigados o teor de água e, velocidade e temperatura de pré-resfriamento mais adequados para criopreservar as sementes. O teor de água de 20% (bu) permitiu maior sobrevivência das sementes à criopreservação, quando estas foram resfriadas a velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura de -40°C . No segundo estudo foram avaliados diferentes métodos de secagem e o tratamento com água catódica. A secagem mais lenta causa redução do desempenho fisiológico e propicia o aumento da atividade das enzimas do sistema antioxidante. A secagem mais rápida ou mais lenta de sementes até 17% bu compromete a integridade ultraestrutural das células. No entanto, o tratamento com água catódica após a secagem rápida (17%) mantém a integridade das células. No terceiro estudo, diferentes procedimentos de pré-resfriamento e tratamento com água catódica foram avaliados. Melhores resultados são encontrados em sementes com teor de água mais baixo (17% bu), independentemente dos métodos de secagem e de pré-resfriamento utilizados. A ação antioxidante da água catódica é benéfica nas sementes com teor de água de 20% bu. Em sementes mais secas, a imersão em água catódica ativa o sistema enzimático antioxidante e melhora o aspecto ultraestrutural das células. Endospermas das sementes tem maior sensibilidade ao congelamento do que os embriões. No último estudo, foram investigados diferentes protocolos de criopreservação de sementes e tratamento com água catódica. Apenas os diferentes métodos de secagem e formas de pré-resfriamento influenciam consideravelmente a qualidade fisiológica e aspectos bioquímicos e ultraestruturais das sementes. As sementes criopreservadas com teor de água de 17% bu respondem melhor à criopreservação, quando comparadas àquelas com teor de água de 20% bu. Sementes de *Coffea arabica* L. secadas mais lentamente até 17% bu (75% ou 81% de umidade relativa) e, pré-resfriadas ou imersas diretamente em nitrogênio líquido, têm a qualidade preservada.

Palavras-chave: Secagem. Resfriamento. Reaquecimento. Água catódica.

ABSTRACT

The cryopreservation of seeds that present intermediate recalcitrance characteristics, like coffee is an alternative to ensure the conservation of genetic resources for indetermined time. Research on the classic and modern methods contribute to the understanding of seeds response to desiccation and freezing. In this context, four studies were carried out aiming to investigate the effects of the steps of cryopreservation on the physiological, biochemical and ultrastructural characteristics of *Coffea arabica* L. seeds. In addition, the effects of cathodic water to overcome the damage caused by stresses arising from these steps were evaluated. In the first study, we investigated water content and rate and pre-cooling temperature before immersion in liquid nitrogen. The water content of 20% (wb) allowed higher survival of seeds after cryopreservation when they were pre-cooled at $-1\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to the temperature of $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. In the second study, we evaluated different drying methods and a treatment with cathodic water. Slower drying causes reduction in physiological performance and provides an increase in the antioxidant enzyme activity. Faster or slower drying of seeds to 17% wb compromises the ultrastructural cells integrity. However, the cathodic treatment after faster drying (17%) maintains the integrity of the cells. In the third study, different pre-cooling procedures and treatment with cathodic water were evaluated. The best results were found in seeds containing the lowest water content (17% wb) regardless of the drying and pre-cooling methods used. The antioxidant action of cathodic water is beneficial in seeds with the highest water content (20% wb). In the driest seeds, immersion in cathodic water activates the antioxidant enzyme system and improves the ultrastructural aspect of the cells. Endosperms has higher sensitivity to freezing than the embryos. In the last study, we investigated different protocols for cryopreservation of seeds and a treatment with cathodic water. Only different methods of drying and pre-cooling affect the physiological quality and modify biochemical and ultrastructural aspects of the seeds. The seeds cryopreserved with 17% water content (wb) have better quality than those with 20% water content (wb). *Coffea arabica* L. seeds dried to 17% wb (75% or 81% of relative humidity), pre-cooled or directly immersed in liquid nitrogen have their quality preserved.

Keywords: Drying. Cooling. Thawing. Cathodic water.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	A importância de preservar o gênero <i>Coffea</i>	12
2.2	Criopreservação.....	15
2.2.1	Etapas de secagem.....	17
2.2.2	Etapas de resfriamento e de reaquecimento	21
2.2.3	Proteção contra os danos da criopreservação.....	24
2.2.3.1	Mecanismos endógenos de proteção	24
2.2.3.2	Mecanismos exógenos de proteção.....	29
	REFERÊNCIAS	31
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	
	ARTIGO 1 - Estudos exploratórios para a criopreservação de sementes de <i>Coffea arabica</i> L.	44
	ARTIGO 2 - Tratamento antioxidante com água catódica após secagem de sementes de <i>Coffea arabica</i> L. visando à criopreservação.....	79
	ARTIGO 3 - Avaliação de sementes de <i>Coffea arabica</i> L. submetidas ao resfriamento controlado visando à criopreservação	113
	ARTIGO 4 - Aspectos fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais de sementes de <i>Coffea arabica</i> L. em diferentes protocolos de criopreservação.....	152

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O café é uma *commoditie* agrícola de indiscutível importância socioeconômica mundial, tendo o Brasil liderança absoluta na produção e exportação desse produto (ARAUJO et al., 2008; DULLO et al. 2009; MONDEGO et al., 2011; ABIC, 2015).

Visando garantir o armazenamento seguro de recursos genéticos do cafeeiro, pesquisadores têm buscado o aprimoramento de técnicas de armazenamento de sementes com características de recalcitrância intermediárias como as de café (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990), em nitrogênio líquido (-196°C), após uma desidratação controlada (TRIGIANO; GRAY, 2011; BERJAK; PAMMENTER, 2014). Além de possuir diversas vantagens em relação ao armazenamento convencional, esta técnica permite a conservação do material vegetal por tempo indeterminado (ENGELMANN, 2004; DULLOO et al., 2009).

Os métodos de criopreservação mais reconhecidos são o clássico, que prioriza o resfriamento controlado da amostra, e o moderno, que consiste em imergir a amostra diretamente em nitrogênio líquido após desidratação parcial, priorizando a vitrificação (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2011). Porém, danos celulares relacionados às etapas da criopreservação podem ocorrer em ambos os métodos (WALTERS et al., 2008; PAMMENTER; BERJAK, 2014).

A etapa de secagem proporciona redução do metabolismo celular, o que pode beneficiar o armazenamento, porém, em espécies sensíveis à dessecação, a retirada de água pode ocasionar danos irreversíveis às células, comprometendo a viabilidade das sementes (KOHOMA et al., 2006). O teor de água remanescente,

assim como a velocidade de secagem são fatores que intervêm no tipo de dano, no grau de tolerância à dessecação e na viabilidade das sementes (GENTIL, 2001; CARVALHO, 2006; ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015). Portanto, o processo de secagem deve ser realizado com muito cuidado, pois representa um dos principais danos relacionados à criopreservação (BERJAK; PAMMENTER, 2013) e sua má condução pode interferir no sucesso das etapas posteriores.

Para obter melhores resultados na criopreservação de sementes é necessário evitar a formação de cristais de gelo durante o processo, que pode ocorrer, principalmente, durante as etapas do resfriamento e do reaquecimento (MAZUR, 2004).

Além da secagem, o processo de resfriamento controlado, requerido para algumas espécies, pode evitar danos por formação de gelo intracelular (BERJAK; PAMMENTER, 2014; PAMMENTER; BERJAK, 2014). No entanto, a taxa e a temperatura nas quais o resfriamento lento ocorre devem ser ajustadas de acordo com cada espécie (MAZUR, 2004). Outra forma de prevenção destes danos intracelulares é realizar o congelamento rápido, a temperaturas inferiores à temperatura de transição vítrea (T_g), permitindo a vitrificação da amostra. Porém, para sementes de café, é necessário cuidado em utilizar os processos que induzem a vitrificação, pois podem ser prejudiciais (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

A etapa do reaquecimento também é fundamental para garantir o sucesso da criopreservação, pois durante este processo pode ocorrer a recristalização de gelo intracelular e se conduzido de forma inadequada, pode impedir a boa regeneração das sementes criopreservadas (BENSON, 2008).

Estas etapas podem causar diversas alterações mecânicas, fisiológicas e bioquímicas, sendo os radicais livres, os principais causadores de danos ao

sistema de membranas e às macromoléculas, causando desequilíbrio iônico, redução de processos metabólicos e indução de morte celular por apoptose (BAUST; GAO; BAUST, 2009; BAUST, 2007; ENGELMANN, 2011). Sistemas enzimáticos removedores de radicais livres, compostos pelas enzimas catalase, superóxido dismutase, peroxidase, dentre outras, podem minimizar ou reverter os danos causados por estes estresses (BERJAK, 2006, DUSSERT; ENGELMANN, 2006). As proteínas resistentes ao calor (LEA) também exibem funções positivas em muitas espécies vegetais quando expostas a estes fatores estressantes (BATTAGLIA; COVARRUBIAS, 2013; AMARA et al., 2014).

A utilização da água catódica, gerada por eletrólise de uma solução contendo cloreto de cálcio e cloreto de magnésio, tem demonstrado efeitos antioxidantes (SHIRAHATA et al., 1997; HANAOKA, 2001; HANAOKA et al., 2004; HIRAOKA et al., 2004) e tem melhorado as respostas ao estresse relacionado aos procedimentos de criopreservação.

Portanto, estudar os mecanismos de proteção endógenos e exógenos e correlacioná-los a estudos fisiológicos e ultraestruturais, pode auxiliar o entendimento da perda da qualidade de sementes de café criopreservadas e assim, promover a manutenção da qualidade destas após a criopreservação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A importância de preservar o gênero *Coffea*

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea*, com destaque para as espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre que apresentam grande valor comercial. Pelo fato de possuir propriedades organolépticas mais pronunciadas e refinadas (EL-ABASSY; DONFACK;

MATERNY, 2011) que agradam ao mercado consumidor, a espécie *Coffea arabica* L. possui maior demanda e devido a isso, é responsável por aproximadamente, 79% da área existente com lavouras de café no País, sendo que quase 68% desta área está concentrada no estado de Minas Gerais (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2016a).

Os principais produtores mundiais de café são o Brasil, Vietnã, Colômbia, Indonésia e Etiópia, sendo o Brasil líder mundial de exportação desse produto (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ - ABIC, 2016).

No Brasil, a maioria da produção nacional de café encontra-se distribuída nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Bahia, Rondônia e Paraná. Para a safra de 2016, essa produção está estimada em 49,67 milhões de sacas de 60 quilos de café beneficiado (CONAB, 2016b).

O café é uma das mais importantes *commodities* agrícolas exportadas e uma das bebidas mais apreciadas no mundo (DULLO et al. 2009). É uma das culturas mais tradicionais da agricultura brasileira (FAGAN et al., 2011) e de indiscutível importância socioeconômica para o País devido às divisas geradas com a exportação e a mão de obra empregada nas diferentes etapas de produção (ARAÚJO et al., 2008).

Mesmo com a grande importância socioeconômica que a cultura cafeeira proporciona, Barbosa; Bregagnoli; Sacconi (2015) afirmam que o Brasil ainda não aproveita o seu total desempenho no setor produtivo. Para estes autores, mais investimentos devem ser realizados a fim de agregar valor ao produto final, principalmente ao produto exportado, gerando maior ganho financeiro e mais competitividade às empresas brasileiras de café frente ao mercado globalizado. Além disso, é necessário investir em pesquisas, gerar

novas tecnologias e inovações para atuar nos pontos de gargalo que podem beneficiar o agronegócio café.

Geralmente, países tropicais em desenvolvimento cultivam a cultura do café e a utilizam como fonte de renda, enquanto os países não tropicais participam do comércio cafeeiro por meio da industrialização de seus produtos (MONDEGO et al., 2011).

Visto então, que a tradicional cafeicultura tem grande participação nos setores econômicos e sociais, em nível nacional e mundial, é fundamental preservar a diversidade genética deste gênero. Entretanto, o gênero *Coffea* produz sementes recalcitrantes e intermediárias que inviabilizam o armazenamento em bancos de sementes convencionais (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990; ABDELNOUR-ESQUIVEL et al., 1992; DUSSERT et al., 1997b).

Os recursos genéticos de cafeeiros que formam a base para programas de melhoramento que visam o aumento na produção e qualidade da bebida estão se tornando cada vez mais escassos devido ao estreitamento e à erosão da base genética (DULLO et al. 2009). A conservação de acessos em campo exige um grande aporte financeiro e está sujeita a desastres ambientais como estiagem, geadas, ataques de pragas e doenças que podem ocasionar a perda de patrimônio genético em um curto espaço de tempo.

Uma opção que garanta o armazenamento seguro de recursos genéticos do cafeeiro por período prolongado é o uso da técnica de criopreservação a -196°C (DUSSERT; ENGELMANN, 2006; TRIGIANO; GRAY, 2011), porém, necessita ainda, de ajustes. Até o momento, existem muitos questionamentos sobre o comportamento de sementes de café em relação à tolerância ao congelamento em nitrogênio líquido (NL) e estes devem, ainda, ser investigados.

2.2 Criopreservação

A conservação *in vitro* por meio da criopreservação é a técnica mais promissora para preservação de recursos genéticos vegetais para as espécies que produzem sementes recalcitrantes ou intermediárias, assim como as do gênero *Coffea* (TRIGIANO; GRAY, 2011; BERJAK; PAMMENTER, 2014), tendo como vantagens a segurança, estabilidade, necessidade de pouco espaço e manutenção, menor custo por adesão e possibilidade de armazenamento por longos períodos (ENGELMANN, 2004; DULLOO et al., 2009; CHEN et al., 2011). É uma forma de conservação de material biológico em nitrogênio líquido à -196°C , ou em sua fase de vapor (-150°C), a qual não permite a ocorrência de reações metabólicas dirigidas termicamente, garantindo a viabilidade do material armazenado sem que ocorram modificações ou alterações genéticas por um período indeterminado (KARTHA, 1985; SANTOS, 2004).

Os métodos de criopreservação baseados em congelamento lento programado (clássico) e congelamento rápido por meio da vitrificação (moderno) são os mais validados no meio vegetal (ENGELMANN, 2011). Segundo Berjak; Pammenter (2014), para espécies recalcitrantes tropicais/subtropicais, melhores resultados são observados quando se utiliza a criopreservação clássica.

A criopreservação clássica ou tradicional pode ser composta pelas etapas subsequentes de desidratação, resfriamento lento, rápida imersão dos explantes em nitrogênio líquido, armazenamento e reaquecimento rápido (ENGELMANN, 2011). Os métodos de criopreservação mais atuais priorizam o congelamento rápido do explante, imergindo-o diretamente em nitrogênio líquido após ter sido desidratado ou imerso em soluções de vitrificação, o que levará à vitrificação da amostra, na qual ocorre a transição direta da água remanescente no estado líquido para um estado sólido amorfo não cristalino, de alta viscosidade, sem

mudanças químicas (FAHY et al., 1984; SANTOS; MENEZES, 2000; PANIS; SWENNEN, 2005; BENSON, 2008; SAKAI; HIRAI; NIINO, 2008).

Geralmente, em resposta às mudanças nas propriedades da água, alterações mecânicas, estruturais e bioquímicas podem ser originadas por meio dos estresses de dessecação e de formação de cristais de gelo, e uma forma de evitar que isso aconteça é aplicar o estresse de forma rápida, antes que o dano potencial ocorra (WALTERS et al., 2008; PAMMENTER; BERJAK, 2014).

A realização de algumas avaliações pode ajudar na compreensão dos danos causados pelas diferentes etapas da criopreservação. A avaliação fisiológica das sementes permite avaliar a extensão dos danos relacionados à viabilidade e vigor, sendo os testes de germinação e de tetrazólio, os mais utilizados em trabalhos com sementes de café (ABREU et al., 2014; CLEMENTE et al., 2011; COELHO et al., 2015). O teste de condutividade elétrica em sementes também é bastante utilizado, pois indica possíveis danos ao sistema de membranas, por meio da análise de lixiviação de solutos (PRETE, 1992; MALTA; PEREIRA; CHAGAS, 2005; REINATO et al., 2007).

Avaliações bioquímicas e ultraestruturais também são importantes para elucidar o efeito dos danos celulares causados por diferentes estresses. No entanto, trabalhos com sementes de café envolvem, geralmente, estudos bioquímicos (ABREU et al., 2014; SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013; SAATH et al., 2014) e ultraestruturais (BORÉM; MARQUES; ALVES, 2008; BORÉM et al., 2013; SAATH et al., 2010) dos efeitos da secagem, sendo pouco comuns estudos do efeito da criopreservação.

Estudos ultraestruturais de sementes recalcitrantes e ortodoxas têm contribuído para a compreensão de diferentes respostas à desidratação e ao resfriamento, que podem levar à perda de viabilidade por causar danos às

membranas das organelas celulares, ao citoesqueleto e ao núcleo esquelético (BERJAK; PAMMANTER, 2000).

Na maioria dos resultados de trabalhos conduzidos com sementes de café submetidas à criopreservação (DUSSERT et al., 1997a; 1997b; 1998, 1999, 2000; 2001; 2003a, 2003b; 2012; DUSSERT; ENGELMANN, 2006), observa-se a baixa porcentagem de germinação ou formação de plântulas normais após a exposição das sementes ao nitrogênio líquido. Por isso, para que a criopreservação seja bem-sucedida é necessário considerar e estudar os efeitos que as etapas de secagem, resfriamento e reaquecimento podem causar a estas sementes.

2.2.1 Etapa de secagem

Para a criopreservação, as sementes precisam passar por um processo de secagem antes de entrar em contato com o nitrogênio líquido, o que evita a formação de cristais de gelo que podem levar à morte celular (PAMMANTER; BERJAK, 2014).

A dessecação de sementes promove a redução do metabolismo celular, sendo uma técnica que visa melhores condições de armazenamento. Contudo, existem espécies intolerantes à dessecação, sendo necessário, portanto, o desenvolvimento de tecnologias específicas para a conservação (KOHOMA et al., 2006). A tolerância à dessecação de sementes, na maioria das espécies, é adquirida durante a maturação e pode variar entre as espécies e até mesmo em um mesmo lote de sementes (GROOT et al., 2003; PAMMANTER; BERJAK, 2014). Esta tolerância está relacionada à capacidade que o organismo tem de enfrentar a quase completa perda de água e posterior reidratação dos tecidos (HOEKSTRA; GOLOVINA; NIJSSE, 2003). E segundo Dekkers et al. (2015), a

longevidade da semente está intimamente relacionada à sua tolerância à dessecação.

Dentro do gênero *Coffea* são encontradas espécies com diferentes graus de tolerância à dessecação, sendo as sementes de *C. liberica* as menos tolerantes e as de *C. racemosa* as mais tolerantes à perda de água (DUSSERT et al., 2001).

A secagem das sementes proporciona a retirada da água livre fracamente ligada às macromoléculas e o teor de água remanescente nas sementes, assim como a velocidade de remoção da água podem intervir no tipo de dano causado, no grau de tolerância à dessecação e na viabilidade, principalmente para sementes com características de recalcitrância intermediárias (GENTIL, 2001; CADDAH; ANDRADDE; MEDEIROS, 2005; ROSA et al., 2005; CARVALHO, 2006; JOSÉ et al., 2011; ROSA et al., 2011; ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015).

Vertucci (1993) e Vertucci; Farrant (1995) descreveram cinco tipos de água na semente, sendo elas: 1) Água estrutural ou de constituição - água remanescente em tecidos muito secos e que não apresenta propriedades de solvente. Sementes com teor de água inferior a 7,5% bu; 2) Água com papel de solvente, não congelável, que permite reações catabólicas (deterioração), no entanto, quando a umidade é inferior a 10%, apresenta características vítreas e essas reações são reprimidas. Sementes com teor de água de 7,5% a 20% bu; 3) Água com indícios de água congelável, que facilita o transporte de elétrons nas mitocôndrias e intensifica a respiração. A atividade fisiológica da semente é alterada facilmente neste nível de hidratação. Sementes com 20% a 30% de teor de água; 4) Água que corresponde às características de solução concentrada, que ocupa espaços intercapilares entre as macromoléculas e não interage com sua superfície. Sementes com teores de água entre 33% a 41%; 5) Água livre, que corresponde às características de solução diluída e não se liga às

macromoléculas. A germinação da semente se completa quando essa água está presente. Sementes com teor de água superior a 41%. Os tipos de água 4 e 5 correspondem à água considerada absorvida.

A água é fundamental para o comportamento fisiológico de sementes e sua deficiência ou excesso pode afetar o crescimento e o desenvolvimento em novas plantas (VILLELA; MARCOS-FILHO, 1998).

Dessecantes como a sílica gel ou atmosferas em equilíbrio com soluções salinas saturadas são algumas formas utilizadas para reduzir a umidade relativa do ar, os quais criam um gradiente de água entre a amostra e o ambiente circundante, proporcionando secagem rápida e lenta, respectivamente (WALTERS et al., 2008).

Geralmente, sementes sensíveis à dessecação, como as de café, podem sobreviver a menores teores de água, se submetidas a uma secagem mais rápida, evitando que os danos se acumulem durante o processo (ROSA et al., 2005; COELHO et al., 2015). No entanto, outros autores afirmam que a secagem lenta aumenta a tolerância das sementes de café à dessecação devido ao maior tempo para indução de mecanismos de proteção (VEIGA et al., 2007; VIEIRA et al., 2007; SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013; ABREU et al., 2014).

No entanto, independentemente da velocidade de secagem, há um limite a partir do qual todas as sementes perdem a viabilidade (DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

De acordo com Pammenter; Vertucci; Berjak (1993), o limite de perda de água que as sementes ou parte de sementes toleram sem perda total da viabilidade, pode coincidir com o nível de água intracelular que não congela. Como a secagem rápida pode proporcionar a sobrevivência de materiais sensíveis à dessecação a conteúdos de água baixos, a água intracelular remanescente pode vitrificar se submetida a um resfriamento (PAMMENTER;

BERJAK, 2014). Segundo Walters (2015), há formação de vidros com o processo de secagem das células, independentemente se são tolerantes ou não à dessecação. No entanto, as propriedades de vidro são dependentes da umidade e temperatura em contextos biológicos (BUITINK; LEPRINCE, 2008).

De acordo com Berjak; Pammenter (2013), os principais danos relacionados à criopreservação são causados pelo processo de dessecação.

Sementes sensíveis à dessecação, geralmente, podem apresentar danos mecânicos, por meio do qual o sistema de membranas é afetado negativamente e pode haver colapso de vacúolos e estruturas macromoleculares. Danos fisiológicos, que são ligados ao metabolismo e podem ocorrer durante a dessecação ou armazenamento hidratado, causando danos ao sistema de membranas, proteínas e DNA pela formação de radicais livres e subprodutos tóxicos. E por fim, após um tempo de armazenamento, pode haver desnaturação macromolecular com formação de muitos vacúolos que se tornam dilatados (PAMMENTER; BERJAK, 2000; UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015). Segundo Farrant et al. (1997), a sensibilidade à dessecação é diretamente proporcional ao grau de vacuolização.

A desidratação reduz o volume celular, pode levar à ruptura de vacúolos e causar danos ao citoesqueleto e às membranas celulares, resultando em perda de viabilidade das sementes (ILJIN, 1957; UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015). Através de estudos ultraestruturais de tecidos expostos à dessecação, descobriu-se que a membrana celular é um dos primeiros e principais pontos de dano (GUIMARÃES, 2000). Alterações na composição relativa de fosfolipídios de membranas podem ocorrer durante a secagem (DUSSERT et al., 2003b), assim como na síntese de proteínas resistentes ao calor (LEA) e na capacidade das sementes em prevenir, tolerar ou reparar danos por radicais livres (BERJAK, 2006).

O aumento da peroxidação de compostos e de espécies reativas de oxigênio (EROs) durante o processo de dessecação, pode levar à perda de viabilidade e envelhecimento das sementes (OLIVEIRA et al., 2012.; PARK et al., 2011.; CORBINEAU, 2012). Esses radicais livres reagem com lipídeos da membrana, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas e outras macromoléculas, alterando as funções biológicas normais da célula (HENDRY, 1993; LEPRINCE; BUITINK; HOEKSTRA, 1999).

A interdependência entre as etapas do processo de criopreservação pode levar ao sucesso da preservação do germoplasma. Ou seja, a desidratação parcial da amostra antes de resfriá-la pode significar redução dos danos nas etapas posteriores à secagem, sendo estas, também, importantes para garantir a qualidade das sementes antes de conservá-las.

2.2.2 Etapas de resfriamento e de aquecimento

Para obter sucesso com a criopreservação é necessário evitar a formação de cristais de gelo no interior da célula. A temperatura crítica para a formação desses cristais pode variar de -15°C a -60°C e o explante pode ser submetido duas vezes a estas faixas de temperatura, ou seja, durante o resfriamento e durante o aquecimento (MAZUR, 1984).

Para algumas espécies, o resfriamento controlado pode ser requerido antes da imersão em nitrogênio líquido, a fim de reduzir os danos causados às células (BERJAK; PAMMENTER, 2014).

O resfriamento lento das amostras até uma temperatura sub-zero pré-definida, favorece a desidratação e evita os danos por formação de gelo intracelular, pois ao diminuir a temperatura a um ritmo relativamente lento ($0,5-2^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$), a água intracelular se movimenta para o meio extracelular por meio

de um gradiente de potencial, permitindo que o conteúdo celular se torne mais concentrado. Essa concentração diminui o ponto de congelamento intracelular e conseqüentemente, pode permitir formação de cristais de gelo apenas fora da célula (ENGELMANN, 2011; PAMMENTER; BERJAK, 2014). O material biológico geralmente é congelado sob o controle de um freezer programável e, uma vez atingida uma adequada desidratação celular, a qual ocorre quando a temperatura do sistema está entre -30 a -40 °C, o material é estocado em nitrogênio líquido à temperatura de -196°C (PAYNTER, 2000).

Assim como a secagem, a taxa e a temperatura nas quais o resfriamento lento ocorre também podem ocasionar danos mecânicos e fisiológicos. Altas concentrações de eletrólitos podem danificar as células se estas são desidratadas por meio de uma taxa de resfriamento muito lenta. Outro possível dano à célula também pode ocorrer se a água não for conduzida com eficiência para o meio extracelular devido à taxa de resfriamento lento ser muito alta, podendo ocorrer a formação de cristais de gelo intracelular devido à menor concentração de solutos (MAZUR, 2004). Como as células se desidratam à medida que a temperatura diminui, definir a temperatura final de resfriamento pode ser também fundamental para impedir que danos ocorram (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

Segundo Trigiano; Gray (2011), o frio pode ocasionar danos celulares em algumas espécies vegetais mesmo antes da formação de cristais de gelo e o fluxo de água do espaço intracelular para o extracelular por meio da desidratação do citoplasma causada pelo resfriamento, pode ser suficiente para ocasionar dano letal às células.

A realização de um resfriamento rápido, a temperaturas inferiores à temperatura de transição vítrea (T_g), pode prevenir a formação de cristais de gelo, por meio da vitrificação da amostra, de maneira que a água congelável

remanescente se transforme em um sólido amorfo não cristalino de alta viscosidade, impedindo que as moléculas de água individuais se unam e formem núcleos de cristais de gelo (BENSON, 2008; ENGELMANN, 2011; PAMMENTER; BERJAK, 2014). Porém, para tecidos sensíveis à dessecação e ao resfriamento, como as sementes de café, os processos utilizados para vitrificação, como a diminuição do volume de solvente, o acúmulo de soluto ou a queda da temperatura abaixo da qual ocorre a transição vítrea, dentre outros, podem ser prejudiciais (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

O estado vítreo das amostras criopreservadas é instável, principalmente durante o reaquecimento (MAZUR, 1984) e a recristalização do gelo de qualquer água residual congelável no tecido ocorrerá entre -80° e -40°C se o reaquecimento for lento (BERJAK; PAMMENTER, 2014; PAMMENTER; BERJAK 2014). Uma forma de evitar a recristalização da água é reaquecer, rapidamente, o material retirado do nitrogênio líquido, atravessando este intervalo de temperatura tão rapidamente quanto possível (BENSON, 2008; BERJAK; PAMMENTER, 2014). Geralmente, para espécies sensíveis a estresses, o reaquecimento é realizado colocando o material em banho-maria, a temperatura entre 38 e 45°C , durante um ou dois minutos (BERJAK; PAMMENTER, 2014). No entanto, para sementes de café, a temperatura, o tempo e método de descongelamento dos materiais criopreservados precisam, ainda, ser sistematicamente investigados (DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

O estresse causado às células sob condições de frio ou congelamento pode causar desequilíbrio iônico, redução da energia disponível para os processos metabólicos, alterações na permeabilidade da membrana celular, desnaturação de proteínas e induzir à morte celular por apoptose (BAUST; GAO; BAUST, 2009; BAUST, 2007; ENGELMANN, 2011). Além disso, o processo de congelamento e de reaquecimento pode levar à desnaturação de

enzimas e à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (BENSON; BREMNER, 2004; BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011; ROACH et al., 2008; WHITAKER et al., 2010).

2.2.3 Proteção contra os danos da criopreservação

Visto que as etapas inerentes à criopreservação podem ocasionar danos às células das sementes, é fundamental estudar os mecanismos de proteção endógenos e exógenos capazes de reverter ou minimizar os efeitos prejudiciais dos diferentes estresses aplicados durante este processo.

2.2.3.1 Mecanismos endógenos de proteção

Segundo Walters et al. (2008), o estresse causado às células por meio da dessecação e resfriamento pode comprometer a integridade destas e provocar alterações na viabilidade do germoplasma. A perda de viabilidade pode ocorrer devido à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ser maior que a eficiência dos sistemas antioxidantes em reparar os danos causados por estes estresses (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

Sistemas enzimáticos removedores de radicais livres são utilizados como marcadores da deterioração e sua correlação com o desempenho fisiológico permite um melhor entendimento da perda de qualidade das sementes.

Espécies reativas de oxigênio, ou radicais livres, são moléculas que contém um ou mais elétrons desemparelhados, são espécies químicas, altamente reativas e tóxicas, que exercem estresse oxidativo em níveis elevados, e incluem o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH)

e anion superóxido (O_2^-) (MITTLER, 2002; GILL; TUTEJA, 2010; TATONE et al., 2010). Porém, a produção destes radicais também pode estar associada ao desenvolvimento das plantas, indicando que o nível de controle e a capacidade celular antioxidante definem a atividade que estes radicais irão exercer (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011).

O peróxido de hidrogênio e o superóxido são, relativamente, pouco danosos, porém, podem formar o radical hidroxila que é muito prejudicial aos componentes celulares essenciais, sendo que podem iniciar a peroxidação lipídica, danificar DNA, proteínas e muitas moléculas pequenas (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002).

Com o estresse oxidativo induzido por EROs, os lipídios da membrana são os primeiros componentes a serem deteriorados (BENSON; BREMNER 2004). A reparação dos danos de membrana depende da atuação de um sistema enzimático eficiente, composto principalmente pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (PO), sendo que a redução na atividade destas enzimas aumenta a sensibilidade das sementes a estresses oxidativos. Estas enzimas atuam na remoção de radicais livres presentes nas células, neutralizando o oxigênio singlete e outros radicais livres, formados em condições de estresse (BERJAK, 2006, DUSSERT; ENGELMANN, 2006), como as que ocorrem durante a criopreservação.

Outras enzimas antioxidantes, como a ascorbato peroxidase (APX), a glutathione redutase (GR), peroxiredoxina (Prx), polifenol oxidase (PPO) e metabólitos, como a glutathione, ácido ascórbico, α -tocoferol e carotenóides podem proteger as células contra os efeitos citotóxicos de espécies reativas a oxigênio (SCANDALIOS, 1993; INZÉ; MONTAGU, 1995; MITTLER, 2002).

A ascorbato peroxidase é uma enzima pertencente ao ciclo ascorbato-glutathione, um sistema importante de desintoxicação de peróxido de hidrogênio.

Esta enzima utiliza o ascorbato como doador de elétron para a conversão do H_2O_2 em H_2O e O_2 , atuando em conjunto com a enzima catalase a fim de proteger as células da ação oxidativa de radicais livres (ASDA, 1992; SOARES; MACHADO, 2007). No entanto, estas duas enzimas têm diferentes afinidades para H_2O_2 (MITTLER, 2002).

A codificação da APX depende da interação entre fatores genéticos e estímulos ambientais, como por exemplo, a sensibilidade a níveis endógenos de ascorbato, desidratação, alta e baixa temperatura, dentre outros (SHIGEOKA et al., 2002; ROSA et al., 2010; BONIFACIO et al., 2011).

Assim como a APX, a CAT decompõe H_2O_2 em H_2O e não é facilmente saturada por substratos, sendo um importante oxirredutor durante estresses oxidativos (SCANDALIOS, 2005; BERJAK, 2006; GARG; MANCHANDA, 2009). A ausência desta enzima pode resultar na inativação da enzima superóxido dismutase, que é outra enzima removedora de radicais livres (FRIDOVICH, 1995).

A enzima SOD exerce importante função como antioxidante, sendo a primeira enzima a atuar contra danos causados por EROs nas células, pois converte o radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (FOYER; NOCTOR, 2005; SINHA, 2006; GILL et al., 2015). Esta reação apresenta grande importância para as células, pois o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$ é mais tóxico do que o H_2O_2 (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002).

Outra enzima pertencente ao ciclo ascorbato-glutationa é a enzima glutathione redutase, que catalisa o oxigênio singleto e o radical hidroxila, regenera o ascorbato e protege os grupos tiol das enzimas (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002).

Em pesquisas relacionadas aos mecanismos endógenos de eliminação de radicais livres em plantas, em resposta a estresses ambientais, a expressão das

enzimas APX, CAT, GR e SOD podem aumentar proporcionalmente (SHIGEOKA, et al., 2002).

As peroxidases também desempenham um importante papel no mecanismo de limpeza de EROs, reduzindo os níveis de H_2O_2 e atua na biossíntese de lignina, na suberização e formação da parede celular, contribuindo para a integridade estrutural destas (ROSSI; LIMA; HAKVOORT, 1997).

A enzima esterase faz parte dos diferentes processos fisiológicos vegetais, pois atua na hidrólise de ésteres e no metabolismo de lipídeos (SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005; COELHO et al., 2015). Apesar de possuir importante função catalítica na desintoxicação celular, sua atividade pode indicar deterioração das sementes (NAKADA et al., 2010; NAUEN, 2007; RUSSEL et al. 2011).

A isocitrato liase é uma enzima chave na fase de germinação, pois quebra lipídios armazenados e sua atividade pode aumentar durante a senescência do organismo (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). Nakada et al. (2010) relataram que esta enzima é indicativo de deterioração das sementes.

Além dos sistemas antioxidantes enzimáticos, as proteínas resistentes ao calor, tais como as LEA (*Late Embryonic Abundant*) são muito importantes, pois exibem uma infinidade de funções positivas em muitas espécies vegetais, dentre estas podem estar relacionadas à tolerância à seca e ao resfriamento, quando expostas a fatores de estresse (BATTAGLIA; COVARRUBIAS, 2013; AMARA et al., 2014).

Essas proteínas se acumulam durante os estágios tardios de desenvolvimento das sementes (GRELET et al., 2005; GRAETHER; BODDINGTON, 2014) e estão associadas a mecanismos de proteção contra danos causados pela remoção de água a partir de tecidos de plantas

(TUNNACLIFFE et al., 2010) e seu acúmulo pode indicar certa tolerância à dessecação para alguns organismos (VIDIGAL et al., 2009).

Tais proteínas revestem as macromoléculas com uma camada coesa de moléculas de água, podendo substituí-las através da ligação direta de seus resíduos com os da superfície de outras proteínas durante a dessecação (HOEKSTRA; GOLOVINA; BUTINK, 2001). As desidrinas, que consistem num grupo de proteínas LEA de natureza anfipática, são capazes de associarem-se a várias macromoléculas impedindo sua desnaturação (PAMMENTER; BERJAK, 1999).

Segundo Tunnacliffe et al. (2010), as proteínas LEA desempenham um importante papel na formação e estabilidade do estado vítreo.

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, sendo capaz de executar diversas funções (HAND et al., 2011), tais como, atuar na estabilidade de membranas, no balanço redox e na homeostase de proteínas e ácidos nucleicos (TUNNACLIFFE et al., 2010).

Devido ao grande número de genes que as codificam, há uma enorme diversidade de proteínas LEA e nem todas atuam de forma significativa na tolerância ao estresse, ou elas precisam de outros fatores para sua ativação (HUNDERTMARK; HINCHA, 2008).

Segundo Santos et al. (2014) a expressão de proteínas resistentes ao calor aumenta com processo de maturação e está associada com a qualidade fisiológica de semente de café.

2.2.3.2 Mecanismos exógenos de proteção

Outra abordagem para melhorar as respostas ao estresse relacionado aos procedimentos de criopreservação tem sido a utilização exógena de antioxidantes, que podem exercer efeito direto e/ou melhorar a atividade antioxidante endógena dos explantes, reduzindo os efeitos prejudiciais dos radicais livres (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011).

A utilização de água catódica, gerada por eletrólise de uma solução contendo cloreto de cálcio e cloreto de magnésio, tem demonstrado efeitos antioxidantes (SHIRAHATA et al., 1997;. HANAOKA, 2001; HANAOKA et al., 2004; HIRAOKA et al., 2004) e não há dúvida sobre o seu potencial para melhorar as respostas ao estresse relacionado aos procedimentos de criopreservação em materiais vegetais (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011).

Os trabalhos iniciais sobre a proteção catódica se basearam na tentativa de reduzir o ataque de radicais livres com aplicação de uma carga negativa, aplicada de maneira análoga à técnica de proteção catódica de metais contra a corrosão (MOLNÁR, 1973).

Pammenter; Adamson; Berjak (1974) concluíram que a proteção catódica reduz o ataque de radicais livres sobre macromoléculas biológicas, presumivelmente porque funciona como uma fonte de elétrons, os quais reagem com estes radicais livres.

A base da proteção catódica lança mão do princípio de da eletrólise de Michael Faraday, por meio do qual ocorre o processo de redução no catodo e de oxidação no anodo. A dissociação de H_2O produz íons H^+ e OH^- . No catodo, os íons H^+ ganham elétrons e se transformam em hidrogênio ativo (H), que apresenta alto potencial redutor e que por sua vez, são convertidos em moléculas

de hidrogênio (H_2), quimicamente inertes em temperatura ambiente. No anodo, os íons OH^- perdem elétrons e formam o OH , que resulta na produção de O_2 e H_2O (SHIRAHATA et al., 1997).

A água catódica (água reduzida) é abundante em hidrogênio dissolvido, possui um alto pH (9,0-10,0), enquanto que a água anódica (água oxidada) é abundante em oxigênio dissolvido e possui pH ácido podendo agir como um descontaminante e, aparentemente, uma potente antimicrobiano (HANAOKA et al., 2004).

Esta solução catódica (água reduzida) tem alto potencial de penetração em organismos vivos e pode exercer funções de remoção de radicais livres, proteção de moléculas de DNA e RNA e até supressão de células humanas cancerosas (SHIRAHATA et al., 1977; SHIRAHATA, 1999). Além disso, tem a vantagem de ser gerada de maneira simples e não tóxica (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

Em estudos atuais, a proteção catódica tem sido adotada para reduzir espécies reativas de oxigênio produzidas durante os procedimentos da criopreservação de espécies recalcitrantes, proporcionando bons resultados (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011; NAIDOO et al., 2016).

REFERÊNCIAS

- ABDELNOUR-ESQUIVEL, A. et al. Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. **CryoLetters**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 297-302, 1992.
- 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, Oct./Dec. 2014.
- 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, Nov. 2014.
- ARAUJO, R. F. et al. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despulpado e não despulpado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 71-78, maio 2008.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidant system in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, May 2002.
- ASDA, K. Ascorbate peroxidase – A hydrogen peroxide – scavenging enzyme in plants. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 85, n. 2, p. 235-241, June 1992.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Produção Mundial de Café - Principais Países Produtores**. Safra 2015. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=48#2810>>. Acesso em: 30 abr. 2016.
- BARBOSA, W. M.; BREGAGNOLI, M.; SACCONI, E. J. da C. A pesquisa e o desenvolvimento tecnológico na cafeicultura brasileira. **Revista Agroambiental**, Pouso Alegre, v. 7, n. 3, p. 89-96, set. 2015.
- BATTAGLIA, M.; COVARRUBIAS, A. A. Late embryogenesis abundant (LEA) proteins in legumes. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 190, p. 1-11, June 2013.
- BAUST, J. G.; GAO, D.; BAUST, J. M. Cryopreservation: an emerging paradigm change. **Organogenesis**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 90-96, July 2009.

BAUST, J. M. Properties of cells and tissues influencing preservation outcome: molecular basis of preservation induced cell death. In: BAUST, J. G.; BAUST, J. M. (Eds.). **Advanced in biopreservation**. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007, cap. 3, p. 63-87.

BENSON, E. E.; BREMNER, D. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap. 6, p. 205-241.

BENSON, E. E. Cryopreservation theory. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008, p. 15-32.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: Approaches and problems. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 29-39, Jan. 2014.

_____. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 478, p. 1-9, Nov. 2013.

_____. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds? **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 22-55, 2000. Edição Especial.

BERJAK, P.; SERSHEN, B. V.; PAMMENTER, N. W. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 21, n. 3, p. 187-203, Sept. 2011.

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, Mar. 2006.

BONIFACIO, A. et al. Role of peroxidases in the compensation of cytosolic ascorbate peroxidase knockdown in rice plants under abiotic stress. **Plant, Cell and Environment**, New York, v. 34, n. 10, p. 1705-1722, Oct. 2011.

BORÉM, F. M. et al. Microscopia eletrônica de varredura de grãos de café submetidos a diferentes formas de processamento e secagem. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 227-237, abr./jun. 2013.

- BORÉM, F. M.; MARQUES, E. R.; ALVES, E. Ultrastructural analysis of drying damage in parchment Arabica coffee endosperm cells. **Biosystems engineering**, Harpenden, v. 99, n. 1, p. 62-66, Jan. 2008.
- BUITINK, J.; LEPRINCE, O. Intracellular glasses and seed survival in the dry state. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 331, n. 10, p. 788-795, Oct. 2008.
- CADDAH, M. K.; ANDRADE, B. O.; MEDEIROS, A. C. S. Efeitos da desidratção e do armazenamento em sementes de *Magnolia ovata* St. Hil. Magnoliaceae. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 15, n. 1-3, p. 285, 2005.
- CARVALHO, L. R. de. **Conservação de sementes de espécies dos gêneros *Nectandra*, *Ocotea* e *Persea* (Lauraceae)**. 2006. 75 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.
- CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grow apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 397-403, Apr. 2011.
- CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 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, jun. 2015.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Safra 2016 - Primeiro levantamento, janeiro 2016. Brasília: Conab, v. 2, n. 1, p. 1-68, 2016a.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Safra 2016 - Segundo levantamento, maio 2016. Brasília: Conab, v. 3, n. 2, p. 1-104, 2016b.
- CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 22, p. 61-68. Feb. 2012. Supplement.
- DEKKERS, B. J. W. et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 563-577, Mar. 2015.

DULLOO, M. E. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, 2009.

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, May/June 2006.

DUSSERT, S. et al. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage? **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 119, n. 4, p. 534-543, Dec. 2003a.

_____. Beneficial effect of post-thawing osmoconditioning on the recovery of cryopreserved coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. **CryoLetters**, Cambridge, v. 21, n. 1, p. 47-52, Jan./Feb. 2000.

_____. Biologie de la conservation des semences de caféiers: aspects fondamentaux et conséquences pratiques: une revue. **Cahiers Agricultures**, Les Ulis, v. 21, n. 2-3, p. 106-114, 2012.

_____. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **CryoLetters**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 269-276, 1997a.

_____. Cryopreservation of seed of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 8, n. 1, p. 9-15, Feb. 1998.

_____. Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 135-144, Feb. 1999.

_____. Rôle de la peroxydation des lipides dans la sensibilité à la cryoconservation des semences de caféier (*Coffea arabica*). **Les Actes du Bureau Ressources Génétiques**, Paris, v. 4, p. 129-141, 2003b.

_____. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition,

and cooling procedure. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 112, n. 4, p. 495-504, Aug. 2001.

_____. Variability in storage response within a coffee (*Coffea* spp.) core collection under slow growth conditions. **Plant Cell Reports**, Heidelberg, v. 16, n. 5, p. 344-348, Feb. 1997b.

EL-ABASSY, R. M.; DONFACK, P.; MATERNY, A. Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 3, p. 1443-1448, June 2011.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, Sept. 1990.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept. 2004.

_____. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FAGAN, E. B. et al. Efeito do tempo de formação do grão de café (*Coffea* sp) na qualidade da bebida. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 5, p. 729-738, set./out. 2011.

FAHY, G. M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, Amsterdam, v. 21, n. 4, p. 407-426, Aug. 1984.

FARRANT, J. M. et al. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 7, n. 2, p. 135-144, May 1997.

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, Aug. 2005.

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

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, London, v. 143, n. 1, p. 81-96, Apr. 2009.

GENTIL, D. F. O. Conservação de sementes de cafeeiro: resultados discordantes ou complementares? **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 3, p. 149-154, nov. 2001.

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, July 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, Dec. 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.

GRELET, J. et al. Identification in Pea seed mitochondria of a late embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 1, p. 157-167, Jan. 2005.

GROOT, S. P. C. et al. Gene expression during loss and regaining of stress tolerance at seed priming and drying. In: NICOLÁS, G. et al. (Eds.). **The biology of seeds: recent research advances**. Cambridge: CAB International, 2003, p. 279-287.

GUIMARÃES, R. M. **Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.)**. 2000. 180 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)–Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

HANAOKA, K. Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride solutions. **Journal of Applied Electrochemistry**, Heidelberg, v. 31, n. 12, p. 1307-1313, Dec. 2001.

HANAOKA, K. et al. The mechanism of enhanced antioxidant effects against superoxide anion radicals of reduced water produced by electrolysis. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 107, n. 1, p. 71-82, Jan. 2004.

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.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.

HIRAOKA, A. et al. Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of 'active hydrogen'. **Journal of Health Science**, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 456-465, 2004.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 6, n. 9, p. 431-438, Sept. 2001.

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; NIJSSE, J. What do we know about desiccation tolerance mechanism? In: NICOLÁS, G. et al. (Eds.). **The biology of seeds: recent research advances**. Cambridge: CAB International, 2003, p. 259-270.

HUNDERTMARK M.; HINCHA D. K. LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 118, p. 1-22, Mar. 2008.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, London, v. 60, n. 7, p. 651-674, Aug. 2002.

ILJIN, W. S. Drought resistance in plants and physiological processes. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 8, p. 257-274, June 1957.

INZÉ, D.; MONTAGU, M.V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1995.

JOSÉ, A. C. et al. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 2, p. 425-434, July 2011.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: _____ (Ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton: CRC Press, 1985. p. 115-134.

KOHOMA, S. et al. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* LAM. (Grumixameira). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 28, n. 1, p. 72-78, 2006.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 338, p. 1515-1524, Sept. 1999.

MALTA, M. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; CHAGAS, S. J. de R. Condutividade elétrica e lixiviação de potássio do exsudato de grãos de café: alguns fatores que podem influenciar essas avaliações. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 5, p. 1015-1020, set./out. 2005.

MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, Bethesda, v. 247, n. 3, p. 125-142, Sept. 1984.

_____. Principles of cryobiology. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap. 1, p. 3-65.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, Cambridge, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MOLNÁR, K. Subbiological aspects of ageing and the concept of biological cathode protection. **Mechanisms of Ageing and Development**, Athens, v. 1, n. 5, p. 319-326, Mar. 1973.

MONDEGO, J. M. C. et al. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 30, p. 1-23, Feb. 2011.

NAIDOO, C. et al. The role of reactive oxygen species and antioxidants during precooling stages of axis cryopreservation in recalcitrant *Trichilia dregeana*. **Botany**, Ottawa, v. 94, n. 5, p. 391-403, May. 2016.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 42-051, 2010.

NAUEN, R. Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 63, n. 7, p. 628-633, July 2007.

OLIVEIRA A. B. et al. Seed priming effects on growth, lipid peroxidation, and activity of ROS scavenging enzymes in NaCl-stressed sorghum seedlings from aged seeds. **Journal of Plant Interactions**, Turim, v. 7, n. 2, p. 151-159, June 2012.

PAMMENTER N. W.; ADAMSON J. H.; BERJAK P. Viability of stored seed: extension by cathodic protection. **Science**, Washington, v. 186, n. 4169, p. 1123-1124, Dec. 1974.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation tolerance mechanisms. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 9, n. 1, p. 13-37, Jan. 1999.

_____. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, p. 56-69, 2000. Edição Especial.

_____. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, Jan. 2014.

PAMMENTER, N. W.; VERTUCCI, C. W.; BERJAK, P. Responses to dehydration in relation to non-freezable water in desiccation sensitive and tolerant seeds. In: CÔME, D.; CORBINEAU, F. (Eds.). **Proceedings of the fourth international workshop on seeds: basic and applied aspects of seed biology**. Paris: AFSIS, 1993, p. 867-872.

PANIS, B.; SWENNEN, B. P. Droplet vitrification of apical meristems: a cryopreservation protocol applicable to all *Musaceae*. **Plant Science**, Shannon, v. 168, n. 1, p. 45-55, Jan. 2005.

PARK, J. J. et al. OsPUB15, an E3 ubiquitin ligase, functions to reduce cellular oxidative stress during seedling establishment. **The Plant Journal**, Oxford, v. 65, n. 2, p. 194-205, Jan. 2011.

PAYNTER, S. J. Current status of the cryopreservation of human unfertilized oocytes. **Human Reproduction**, Oxford, v. 6, n. 5, p. 449-456, May 2000.

PRETE, C. E. C. **Condutividade elétrica do exsudato de grãos de café (*Coffea arabica* L.) e sua relação com a qualidade da bebida**. 1992. 125 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1992.

REINATO, C. H. R. et al. Influência da secagem, em diferentes tipos de terreiro, sobre a qualidade do café ao longo do armazenamento. **Coffee Science**, Lavras, v. 2, n. 1, p. 48-60, jan./jun. 2007.

ROACH, T. et al. An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 133, n. 2, p. 131-139, June 2008.

ROSA, S. B. et al. Cytosolic APX knockdown indicates an ambiguous redox responses in rice. **Phytochemistry**, London, v. 71, n. 5-6, p. 548-558, Apr. 2010.

ROSA, S. D. V. F. et al. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 199-205, Apr./June 2005.

_____. The effect of storage conditions on coffee seed and seedling quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 1, p. 151-164, Apr. 2011.

ROSSI, C.; LIMA, G. P. P.; HAKVOORT, D. M. R. Atividade de peroxidases (EC 1.11.1.7) e teor de prolina no embrião e cotilédones de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 123-127, set./dez. 1997.

RUSSEL, R. J. et al. The evolution of new enzyme functions: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. **Evolutionary Applications**, Malden, v. 4, n. 2, p. 225-248, Mar. 2011.

SAATH, R. et al. Microscopia eletrônica de varredura do endosperma de café (*Coffea arabica* L.) durante o processo de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 196-203, jan./fev. 2010.

_____. Activity of some isoenzymatic systems in stored coffee grains. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 1, p. 15-24, Jan./Feb. 2014.

SAKAI, A.; HIRAI, D.; NIINO, T. Development of PVS-Based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008, p. 33-57.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L. Tratamentos pré-germinativos em sementes de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 253-258, ago. 2000.

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, jun. 2005.

SANTOS, F. C. et al. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2014.

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, Dec. 2013.

SANTOS, I. R. I. **Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. 23p. (EMBRAPA-CERNAGEN. Documentos, 115).

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, Rockville, v. 101, n. 1, p. 7-12, Jan. 1993.

_____. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 995-1014, July 2005.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, May 2002.

SHIRAHATA, S. et al. Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 234, n. 1, p. 269-274, May 1997.

SHIRAHATA, S. Medical treatment and water, Oxygen-radical scavenging activity and inhibition of growth of cancer cells by electrolyzed-reduced water (in Japanese). In: **Science and Application Technology of Functional Water** (in Japanese), Water Science Association (Water Science Kenkyukai), Osaka, 1999, p. 137–138.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.

TATONE, C. et al. Cryopreservation and oxidative stress in reproductive cells. **Gynecological Endocrinology**, London, v. 26, n. 8, p. 563-567, Aug. 2010.

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. **Plant tissue culture, development and biotechnology**. London: CRC Press, 2011, 583 p.

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.

UMARANI, R.; AADHAVAN, E. K.; FAISAL, M. M. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. **Current Science**, Bangalore, v. 108, n. 11, p. 2023-2034, June 2015.

VEIGA, A. D. et al. Armazenabilidade de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-91, abr. 2007.

VERTUCCI, C.W. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. **Journal Seed Technology**, Lansing, v.17, n.2, p.41-53, 1993.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J. & GALILI, G (ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. p.237-271.

VIDIGAL, D. S.; DIAS, D. C. F. S.; VON PINHO, E. V. R.; DIAS, L. A. S. 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, A. R. et al. Armazenamento de sementes de cafeeiro: ambientes e métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 76-82, abr. 2007.

VILLELA, F. A.; MARCOS-FILHO, J. Estados energéticos e tipos de água na semente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 20, n. 2, p.79-83, 1998.

WALTERS, C. et al. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008, p. 465-484.

WALTERS, C. Orthodoxy, recalcitrance and in-between: describing variation in seed storage characteristics using threshold responses to water loss. **Planta**, Berlin, v. 242, n. 2, p. 397-406, Aug. 2015.

WHITAKER, C. et al. Production of reactive oxygen species in excised and cryopreserved explants of *Trichilia dregeana* Sond. **South African Journal of Botany**, Matieland, v. 76, n. 1, p. 112-118, Jan. 2010.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

**Estudos exploratórios para a criopreservação de sementes de
Coffea arabica L.**

(Artigo elaborado segundo norma NBR 6022 – ABNT 2003)

RESUMO

A utilização da técnica de criopreservação é uma opção viável para a conservação de germoplasma de café. Entretanto, para que essa técnica apresente total sucesso é de fundamental importância realizar pesquisas que garantam a manutenção da integridade celular antes e após a imersão em nitrogênio líquido. Portanto, o objetivo neste estudo foi investigar o teor de água, velocidade e temperatura final de resfriamento mais adequados para criopreservar sementes de *Coffea arabica* L. As sementes foram secadas por meio de sílica gel até os teores de água de 5, 10, 15, 20, 30 e 40% bu, submetidas a tratamentos de resfriamento lento nas velocidades $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$, $-3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até as temperaturas finais de -40°C , -50°C , e -60°C , por meio de um biocongelador. As sementes embaladas em envelopes trifoliados de alumínio foram diretamente imersas em nitrogênio líquido e após 36 horas de armazenamento foram reaquecidas em banho-maria por dois minutos à 40°C . As alterações fisiológicas foram avaliadas por meio do teste de tetrazólio e de germinação. Observou-se que se o resfriamento lento de sementes for realizado até temperaturas menores que -40°C , a velocidade de resfriamento deve ser maior que $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Por meio do teste de tetrazólio, observa-se que embriões excisados das sementes criopreservadas são menos sensíveis à criopreservação quando comparados às sementes inteiras. O teor de água de 20% (bu) permite maior sobrevivência das sementes de *Coffea arabica* L. à criopreservação quando resfriadas a uma velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura final de -40°C .

Palavras-chave: Criopreservação. Sílica gel. Teor de água. Resfriamento lento.

1 INTRODUÇÃO

A segurança, a necessidade de pouco espaço e o menor custo, além de outras vantagens oferecidas pela criopreservação de recursos genéticos de café em relação à conservação *ex situ* (DULLOO et al., 2009) tem impulsionado as pesquisas e os avanços desta técnica para a preservação dessa espécie. Porém, muitos questionamentos sobre o comportamento destas sementes intermediárias, parcialmente tolerantes à dessecação e às baixas temperaturas (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990) ainda são pesquisados pela comunidade científica a fim de elucidar os entraves que prejudicam o sucesso da sua criopreservação. Segundo Dekkers et al. (2015) a longevidade da semente está intimamente relacionada à sua tolerância à dessecação.

Para espécies recalcitrantes tropicais e subtropicais, a criopreservação clássica, que pode ser composta pelas etapas de dessecação, resfriamento lento, seguido de uma rápida imersão dos explantes em nitrogênio líquido, armazenamento e reaquecimento rápido, tem se mostrado superior à criopreservação moderna, que prioriza a imersão direta da amostra em nitrogênio líquido (ENGELMANN, 2011; BERJAK; PAMMENTER, 2014). Porém, o estresse causado às células por meio da dessecação e resfriamento, em resposta às mudanças nas propriedades da água, pode comprometer a integridade destas e provocar alterações na viabilidade das sementes (WALTERS et al., 2008).

Sementes sensíveis à dessecação, geralmente, apresentam três tipos de danos. No dano relacionado à dessecação, que é o mecânico, o sistema de membranas é afetado negativamente e pode haver colapso de vacúolos e estruturas macromoleculares. Os danos fisiológicos, ligados ao metabolismo, podem ocorrer durante a dessecação ou armazenamento hidratado, causando

danos ao sistema de membranas, proteínas e DNA pela formação de radicais livres e subprodutos tóxicos. E por fim, após um tempo de armazenamento, pode haver desnaturação macromolecular com formação de muitos vacúolos que se tornam dilatados (PAMMENTER; BERJAK, 2000; UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015). Segundo Farrant et al. (1997) a sensibilidade à dessecação é diretamente proporcional ao grau de vacuolização.

De acordo com Coelho et al. (2015), o teor de água remanescente nas sementes após a secagem e a velocidade com que esta ocorre podem afetar a qualidade fisiológica de sementes de café. Estes autores afirmaram que essas sementes toleram maior perda de água quando submetidas à secagem rápida. Dessecantes de ar como a sílica gel reduzem a umidade relativa a menos de 20%, proporcionando a secagem rápida ao criar um gradiente de água entre a amostra e o meio circundante (WALTERS et al., 2008). Segundo Umarani; Aadhavan; Faisal (2015), as sementes recalcitrantes podem sofrer danos mecânicos se secadas a teores muito baixos de água, e danos fisiológicos se o teor de água for alto, sendo esta uma possível razão para os resultados conflitantes das pesquisas realizadas até então. Zhang et al. (2014) constataram que sementes de *Citrus paradisi* Macfad. secadas em sílica gel apresentaram melhor viabilidade após a criopreservação em comparação às secadas em soluções salinas.

O resfriamento lento faz com que a água intracelular se movimente para o meio extracelular por meio de um gradiente de potencial, permitindo que o conteúdo celular se torne mais concentrado. Essa concentração diminui o ponto de congelamento intracelular e conseqüentemente, pode permitir formação de cristais de gelo apenas fora da célula (PAMMENTER; BERJAK, 2014). Assim como a secagem, a taxa e a temperatura nas quais o resfriamento lento ocorre também podem ocasionar danos mecânicos e fisiológicos. Altas concentrações

de eletrólitos podem danificar as células se estas são desidratadas por meio de uma taxa de resfriamento muito lenta. Outro possível dano à célula também pode ocorrer se a água não for conduzida com eficiência para o meio extracelular devido à taxa de resfriamento lento ser muito alta, podendo ocorrer a formação de cristais de gelo intracelular devido à menor concentração de solutos (MAZUR, 2004). Como as células se desidratam à medida que a temperatura diminui, definir a temperatura final de resfriamento pode ser também fundamental para impedir que danos ocorram (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

Em função da maneira com que se conduzem as etapas da criopreservação clássica pode contribuir para a redução dos danos em sementes criopreservadas, o objetivo neste estudo foi investigar o teor de água, velocidade e temperatura final de resfriamento mais adequados para criopreservar sementes de *Coffea arabica* L.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Frutos em estágio na maturidade fisiológica (cereja) da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, foram colhidos em lavouras da Fazenda Experimental de Varginha - Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira) e transportados para a Universidade Federal de Lavras, onde foram despulpados mecanicamente. As sementes foram então, desmuciladas por fermentação em água, por período de 24 horas em temperatura ambiente e posteriormente, dispostas em camada única em uma tela, mantidas sob sombra, para serem secadas superficialmente.

Após o processamento, as sementes foram submetidas à determinação do teor de água inicial e à avaliação da qualidade fisiológica inicial, por meio dos testes de germinação e teste de viabilidade em sal de tetrazólio, no Laboratório Central de Sementes, da UFLA.

Procedimentos de criopreservação das sementes de café

Testes preliminares de secagem lenta (soluções saturadas de sais) e rápida (sílica gel) de sementes de café foram realizados. Como a secagem rápida proporcionou melhores resultados fisiológicos (COELHO et al., 2015), este método de secagem foi o escolhido neste experimento.

A secagem rápida foi realizada colocando-se as sementes, com o teor de água inicial determinado, em recipientes herméticos contendo 60 gramas de sílica gel ativada, os quais foram mantidos em câmaras B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*), reguladas à 25°C, na ausência de luz. Tomou-se o cuidado para que as sementes não ficassem em contato direto com o agente secante e a

perda de água durante a secagem foi monitorada até as amostras atingirem os seguintes teores de água de interesse, 40, 30, 20, 15, 10 e 5% (base úmida).

À medida que as amostras de sementes de café atingiam os teores de água de interesse, uma parte dessas amostras era usada para realizar testes de tetrazólio e teste de germinação e a outra parte usada para compor os testes de resfriamento descritos a seguir.

Para o teste de resfriamento, 170 sementes para cada teores de água (40, 30, 20, 15, 10 e 5%) foram acondicionadas em embalagens trifoliadas de papel alumínio e colocadas em um biocongelador (Icecube, modelo 14S-B, software SY-LAB - Minitub do Brasil), por meio do qual foram programadas diferentes curvas de resfriamento, variando-se as velocidades ($-1^{\circ}\text{C min.}^{-1}$; $-3^{\circ}\text{C min.}^{-1}$; $-5^{\circ}\text{C min.}^{-1}$) e as temperaturas finais (-40°C ; -50°C ; -60°C).

De acordo com a metodologia de Dussert et al. (1998), com modificações, após a realização das curvas de resfriamento, as embalagens contendo as sementes foram imersas diretamente em nitrogênio líquido (-196°C) e após 36 horas de armazenamento foram retiradas e reaquecidas diretamente em água por 2 minutos à $40\pm 1^{\circ}\text{C}$. As sementes, então, foram secadas superficialmente em papel toalha e seus pergaminhos manualmente retirados para serem submetidas a avaliações fisiológicas, por meio do teste de germinação e teste de tetrazólio.

Após retirar as sementes do nitrogênio líquido e antes de reaquecê-las, uma pequena amostra foi retirada de cada tratamento, para determinação do teor de água destas.

Determinação do teor de água das sementes

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.

Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso seco das sementes.

Análises fisiológicas

- Teste de germinação:

Realizado com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, semeadas em papel toalha tipo "germitest" umedecidos com água destilada na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Os rolos de germinação foram acondicionados em germinador, regulado a 30°C, na presença de luz (BRASIL, 2009). Foram determinadas as porcentagens de protrusão radicular aos 15 dias e plântulas normais aos 30 dias após a semeadura, sendo computadas como plântulas normais, aquelas que apresentaram raiz principal e pelo menos duas raízes laterais. No teste de germinação determinou-se também: porcentagem de plântulas normais fortes, sendo computadas aquelas que apresentaram alça hipocotiledonar com, no mínimo, três centímetros; e porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias após a semeadura.

- Massa seca de plântulas:

A massa seca de plântulas foi realizada ao final do teste de germinação, nas plântulas normais. Para isso, a parte aérea foi separada das raízes, com auxílio de um bisturi e o material vegetal colocado em sacos de papel e submetido à secagem em estufa de circulação forçada de ar à 60°C por 4 a 5 dias ou até massa constante. A massa seca foi determinada em balança de precisão.

- Teste de tetrazólio:

Realizado com quatro repetições de 10 sementes. As sementes foram embebidas em água por 36 horas para a extração dos embriões. Os embriões extraídos, mantidos em solução antioxidante de polivinilpirrolidona (PVP),

foram lavados em água corrente, imersos em solução de tetrazólio 0,5% utilizando-se frascos escuros e acondicionados em temperatura de 30°C por 3 horas (BRASIL, 2009; CLEMENTE et al., 2011). A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para melhor visualização das estruturas internas e externas dos mesmos. Para isso, realizou-se um corte longitudinal nos embriões, os quais foram classificados em viáveis e inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (BRASIL, 2009).

Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 6x3x3 (sementes de café com seis teores de água, três velocidades e três temperaturas finais de resfriamento), com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância, as médias qualitativas foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, e os dados quantitativos foram submetidos à regressão, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, encontra-se representada a curva de secagem para sementes de café submetidas à secagem rápida, em sílica gel, até atingir diferentes teores de água.

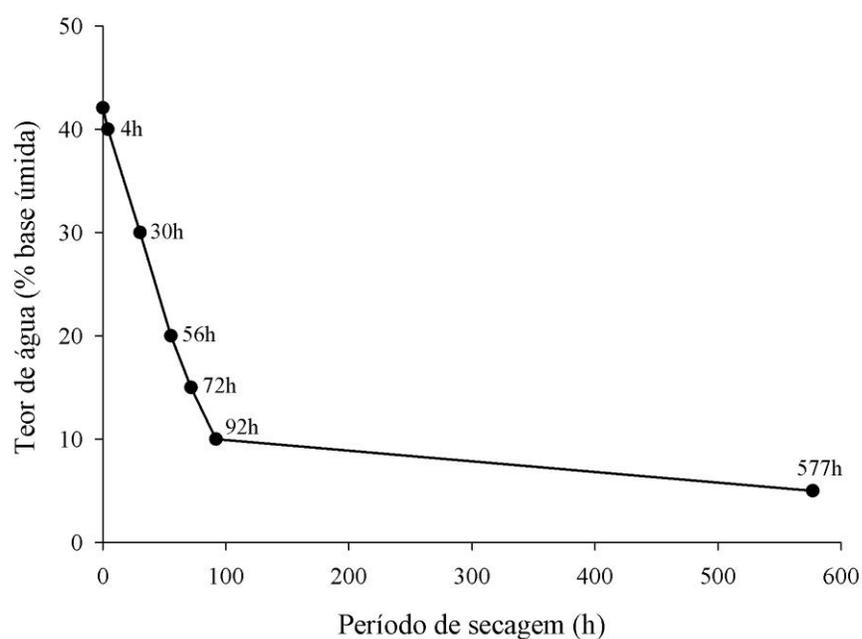


Figura 1 Curva de secagem das sementes de *Coffea arabica* L. submetidas à secagem rápida, em sílica gel.

A sílica gel retém as moléculas de água na superfície de seus poros, por meio de adsorção física (JOSÉ et al., 2009), no entanto, observa-se que a taxa de secagem média diminui à medida que o teor de água da semente diminui. Isso acontece porque em sementes mais secas, a água fica fortemente ligada às superfícies coloidais das macromoléculas, dificultando assim, a saída de água (MARCOS FILHO, 2005).

Houve diferenças significativas para os resultados fisiológicos das sementes com diferentes teores de água após secagem (APÊNDICE A). No teste de germinação foi possível observar que sementes com teor de água acima de 5% bu resultaram em maiores porcentagens de protrusão radicular, de plântulas normais, de plântulas normais fortes e de folhas cotiledonares expandidas (TABELA 1). As sementes mais vigorosas, que resultaram em maiores porcentagens de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, foram as que continham 15% e 20% de teor de água.

Tabela 1 Resultados médios de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (NF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) e de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de *Coffea arabica* L. secadas em sílica gel até diferentes teores de água (% base úmida).

Teores de água (% bu)	PR (%)	PN (%)	NF (%)	FC (%)	EV (%)
5	24 B	5 B	1 E	5 C	63 B
10	94 A	86 A	40 B	88 B	85 A
15	98 A	92 A	24 D	97 A	78 B
20	96 A	94 A	21 D	96 A	70 B
30	90 A	89 A	17 D	93 B	93 A
40	96 A	94 A	32 C	92 B	95 A
42*	96 A	92 A	54 A	91 B	88 A
CV (%)	6,9	6,3	16,2	4,5	12,7

Médias seguidas pela mesma letra não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de *Skott-Knott*, ao nível de 5% probabilidade. *Sementes sem secagem.

No teste de tetrazólio das sementes após a secagem (TABELA 1) observa-se que maior viabilidade dos embriões foi obtida em sementes com teores de água de 10, 30, 40 e 42% bu (sementes sem secagem).

Assim como para os resultados do teste de germinação, a porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio também foi menor para as sementes com teor de água de 5% bu (TABELA 1). Entretanto, nota-se que a diferença de viabilidade desses embriões com a dos demais teores de água foi menos

discrepante quando comparada à diferença de viabilidade observada no teste de germinação (plântulas normais) entre esses mesmos teores de água. Isso indica que existe sensibilidade do endosperma a algum tipo de dano que pode contribuir para a perda de viabilidade da semente de café. Esta perda de viabilidade devido ao endosperma também foi constatada em trabalhos com sementes de *Coffea arabica* L.(DUSSERT; ENGELMANN, 2006; COELHO et al., 2015).

A determinação do teor de água das sementes realizada após o armazenamento em nitrogênio líquido e antes do reaquecimento encontra-se na Tabela 2. Percebe-se que, de maneira geral, o incremento de teor de água final (% bu) foi inversamente proporcional ao teor de água inicial das sementes. Isso é explicado por meio da diferença de potencial hídrico entre a semente e o ambiente. Se o potencial hídrico da semente for muito negativo, quando em contato com a água no reaquecimento, a sementes irá absorver água mais rapidamente e vice-versa (ZUCARELI et al., 2008; OLIVEIRA; BOSCO, 2013).

Tabela 2 Variações no teor de água (θ) de sementes de *Coffea arabica* L. antes (inicial) e após o armazenamento em nitrogênio líquido (antes do reaquecimento). (Continua)

θ inicial (% bu)	Velocidade de resfriamento ($^{\circ}\text{C min.}^{-1}$)	T $^{\circ}\text{C}$ final de resfriamento ($^{\circ}\text{C}$)	θ antes do reaquecimento (% bu)	Diferença ou Incremento (% bu)	\bar{x} da diferença ou incremento (% bu)
40,2	- 1		38,5	- 1,7	
40,2	- 3	- 40	41,2	1,0	
40,2	- 5		39,1	- 1,1	
40,2	- 1		40,7	0,5	
40,2	- 3	- 50	39,2	- 1,0	- 0,3
40,2	- 5		42,8	2,6	
40,2	- 1		39,7	- 0,5	
40,2	- 3	- 60	39,8	- 0,4	
40,2	- 5		38,1	- 2,1	

Tabela 2 Variações no teor de água (θ) de sementes de *Coffea arabica* L. antes (inicial) e após o armazenamento em nitrogênio líquido (antes do reaquecimento). (Continua)

θ inicial (% bu)	Velocidade de resfriamento (°C min. ⁻¹)	T°C final de resfriamento (°C)	θ antes do reaquecimento (% bu)	Diferença ou Incremento (% bu)	\bar{x} da diferença ou incremento (% bu)
29,3	- 1		32,2	2,9	
29,3	- 3	- 40	29,3	0,0	
29,3	- 5		30,1	0,8	
29,3	- 1		30,7	1,4	
29,3	- 3	- 50	31,2	1,9	1,7
29,3	- 5		30,6	1,3	
29,3	- 1		32,8	3,5	
29,3	- 3	- 60	31,0	1,7	
29,3	- 5		30,8	1,5	
20,8	- 1		22,5	1,7	
20,8	- 3	- 40	22,0	1,2	
20,8	- 5		22,4	1,6	
20,8	- 1		21,8	1,0	
20,8	- 3	- 50	21,9	1,1	1,8
20,8	- 5		22,8	2,0	
20,8	- 1		21,6	0,8	
20,8	- 3	- 60	23,0	2,2	
20,8	- 5		25,3	4,5	
14,9	- 1		19,2	4,3	
14,9	- 3	- 40	21,9	7,0	
14,9	- 5		22,6	7,7	
14,9	- 1		19,8	4,9	
14,9	- 3	- 50	20,3	5,4	5,6
14,9	- 5		17,8	2,9	
14,9	- 1		22,1	7,2	
14,9	- 3	- 60	20,6	5,7	
14,9	- 5		20,2	5,3	

Tabela 2 Variações no teor de água (θ) de sementes de *Coffea arabica* L. antes (inicial) e após o armazenamento em nitrogênio líquido (antes do reaquecimento). (Conclusão)

θ inicial (% bu)	Velocidade de resfriamento ($^{\circ}\text{C min.}^{-1}$)	T $^{\circ}\text{C}$ final de resfriamento ($^{\circ}\text{C}$)	θ antes do reaquecimento (% bu)	Diferença ou Incremento (% bu)	\bar{x} da diferença ou incremento (% bu)
10,9	- 1		18,8	7,9	
10,9	- 3	- 40	18,7	7,8	
10,9	- 5		17,6	6,7	7,0
10,9	- 1		18,8	7,9	
10,9	- 3	- 50	19,6	8,7	
10,9	- 5		16,5	5,6	
10,9	- 1		18,1	7,3	
10,9	- 3	- 60	15,6	4,7	
10,9	- 5		16,9	6,0	
5,2	- 1		17,3	12,1	
5,2	- 3	- 40	17,5	12,3	
5,2	- 5		18,7	13,5	
5,2	- 1		17,7	12,5	
5,2	- 3	- 50	16,1	10,9	11,5
5,2	- 5		15,0	9,8	
5,2	- 1		17,1	11,9	
5,2	- 3	- 60	16,6	11,4	
5,2	- 5		14,1	8,9	

Na análise de variância dos dados, constatou-se interação tripla significativa dos fatores estudados (APÊNDICE A). Nas Tabelas 3, 4 e 5 encontram-se os resultados dos desdobramentos destes fatores e seus efeitos sobre as variáveis de germinação e do teste de tetrazólio, após a criopreservação das sementes.

Tabela 3 Efeitos do teor de água das sementes, em cada velocidade e temperatura final do resfriamento, sobre as porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de café criopreservadas. (Continua)

Temperatura final (°C)	Velocidade (°C/min.)	Teor de água (% b.u.)	PR (%)	PN (%)	PNF (%)	FC (%)	MSR (cg)	MSPA (cg)	EV (%)
- 40	- 1	5	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	50 C
		10	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	73 B
		15	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	90 A
		20	85 A	79 A	33 A	77 A	19,6 A	103,7 A	75 B
		30	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 D
	40	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 D	
	- 3	5	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	40 C
		10	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	85 A
		15	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	88 A
		20	83 A	71 A	16 A	65 A	15,2 A	77,5 A	70 B
		30	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 D
	40	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 D	
	- 5	5	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	40 B
		10	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	68 A
		15	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	73 A
20		61 A	49 A	19 A	47 A	12,5 A	67,3 A	80 A	
30		0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 C	
40	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 C		
- 50	- 1	5	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	43 C
		10	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	85 A
		15	3 B	1 B	0 B	1 B	0,2 B	1,1 B	70 B
		20	37 A	28 A	16 A	25 A	6,1 A	33,0 A	70 B
		30	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 D
	40	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 D	
	- 3	5	0 B	0 B	0 A	0 B	0,0 B	0,0 A	38 B
		10	0 B	0 B	0 A	0 B	0,0 B	0,0 A	80 A
		15	4 A	0 B	0 A	1 B	0,3 B	1,0 A	80 A

Tabela 3 Efeitos do teor de água das sementes, em cada velocidade e temperatura final do resfriamento, sobre as porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de café criopreservadas. (Conclusão)

Temperatura final (°C)	Velocidade (°C/min.)	Teor de água (% b.u.)	PR (%)	PN (%)	PNF (%)	FC (%)	MSR (cg)	MSPA (cg)	EV (%)	
- 50	- 3	20	8 A	7 A	4 A	7 A	1,5 A	8,8 A	40 B	
		30	0 B	0 B	0 A	0 B	0,0 B	0,0 A	0 C	
		40	0 B	0 B	0 A	0 B	0,0 B	0,0 A	0 C	
	- 5	5	5	0 B	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	50 B
			10	0 B	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	60 B
			15	4 B	1 A	0 A	1 A	0,2 A	1,1 A	83 A
		20	20	9 A	3 A	3 A	3 A	0,6 A	3,8 A	58 B
			30	0 B	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 C
			40	0 B	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 C
	- 60	- 1	5	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	48 B
			10	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	83 A
			15	0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	58 B
20			51 A	28 A	13 A	25 A	6,3 A	33,0 A	80 A	
30			0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 C	
40			0 B	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 C	
- 3		5	5	0 C	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	30 C
			10	0 C	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	63 B
			15	5 B	3 B	8 A	1 B	0,3 B	1,8 B	90 A
		20	20	55 A	37 A	0 B	36 A	8,0 A	41,1 A	73 B
			30	0 C	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 D
			40	0 C	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 D
- 5	5	5	0 C	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	68 B	
		10	0 C	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	85 A	
		15	7 B	3 B	3 B	0 B	0,0 B	0,0 B	85 A	
	20	20	55 A	39 A	19 A	35 A	8,9 A	44,5 A	95 A	
		30	0 C	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 C	
		40	0 C	0 B	0 B	0 B	0,0 B	0,0 B	0 C	
CV (%)			29,99	41,09	101,02	43,33	42,36	44,17	20,61	

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

Tabela 4 Efeitos da velocidade de resfriamento, em cada temperatura final do resfriamento e teor de água das sementes, sobre as porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de café criopreservadas. (Continua)

Teor de água (% b.u.)	Temperatura final (°C)	Velocidade (°C/min.)	PR (%)	PN (%)	PNF (%)	FC (%)	MSR (cg)	MSPA (cg)	EV (%)
5	- 40	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	50 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	40 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	40 A
	- 50	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	43 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	38 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	50 A
	- 60	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	48 B
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	30 C
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	68 A
10	- 40	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	73 B
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	85 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	68 B
	- 50	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	85 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	80 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	60 B
	- 60	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	83 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	63 B
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	85 A
15	- 40	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	90 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	88 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	73 B
	- 50	- 1	3 A	1 A	0 A	1 A	0,2 A	1,1 A	70 A
		- 3	4 A	0 A	0 A	1 A	0,3 A	1,0 A	80 A
		- 5	4 A	1 A	0 A	1 A	0,2 A	1,1 A	83 A
	- 60	- 1	0 B	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	58 B
		- 3	5 A	3 A	0 A	1 A	0,3 A	1,8 A	90 A
		- 5	7 A	3 A	3 A	0 A	0,0 A	0,0 A	85 A

Tabela 4 Efeitos da velocidade de resfriamento, em cada temperatura final do resfriamento e teor de água das sementes, sobre as porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de café criopreservadas. (Conclusão)

Teor de água (% b.u.)	Temperatura final (°C)	Velocidade (°C/min.)	PR (%)	PN (%)	PNF (%)	FC (%)	MSR (cg)	MSPA (cg)	EV (%)
20	- 40	- 1	85 A	79 A	33 A	77 A	19,6 A	103,7 A	75 A
		- 3	83 A	71 B	16 B	65 B	15,2 B	77,5 B	70 A
		- 5	61 B	49 C	19 B	47 C	12,5 C	67,3 C	80 A
	- 50	- 1	37 A	28 A	16 A	25 A	6,1 A	33,0 A	70 A
		- 3	8 B	7 B	4 B	7 B	1,5 B	8,8 B	40 B
		- 5	9 B	3 B	3 B	3 B	0,6 B	3,8 B	58 A
	- 60	- 1	51 A	28 B	13 B	25 B	6,3 B	33,0 B	80 B
		- 3	55 A	37 A	8 C	36 A	8,0 A	41,1 A	73 B
		- 5	55 A	39 A	19 A	35 A	8,9 A	44,5 A	95 A
30	- 40	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
	- 50	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
	- 60	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
40	- 40	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
	- 50	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
	- 60	- 1	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 3	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
		- 5	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
CV (%)			29,99	41,09	101,02	43,33	42,36	44,17	20,61

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

Tabela 5 Efeitos das temperaturas finais de resfriamento, em cada velocidade do resfriamento e teor de água das sementes, sobre as porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de café criopreservadas. (Continua)

Teor de água (% b.u.)	Velocidade (°C/min.)	Temperatura final (°C)	PR (%)	PN (%)	PNF (%)	FC (%)	MSR (cg)	MSPA (cg)	EV (%)
5	-1	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	50 A
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	43 A
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	48 A
	-3	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	40 A
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	38 A
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	30 A
	-5	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	40 B
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	50 B
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	68 A
10	-1	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	73 A
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	85 A
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	83 A
	-3	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	85 A
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	80 A
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	63 B
	-5	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	68 B
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	60 B
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	85 A
15	-1	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	90 A
		-50	3 A	1 A	0 A	1 A	0,2 A	1,1 A	70 B
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	58 B
	-3	-40	0 B	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	88 A
		-50	4 A	0 A	0 A	1 A	0,3 A	1,0 A	80 A
		-60	5 A	3 A	0 A	1 A	0,3 A	1,8 A	90 A
	-5	-40	0 B	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	73 A
		-50	4 A	1 A	0 A	1 A	0,2 A	1,1 A	83 A
		-60	7 A	3 A	3 A	0 A	0,0 A	0,0 A	85 A

Tabela 5 Efeitos das temperaturas finais de resfriamento, em cada velocidade do resfriamento e teor de água das sementes, sobre as porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de café criopreservadas. (Conclusão)

Teor de água (% b.u.)	Velocidade (°C/min.)	Temperatura final (°C)	PR (%)	PN (%)	PNF (%)	FC (%)	MSR (cg)	MSPA (cg)	EV (%)	
20	-1	-40	85 A	79 A	33 A	77 A	19,6 A	103,7 A	75 A	
		-50	37 C	28 B	16 B	25 B	6,1 B	33,0 B	70 A	
		-60	51 B	28 B	13 B	25 B	6,3 B	33,0 B	80 A	
	-3	-40	83 A	71 A	16 A	65 A	15,2 A	77,5 A	70 A	
		-50	8 C	7 C	4 B	7 C	1,5 C	8,8 C	40 B	
		-60	55 B	37 B	8 B	36 B	8,0 B	41,1 B	73 A	
	-5	-40	61 A	49 A	19 A	47 A	12,5 A	67,3 A	80 B	
		-50	9 C	3 C	3 B	3 C	0,6 C	3,8 C	58 C	
		-60	55 B	39 B	19 A	35 B	8,9 B	44,5 B	95 A	
	30	-1	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
			-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
			-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
-3		-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
-5		-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
40		-1	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
			-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
			-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A
	-3	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
	-5	-40	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
		-50	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
		-60	0 A	0 A	0 A	0 A	0,0 A	0,0 A	0 A	
	CV (%)			29,99	41,09	101,02	43,33	42,36	44,17	20,61

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

Para as variáveis do teste de germinação (TABELAS 3, 4 e 5), apenas as sementes com teor de água de 20% bu apresentaram sobrevivência, indicando ser um teor de água adequado para a criopreservação de sementes de café. Percebe-se uma taxa de sobrevivência para as sementes com teor de água de 15% bu, no entanto, muito baixa em relação às de 20% de teor de água. Graiver; Califano; Zaritzky (2011) afirmaram que secar as sementes de *Citrus*, também sensíveis à dessecação, a um teor de água limite que evite a formação de gelo intracelular é fundamental para a sobrevivência destas à criopreservação.

Como o resfriamento lento pode causar dessecação celular, propiciando a passagem da água do meio intra para o extracelular, as sementes de café com teores de água abaixo de 20% podem ter sofrido com os danos mecânicos às células por meio do excesso de dessecação (PAMMENTER; BERJAK, 2000; PAMMENTER; BERJAK, 2014; UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015). Já para as sementes com teores de água acima de 20%, o resfriamento pode ter ocasionado a cristalização da água remanescente, sendo considerada um problema para o processo de criopreservação, ocasionando danos irreversíveis à estrutura celular (BENSON, 2008; DUSSERT et al., 2012). Zhang et al. (2014) observaram que quanto maior o teor de água em sementes de *Citrus paradisi* Macfad., mais sensíveis estas são à temperatura sub-zero.

Nota-se que antes de submeter as sementes de café aos testes de resfriamento, as sementes com teor de água de 5% bu já apresentavam baixa porcentagem de germinação (TABELA 1), mostrando a baixa tolerância à alta dessecação por essas sementes. Esta baixa viabilidade se deve à retirada da água de constituição celular, que não apresenta propriedades solventes (VERTUCCI, 1993; VERTUCCI; FARRANT, 1995). Sementes recalcitrantes podem sofrer danos mecânicos se secadas a teores muito baixos de água (UMARANI;

AADHAVAN; FAISAL, 2015). Segundo Pritchard (2007), o teor de água presente nas sementes é o fator que mais afeta a criopreservação destas.

O grande número de valores nulos presentes nos resultados (TABELAS 3, 4 e 5) pode ter sido a causa do alto coeficiente de variação da análise estatística. Portanto, outra análise foi aplicada apenas aos dados obtidos com as sementes de 20% bu, com a finalidade de verificar com mais clareza a interferência da velocidade e da temperatura final de resfriamento nessas sementes (TABELA 6) (APÊNDICE A).

Tabela 6 Efeitos da velocidade e temperatura final de resfriamento sobre os resultados do teste de germinação de sementes de *Coffea arabica* L. com teor de água de 20% (bu) criopreservadas.

Variáveis	Velocidade	Temperatura final		
		- 40°C	- 50°C	- 60°C
Protrusão radicular (%)	- 1	85 Aa	37 Ac	51 Ab
	- 3	83 Aa	8 Bc	55 Ab
	- 5	61 Ba	9 Bb	55 Aa
	CV (%)		10,04	
Plântula normal (%)	- 1	79 Aa	28 Ab	28 Bb
	- 3	71 Ba	7 Bc	37 Ab
	- 5	49 Ca	3 Bc	39 Ab
	CV (%)		13,31	
Normal forte (%)	- 1	33 Aa	16Ab	13 Bb
	- 3	16 Ba	4 Bb	8 Cb
	- 5	19 Ba	3 Bb	19 Aa
	CV (%)		33,24	
Folha cotiledonar (%)	- 1	77 Aa	25Ab	25 Bb
	- 3	65 Ba	7 Bc	36 Ab
	- 5	47 Ca	3 Bc	35 Ab
	CV (%)		14,26	
Massa seca de raiz (cg)	- 1	19,6 Aa	6,1 Ab	6,3 Bb
	- 3	15,2 Ba	1,5 Bc	8,0Ab
	- 5	12,5 Ca	0,6 Bc	8,9Ab
	CV (%)		14,02	
Massa seca de parte aérea (cg)	- 1	103,7 Aa	33,0 Ab	33,0 Ab
	- 3	77,5 Ba	8,8 Bc	41,1 Ab
	- 5	67,3 Ca	3,8 Bc	44,5 Ab
	CV (%)		14,67	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem, estatisticamente, entre si pelo teste de *Skott-Knott*, ao nível de 5% de probabilidade.

A protrusão radicular foi maior nas sementes de café resfriadas a velocidades de -1 ou -3°C min.⁻¹ até temperatura final de -40°C, com valor máximo de 85% (TABELA 6). Segundo Kulus; Zalewska (2014) a escolha da velocidade e temperatura final, às quais o material de plantas ornamentais é submetido ao resfriamento deve ser ajustada de acordo com a espécie e, geralmente, está entre uma taxa de 0,1-1,0°C min.⁻¹ até temperatura de -40°C. O

frio pode ocasionar danos celulares em algumas espécies vegetais antes mesmo da formação de cristais de gelo ou até pela simples dessecação do citoplasma causada pelo resfriamento (TRIGIANO; GRAY, 2011), o que justifica os resultados positivos à temperatura de -40°C em comparação às demais testadas no presente trabalho.

Para a variável porcentagem de plântulas normais, os melhores resultados foram encontrados quando as sementes de café foram resfriadas a uma velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura final de -40°C (TABELA 6). Percebe-se que melhor vigor das sementes também foi observado quando estas foram submetidas a essas mesmas condições. Nessa situação, apesar da desidratação ocorrer de forma mais lenta, a temperatura mais alta não permite a formação de cristais de gelo no meio intracelular, beneficiando a manutenção da integridade celular. Apesar de não usarem um biocongelador para o resfriamento, Dussert; Engelmann (2006) verificaram que realizar um pré-resfriamento antes da imersão em nitrogênio líquido favorece o aumento da tolerância de sementes de café à criopreservação.

Para todas as variáveis analisadas, de maneira geral, a temperatura final de -50°C se mostrou menos eficiente, resultando em menor viabilidade e vigor das sementes de café, principalmente quando submetidas às velocidades de -3 e $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ (TABELA 6). Dussert et al. (1997) observaram que a velocidade de resfriamento de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura de -50°C proporcionou melhor viabilidade de sementes de café, porém, poucas se desenvolveram em plântulas normais.

Já para a temperatura final de -60°C , de maneira geral, o resultado foi contrário ao da temperatura de -50°C , sendo as velocidades de -3 e $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ as que proporcionaram melhores resultados para o teste de germinação (TABELA 6). Apesar de a dessecação ocorrer a uma temperatura mais baixa, o

fluxo mais rápido de água do espaço intracelular para o extracelular pode impedir a formação de cristais de gelo dentro da célula (PAMMENTER; BERJAK, 2014), resultando em menores danos e maior viabilidade das sementes.

O resultado do teste de tetrazólio (Tabelas 3, 4 e 5) também apresentou interação tripla dos fatores em estudos. Foi observada a sobrevivência de embriões em apenas quatro teores de água testados, sendo que nos teores de 30 e 40% a viabilidade foi nula e, conseqüentemente, pior que os demais tratamentos. Pukacki; Juszczak (2015) observaram danos significativos nos tecidos de eixos embrionários de duas espécies de *Acer* quando estes excederam 30% de teor de água e foram resfriados a -40°C ou criopreservados.

A sobrevivência de embriões excisados das sementes criopreservadas com diferentes teores de água, no sal de tetrazólio, demonstra a menor sensibilidade destes em relação às sementes inteiras, que apenas foram viáveis com teor de água de 20% (Tabelas 3, 4 e 5). Dussert; Engelmann (2006) e Coelho et al. (2015) também observaram maior viabilidade de embriões em relação às sementes em trabalhos de criopreservação e secagem com café, respectivamente.

Como realizado para sementes inteiras, outra análise estatística foi realizada apenas para os tratamentos que apresentaram sobrevivência de embriões, como pode ser verificado na Figura 2 (APÊNDICE A).

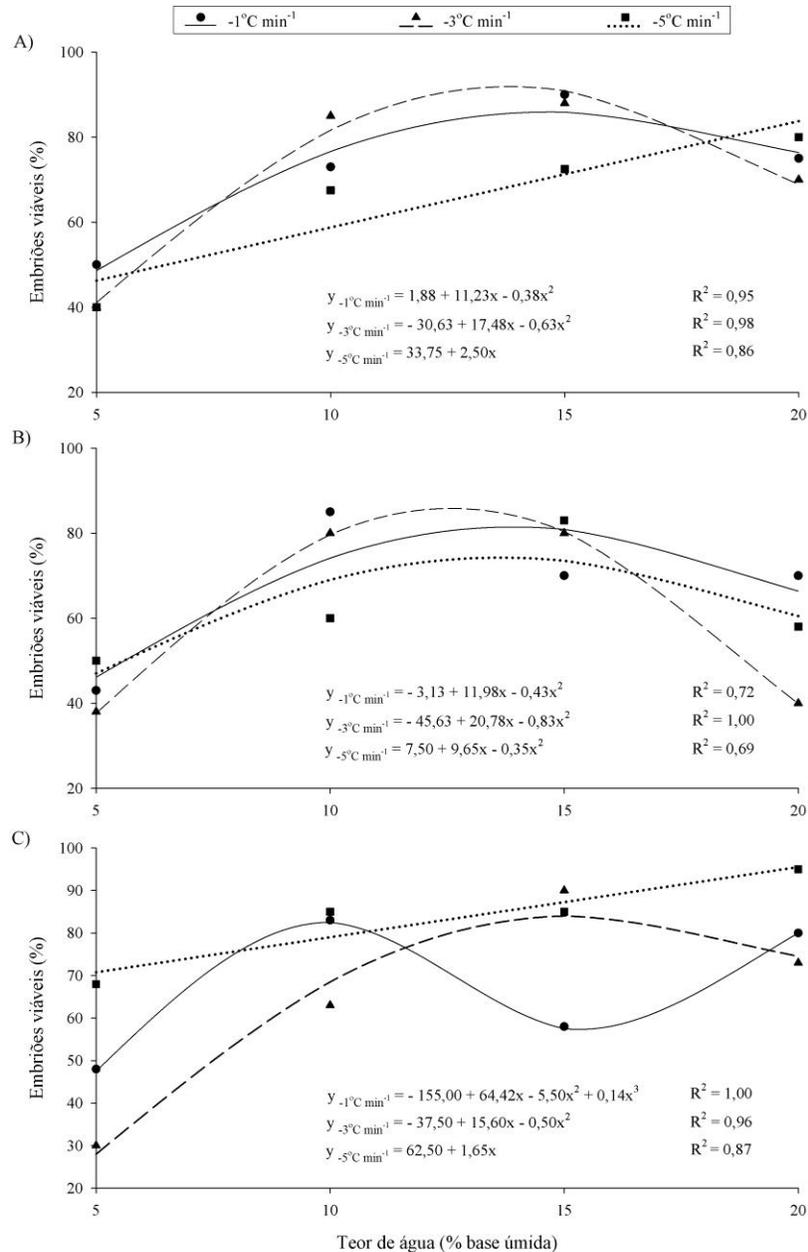


Figura 2 Porcentagem de embriões viáveis excisados de sementes de café criopreservadas, secadas em sílica gel a teores de água de 5, 10, 15 e 20% bu, resfriadas a velocidades de -1, -3 e -5°C min⁻¹ até temperaturas finais de -40°C (A), -50°C (B) e -60°C (C).

A porcentagem de embriões viáveis variou de acordo com o teor de água, velocidade e temperatura final de resfriamento as quais as sementes foram submetidas (FIGURA 2). Para a temperatura de -40°C (Figura 2A), a viabilidade estimada dos embriões foi máxima (91%) quando as sementes apresentaram, aproximadamente, 14% de teor de água e foram resfriadas a uma velocidade de $-3^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Ainda para esta temperatura, foi observado aumento linear da viabilidade dos embriões quando as sementes foram resfriadas a $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com valor máximo de 84% em sementes com teor de água de 20%. A maior viabilidade de embriões (84%) encontrada para a temperatura final de -50°C (Figura 2B) também foi observada quando as sementes foram resfriadas à velocidade de $-3^{\circ}\text{C min}^{-1}$, porém em teor de água mais baixo, em torno de 12,5% bu. Já para a temperatura de -60°C (Figura 2C) houve um aumento linear quando as sementes foram resfriadas a $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, com porcentagem máxima de 96% de embriões viáveis quando as sementes apresentavam teor de água de 20% bu. Sisunandar et al. (2010) observaram que a dessecação aumenta a viabilidade de embriões zigóticos de coco criopreservados.

Observa-se então que, independentemente do teor de água presente, nas temperaturas de -40°C e -50°C , resfriar as sementes a uma velocidade maior ($-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$) é prejudicial à viabilidade dos embriões e que esse resultado é inverso quando a temperatura final é menor, ou seja, alta viabilidade de embriões é observada em sementes resfriadas a uma velocidade mais rápida (-3 ou $-5^{\circ}\text{C min}^{-1}$) até temperatura final mais baixa (-60°C).

De maneira geral, boas porcentagens de viabilidade dos embriões foram obtidas em intervalo de teor de água entre 10% e 20% bu. Pukacki; Juszczuk (2015) observaram alta viabilidade, após a criopreservação, de eixos

embrionários de sementes recalcitrantes de *Acer pseudoplatanus* dessecados a teores de água entre 15-20%.

4 CONCLUSÕES

O teor de água de 20% (bu) permite maior sobrevivência das sementes de *Coffea arabica* L. à criopreservação quando resfriadas a uma velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura final de -40°C .

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq, à Fapemig, à Embrapa e à UFLA pelo financiamento do estudo e pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

BENSON, E.E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Apopka, v. 27, n. 3, p. 141-219, July 2008.

BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: Approaches and problems. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 29-39, Jan. 2014.

_____. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 478, p. 1-9, Nov. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 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, jun. 2015.

DEKKERS, B. J. W. et al. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, Berlin, v. 241, n. 3, p. 563-577, Mar. 2015.

DULLOO, M. E. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, 2009.

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, May/June 2006.

DUSSERT, S. et al. Biologie de la conservation des semences de caféiers: aspects fondamentaux et conséquences pratiques: une revue. **Cahiers Agricultures**, Les Ulis, v. 21, n. 2-3, p. 106-114, 2012.

_____. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 269-276, 1997.

_____. Cryopreservation of seed of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 8, n. 1, p. 9-15, Feb. 1998.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, Sept. 1990.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FARRANT, J. M. et al. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 7, n. 2, p. 135-144, May 1997.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

GRAIVER, N.; CALIFANO, A.; ZARITZKY, N. Partial dehydration and cryopreservation of *Citrus* seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, n. 14, p. 2544–2550, Nov. 2011.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Umidificação de sementes de girassol após ultrassecagem em sílica gel e câmara de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 3, p.16-26, ago. 2009.

KULUS, D.; ZALEWSKA, M. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species – A review. **Scientia Horticulturae**, British Columbia, v. 168, p. 88–107, Mar. 2014.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MAZUR, P. Principles of cryobiology. In: FULLER, B. J.; LANE, N.; BENSON, E. E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap. 1, p. 3-65.

OLIVEIRA, A. B.; BOSCO, M. R. O. Biometria, determinação da curva de absorção de água em sementes e emergência inicial de plântulas de *Copernicia hospita* Marti. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 66-74, 2013.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Aspects of recalcitrant seed physiology. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Campinas, v. 12, p. 56-69, 2000. Edição Especial.

_____. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, Jan. 2014.

PRITCHARD, H. W. Cryopreservation of desiccation-tolerant seeds. In: DAY, J. G.; STACEY, G. N. (Eds.). **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New Jersey: Human Press Inc Totowa, 2007, p. 185-201.

PUKACKI, P. M.; JUSZCZYK, K. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two *Acer* species. **Trees**, Heidelberg, v. 29, n. 2, p. 385–396, Apr. 2015.

SISUNANDAR et al. Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 289-296, Dec. 2010.

TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. **Plant tissue culture, development and biotechnology**. London: CRC Press, 2011, 583 p.

UMARANI, R.; AADHAVAN, E. K.; FAISAL, M. M. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. **Current Science**, v. 108, n. 11, p. 2023-2034, June 2015.

VERTUCCI, C.W. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. **Journal Seed Technology**, Lansing, v.17, n.2, p.41-53, 1993.

VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J. & GALILI, G (ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. p.237-271.

WALTERS, C. et al. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008, p. 465-484.

ZHANG, N.; WEN, B.; J. I. M.; YAN, Q. Low-temperature storage and cryopreservation of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.) seeds. **CryoLetters**, Cambridge, v. 35, n. 5, p. 418-426, Sept./Oct. 2014.

ZUCARELI, C. et al. Potencial fisiológico de sementes de milho hidratadas pelo método do substrato de papel toalha. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 122-129, ago. 2008.

APÊNDICE A – Tabelas das análises de variância do artigo 1

Tabela 1 Resumo da análise de variância dos dados referentes a porcentagens de prostrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (NF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC) e embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de café com diferentes teores de água (% base úmida).

FV	GL	Quadrados Médios				
		PR	PN	NF	FC	EV
Umidade	6	2905,9048**	4275,2381**	1159,3690**	4424,1548**	589,2857**
Erro	21	34,2857	24,7619	19,1786	12,8333	108,3333
CV (%)	-	6,90	6,31	16,20	4,46	12,73

** e *: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 2 Resumo da análise de variância dos dados referentes a porcentagens de prostrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) de sementes de café criopreservadas a diferentes teores de água e submetidas a diferentes velocidades e temperaturas finais de resfriamento.

FV	GL	Quadrados Médios						
		PR	PN	PNF	FC	MSR	MSPA	EV
Umidade (U)	5	10756,8988**	6365,3333**	941,1951**	5652,5432**	342,9277**	9422,9770**	49331,8519**
Temperatura (T)	2	1154,4691**	1054,5185**	86,0247**	961,2840**	62,4835**	1708,1223**	601,8519**
Velocidade (V)	2	66,7654**	71,4074**	50,4691**	81,2840**	4,4585**	131,5751**	267,1296*
U x T	10	1324,7802**	1105,0074**	87,9210**	1021,7284**	65,3110**	1772,6036**	382,9630**
U x V	10	106,5877**	83,1407**	52,3654**	80,9284**	4,5204**	135,0880**	469,9074**
T x V	4	80,6914**	83,7037**	21,2840*	65,5802**	3,6287**	93,0955**	590,7407**
U x T x V	20	63,6247**	70,1926**	16,0691**	64,1580**	3,5664**	90,3537**	282,6852**
Erro	108	6,7160	7,0123	6,2222	6,8148	0,3919	11,6757	86,7284
CV (%)	-	29,99	41,09	101,02	43,33	42,36	44,17	20,61

** e *: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 3 Resumo da análise de variância dos dados referentes a porcentagens de prostrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR) e de massa seca da parte aérea (MSPA) de sementes de café criopreservadas com teor de água de 20% bu e submetidas a diferentes velocidades e temperaturas finais de resfriamento.

FV	GL	Quadrados Médios					
		PR	PN	PNF	FC	MSR	MSPA
Temperatura (T)	2	10329,2500**	8755,8611**	695,3611**	8070,5278**	518,6033**	14093,0008**
Velocidade (V)	2	774,2500**	647,1111**	407,8611**	632,5278**	35,9175**	1073,6158**
T x V	4	518,7500**	578,1111**	132,6944**	513,1944**	28,6208**	725,0592**
Erro	27	24,5185	25,3056	23,3240	25,7037	1,5046	45,2555
CV (%)	-	10,04	13,31	33,24	14,26	14,02	14,67

** e *: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

Tabela 4 Resumo da análise de variância dos dados referentes à porcentagem de embriões viáveis no sal de tetrazólio, excisados de sementes de café criopreservadas com teores de água de 5, 10, 15 e 20% bu, submetidas a diferentes velocidades e temperaturas finais de resfriamento.

FV	GL	Quadrados Médios
		Embriões
Umidade (U)	3	8718,5185**
Temperatura (T)	2	902,7778**
Velocidade (V)	2	400,6944*
U x T	6	537,9630**
U x V	6	738,6574**
T x V	4	886,1111**
U x T x V	12	372,6852**
Erro	108	130,0926
CV (%)	-	16,83

** e *: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ARTIGO 2

**Tratamento antioxidante com água catódica após secagem de sementes de
Coffea arabica L. visando à criopreservação**

(Artigo elaborado segundo norma NBR 6022 – ABNT 2003)

RESUMO

O processo de dessecação de sementes pode ocasionar a perda de viabilidade ou envelhecimento das mesmas devido à ocorrência de peroxidação de compostos na presença de oxigênio. Além de danos fisiológicos, a desidratação pode levar à redução de volume e danos mecânicos associados às células por meio de colapso de vacúolos. A reparação dos danos de membrana, causados pela peroxidação oxidativa depende da atuação de um sistema enzimático eficiente na remoção de radicais livres presentes nas células, neutralizando o oxigênio singlete e outros radicais livres, formados em condições de estresse. Assim objetivou-se avaliar as alterações fisiológicas, bioquímicas e ultraestruturais em sementes de café submetidas a diferentes métodos de secagem e a tratamento antioxidante. A secagem lenta foi realizada em soluções salinas saturadas e a secagem rápida em sílica gel. Como tratamento antioxidante foi utilizada a água catódica, abundante em hidrogênio atômico ativo e fração reduzida, resultante da eletrólise de uma solução de cloreto de cálcio e cloreto de magnésio. A secagem lenta até 17% bu causa redução do desempenho fisiológico em sementes de café, independentemente do método utilizado. A atividade das enzimas antioxidantes catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase aumenta durante a secagem das sementes, principalmente na secagem lenta. A imersão de sementes de café em água catódica contribui para a redução da atividade de enzimas antioxidantes, principalmente da peroxidase. A expressão da enzima isocitrato liase é menor em sementes de café secadas lentamente, as quais apresentam qualidade fisiológica inferior à secagem rápida. A secagem rápida ou lenta de sementes de café até 17% bu compromete a integridade ultraestrutural das células em relação à secagem rápida até 20% bu. O tratamento com água catódica após a secagem rápida (17%) contribui para a manutenção ou reestabelecimento da integridade das células, evitando a perda do conteúdo celular.

Palavras-chave: Sílica gel. Soluções salinas saturadas. Água antioxidante.

1 INTRODUÇÃO

Sementes de café (*Coffea arabica* L.) são parcialmente tolerantes à dessecação, sendo classificadas como intermediárias (DUSSERT et al., 1999; 2001; 2003; EIRA et al., 1999; ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990), o que pode dificultar a conservação destas por longos períodos. Desta forma, o tipo de secagem e o conteúdo final de água nas sementes são importantes fatores a serem considerados, pois interferem substancialmente na conservação da qualidade reduzindo o período de armazenamento. Nestes casos, uma técnica que vem sendo utilizadas para conservação das sementes por longo prazo é a criopreservação.

Para a criopreservação, as sementes devem ser submetidas à secagem antes de serem imersas em nitrogênio líquido, o que evita a formação de cristais de gelo que podem levar à morte celular (PAMMENTER; BERJAK, 2014). No entanto, o processo de dessecação de sementes pode ocasionar a perda de viabilidade ou envelhecimento das mesmas devido à ocorrência de peroxidação de compostos na presença de oxigênio (HENDRY, 1993; OLIVEIRA et al., 2012; PARK et al., 2011; CORBINEAU, 2012). Isso ocorre devido à formação de radicais livres, capazes de reagir com os lipídeos da membrana, ácidos nucléicos, proteínas, enzimas e outras macromoléculas resultando na diminuição da composição lipídica, redução da competência respiratória e aumento na produção de compostos voláteis como aldeídos. Esta reação altera as funções biológicas normais da célula ocasionando deterioração e pode resultar em desintegração da membrana seguida por morte celular (LEPRINCE; BUITINK; HOEKSTRA, 1999).

Durante a secagem artificial, a velocidade com que a água é retirada do interior da semente pode influenciar no tipo de dano causado e grau de

tolerância à dessecação, principalmente para sementes consideradas intermediárias (CADDAH; ANDRADE; MEDEIROS, 2005; ROSA et al., 2005; CARVALHO, 2006; JOSÉ et al., 2011). Geralmente, sementes sensíveis à dessecação podem sobreviver a menores teores de água se submetidas a uma secagem mais rápida, evitando que os danos se acumulem durante o processo. No entanto, independentemente da velocidade de secagem, há um limite a partir do qual todas as sementes perdem a viabilidade (DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

Coelho et al., (2015) observaram que, com a secagem rápida as sementes de café toleraram dessecação a menores teores de água, ou seja limites inferiores do que quando se utilizou secagem lenta. Por outro lado, a secagem lenta foi mais eficiente quando as sementes foram secadas até teores mais elevados de água.

Segundo Farrant et al. (1997), a sensibilidade à dessecação é diretamente proporcional ao grau de vacuolização. Além dos danos fisiológicos, a desidratação reduz o volume celular, pode levar à ruptura de vacuolos e causar danos ao citoesqueleto e às membranas celulares, resultando em perda de viabilidade das sementes (ILJIN, 1957; UMARANI; AADHAVAN; FAISAL, 2015).

A reparação dos danos de membrana, causados pela peroxidação oxidativa depende da atuação de um sistema enzimático eficiente composto principalmente pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (PO). Estas atuam na remoção de radicais livres presentes nas células, neutralizando o oxigênio singlete e outros radicais livres, formados em condições de estresse (BERJAK, 2006, DUSSERT; ENGELMANN, 2006), como as que ocorrem durante a secagem.

Uma técnica que vem sendo estudada para minimizar os efeitos da condição de estresse é a proteção catódica, visando reduzir o ataque de radicais livres sobre macromoléculas biológicas, presumivelmente, porque funciona como uma fonte de elétrons, os quais reagem com estes radicais livres (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011). Estes autores tem demonstrado que a utilização da água catódica proporciona melhoria nos danos oxidativos relacionados aos procedimentos de criopreservação de eixos de espécies recalcitrantes.

A compreensão dos mecanismos biológicos envolvidos durante a dessecação de sementes é de grande importância para a busca de metodologias que possibilitem a desidratação de sementes de café, com redução dos danos acumulados. Assim o objetivo foi avaliar as alterações fisiológicas, bioquímicas e ultraestruturais em sementes de café, após diferentes métodos de secagem e imersão em água catódica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das sementes

Sementes da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí amarelo IAC 62, de frutos colhidos em lavouras da Fazenda Experimental de Varginha - Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira) foram processadas na Universidade Federal de Lavras.

Os frutos foram despulpados mecanicamente e as sementes desmuciladas via úmida, por meio de fermentação em água, por período de 24 horas em temperatura ambiente. Posteriormente, foram secadas superficialmente à sombra e levadas ao Laboratório Central de Sementes (LAS) para determinação do teor de água e avaliação da qualidade fisiológica inicial, por meio dos testes de germinação e teste de tetrazólio (tratamento adicional).

Secagem das sementes

Após avaliação inicial, as sementes foram submetidas a quatro metodologias de secagem, duas definidas de acordo com os resultados de testes preliminares e também, com métodos testados em outros trabalhos de pesquisa, cujas técnicas de secagem foram satisfatórias para a criopreservação de sementes de café (DUSSERT et al., 1997; 1998; EIRA et al., 2005).

Os métodos de secagem utilizados em amostras de sementes de café encontram-se sumarizados a seguir:

Tabela 1 Métodos de secagem de sementes de *Coffea arabica* L..

Método	Produto utilizado para Secagem	Teor de água final das sementes	Umidade Relativa	Atividade de Secagem
1	Sílica gel	20% bu	-	Rápida
2	Sílica gel	17% bu	-	Rápida
3	Solução saturada de (NH ₄) ₂ SO ₄	17% bu	81%	Lenta
4	Solução saturada de NaCl	17% bu	75%	Lenta

As secagens rápidas utilizando a sílica até teores de água de 20 e 17% bu foram realizadas colocando-se 720 sementes, com o teor de água inicial determinado (38,7% bu), em recipientes herméticos juntamente com 60 gramas de sílica gel ativada, que foram colocados em câmaras B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*) reguladas à 25°C, na ausência de luz. As secagens lentas através dos métodos 3 e 4 (TABELA 1) foram realizadas da mesma maneira da secagem rápida, porém, os recipientes herméticos continham 65g de (NH₄)₂SO₄ ou de NaCl com 15 mL de água destilada para formar uma solução saturada de sal. Em todos os métodos teve-se o cuidado de não permitir o contato das sementes com o agente secante. A perda de água durante a secagem foi monitorada até as amostras atingirem os teores de água de 17% bu (TABELA 1).

Tratamento antioxidativo

Após terem sido submetidas aos tratamentos de secagem, as sementes de café de uma parte das amostras tiveram seus pergaminhos retirados, manualmente, e foram avaliadas quanto à qualidade fisiológica, bioquímica e ultraestrutural. As sementes da outra parte foram imersas em água catódica durante 60 minutos, com o intuito de prevenir danos oxidativos, segundo

metodologia descrita por Berjak; Sershen; Pammenter (2011), com modificações: 1L de solução contendo como eletrólitos 0,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi dividido e acondicionado em uma cuba horizontal, própria para corrida eletroforética. O circuito foi completado utilizando-se uma ponte salina à base de ágar contendo cloreto de potássio e a solução foi eletrolisada aplicando-se uma diferença de potencial de 60V. A eletrólise foi realizada durante uma hora, em temperatura ambiente, produzindo 500 mL de água anódica (oxidada) com pH próximo a 3-4, e 500 mL de água catódica (reduzida) com pH próximo a 11-12, a qual foi utilizada no experimento. Em seguida, as sementes foram secadas, superficialmente, em papel toalha e seus pergaminhos retirados, manualmente, para posteriores avaliações fisiológicas, bioquímicas e ultraestruturais.

Determinação do teor de água das sementes

Realizado pelo método de estufa a 105°C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso seco das sementes.

Análises fisiológicas

- Teste de germinação:

Realizado com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, semeadas em papel toalha tipo "germitest" umedecidos com água destilada na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Os rolos de germinação foram acondicionados em germinador, regulado a 30°C, na presença de luz (BRASIL, 2009). Foram determinadas as porcentagens de protrusão radicular aos 15 dias e plântulas normais aos 30 dias após a semeadura, sendo computadas como plântulas normais as sementes que apresentaram raiz principal e pelo

menos duas raízes laterais. No teste de germinação determinou-se também: porcentagem de plântulas normais fortes e fracas, sendo computadas como fortes aquelas que apresentaram alça hipocotiledonar com três centímetros ou mais, e fracas as que se encontraram abaixo deste padrão; e porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias após a semeadura.

- Massa seca de plântulas:

Ao final do teste de germinação, nas plântulas normais, a parte aérea foi separada da raiz com auxílio de um bisturi, colocadas em sacos de papel e submetidas à secagem em estufa de circulação forçada de ar à 60°C por 4 a 5 dias ou até massa constante. A massa seca foi determinada em balança de precisão.

- Teste de tetrazólio:

Realizado com quatro repetições de 10 sementes. As sementes foram embebidas em água por 36 horas para a extração dos embriões. Os embriões extraídos, mantidos em solução antioxidante de polivinilpirrolidona (PVP) foram lavados em água corrente, imersos em solução de tetrazólio 0,5% utilizando-se frascos escuros e acondicionados em temperatura de 30°C por 3 horas (BRASIL, 2009; CLEMENTE et al., 2011).

A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para melhor visualização das estruturas internas e externas dos mesmos. Para isso, realizou-se um corte longitudinal nos embriões, os quais foram classificados em viáveis e inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (BRASIL, 2009).

- Teste de condutividade elétrica:

Foi conduzido no sistema de massa com quatro repetições de 25 sementes, segundo metodologia de Krzyzanowsky et al., 1991, modificada. As sementes foram pesadas em balança de precisão e colocadas em copos plásticos

descartáveis com 37,5 mL de água destilada. Após 24 horas de embebição à temperatura de 25°C, a condutividade elétrica foi determinada com auxílio de um condutivímetro e os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$.

Análises bioquímicas:

- Eletroforese de isoenzimas:

Duas amostras de 25 sementes de cada tratamento, sem pergaminho, foram armazenadas em temperatura de -86°C , para as análises de isoenzimas por meio da técnica de eletroforese. As sementes foram trituradas em moinho a 22.500 RPM, na presença de PVP (polivinilpirrolidona) e armazenadas em temperatura de -86°C até o momento de seu uso. Para a extração foi utilizado o tampão adequado para cada enzima, na proporção de 320 μL por 100mg de pó das sementes. O material foi homogeneizado em vórtex e mantido em geladeira por uma hora, seguido de centrifugação a 14.000 RPM por 60 minutos, a 4°C . Foram aplicados 40 μL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética ocorreu em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador), efetuada a 150 V por 5 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), esterase (EST), peroxidase (PO), isocitrato liase (ICL), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR) (MITTLER; ZILINSKAS, 1993; LEE; LEE, 2000; ALFENAS et al., 2006).

- Eletroforese de proteínas resistentes ao calor:

Para análise eletroforética das proteínas resistentes ao calor foram pesados em microtubos 100mg de sementes moídas de cada tratamento. A extração das proteínas foi efetuada adicionando 1000 μL do tampão de extração (tris-HCl 50mM, pH=7,5; 500 mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) em 100mg do pó. Em seguida, os microtubos foram agitados em vórtex e

centrifugados a 14.000 RPM por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi incubado em banho-maria a 85°C, por 15 minutos e, novamente, centrifugado por 30 minutos a 14.000 RPM. Posteriormente, 70µL do o sobrenadante foram vertidos em microtubos, aos quais foram adicionados 40µL do tampão da amostra (5mL de glicerol, 2,5mL de solução tampão do gel concentrador, 2,5mg de azul de bromofenol e completado o volume para 25mL com água destilada). Em seguida, foram levados ao banho-maria em ebulição por 5 minutos. Em cada canaleta do gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador) foram aplicados 50µL de cada amostra. A corrida eletroforética foi realizada com tampão de corrida Tris-glicina + SDS pH 8,0 a 150 V por 4 horas. Os géis foram corados em *Coomassie Blue* (0,5g *Coomassie Blue* R-250; 250mL de etanol; 50mL de ácido acético glacial, completando o volume até 500mL com água destilada), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% e etanol 5%, conforme Alfenas; Brune (1998).

Análise ultraestrutural:

- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

Sementes armazenadas foram imersas em solução fixativa *Karnovsky* modificado (glutaraldeído 25%, formaldeído 10% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2), pH 7,2 e armazenadas em câmara fria a 10°C até o preparo para MEV. Para o preparo, os materiais (cortes das sementes) foram lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 min.), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora e subsequentemente desidratados em uma série ascendente de concentração de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 % por três vezes). A desidratação final foi realizada em um aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030). Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, cobertos com ouro em um aparelho de Sputter (BAL-TEC SCD 050) e

observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Imagens foram geradas e registradas digitalmente, com aumentos variáveis para cada amostra nas condições de trabalho de 20Kv e distância de trabalho entre 6 e 7,5mm.

Delineamento experimental

O delineado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4x2 (4: métodos de secagem – 1S, 2S, 3S, 4S e 2: com e sem imersão em água catódica – 1C, 2C, 3C, 4C) + 1 adicional (sementes recém colhidas – 1P), com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade, pelo *software R* (2013) e com o adicional.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do teor de água

Após os diferentes métodos de secagem, as sementes atingiram as umidades desejadas (TABELA 2). A sílica gel proporcionou secagem mais rápida das sementes, principalmente em relação à secagem na qual se utilizou solução saturada de sulfato de amônio (TABELA 2).

Houve ganho de umidade quando as sementes de café foram expostas à água catódica após a secagem, sendo este incremento variável entre os tratamentos (TABELA 2).

Tabela 2 Teor de água inicial (TI), taxa de secagem (TS), teor de água final após a secagem (TF-AS) e teor de água final das amostras tratadas com água catódica (TF-AAC), de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem.

Método de secagem	TI (% bu)	TS (% bu h ⁻¹)	TF-AS (% bu)	TF-AAC (% bu)
Sílica gel	38,7	0,40*	20,5	27,7
Sílica gel	38,7	0,48**	17,1	25,4
Solução saturada de (NH ₄) ₂ SO ₄	38,7	0,05	17,4	22,3
Solução saturada de NaCl	38,7	0,11	17,5	21,9

*Sílica gel trocada após 43h de secagem; **Sílica gel trocada após 40h de secagem.

Avaliações fisiológicas

Pela análise de variância dos resultados dos testes fisiológicos houve interação significativa entre os fatores estudados apenas para a variável porcentagem de embriões viáveis no teste de tetrazólio. Para as demais, não houve interação entre os fatores, mas efeito significativo do fator métodos de secagem sobre a qualidade das sementes (APÊNDICE A).

De modo geral, observou-se melhor desempenho fisiológico quando a secagem foi realizada em sílica gel até os teores de água de 20 e 17% bu. Coelho

et al. (2015), também relataram que sementes sensíveis à dessecação podem sobreviver a menores teores de água, se submetidas a uma secagem mais rápida. Neste caso, não há tempo suficiente para que os danos se acumulem durante o processo.

A utilização da água catódica não promoveu melhoria para a qualidade fisiológica das sementes de café após os tratamentos de secagem (TABELA 3). Possivelmente, não houve efeito do agente antioxidante, porque as sementes se mantiveram com alta qualidade, mesmo após a secagem.

Comparando o adicional (sementes recém-colhidas - 1P) com o fatorial (TABELA 3), observou-se redução do vigor das sementes após os tratamentos de secagem e água catódica, por meio das variáveis plântulas normais fortes, massa seca de raiz, porcentagem de embriões viáveis e condutividade elétrica. Para as demais variáveis, não houve diferenças significativas. O processo de secagem causa estresse hídrico e oxidativo, gerando espécies reativas de oxigênio (DUSSERT; ENGELMANN, 2006) o que pode afetar a viabilidade e vigor das sementes de café.

Tabela 3 Resultados médios de protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas normais fortes (PNF), folhas cotiledonares (FC), massa seca da raiz (MR), massa seca da parte aérea (MPA) e condutividade elétrica (CE) de sementes de café submetidas a diferentes métodos de secagem e utilização de água catódica.

Tratamento	PR (%)	PN (%)	PNF (%)	FC (%)	MR (cg)	MPA (cg)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$)
Secagem							
1S	98 A	94 A	38 A	94 A	25,1 B	113,1 A	14,95 A
2S	99 A	96 A	1 C	95 A	29,7 A	103,9 A	13,96 A
3S	96 A	84 B	20 B	83 B	12,9 D	92,9 B	15,84 A
4S	98 A	86 B	26 B	85 B	15,2 C	91,5 B	14,95 A
Água Catódica							
Sem	97 A	89 A	21 A	88 A	20,1 A	98,0 A	15,26 A
Com	98 A	91 A	22 A	90 A	21,3 A	102,7 A	14,48 A
Adicional	97 A	93 A	49 A	92 A	23,1 A	110,4 A	10,53 A
Fatorial	97 A	90 A	21 B	89 A	20,7 B	100,3 A	14,87 B
CV(%)	2,7	6,9	40,3	7,1	8,9	9,6	8,7

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

Com relação à condutividade elétrica, não foram observadas diferenças entre os métodos de secagem e o tratamento com água catódica, porém comparando o fatorial com o adicional, observou-se maiores valores de condutividade do fatorial, possivelmente por danos no sistema de membranas causado pela secagem. Dussert; Engelmann (2006) também observaram que a secagem induziu, significativamente, processos deteriorativos em sementes de café.

De forma geral, observou-se melhor qualidade fisiológica em sementes que foram submetidas à secagem rápida em sílica gel. Alguns autores tem associado a secagem rápida de sementes de café como melhor método para se alcançar níveis mais baixos de umidade da sementes sem a perda da viabilidade (DUSSERT; ENGELMANN, 2006; COELHO et al., 2015). Por outro lado, a secagem rápida apresenta maior potencial de dano ao endosperma do que aos embriões (COELHO et al., 2015), não sendo recomendada quando as sementes forem secadas a níveis intermediários e ou armazenadas por longos períodos (VIEIRA et al., 2007). Sementes de *Magnolia ovata*, uma espécie de comportamento intermediário, têm a germinação mais prejudicada pela secagem rápida do que pela secagem lenta, para um mesmo conteúdo de água (JOSÉ et al., 2011).

Pelo teste de tetrazólio (TABELA 4) foi possível observar que a porcentagem de embriões viáveis foi prejudicada pela secagem até 17%, independentemente do método de secagem, quando as sementes foram tratadas com água catódica. Por outro lado, apenas o tratamento 2S, no qual as sementes foram secadas em sílica gel até 17% bu e não foram imersas em água catódica, apresentou menor porcentagem de embriões viáveis. Porém, houve uma recuperação da viabilidade desses embriões quando imersos em água catódica. Por meio deste resultado, pode-se inferir que a água catódica atuou

positivamente quando as sementes sofreram maiores danos por estresse. Possivelmente, houve maior produção de radicais livres nessas sementes, o que propiciou a redução na qualidade, e que logo foi reestabelecida pela provável ação antioxidante da água catódica, sendo capaz de recuperar as propriedades fisiológicas do tecido danificado. Segundo Berjak; Sershen; Pammenter (2011), a água catódica apresenta um grande potencial para melhorar as respostas ao estresse relacionado aos procedimentos que podem deteriorar materiais vegetais.

Neste trabalho foi observado um comportamento diferente entre os resultados de viabilidade pelos testes de tetrazólio e de germinação das sementes. Apesar de o desempenho fisiológico ser afetado negativamente pela secagem lenta, os embriões se mostraram mais sensíveis à secagem rápida (teste de tetrazólio). Isto pode indicar sensibilidades diferentes à secagem das diferentes estruturas (endosperma e embrião). Essa diferença de sensibilidade à secagem pelo endosperma e embrião de sementes de café também foi observada por Coelho et al. (2015).

Tabela 4 Efeito da secagem e do uso da água catódica para porcentagem de embriões viáveis no sal de tetrazólio, excisados de sementes de café.

Secagem	Água catódica	
	Sem	Com
1S	88 Aa	95 Aa
2S	50 Bb	80 Ba
3S	93 Aa	85 Ba
4S	95 Aa	85 Ba
CV(%)	8,9	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste de *Skott-Knott*, ao nível de 5% de probabilidade.

Avaliações bioquímicas

As alterações bioquímicas foram avaliadas por meio da análise de padrões eletroforéticos de isoenzimas e proteína resistente ao calor (FIGURAS 1 e 2).

A enzima catalase (FIGURA 1A) apresentou maior atividade quando as sementes foram submetidas à secagem lenta, em relação à secagem rápida, independentemente do tratamento em água catódica. Essa enzima é oxirredutora e atua na remoção de radicais livres, durante estresses oxidativos (BERJAK, 2006), assim a maior atividade pode estar relacionada com maior intensidade de danos ocorridos durante a secagem das sementes. Estes resultados estão relacionados com o pior desempenho fisiológico das sementes submetidas à secagem lenta, como pode ser constatado pelos resultados de vigor (TABELA 4). As sementes frescas (1P) apresentaram baixa atividade da catalase, o que confirma que a secagem propicia o aumento de radicais livres no metabolismo para sinalização do estresse e preparo do maquinário de “defesa” das células ou por ocorrência de danos às sementes.

A ascorbato peroxidase, por sua vez, é uma enzima que pertence ao ciclo ascorbato glutationa, que ao degradar o H_2O_2 , catalisa a oxidação de duas moléculas de ascorbato, resultando em monodeidroascorbato (MDHA) e H_2O . Para que a APX se mantenha ativa é necessário a regeneração do MDHA, que é realizada pela enzima glutationa redutase (GR) (APEL; HIRT, 2004).

Pelo perfil de expressão da enzima APX (FIGURA 1B), observou-se maior intensidade das bandas quando as sementes foram submetidas à secagem lenta, em comparação com a secagem rápida. Além disso, para secagem rápida (sílica gel) a atividade desta enzima foi maior, quando as sementes foram secadas até 17% bu. Este resultado indica que a enzima ascorbato peroxidase é ativada em situações de estresse e pode servir como marcador enzimático de

estresse oxidativo. Esta enzima atua em conjunto com a enzima catalase, na remoção da H_2O_2 , para proteger as células da ação oxidativa dos peróxidos. No entanto, estas duas enzimas têm diferentes afinidades para H_2O_2 (MITTLER, 2002). Estudos recentes têm relacionando o aumento da atividade de APX sob condições de estresse em sementes de girassol (CARNEIRO et al., 2011) e sementes de feijão (DEUNER et al., 2011), assim como foi observado neste trabalho. Para a enzima glutathione redutase (FIGURA 1C) também foi observado maior expressão da enzima após a secagem, relacionada com maior estresse oxidativo nas sementes.

As peroxidases também desempenham um importante papel no mecanismo de limpeza de EROs e no afrouxamento da parede celular e reorganização (ROSSI; LIMA; HAKVOORT, 1997). Neste trabalho foi observado alterações dos perfis de peroxidase, com ativação e aumento da expressão da enzima com o processo de secagem, e em maior intensidade para os tratamentos secados até 17% bu (FIGURA 1 D). O método de secagem e o tratamento com água catódica também influenciou na expressão desta enzima. Houve maior expressão da enzima nos tratamentos secados em solução salina, e dentre os sais, a secagem utilizando sulfato de amônio parece ser mais estressante, com maior expressão da enzima peroxidase. Por outro lado, o tratamento com água catódica influenciou positivamente, com menor atividade da enzima, principalmente para o tratamento 4C (secagem em NaCl até 17%, com água catódica). Estes resultados podem indicar a ação da água catódica em reduzir peróxidos, levando a menor necessidade da enzima peroxidase, com o foi observado pela redução da atividade nos tratamentos em que se utilizou a água catódica.

A superóxido dismutase (SOD) é considerada a primeira enzima a atuar no sistema antioxidante, realizando a dismutação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$),

resultando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SINHA, 2006). Pela Figura 1E, observaram-se pequenas diferenças no perfil de expressão, com menor atividade da enzima SOD para os tratamentos 2C e 3C, podendo indicar uma possível redução de radicais livres, devido a ação da água catódica.

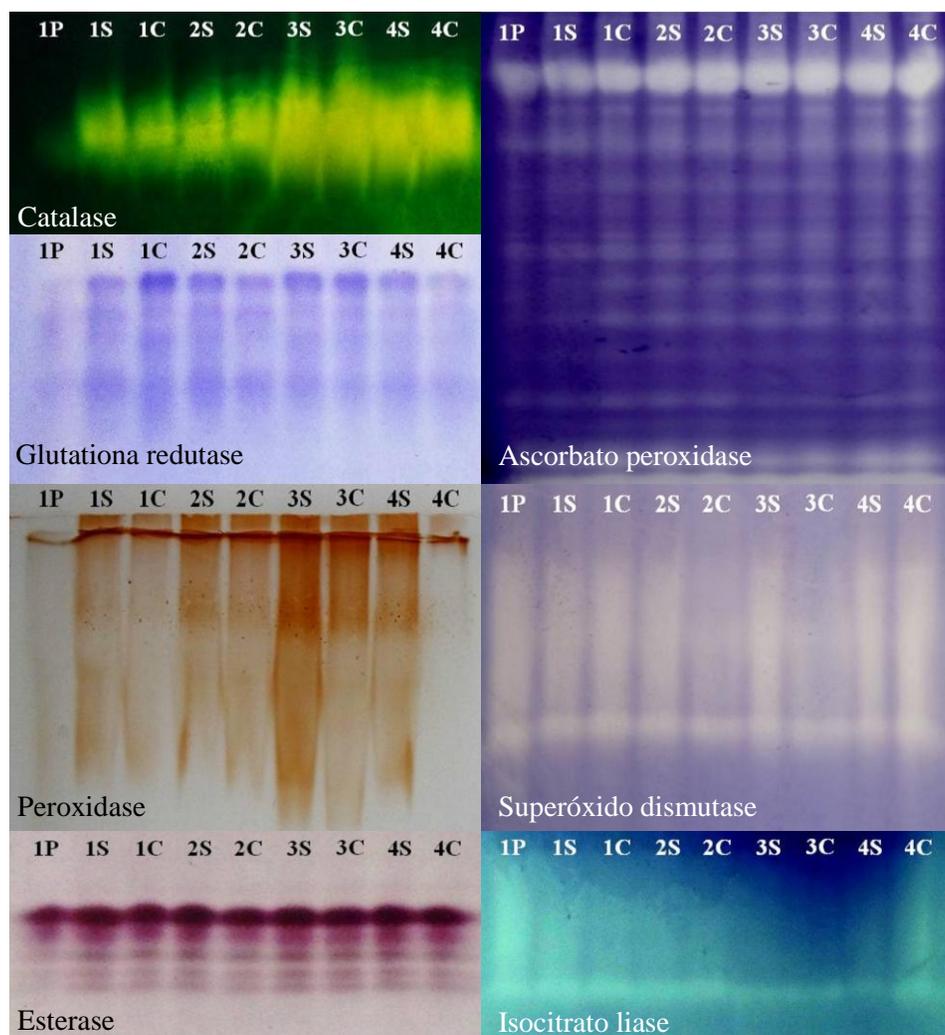


Figura 1 Padrão eletroforético de isoenzimas em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem. Métodos: 1) Secagem em sílica gel até 20% bu; 2) Secagem em sílica gel até 17% bu; 3) Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17% bu; 4) Secagem em solução saturada de NaCl até 17% bu. Avaliações realizadas sem (S) e com (C) água catódica. 1P) Sementes recém-colhidas, não submetidas à secagem.

A esterase (FIGURA 1F) atua na hidrólise de ésteres e no metabolismo de lipídeos e é indicativo de deterioração das sementes (COELHO et al., 2015; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005). Neste trabalho notou-se maior atividade dessa enzima em sementes secadas em soluções saturadas de sal (3S e 4S). Para os métodos, cujas sementes foram imersas em água catódica (1C, 2C, 3C e 4C), assim como para as sementes frescas (1P), percebe-se uma suave diminuição na atividade desta enzima, indicando que a água catódica pode ter beneficiado essas sementes, permitindo uma recuperação do estresse causado pela secagem.

Pelo perfil de expressão da enzima isocitrato liase (FIGURA 1G), observou-se maior atividade nas sementes do perfil (não secadas) ou submetidas à secagem rápida, quando comparadas com as sementes secadas em solução salina, independentemente do tratamento em água catódica. Para o tratamento 4C, em que as sementes foram secadas na solução de cloreto de sódio e embebidas em água catódica, também foi observada alta expressão da ICL. A enzima isocitrato liase está relacionada com o metabolismo de germinação, atuando no ciclo do glioxilato e envolvidas no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes oleaginosas, e no desenvolvimento das atividades no glioxissomos (BEWLEY; BLACK, 1994). Estudos anteriores tem associado à atividade da enzima como indicador de germinação (IGAMBERDIEV; LEA, 2002), podendo também estar ligada à melhor qualidade fisiológica dessas sementes, como observado neste trabalho.

O método de secagem não interferiu na degradação de proteínas resistentes ao calor, sendo que para todos os tratamentos, o número de bandas se manteve uniforme (FIGURA 2). Estas proteínas, assim como as LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), são muito importantes, pois estão associadas a mecanismos de proteção contra danos causados pela remoção de água a partir de

tecidos de plantas (TUNNACLIFFE et al., 2010) e podem estar associadas com a qualidade fisiológica de sementes de café (SANTOS et al., 2014).

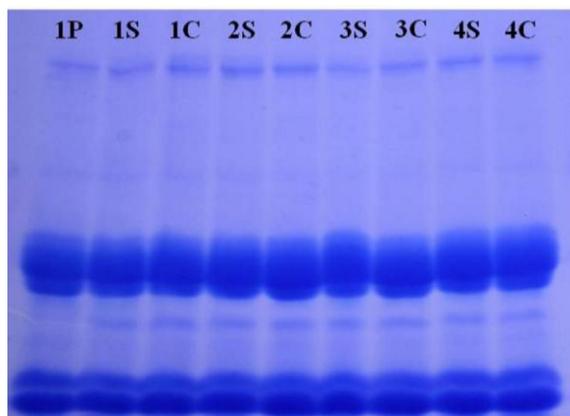


Figura 2 Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem. Métodos: 1) Secagem em sílica gel até 20% bu; 2) Secagem em sílica gel até 17% bu; 3) Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17% bu; 4) Secagem em solução saturada de NaCl até 17% bu. Avaliações realizadas sem (S) e com (C) água catódica. 1P) Sementes recém-colhidas, não submetidas à secagem.

Avaliações ultraestruturais

Para as análises de microscopia eletrônica de varredura, foram selecionados os tratamentos: sementes frescas (1P), sementes submetidas à secagem rápida (2S) e lenta (4S) até 17% bu, e sementes secadas em sílica gel (17%), tratadas com água catódica (2C).

Nas sementes com teor de água mais elevado (FIGURA 3A), notou-se que as células se apresentam mais túrgidas e por consequência, com maior volume. Não é possível visualizar a membrana plasmática, pois esta se encontra aderida à parede celular. Já para os demais tratamentos (FIGURA 3B, 3C e 3D) observou-se o descolamento da membrana plasmática, sendo possível a sua

identificação. Isto ocorre devido ao processo de dessecação com redução do volume das células, não sendo acompanhado na mesma proporção pela parede celular. Segundo Saath et al. (2010) o processo de secagem causa significativos danos na membrana plasmática. Isto foi observado em grãos de café secados à temperatura de 60°C, resultando em redução da qualidade, pois provoca rupturas nas membranas celulares e consequente extravasamento de parte do protoplasma no interior das células e nos espaços intercelulares.

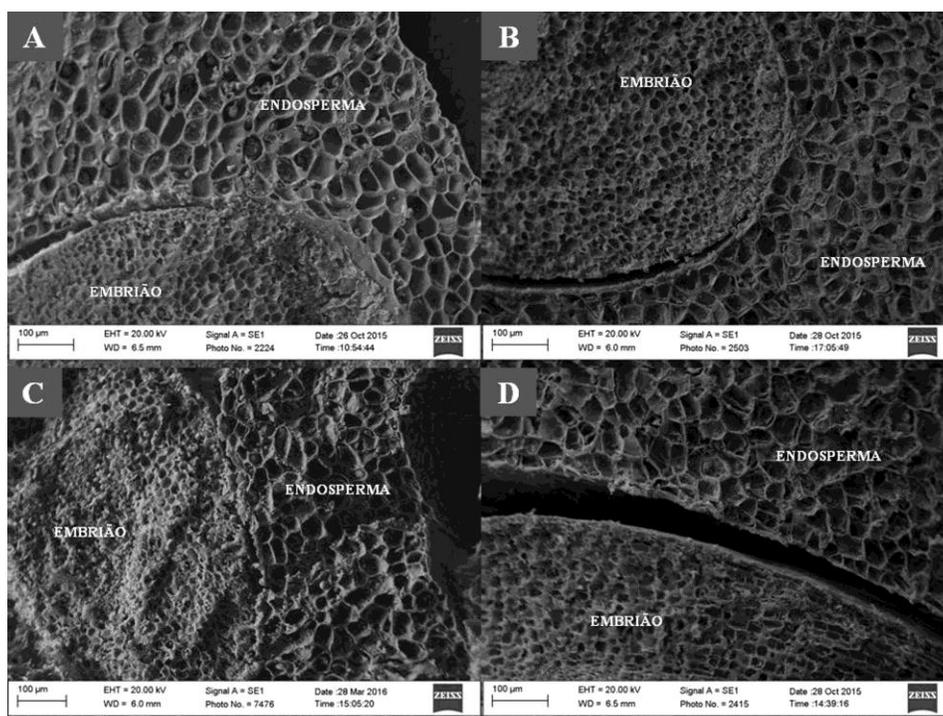


Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem. Métodos: Sementes recém-colhidas (A); 2) Secagem em sílica gel até 17% bu, sem (B) e com (C) tratamento com água catódica; 4) Secagem em solução saturada de NaCl até 17% bu, sem tratamento com água catódica. Detalhes das células do embrião e do endosperma das sementes.

A Figura 4A, correspondente à ilustração das células do endosperma de sementes de café não submetidas à secagem, mostra que o conteúdo celular se manteve em grande parte dentro das células, visto que estas não passaram por nenhum processo de estresse. Para as sementes com 17% bu secadas em sílica gel e que não foram imersas em água catódica (FIGURA 4B), houve o extravasamento de parte do protoplasma, substância viva da célula, bem como a formação de glóbulos de óleo. Já para as células das sementes que foram imersas em água catódica (FIGURA 4C) observou-se menor quantidade de espaços intercelulares e glóbulos de óleo. Os corpos oléicos são formados devido a lesões nas membranas, provocando o extravasamento do conteúdo celular que se concentra em forma globular (BORÉM et al., 2013). A maior presença de glóbulos de óleo pode indicar maior ruptura das membranas celulares.

As células das sementes com o mesmo teor de água (17% bu), porém secadas em solução salina saturada de NaCl (FIGURA 4D) apresentaram retração da parede celular, lesões na membrana celular e diminuição no conteúdo celular, o que propiciou extravasamento do citoplasma de algumas células. Marques (2006) e Saath et al. (2010) observaram maior desestruturação das estruturas celulares de cafés naturais, os quais foram expostos por um tempo maior até atingir o ponto de secagem, do que para grãos de cafés despolidos, nos quais o processo de secagem foi mais rápido. Borém et al. (2013) em estudos com diferentes temperaturas de secagem para grãos de café, também observaram contração do conteúdo interno das células, extravasamentos celulares e rupturas da membrana plasmática e da parede celular quando se utilizou temperaturas mais altas durante a secagem.

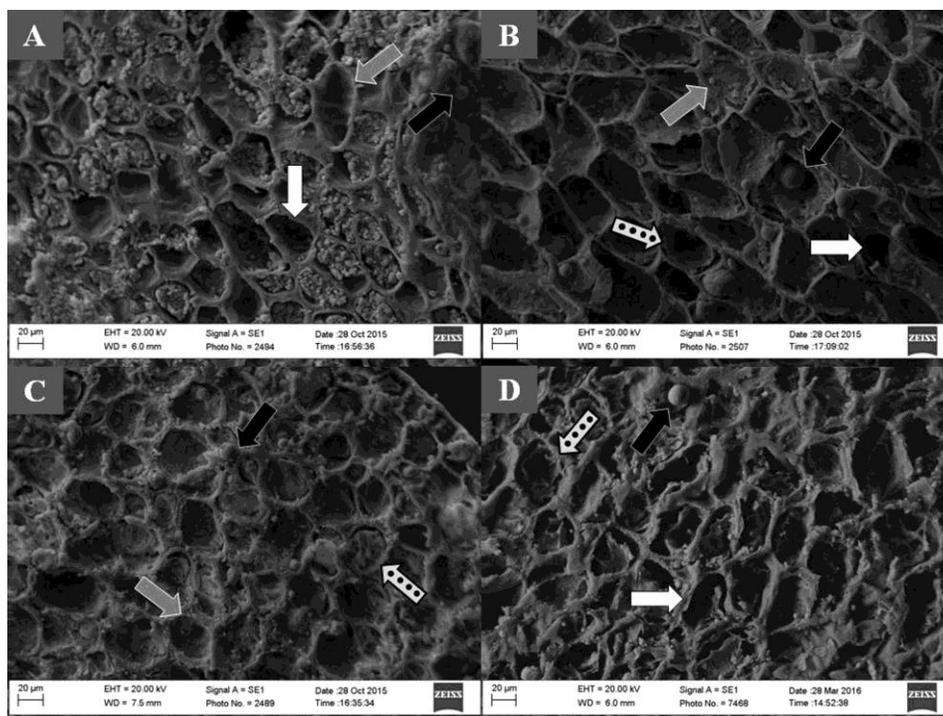


Figura 4 Microscopia eletrônica de varredura em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem. Métodos: Sementes recém-colhidas (A); 2) Secagem em sílica gel até 17% bu, sem (B) e com (C) tratamento com água catódica; 4) Secagem em solução saturada de NaCl até 17% bu, sem tratamento com água catódica. Detalhes de células contraídas (setas com círculos), gotas de óleo (setas pretas), espaços celulares vazios (setas brancas) e células intactas (setas cinzas).

As eletromicrografias da Figura 5 mostram a estrutura das células do embrião dos mesmos procedimentos citados na Figura 4. Pequenas diferenças foram observadas entre os tratamentos. Apesar do teste de tetrazólio ter mostrado um resultado benéfico da água catódica para a recuperação dos danos dos embriões do tratamento 2S, não foi possível diferenciar essa melhoria, visualmente, por meio dessas eletromicrografias.

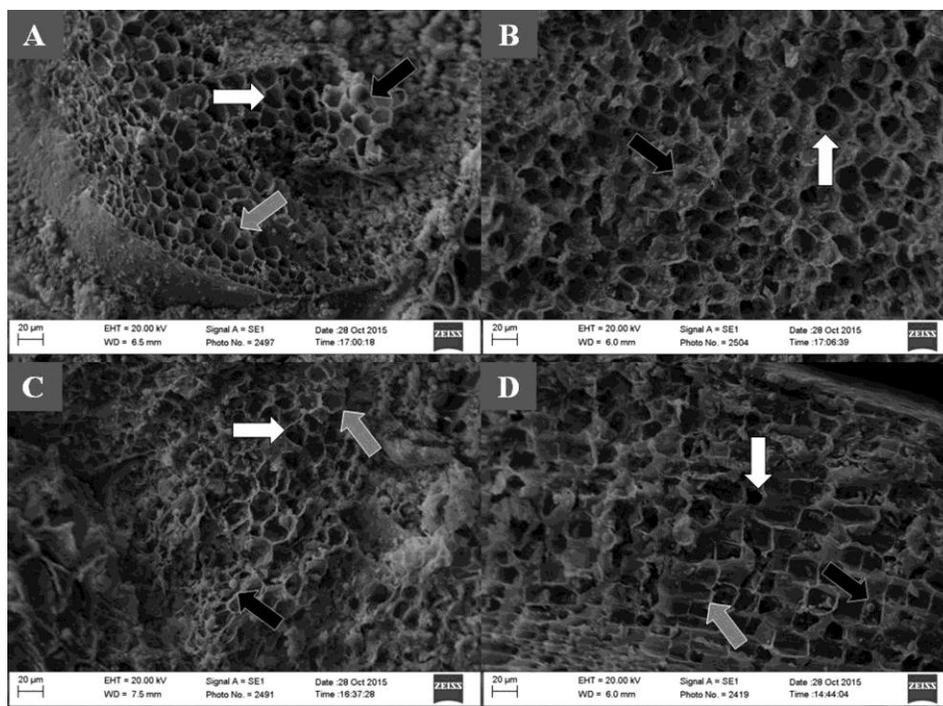


Figura 5 Microscopia eletrônica de varredura em embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem. Métodos: Sementes recém-colhidas (A); 2) Secagem em sílica gel até 17% bu, sem (B) e com (C) tratamento com água catódica; 4) Secagem em solução saturada de NaCl até 17% bu, sem tratamento com água catódica. Detalhes de gotas de óleo (setas pretas), espaços celulares vazios (setas brancas) e células intactas (setas cinzas).

4 CONCLUSÕES

A secagem lenta até 17% bu, causa redução do desempenho fisiológico em sementes de café, independentemente do método utilizado.

A atividade das enzimas antioxidantes catalase, peroxidase e ascorbato peroxidase aumenta durante a secagem das sementes de café, principalmente na secagem lenta.

A imersão de sementes de café em água catódica contribui para a redução da atividade de enzimas antioxidantes, principalmente da peroxidase.

A expressão da enzima isocitrato liase é menor em sementes de café secadas lentamente, as quais apresentam qualidade fisiológica inferior à secagem rápida.

A secagem rápida ou lenta de sementes de café até 17% bu compromete a integridade das membranas celulares, ocorrendo extravasamento do citoplasma e aumento de corpos oléicos em relação à secagem rápida até 20% bu.

O tratamento com água catódica após a secagem rápida (17%) contribui para a manutenção ou reestabelecimento da integridade das células, evitando a perda do conteúdo celular.

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq, à Fapemig, à Embrapa e à UFLA pelo financiamento do estudo e pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

- 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 Microrganismos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1998, p. 201-328.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 627 p.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 55, p. 373-399, 2004.
- BERJAK, P.; SERSHEN, B. V.; PAMMENTER, N. W. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 21, n. 3, p. 187-203, Sept. 2011.
- 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, Mar. 2006.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994, 445 p.
- BORÉM, F. M. et al. Microscopia eletrônica de varredura de grãos de café submetidos a diferentes formas de processamento e secagem. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 227-237, abr./jun. 2013.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- CADDAH, M. K.; ANDRADE, B. O.; MEDEIROS, A. C. S. Efeitos da desidratação e do armazenamento em sementes de *Magnolia ovata* St. Hil. Magnoliaceae. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 15, n. 1-3, p. 285, 2005.
- CARNEIRO, M. M. L. C. et al. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 752-761, maio 2011.

CARVALHO, L. R. de. **Conservação de sementes de espécies dos gêneros *Nectandra*, *Ocotea* e *Persea* (Lauraceae)**. 2006. 75 p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 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, jun. 2015.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 22, p. 61-68. Feb. 2012. Supplement.

DEUNER, C. et al. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 713-722, maio 2011.

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, May/June 2006.

DUSSERT, S. et al. Basis of coffee seed sensitivity to liquid nitrogen exposure: oxidative stress or imbibitional damage? **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 119, n. 4, p. 534-543, Dec. 2003.

_____. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **Cryo Letters**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 269-276, 1997.

_____. Cryopreservation of seed of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 8, n. 1, p. 9-15, Feb. 1998.

_____. Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 135-144, Feb. 1999.

_____. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 112, n. 4, p. 495-504, Aug. 2001.

EIRA, M. T. S. et al. **Banco de sementes de café em criopreservação: experiência inédita do Brasil**, Circular Técnica 42, Brasília, DF, 6 p, 2005.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, Sept. 1990.

FARRANT, J. M. et al. Subcellular organization and metabolic activity during the development of seeds that attain different levels of desiccation tolerance. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 7, n. 2, p. 135-144, May 1997.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, London, v. 60, n. 7, p. 651-674, Aug. 2002.

ILJIN, W. S. Drought resistance in plants and physiological processes. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 8, p. 257-274, June 1957.

JOSÉ, A. C. et al. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 2, p. 425-434, July 2011.

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, mar. 1991.

LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Shannon, v. 159, n. 1, p. 75-85, Oct. 2000.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 50, n. 338, p. 1515-1524, Sept. 1999.

MARQUES, E. R. **Alterações químicas, sensoriais e microscópicas do café cereja descascado em função da taxa de remoção de água**. 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, Cambridge, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 212, n. 2, p. 540-546, Aug. 1993.

OLIVEIRA A. B. et al. Seed priming effects on growth, lipid peroxidation, and activity of ROS scavenging enzymes in NaCl-stressed sorghum seedlings from aged seeds. **Journal of Plant Interactions**, Turim, v. 7, n. 2, p. 151-159, June 2012.

PAMMENTER, N. W; BERJAK, P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, Jan. 2014.

PARK, J. J. et al. OsPUB15, an E3 ubiquitin ligase, functions to reduce cellular oxidative stress during seedling establishment. **The Plant Journal**, Oxford, v. 65, n. 2, p. 194-205, Jan. 2011.

ROSA, S. D. V. F. et al. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 199-205, Apr./June 2005.

ROSSI, C.; LIMA, G. P. P.; HAKVOORT, D. M. R. Atividade de peroxidases (EC 1.11.1.7) e teor de prolina no embrião e cotilédones de feijoeiro *Phaseolus vulgaris* L. cultivado em condições de salinidade. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 123-127, set./dez. 1997.

SAATH, R. et al. Microscopia eletrônica de varredura do endosperma de café (*Coffea arabica* L.) durante o processo de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 196-203, jan./fev. 2010.

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, jun. 2005.

SANTOS, F. C. et al. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2014.

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.

UMARANI, R.; AADHAVAN, E. K.; FAISAL, M. M. Understanding poor storage potential of recalcitrant seeds. **Current Science**, Bangalore, v. 108, n. 11, p. 2023-2034, June 2015.

VIEIRA, A. R. et al. Armazenamento de sementes de cafeeiro: ambientes e métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 76-82, abr. 2007.

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do artigo 2

Tabela 1 Resumo da análise de variância dos dados referentes a porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) e condutividade elétrica (CE) de sementes de café submetidas a diferentes métodos de secagem e utilização de água catódica.

FV	GL	Quadrados Médios							
		PR	PN	PNF	FC	MSR	MSPA	EV	CE
Secagem (S)	3	8.5000	277.3333**	1916.0000**	305.3333**	506.9733**	824.7311**	1258.3333**	4.7762*
Água catódica (AC)	1	12.5000	18.0000	8.0000	32.0000	10.5800	175.3128	200.0000	4.9691
S x AC	3	13.8333	34.0000	164.0000	62.6667	4.1467	86.2062	675.0000**	2.1675
Adicional vs Fatorial	1	0.5000	32.0000	2787.5556**	32.0000	20.4800*	361.5809	938.8889**	66.7494**
Erro	27	7.7037	39.8519	67.7037	38.5185	3.3719	89.2792	50.0000	1.5366
CV (%)	-	2,68	6,94	40,31	7,05	8,92	9,64	8,96	8,74

** e *: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ARTIGO 3

Avaliação de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas ao resfriamento controlado visando à criopreservação

(Artigo elaborado segundo norma NBR 6022 – ABNT 2003)

RESUMO

Sementes de *Coffea arabica* L. toleram relativa dessecação e são sensíveis ao armazenamento sob baixa temperatura, o que impossibilita assegurar a viabilidade do germoplasma por longos períodos. Além da conservação em bancos vivos de germoplasma, a criopreservação é uma alternativa para manter essa espécie que tem este comportamento. No entanto, sendo o resfriamento uma das etapas de preparação para a criopreservação, é necessário garantir a qualidade das sementes antes de armazená-la em nitrogênio líquido. Este estudo foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito de diferentes procedimentos de resfriamento e da água catódica, uma solução com grande potencial antioxidante, sobre a qualidade fisiológica, bioquímica e ultraestrutural de sementes de café após estas serem submetidas a uma desidratação controlada. De acordo com os resultados das avaliações após a aplicação dos tratamentos, de maneira geral, melhores resultados fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais são encontrados em sementes com teor de água mais baixo (17% bu), independentemente dos métodos de secagem e de resfriamento utilizados. A ação antioxidante da água catódica é eficiente nas sementes com maior teor de água (20% bu), porém não produz efeito nas demais sementes, demonstrando sua maior eficácia em sementes danificadas pelo resfriamento. Os resultados das avaliações bioquímicas e ultraestruturais confirmam os efeitos danosos do resfriamento no desempenho fisiológico das sementes. Em sementes mais secas, a imersão em água catódica ativa o sistema enzimático antioxidante e melhora o aspecto ultraestrutural das células do endosperma e do embrião de sementes de café, demonstrando a ação antioxidante dessa solução. O endosperma de sementes de café tem maior sensibilidade ao resfriamento que o embrião, evidenciado pela análise ultraestrutural.

Palavras-chave: Biocongelador. Curvas de resfriamento. Solução antioxidante.

1 INTRODUÇÃO

Muitos estudos realizados atualmente comprovam a afirmativa de Ellis; Hong; Robert, (1990) de que sementes intermediárias são parcialmente tolerantes à dessecação e sensíveis a baixas temperaturas (ABREU et al. 2014; BERJAK; PAMMENTER, 2014; COELHO et al., 2015; MICHALAK; PLITTA-MICHALAK; CHMIELARZ, 2015). As sementes da espécie *Coffea arabica* L. também apresentam este comportamento (DUSSERT et al., 2001) e, portanto, apresentam limitações que impedem o seu armazenamento a longo prazo em bancos convencionais de sementes, geralmente mantidos a temperaturas próximas a -18°C.

A criopreservação é uma alternativa viável para a conservação de sementes desta categoria e envolve várias etapas preparatórias à imersão em nitrogênio líquido. Para manter a viabilidade de sementes nas etapas antecedentes ao armazenamento, em especial as recalcitrantes e intermediárias como as de café, é fundamental garantir a qualidade antes de conservá-las e primordial para o sucesso da preservação.

Para algumas espécies, o resfriamento controlado pode ser requerido antes da criopreservação, para redução de danos causados às células (BERJAK; PAMMENTER, 2014). Como a água é o principal reservatório de calor em células hidratadas (BACHMANN; MEYER 1987), realizar uma desidratação parcial da amostra antes de resfriá-la pode proporcionar redução na sua capacidade de reter calor e, conseqüentemente, aumentar a taxa de resfriamento. Segundo Pammenter; Berjak (2014) é possível maximizar a taxa de resfriamento, controlando, por exemplo, o tamanho da amostra e a sua área de contato com o ambiente de resfriamento.

O resfriamento rápido a temperaturas inferiores à temperatura de transição vítrea (T_g) permite a vitrificação da amostra (PAMMENTER; BERJAK, 2014). Já o resfriamento lento das amostras até uma temperatura sub-zero pré-definida, favorece a desidratação e evita os danos por formação de gelo intracelular, pois ao diminuir a temperatura a um ritmo relativamente lento ($0,5-2^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$) a água é removida do interior da célula e os cristais de gelo se formam no meio extracelular (ENGELMANN, 2011). Porém, segundo Trigiano; Gray (2010), o frio pode ocasionar danos celulares em algumas espécies vegetais mesmo antes da formação de cristais de gelo e o fluxo de água do espaço intracelular para o extracelular, por meio da desidratação do citoplasma causada pelo resfriamento, pode ser suficiente para ocasionar dano letal às células.

O estresse causado às células sob condições de frio ou congelamento pode causar desequilíbrio iônico, redução da energia disponível para os processos metabólicos, produção e acúmulo de radicais livres, alterações na permeabilidade da membrana celular, desnaturação de proteínas e induzir à morte celular por apoptose (BAUST; GAO; BAUST, 2009; BAUST, 2007).

A geração de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e anion superóxido (O_2^-) (ASADA, 2006), podem ser reduzidos por meio do aumento de antioxidantes endógenos ou exógenos (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011). Enzimas antioxidantes, que incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona redutase (GR), ascorbato peroxidase (APX), peroxidase (PO), dentre outras, são detectadas em células vegetais (KRANNER; BIRTIC, 2005) e são fundamentais para esse processo de remoção de radicais livres.

O uso de água catódica, uma solução com alto potencial redutor, também tem sido adotado para reduzir muitas espécies reativas de oxigênio que

são produzidas durante os procedimentos da criopreservação em vegetais (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011). Esta solução redutora possui um pH alto (9,0 - 10,0) e é abundante em hidrogênio dissolvido (HANAOKA et al., 2004). Além disso, tem a vantagem de ser gerada de maneira simples e não tóxica (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

Pesquisas com proteínas resistentes ao calor, tais como as LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), em sementes submetidas a diferentes estresses têm crescido nos últimos anos, principalmente por poderem expressar múltiplas isoformas em diversos organismos e por terem a capacidade de executar diversas funções, dentre elas a de proteção macromolecular (HAND et al., 2011).

Além disso, estudos ultraestruturais de sementes recalcitrantes e ortodoxas têm contribuído para a compreensão de diferentes respostas à desidratação e ao resfriamento, que podem levar à perda de viabilidade por causar danos às membranas das organelas celulares, ao citoesqueleto e ao núcleo esquelético (BERJAK; PAMMANTER, 2000).

Objetivou-se neste estudo avaliar o efeito que diferentes procedimentos de resfriamento podem exercer sobre a fisiologia, o perfil enzimático e a ultraestrutura de sementes de café antes da imersão em nitrogênio líquido, assim como o efeito antioxidante da água catódica sobre essas sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das sementes

A pesquisa foi conduzida no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, com a utilização de sementes da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, colhidas em lavouras da Fazenda Experimental de Varginha - Fundação Procafé (Programa Integrado de Apoio à Tecnologia Cafeeira).

Os frutos colhidos em estágio de maturidade fisiológica (cereja) foram despulpados mecanicamente, as sementes desmuciladas por fermentação em água por período de 24 horas a 25°C e secadas superficialmente à sombra. O teor de água inicial foi determinado e a qualidade fisiológica inicial foi avaliada por meio de testes de protrusão radicular das sementes, de germinação, de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, de massa seca de plântulas, e de condutividade elétrica das sementes. Também foi realizado o teste de viabilidade em sal de tetrazólio (BRASIL, 2009).

Procedimentos de secagem e de resfriamento

Após avaliação inicial, as sementes foram submetidas à secagem e diferentes métodos de resfriamento. As formas de secagem e de resfriamento foram definidas de acordo com testes preliminares e também com métodos testados em outros trabalhos de pesquisa, cujas técnicas foram satisfatórias para a criopreservação de sementes de café (DUSSERT et al., 1997; DUSSERT; ENGELMANN, 2006; EIRA et al., 2005).

Os procedimentos utilizados em amostras de sementes de café encontram-se na Tabela 1:

Tabela 1 Métodos de secagem, período de secagem (PS), teor de água nas sementes após secagem (TF) e métodos de resfriamento em sementes de *Coffea arabica* L.

Procedimento	Método de secagem	PS (horas)	TF (% bu)	Método de resfriamento
1	Sílica gel	45*	20,5	-1°C min. ⁻¹ até -40°C
2	Sílica gel	45**	17,1	-1°C min. ⁻¹ até -40°C
3	Solução saturada de (NH ₄) ₂ SO ₄ (81% UR)	403	17,4	-1°C min. ⁻¹ até -50°C
4	Solução saturada de NaCl (75% UR)	188	17,5	Sem resfriamento

*Sílica gel trocada após 43h de secagem; **Sílica gel trocada após 40h de secagem.

Após secagem, 360 sementes de cada tratamento foram acondicionadas em embalagens trifoliadas de papel alumínio ou em criotubos - apenas para o procedimento 3 - e colocadas em um biocongelador *Icecube*, modelo 14S-B, *software* SY-LAB - Minitub do Brasil, por meio do qual foram programadas diferentes curvas de resfriamento, variando-se a velocidade (-1°C min.⁻¹) e temperaturas finais (-40°C; -50°C). As curvas sempre foram programadas a partir de 25°C (temperatura ambiente). As sementes do procedimento 4 não foram submetidas ao resfriamento.

Tratamento com água catódica

Após realização dos procedimentos de resfriamento, as embalagens contendo as sementes foram retiradas do biocongelador, sendo parte destas tratadas e parte não tratada com água catódica, um tratamento antioxidante. As sementes não foram expostas ao nitrogênio líquido e ao reaquecimento, mas todas foram avaliadas quanto à qualidade fisiológica, bioquímica e ultraestrutural após terem sido submetidas aos seus devidos tratamentos.

Para a imersão em água catódica, as sementes foram imersas em 250mL da solução eletrolisada de Ca e Mg durante 60 minutos, na presença de luz e em temperatura ambiente. A água catódica foi produzida segundo metodologia descrita por Berjak; Sershen; Pammenter (2011), com modificações: 1L de solução contendo os eletrólitos, 0,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi dividido e acondicionado em uma cuba horizontal, própria para corrida eletroforética. O circuito foi completado utilizando-se uma ponte salina à base de ágar contendo cloreto de potássio e a solução foi eletrolisada aplicando-se uma diferença de potencial de 60V. A eletrólise foi realizada durante uma hora, em temperatura ambiente, produzindo 500mL de água anódica (oxidada) com pH próximo a 3-4, e 500mL de água catódica (reduzida) com pH próximo a 11-12, a qual foi utilizada no experimento.

Após a imersão em água catódica, as sementes foram secadas em papel toalha e os pergaminhos retirados, manualmente, para posteriores avaliações fisiológicas, bioquímicas e estruturais. As sementes que não foram imersas em água catódica, foram retiradas do biocongelador e de suas respectivas embalagens e tiveram seus pergaminhos retirados manualmente, sendo diretamente submetidas às avaliações supracitadas.

Determinação do teor de água das sementes

Realizada pelo método de estufa a 105°C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes.

Análises fisiológicas

- Teste de germinação:

Realizado com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, semeadas em rolos de papel toalha tipo "germitest" umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5x o peso do papel seco. As sementes foram semeadas e acondicionadas em germinador, regulado a 30° C, na presença de luz (BRASIL, 2009). Foram determinadas a porcentagem de protrusão radicular após 15 dias; plântulas normais com presença de raiz principal e pelo menos duas raízes laterais após 30 dias; plântulas normais fortes com alça hipocotiledonar de no mínimo 3cm e plântulas com folhas cotiledonares expandidas após 45 dias da semeadura.

Ao final do teste de germinação, a massa seca da raiz e da parte aérea das plântulas normais foram determinadas em balança de precisão após serem submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçada à 60°C por quatro dias ou até massa constante.

- Teste de tetrazólio:

Realizado com quatro repetições de 10 sementes para cada tratamento. As sementes foram embebidas em água por 36 horas para a extração dos embriões, os quais, posteriormente, foram imersos em solução de tetrazólio 0,5% utilizando-se frascos escuros, acondicionados sob temperatura de 30°C por três horas (BRASIL, 2009; CLEMENTE et al., 2011). A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica com aumento de 10x para melhor visualização das estruturas internas e externas e então foram classificados em viáveis ou inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (BRASIL, 2009).

- Teste de condutividade elétrica:

Conduzido no sistema de massa com quatro repetições de 25 sementes, segundo metodologia de Krzyzanowsky; França Neto; Henning (1991) com modificações. As sementes foram pesadas e colocadas em copos plásticos

descartáveis com 37,5mL de água destilada. Após 24 horas de embebição a temperatura de 25°C, a condutividade elétrica foi determinada com auxílio de um condutivímetro e os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Análises eletroforéticas

- Expressão de isoenzimas em géis de eletroforese:

Realizada com duas amostras de 50 sementes para cada tratamento. As sementes, sem pergaminho, foram trituradas em moinho a 22.500 RPM, na presença de PVP (polivinilpirrolidona) e posteriormente, as amostras armazenadas em temperatura de -86°C. Para a extração das enzimas foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 320 μL por 100mg de pó das sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido em geladeira por uma hora, seguido de centrifugação a 14.000 RPM por 60 minutos, a 4°C. A corrida eletroforética ocorreu em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 40 μL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 150 V por cinco horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), esterase (EST), peroxidase (PO), isocitrato liase (ICL), ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona redutase (GR) (MITTLER; ZILINSKAS, 1993; LEE; LEE, 2000; ALFENAS et al., 2006).

- Expressão de proteínas resistentes ao calor em gel de eletroforese:

Para análise eletroforética das proteínas resistentes ao calor foram pesados em microtubos 100mg de sementes moídas de cada tratamento. A extração das proteínas foi efetuada adicionando 1000 μL do tampão de extração (tris-HCl 50mM, pH=7,5; 500 mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) em 100mg do pó. Em seguida, os microtubos foram agitados em Vortex e

centrifugados a 14.000 RPM por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi incubado em banho-maria a 85°C, por 15 minutos e, novamente, centrifugado por 30 minutos a 14.000 RPM. Posteriormente, 70µL do o sobrenadante foi vertido em microtubos, ao qual foi adicionado 40 µL do tampão da amostra (5mL de glicerol, 2,5mL de solução tampão do gel concentrador, 2,5mg de azul de bromofenol e completado o volume para 25mL com água destilada). Em seguida, foram levados ao banho-maria em ebulição por cinco minutos. Em cada canaleta do gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12,5% (gel separador) e 6% (gel concentrador) foram aplicados 50µL de cada amostra. A corrida eletroforética foi realizada com tampão de corrida Tris-glicina + SDS pH 8,0 a 150 V por quatro horas. Os géis foram corados em *Coomassie Blue* durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% e etanol 5% até o aparecimento de bandas (ALFENAS; BRUNE, 1998).

Microscopia eletrônica de varredura

A análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada em cortes de sementes de café armazenados em solução fixativa *Karnovsky* modificado (glutaraldeído 25%, formaldeído 10% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2), pH 7,2, armazenados em geladeira a 4°C até o preparo para MEV. Para o preparo, os materiais (cortes do endosperma e embriões) foram lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 min.), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por uma hora e subsequentemente desidratados em uma série ascendente de concentração de acetona (30, 50, 70, 90 e 100 % por três vezes). A desidratação final foi realizada em um aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030). Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, cobertos com ouro em um aparelho de Sputter (BAL-TEC SCD 050) e observados em microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Imagens

foram geradas e registradas digitalmente, com aumentos variáveis, para cada amostra, nas condições de trabalho de 20Kv e distância de trabalho entre 5,5 a 7mm.

Delineamento experimental

O delineamento estatístico foi o inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 4x2, sendo quatro procedimentos de resfriamento de sementes de café e dois, com e sem imersão em água catódica, com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa computacional SISVAR® (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliações fisiológicas

Os resultados das avaliações das sementes recém-colhidas, antes de serem submetidas aos tratamentos, encontram-se na Tabela 2. As sementes apresentavam teor de água de 38% base úmida (bu) e boa qualidade final, com 93% de formação de plântulas normais e 100% de embriões viáveis (TABELA 2).

Tabela 2 Valores médios de porcentagem de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MR), de massa seca da parte aérea (MPA), de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) e de condutividade elétrica (CE) das sementes de *Coffea arabica* L. recém-colhidas.

Parâmetros	PR (%)	PN (%)	PNF (%)	FC (%)	MR (cg)	MPA (cg)	EV* (%)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)
Resultado	97	93	49	92	23,1	110,4	100	10,53

*Viabilidade obtida pelo teste de tetrazólio.

As sementes com teores de água correspondentes a cada um dos procedimentos 1, 2, 3 e 4 apresentaram elevações no teor de água de 6,1; 6,0; 2,7 e 4,4, respectivamente, após imersão em água catódica.

As sementes resfriadas à $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura final de -40°C utilizando-se a sílica gel no processo de secagem, procedimentos 1 e 2, apresentaram maior incremento de teor de água quando comparadas às sementes resfriadas à $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura final de -50°C no procedimento 3, ou que não foram submetidas ao resfriamento no procedimento 4. Essa elevação de teor de água pode ser explicada pela velocidade de secagem que estas sementes foram submetidas, sendo diretamente proporcionais. A secagem mais rápida em

sílica gel pode ter proporcionado uma entrada mais rápida de água pelas células e a secagem mais lenta em solução saturada de sal permitiu uma entrada de água menos intensa. Danos ao sistema de membranas podem ocorrer durante a secagem rápida de sementes de café (SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013), fazendo com que este fique menos seletivo e mais permeável, o que explica a maior entrada de água pelas células. Dussert; Engelmann (2006) afirmaram que uma umidade relativa de 81% do ambiente de secagem proporciona o teor de água mais adequado para criopreservar sementes de café.

Nota-se ainda, que houve diferença até mesmo entre o tipo de sal utilizado, sendo as sementes que foram secadas em solução saturada de sulfato de amônio, as que alcançaram menor teor de água, com um incremento de apenas 2,7%, observado no procedimento 3, com imersão em água catódica (TABELA 1). Este fato se deve, provavelmente, pela maior umidade relativa (81%) que esse sal proporciona no ambiente, fazendo com que a secagem tenha sido mais lenta que à secagem na qual se utilizou o sal cloreto de sódio (UR de 75%). Essa hidratação lenta das sementes pode ser benéfica, pois reduz os riscos de danos ao eixo embrionário pelo fato de terem mais tempo para reparar ou reorganizar as suas membranas (SANTOS; MENEZES, 2000).

Para todas as variáveis analisadas houve interação significativa entre os procedimentos de resfriamento e a imersão em água catódica (TABELA 3) (APÊNDICE A).

Foi observado que as sementes secadas até teor de água de 20% bu em sílica gel apresentaram menor porcentagem de protrusão radicular quando comparadas às sementes com teor de água de 17% bu, independentemente do método de secagem, resfriamento e do uso da água catódica (TABELA 3). Para sementes de café, o maior teor de água presente em sua estrutura pode ser prejudicial à sua qualidade quando são submetidas ao resfriamento, pois a baixa

temperatura pode transformar a água remanescente em cristais de gelo no meio extracelular, ocasionando dano celular (DUSSERT et al., 2012).

Tabela 3 Valores médios de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA), de embriões viáveis (EV) e de condutividade elétrica (CE) de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de resfriamento e tratamentos com água catódica. (Continua)

Variáveis	Procedimento de resfriamento	Água catódica	
		Sem	Com
PR (%)	1	10,0 Bb	83,0 Ba
	2	95,0 Aa	97,0 Aa
	3	96,0 Aa	95,0 Aa
	4	95,0 Aa	100,0 Aa
	CV (%)	5,22	
PN (%)	1	5,0 Bb	79,0 Aa
	2	86,0 Aa	90,0 Aa
	3	91,0 Aa	88,0 Aa
	4	85,0 Aa	87,0 Aa
	CV (%)	8,54	
PNF (%)	1	0,0 Bb	34,0 Aa
	2	30,0 Aa	37,0 Aa
	3	21,0 Aa	15,0 Ba
	4	27,0 Aa	25,0 Ba
	CV (%)	34,52	
FC (%)	1	5,0 Bb	77,0 Ba
	2	86,0 Aa	90,0 Aa
	3	91,0 Aa	88,0 Aa
	4	83,0 Aa	87,0 Aa
	CV (%)	8,73	
MSR (cg)	1	0,95 Db	20,18 Ba
	2	20,68 Bb	23,98 Aa
	3	24,48 Aa	19,75 Bb
	4	14,73 Ca	15,68 Ca
	CV (%)	10,40	

Tabela 3 Valores médios de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA), de embriões viáveis (EV) e de condutividade elétrica (CE) de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de resfriamento e tratamentos com água catódica. (Conclusão)

Variáveis	Procedimento de resfriamento	Água catódica	
		Sem	Com
MSPA (cg)	1	4,48 Cb	86,58 Ba
	2	105,33 Aa	109,93 Aa
	3	110,15 Aa	108,13 Aa
	4	87,63 Ba	95,33 Ba
	CV (%)	10,08	
EV* (%)	1	12,5 Db	80,0 Aa
	2	55,0 Ca	60,0 Ba
	3	82,5 Ba	77,5 Aa
	4	95,0 Aa	85,0 Aa
	CV (%)	10,86	
CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)	1	14,35 Aa	16,46 Bb
	2	13,77 Aa	14,57 Aa
	3	17,16 Ba	16,57 Ba
	4	15,86 Bb	13,61 Aa
	CV (%)	7,96	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de *Skott-Knott*, ao nível de 5% de probabilidade. *Viabilidade obtida pelo teste de tetrazólio.

Imergir as sementes submetidas ao procedimento 1 em água catódica, após o resfriamento, melhorou notadamente a protrusão radicular, que passou de uma porcentagem de 10% para 83%.

As sementes com teor de água de 17% bu que não foram imersas em água catódica, mas secadas e resfriadas de formas diferentes, se comportaram de forma estatisticamente iguais e apresentaram porcentagem máxima de 91% de plântulas normais após 30 dias da germinação (TABELA 3). Esse resultado se sobressaiu ao das sementes secadas até teor de água de 20% bu, as quais

apresentaram uma porcentagem de germinação de apenas 5%. Zhang et al. (2014) também observaram que quanto maior o teor de água em sementes intermediárias de *Citrus paradisi* Macfad., mais sensíveis estas são à temperatura sub-zero. Em sementes recalcitrantes de *Populus nigra* L., a porcentagem de germinação se manteve alta quando estas foram secadas até 0,15 g g⁻¹ e 0,07 g g⁻¹ de peso seco e criopreservadas (SUSZKA et al., 2014).

Com a utilização da água catódica, os resultados de germinação das sementes de todos os procedimentos de resfriamento testados não diferiram entre si, indicando que esta solução foi eficiente para recuperar a qualidade fisiológica das sementes que foram prejudicadas pelo maior teor de água contido em suas estruturas.

A porcentagem de germinação aumentou 15,8 vezes quando as sementes do procedimento 1 foram imersas em água catódica. Como a água catódica tem alta propriedade redutora e potencial para extinguir espécies reativas de oxigênio (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011), o seu uso pode ter contribuído para eliminação dos produtos gerados pelo estresse do resfriamento. Para os demais procedimentos, o tratamento das sementes com a água antioxidante não produziu efeito, provavelmente, porque essas sementes já apresentavam alta qualidade fisiológica.

Para porcentagem de plântulas normais fortes, de maneira geral, as sementes com 17% bu que não foram imersas em água catódica apresentaram melhores resultados quando comparados ao das sementes com 20% bu (TABELA 3). Apesar da porcentagem ter sido maior em sementes mais secas, esta não ultrapassou 30%, indicando baixo vigor dessas sementes. Segundo Berjak; Pammenter (2013), embora haja o objetivo de reduzir o teor de água a um mínimo necessário para assegurar a sobrevivência do explante ao resfriamento criogênico, na prática, inevitavelmente, alguma solução aquosa

congelável permanecerá nas células, o que pode ter afetado negativamente o vigor destas sementes. Baixo vigor também foi observado nas sementes imersas em água catódica, que apresentaram máxima de 37% de plântulas normais fortes. Para essas sementes, melhores resultados foram observados com a desidratação em sílica gel e resfriamento à $-1^{\circ}\text{C min.}^{-1}$ até temperatura final de -40°C (TABELA 3).

Independentemente dos métodos de resfriamento e da utilização da água catódica, as sementes mais secas, com 17% bu apresentaram maior porcentagem de folhas cotiledonares aos 45 dias de avaliação, não diferindo estatisticamente entre si (TABELA 3). Após secagem em solução salina de sulfato de amônio, Dussert; Engelmann (2006) observaram que sementes de café pré-resfriadas em gelo seco, melhoraram, consideravelmente, a tolerância à imersão em nitrogênio líquido. As sementes com 20% bu apresentaram aumento considerável na porcentagem de folhas cotiledonares quando imersas em água catódica.

As sementes submetidas ao procedimento 3 que não foram imersas em água catódica apresentaram maior massa seca de raiz (TABELA 3). Porém, quando as sementes foram imersas, a maior massa seca de raiz foi observada nas sementes do procedimento 2. A massa seca da parte aérea observada em sementes tratadas ou não em água catódica foi maior nos procedimentos 2 e 3. Todas estas sementes tinham o mesmo teor de água (17% bu), mas foram secadas e resfriadas com procedimentos diferentes. No procedimento 3, resfriado até -50°C , o tempo de resfriamento foi mais longo, o que pode ter ocasionado maior desidratação intracelular.

A maior massa de parte aérea obtida foi de 110,15cg (procedimento 3, sem imersão em água catódica) e a menor foi a de 4,48cg (procedimento 1, sem imersão em água catódica) (TABELA 3).

Avaliando-se o resultado do teste de tetrazólio, as sementes que não foram tratadas com água catódica e que não foram resfriadas no procedimento 4 apresentaram a maior porcentagem de embriões viáveis de 95% (TABELA 3). Dussert et al. (1997) observaram maior porcentagem de plântulas normais a partir da cultura dos embriões quando sementes de café foram imersas diretamente em nitrogênio líquido após a desidratação, sem pré-resfriamento. Observa-se que a menor viabilidade dos embriões foi constatada em sementes mais úmidas submetidas ao resfriamento. Já para as que foram imersas na solução antioxidante, somente o procedimento 2 diferiu dos demais, apresentando menor porcentagem de embriões viáveis (TABELA 3). Sisunandar et al. (2012), estudando temperaturas baixa (-20°C) e ultra-baixa (-80°C) para a conservação de embriões de coco, observaram que maior viabilidade foi obtida em temperatura ultra-baixa.

As sementes que apresentaram menor lixiviação de exsudados, resultando em menor condutividade elétrica, foram aquelas não tratadas com água catódica, secadas em sílica gel e resfriadas à $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura final de -40°C . Porém, quando as sementes foram imersas na solução eletrolisada, além do procedimento 2, melhores resultados foram observados também para o procedimento 4 (TABELA 3).

Verifica-se que para as variáveis analisadas, com exceção da condutividade elétrica, a qualidade fisiológica das sementes com 20% de teor de água apresentou melhora significativa quando as sementes foram imersas na solução de água catódica. Isso confirma a afirmativa de Berjak; Sershen; Pammenter (2011), sobre o potencial antioxidante desta solução, reduzindo os danos acumulativos causados pela secagem e resfriamento.

Avaliações bioquímicas

Avaliações bioquímicas em sementes submetidas à secagem e à criopreservação são mais fáceis de serem encontradas na literatura. No entanto, não são comuns em estudos do efeito do resfriamento.

No perfil eletroforético da enzima catalase (FIGURA 1), observa-se atividade maior em sementes de café secadas lentamente, resfriadas à taxa de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura de -50°C e não submetidas ao resfriamento. As sementes desses tratamentos que foram imersas em água catódica, 3C e 4C, tiveram uma redução na atividade da catalase, sendo mais evidente nas sementes que foram resfriadas (3C). De forma geral, as sementes secadas até teor de água de 17% apresentaram maior atividade dessa enzima. As sementes que foram secadas em sílica gel até teor de água de 20% e que não foram imersas em água catódica apresentaram baixa atividade da catalase e quando imersas nessa solução, apresentaram aumento da expressão desta enzima. Estes resultados corroboram com o resultado fisiológico destas sementes (TABELA 3) indicando que a maior atividade da catalase corresponde à maior viabilidade destas.

A catalase atua removendo radicais livres como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), decompondo-o em água (H_2O) e oxigênio (O_2) (GARG; MANCHANDA, 2009). Assim, maior expressão desta pode ser indicativo de melhor qualidade fisiológica, reduzindo os danos da secagem e resfriamento.

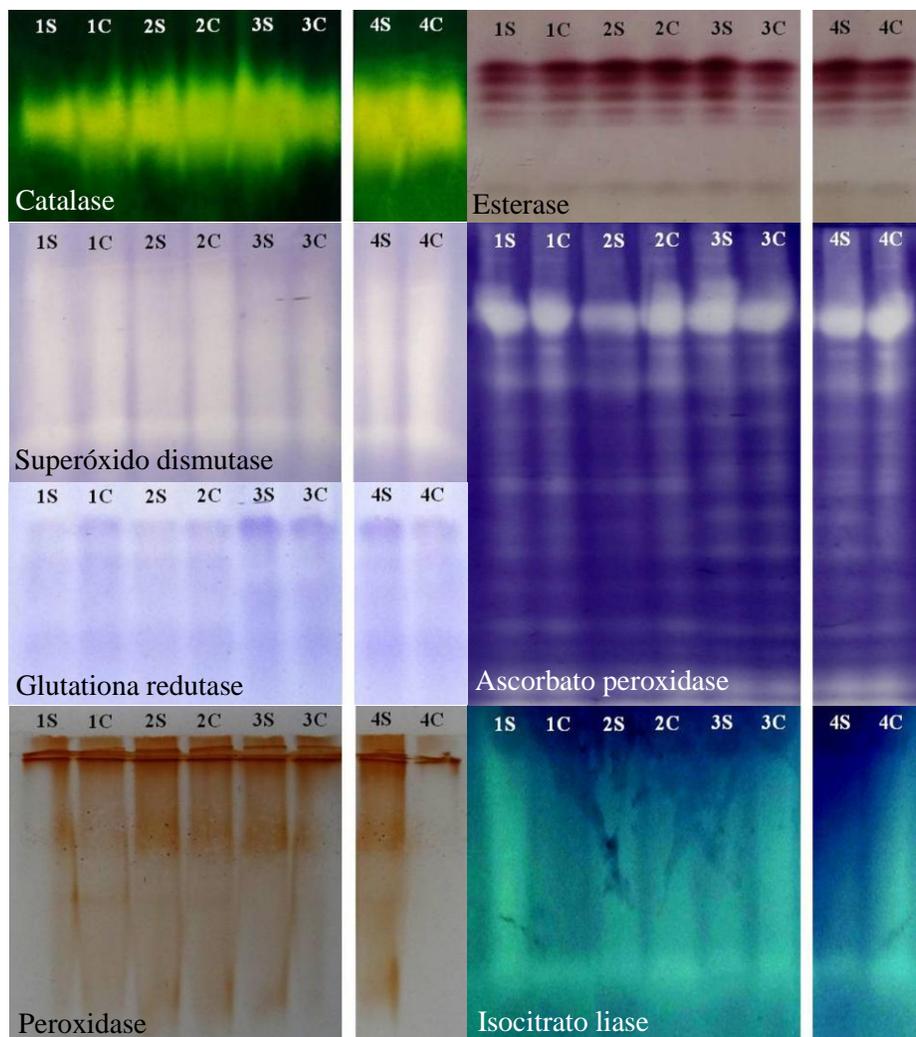


Figura 1 Padrão eletroforético de isoenzimas em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas aos procedimentos: 1) Secagem em sílica gel até teor de água de 20% bu e resfriamento à velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C ; 2) Secagem em sílica gel até teor de água de 17% bu e resfriamento à velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C ; 3) Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até teor de água de 17% bu e resfriamento à velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -50°C ; 4) Secagem em solução saturada de NaCl até teor de água de 17% bu e não submetidas ao resfriamento. Avaliadas com (C) e sem (S) água catódica.

A atividade da enzima esterase (FIGURA 1), nos diferentes procedimentos, foi semelhante ao da catalase, com aumento de expressão associado à maior redução do teor de água das sementes. Apesar desta enzima estar vinculada ao aumento da peroxidação de lipídios, o que provoca danos às membranas celulares e podem levar à ocorrência de eventos deteriorativos (COELHO et al., 2015; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2005), sua maior expressão em sementes mais secas não indicou perda de qualidade fisiológica. Essas enzimas hidrolíticas podem ter contribuído para o processo germinativo, liberando ácidos graxos dos lipídeos, os quais são usados na β -oxidação como fonte de energia para a germinação (DOS SANTOS et al., 2016).

A enzima superóxido dismutase (FIGURA 1) exerce importante função como antioxidante, pois converte o radical aniônico superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (GILL et al., 2015). Observa-se baixa expressão dessa enzima nas sementes secadas em solução saturada de sulfato de amônio até teor de água de 17% bu e resfriadas a uma velocidade de $-1^\circ C \text{ min.}^{-1}$ até temperatura final de $-50^\circ C$, independentemente se imersas ou não em água catódica. Algumas hipóteses para esta baixa atividade podem ser a secagem mais lenta proporcionada pela alta umidade relativa desse sal (81%) e o resfriamento até uma temperatura mais baixa que pode ter contribuído para uma desidratação intracelular maior. Portanto, a junção desses fatores pode ter colaborado para menores danos celulares e, conseqüente, menor formação de radicais livres.

Em todos os procedimentos, independentemente da utilização da água catódica, verifica-se a presença de muitas bandas da enzima ascorbato peroxidase (FIGURA 1), com semelhança na intensidade destas. Assim como a catalase, esta enzima catalisa o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio,

protegendo as células do efeito citotóxico causado pelas espécies reativas de oxigênio (SOARES; MACHADO, 2007).

A expressão da enzima glutationa redutase (FIGURA 1) foi semelhante à da catalase e esterase. A maior atividade observada no procedimento 3 e 4, os quais tiveram melhor desempenho fisiológico, pode indicar menores concentrações de oxigênio singlete e radicais hidroxila, que são os radicais catalisados por esta enzima (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002).

Independentemente do método de secagem e de resfriamento, a expressão da enzima peroxidase (FIGURA 1) foi mais intensa em sementes com 17% bu. Nota-se que quando estas sementes foram imersas em água catódica apresentaram menor expressão dessa enzima, sendo mais evidente nas sementes dos procedimentos 3 e 4. As sementes com 20% bu (procedimento 1) apresentaram resultado contrário, sendo que aquelas imersas em água catódica apresentaram maior expressão da peroxidase. Como a peroxidase atua na formação da parede celular (GIJSEN, 1997), sua atividade pode estar relacionada à recuperação desta estrutura quando submetida a danos de secagem, como ocorreu em sementes com 17% bu e; quando submetidas aos danos de resfriamento nas sementes com 20% bu, já que sementes mais úmidas são mais propícias à formação de cristais de gelo.

A isocitrato liase é uma enzima chave na fase de germinação, pois quebra lipídios armazenados e sua atividade pode aumentar durante a senescência do organismo (IGAMBERDIEV; LEA, 2002). Para todos os procedimentos investigados, a expressão da enzima isocitrato liase (FIGURA 1) teve comportamento inverso à da peroxidase, sendo mais perceptível nas sementes do procedimento 1 que não foram tratadas com água catódica e que pode estar relacionada à maior deterioração da semente, comprovada pelos resultados dos testes fisiológicos. Nas sementes dos procedimentos 3 e 4,

imersas na solução eletrolisada, alta atividade desta enzima também foi observada, porém, com resultados fisiológicos melhores (TABELA 3). Acredita-se que esta alta expressão seja vinculada à sua função na fase de germinação.

A atividade das proteínas resistentes ao calor, incluindo as LEA apresentou perfis semelhantes em todos os procedimentos, exceto nas sementes secadas até 20% em sílica gel e resfriadas a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C . Nota-se, no entanto, maior atividade nas sementes que foram imersas em água catódica (FIGURA 2). Essas proteínas se acumulam durante os estágios tardios de desenvolvimento das sementes (GRELET et al., 2005; GRAETHER; BODDINGTON, 2014) e exibem uma infinidade de funções, dentre estas podem estar relacionadas à tolerância à seca e ao resfriamento, quando expostas a fatores de estresse (AMARA et al., 2014). Como há uma diversidade enorme de proteínas termo estáveis devido ao grande número de genes que as codificam (HUNDERTMARK; HINCHA, 2008), as bandas oriundas das sementes do procedimento 1 podem estar relacionadas ao maior teor de água, pois quando as sementes foram imersas em água catódica, houve intensificação da banda. Este resultado corresponde à melhoria na qualidade fisiológica das sementes deste tratamento que foram imersas em água catódica, indicando uma possível ação protetora das proteínas resistentes ao calor.

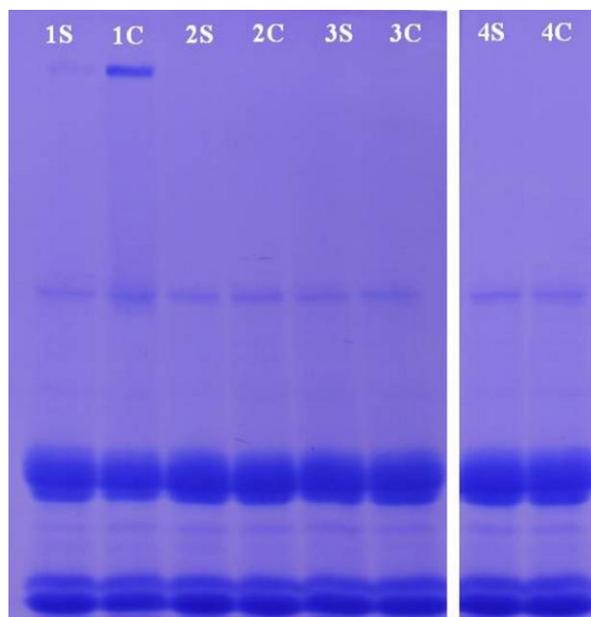


Figura 2 Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas aos procedimentos: 1) Secagem em sílica gel até teor de água de 20% bu e resfriamento à velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C ; 2) Secagem em sílica gel até teor de água de 17% bu e resfriamento à velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C ; 3) Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até teor de água de 17% bu e resfriamento à velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -50°C ; 4) Secagem em solução saturada de NaCl até teor de água de 17% bu e não submetidas ao resfriamento. Avaliadas com (C) e sem (S) água catódica.

As demais bandas verificadas no gel das proteínas resistentes ao calor não apresentaram diferença significativa entre os procedimentos, sendo estas de mesmo tamanho e intensidade. Neste caso, a expressão da enzima não está associada aos eventos metabólicos durante a secagem e resfriamento. Segundo Hundertmark; Hinch (2008), nem todas as proteínas resistentes ao calor atuam de forma significativa na tolerância ao estresse, ou elas precisam de outros fatores para sua ativação.

Avaliações ultraestruturais

As estruturas celulares nos endospermas e nos embriões de sementes de café submetidas aos diferentes procedimentos de resfriamento foram avaliadas em microscopia eletrônica de varredura.

A Figura 3 ilustra as alterações na estrutura celular ocorridas nos tratamentos avaliados. Porém, os danos são mais evidentes nas células das sementes com 20% bu, resfriadas à $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até temperatura final de -40°C (1S), sem imersão em água catódica (FIGURA 3A). Nestas amostras observa-se maior número de células vazias, que devido ao rompimento da membrana plasmática e extravasamento do conteúdo celular, possivelmente ocasionado por danos de frio durante o resfriamento. Nas sementes deste mesmo tratamento, imersas em solução catódica antioxidante (FIGURA 3B), as estruturas das células do endosperma e do embrião se apresentam menos danificadas. É possível ainda, diferenciar com clareza as células do parênquima fundamental, do procâmbio, do protoxilema e do protofloema do embrião.

Na Figura 3C pode-se notar que o conteúdo celular de algumas células do endosperma está contraído, provavelmente, devido à secagem aplicada às sementes de café, antes do resfriamento. Borém et al. (2013) também observaram contração celular em grãos de café secados em terreiro e secadores.

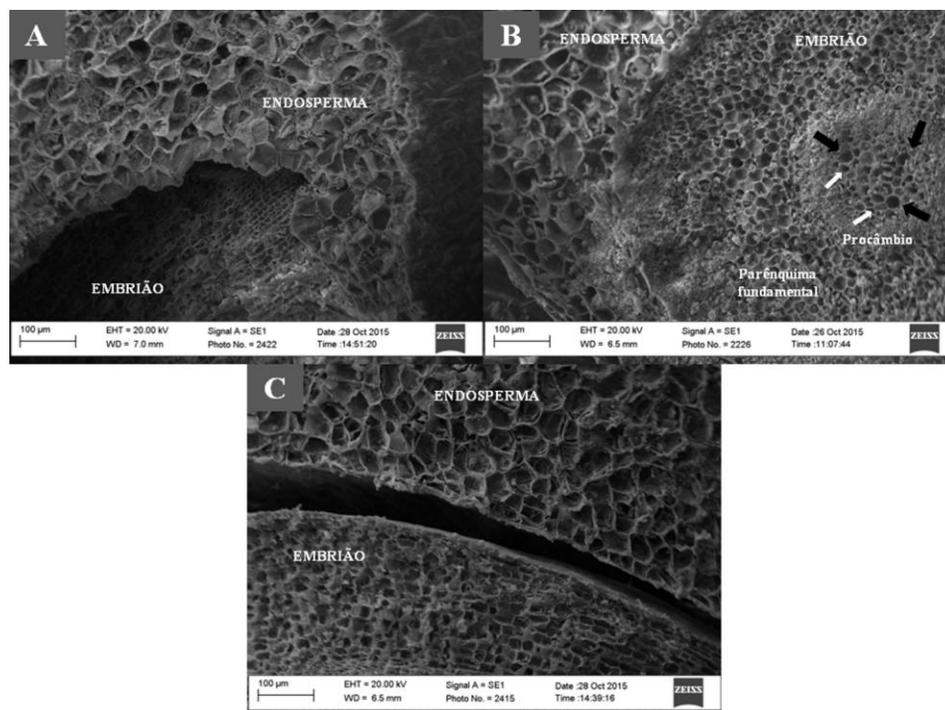


Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura das células do embrião e do endosperma de semente de café submetida aos procedimentos: 1) Secagem em sílica gel até teor de água de 20% bu e resfriamento à velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , sem (A) e com (B) tratamento com água catódica; e 4) Secagem em solução saturada de NaCl até teor de água de 17% bu e não submetidas ao resfriamento, sem tratamento com água catódica (C). As setas pretas e brancas apontam as células do protoxilema e do protofloema, respectivamente.

Pode-se observar nas eletromicrografias das células do endosperma do procedimento 1 que há uma clara melhora na estrutura celular quando as sementes foram imersas em água catódica (FIGURAS 4A e 4B), sustentando a premissa de Berjak; Sershen; Pammenter (2011), que esta solução tem potencial antioxidante. Verifica-se ainda, células intactas, porém quando comparadas às células das sementes que não sofreram resfriamento (FIGURA 4C), nota-se que foram menos frequentes.

Em todos os procedimentos analisados a presença de glóbulos de óleo é constatada, indicando que o citoplasma sofreu extravasamento pela perda da integridade da membrana plasmática. No entanto, os danos sofridos são mais perceptíveis nas sementes do procedimento 1. A baixa qualidade estrutural observada neste procedimento corrobora com o resultado fisiológico, que também foi inferior aos demais quando não submetidos à solução eletrolisada. Saath et al. (2010) também observaram que em grãos de café com teor de água de 30-20%, a estrutura celular das células do endosperma também foi comprometida. Borém; Marques; Alves (2008) verificaram que danos ultraestruturais em grãos de café foram maiores quando uma secagem mais rápida foi aplicada.

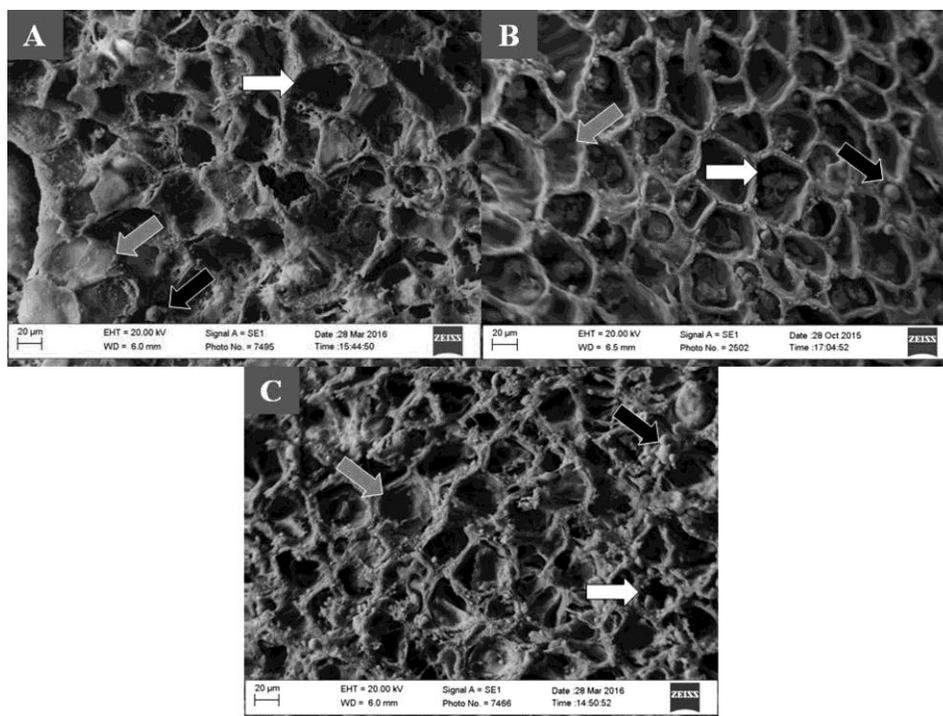


Figura 4 Microscopia eletrônica de varredura das células do endosperma de semente de café submetida aos procedimentos: 1) Secagem em sílica gel até teor de água de 20% bu e resfriamento à velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , sem (A) e com (B) tratamento com água catódica; e 4) Secagem em solução saturada de NaCl até teor de água de 17% bu e não submetidas ao resfriamento, sem tratamento com água catódica (C). Detalhes de glóbulos de óleo (setas pretas), células vazias (setas brancas) e células intactas (setas cinzas).

Assim como ocorreu nas células do endosperma, as células do embrião de sementes dos procedimentos investigados também sofreram alterações estruturais, sendo mais evidentes em sementes do procedimento 1 (FIGURAS 5A e 5B). Como o teor de água é maior nessas sementes, a formação de cristais de gelo pode ocorrer, ocasionando danos irreversíveis às células. Infere-se que esta maior degradação nas células deste procedimento se deve mais ao alto teor de água presente em sua estrutura do que pelo resfriamento propriamente dito.

Borém et al., (2013), avaliando diferentes métodos de secagens (em terreiro e mecânica) em grãos de café, constataram danos ultraestruturais em todos os tratamentos realizados.

De maneira geral, nota-se que as células do embrião das sementes dos procedimentos com menores danos visíveis (FIGURAS 5B e 5C) se apresentam com melhor aspecto, quando comparadas às células do endosperma. Este resultado pode indicar maior sensibilidade ao frio pelo endosperma, sendo uma hipótese levantada também, por outros autores, como Dussert; Engelmann, 2006 e Coelho et al., 2015.

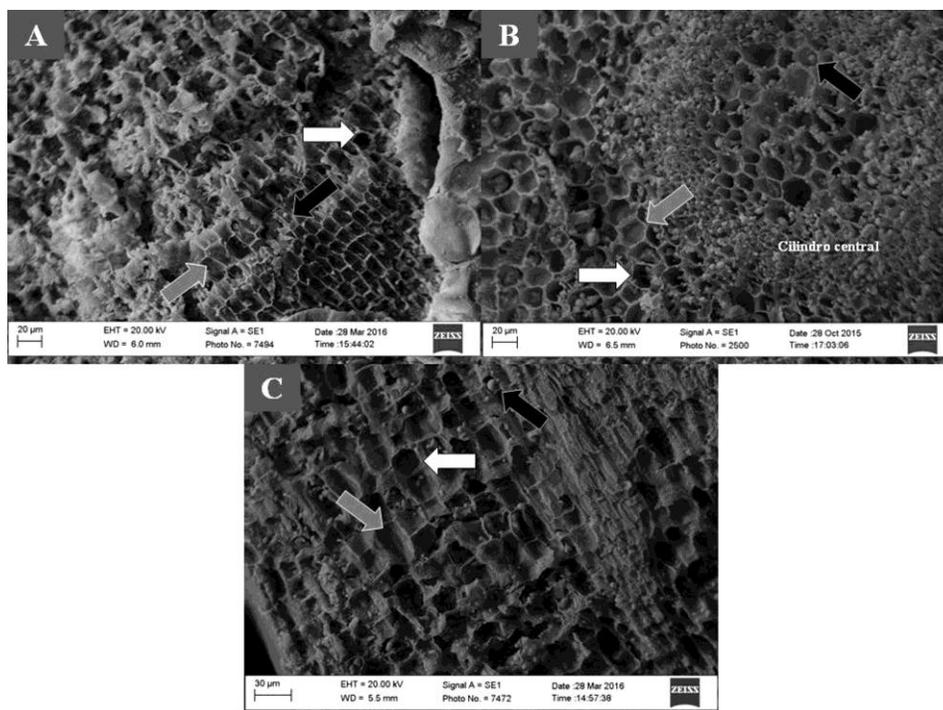


Figura 5 Microscopia eletrônica de varredura das células do embrião de semente de café submetida aos procedimentos: 1) Secagem em sílica gel até teor de água de 20% bu e resfriamento à velocidade de $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , sem (A) e com (B) tratamento com água catódica; e 4) Secagem em solução saturada de NaCl até teor de água de 17% bu e não submetidas ao resfriamento, sem tratamento com água catódica (C). Detalhes de células do cilindro central, glóbulos de óleo (setas pretas), células vazias (setas brancas) e células intactas (setas cinzas).

Observa-se por meio das avaliações realizadas neste experimento, que muitos danos já estão ocorrendo na etapa que antecede a imersão em nitrogênio líquido, e que poderão comprometer a viabilidade das sementes após a criopreservação.

Levando-se em conta que os diferentes procedimentos de resfriamento testados neste trabalho tiveram efeitos similares nas sementes de café mais secas (17% bu), evidenciados pelos resultados fisiológicos, bioquímicos e

ultraestruturais e, que a utilização de um congelador programável pode significar um gasto extra em bancos de germoplasmas de café, pode ser mais interessante não realizar o resfriamento controlado e realizar a imersão direta das sementes em nitrogênio líquido, no caso de criopreservar as sementes.

4 CONCLUSÕES

Melhores resultados fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais são encontrados em sementes com teor de água mais baixo (17% bu), independentemente dos métodos de secagem e de resfriamento utilizados.

A ação antioxidante da água catódica é eficiente nas sementes com maior teor de água (20% bu), porém não produz efeito nas demais sementes, demonstrando sua maior eficácia em sementes danificadas pelo resfriamento.

Os resultados das avaliações bioquímicas e ultraestruturais confirmam os efeitos danosos do resfriamento no desempenho fisiológico das sementes.

Em sementes mais secas, a imersão em água catódica ativa o sistema enzimático antioxidante e melhora o aspecto ultraestrutural das células do endosperma e do embrião de sementes de café, demonstrando a ação antioxidante dessa solução.

O endosperma de sementes de café tem maior sensibilidade ao resfriamento que o embrião, evidenciado pela análise ultraestrutural.

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq, à Fapemig, à Embrapa e à UFLA pelo financiamento do estudo e pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

- 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, Oct./Dec. 2014.
- 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 Microrganismos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1998, p. 201-328.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 627 p.
- 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, Nov. 2014.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidant system in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, May 2002.
- BACHMANN, L.; MAYER, E. Physics of water and ice: implications for cryofixation. In: STEINBRECHT, R. A.; ZIEROLD, K. (Eds.). **Cryotechniques in biological electron microscopy**. Berlin: Springer, 1987, p. 3-34.
- BAUST, J. G.; GAO, D.; BAUST, J. M. Cryopreservation: an emerging paradigm change. **Organogenesis**, Philadelphia, v. 5, n. 3, p. 90-96, July 2009.
- BAUST, J. M. Properties of cells and tissues influencing preservation outcome: molecular basis of preservation induced cell death. In: BAUST, J. G.; BAUST, J. M. (Eds.). **Advanced in Biopreservation**. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2007, cap. 3, p. 63-87.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: Approaches and problems. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 29-39, Jan. 2014.
- _____. Implications of the lack of desiccation tolerance in recalcitrant seeds. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 4, n. 478, p. 1-9, Nov. 2013.

_____. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds? **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 22-55, 2000. Edição Especial.

BERJAK, P.; SERSHEN, B. V.; PAMMENTER, N. W. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 21, n. 3, p. 187-203, Sept. 2011.

BORÉM, F. M. et al. Microscopia eletrônica de varredura de grãos de café submetidos a diferentes formas de processamento e secagem. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 2, p. 227-237, abr./jun. 2013.

BORÉM, F. M.; MARQUES, E. R.; ALVES, E. Ultrastructural analysis of drying damage in parchment Arabica coffee endosperm cells. **Biosystems engineering**, Harpenden, v. 99, n. 1, p. 62-66, Jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 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, jun. 2015.

DOS SANTOS, H. O. et al. Physiological quality of habanero pepper (*Capisicum chinense*) seeds based on development and drying process. **African Journal of Agricultural Research**, Nairobi, v. 11, n. 12, p. 1102-1109, Mar. 2016.

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, May/June 2006.

DUSSERT, S. et al. Biologie de la conservation des semences de caféiers: aspects fondamentaux et conséquences pratiques: une revue. **Cahiers Agricultures**, Les Ulis, v. 21, n. 2-3, p. 106-114, 2012.

_____. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **CryoLetters**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 269-276, 1997.

_____. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 112, n. 4, p. 495-504, Aug. 2001.

EIRA, M. T. S. et al. **Banco de sementes de café em criopreservação: experiência inédita do Brasil**, Circular Técnica 42, Brasília, DF, 6 p, 2005.

ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

GARG, N.; MANCHANDA, G. ROS generation in plants: boon or bane? **Plant Biosystems**, London, v. 143, n. 1, p. 81-96, Apr. 2009.

GIJSEN, M. A deletion mutation at the *ep* locus causes low seed coat peroxidase activity in soybean. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 991-998, Nov. 1997.

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, July 2015.

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.

GRELET, J. et al. Identification in Pea seed mitochondria of a late embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. **Plant Physiology**, Rockville, v. 137, n. 1, p. 157-167, Jan. 2005.

HANAOKA, K. et al. Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of

‘active hydrogen’. **Journal of Health Science**, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 456–465, June 2004.

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.

HUNDERTMARK M.; HINCHA D. K. LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, London, v. 9, n. 118, p. 1-22, Mar. 2008.

IGAMBERDIEV, A. U.; LEA, P. J. The role of peroxisomes in the integration of metabolism and evolutionary diversity of photosynthetic organisms. **Phytochemistry**, London, v. 60, n. 7, p. 651-674, Aug. 2002.

KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 734-740, Nov. 2005.

KRZYŻANOWSKY, 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, mar. 1991.

LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Shannon, v. 159, n. 1, p. 75-85, Oct. 2000.

MICHALAK, M.; PLITTA-MICHALAK, B. P.; CHMIELARZ, P. A new insight in desiccation tolerance and cryopreservation of mazzard cherry (*Prunus avium* L.) seeds. **Central European Journal of Biology**, Louisville, v. 10, n. 1, p. 354-364, May 2015.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 212, n. 2, p. 540-546, Aug. 1993.

- PAMMENTER, N. W; BERJAK, P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, Jan. 2014.
- SAATH, R. et al. Microscopia eletrônica de varredura do endosperma de café (*Coffea arabica* L.) durante o processo de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 196-203, jan./fev. 2010.
- SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L. Tratamentos pré-germinativos em sementes de alface. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 1, p. 253-258, ago. 2000.
- 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, jun. 2005.
- 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, Dec. 2013.
- SISUNANDAR et al. Conservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) germplasm at sub-zero temperature. **CryoLetters**, Cambridge, v. 33, n. 6, p. 465-475, Nov./Dec. 2012.
- SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 1, n. 1, p. 9-19, 2007.
- SUSZKA, J. et al. Optimal seed water content and storage temperature for preservation of *Populus nigra* L. germplasm. **Annals of Forest Science**, Champenoux, v. 71, n. 5, p. 543-549, July 2014.
- TRIGIANO, R. N.; GRAY, D. J. **Plant tissue culture, development and biotechnology**. London: CRC Press, 2011, 583 p.
- ZHANG, N.; WEN, B.; J. I. M.; YAN, Q. Low-temperature storage and cryopreservation of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.) seeds. **CryoLetters**, Cambridge, v. 35, n. 5, p. 418-426, Sept./Oct. 2014.

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do artigo 3

Tabela 1 Resumo da análise de variância dos dados referentes à protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas normais fortes (PNF), plântulas com folhas cotiledonares (FC), massa seca da raiz (MSR), massa seca da parte aérea (MSPA), embriões viáveis (EV) e condutividade elétrica (CE) de sementes de café criopreservadas submetidas a diferentes métodos de resfriamento e água catódica.

FV	GL	Quadrados Médios							
		PR	PN	PNF	FC	MSR	MSPA	EV	CE
Resfriamento (R)	3	4972,5000**	4217,8333**	476,5000**	4352,5000**	261,2392**	7059,6245**	3228,1250**	10,8002**
Água catódica (AC)	1	3120,5000**	2964,5000**	544,5000**	2964,5000**	175,7813**	4266,5703**	1653,1250**	0,0023
R x AC	3	2532,5000**	2681,8333**	648,5000**	2495,1667**	210,5520**	3127,7836**	2586,4583**	6,9996**
Erro	24	19,1667	42,5000	66,5000	43,8333	3,3344	79,4751	55,2083	1,4826
CV (%)	-	5,22	8,54	34,52	8,73	10,40	10,08	10,86	7,96

** e *: Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.

ARTIGO 4

**Aspectos fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais de sementes de
Coffea arabica L. em diferentes protocolos de criopreservação**

(Artigo elaborado segundo norma NBR 6022 – ABNT 2003)

RESUMO

A criopreservação é uma técnica com potencial para conservar o germoplasma de espécies do gênero *Coffea* por tempo indeterminado, pois a baixa longevidade das sementes atribuída à sensibilidade a dessecação e a baixas temperaturas não permite que estas sejam armazenadas em bancos de germoplasma convencionais. Devido a isso, objetivou-se investigar diferentes protocolos de criopreservação de sementes de *Coffea arabica* L.. Foram investigadas diferentes formas de secagem, resfriamento e reaquecimento das sementes após imersão em nitrogênio líquido, além do uso da água catódica nestes protocolos. Alterações fisiológicas, bioquímicas e ultraestruturais ocorridas nas sementes de café após a criopreservação foram avaliadas. O tempo de reaquecimento após imersão em nitrogênio líquido e a imersão em água catódica não influenciam a qualidade fisiológica de sementes de café criopreservadas para os tratamentos testados. No entanto, os diferentes métodos de secagem e formas de resfriamento influenciam, consideravelmente, a qualidade fisiológica, bioquímica e ultraestrutural das sementes. As sementes de café criopreservadas com teor de água de 17% bu respondem melhor à criopreservação, quando comparadas às sementes com teor de água de 20% bu. Sementes de *Coffea arabica* L. secadas até 17% bu em 75% de umidade relativa e imersas diretamente em nitrogênio líquido, têm a qualidade preservada.

Palavras-chave: Secagem. Resfriamento. Nitrogênio líquido. Conservação.

1 INTRODUÇÃO

Por ser uma das bebidas mais apreciadas no mundo (DULLOO et al., 2009), o café é produzido em vários países tropicais em desenvolvimento, onde é utilizado como fonte de renda. Países não tropicais, além de serem consumidores natos, contribuem para os setores de comércio e industrialização desse produto (MONDEGO et al., 2011).

O Brasil é líder mundial de produção e exportação dessa *commoditie* agrícola (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015) e devido à sua importância socioeconômica para o agronegócio de vários países, a conservação da diversidade genética do gênero *Coffea*, torna-se fundamental. No entanto, sua conservação não pode ser realizada em bancos de sementes convencionais, pois as sementes, classificadas como intermediárias, são parcialmente tolerantes à dessecação a baixos teores de água e sua armazenabilidade é reduzida a temperaturas baixas (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990).

Uma alternativa para que sementes desta categoria sejam armazenadas por período indeterminado, de forma segura e que proporcione um custo-benefício eficiente, com pouca necessidade de manutenção é o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C), técnica esta conhecida como criopreservação (ENGELMANN, 2004; CHEN et al., 2011). Porém, as propriedades físicas, fisiológicas e genéticas de diferentes tecidos a serem criopreservados podem influenciar a viabilidade e a integridade genética do germoplasma em questão (WALTERS et al., 2008).

A formação de cristais de gelo intracelular é considerada um problema no processo de criopreservação e uma forma de evitá-la é induzir a vitrificação da amostra, de maneira que a água congelável remanescente se transforme em

um sólido amorfo não cristalino de alta viscosidade, impedindo que as moléculas de água individuais se unam e formem núcleos de cristais de gelo (BENSON, 2008). Outra vantagem é a quiescência metabólica alcançada com a formação de vidros que previnem reações oxidativas entre os metabólitos. Para tecidos sensíveis à dessecação e ao resfriamento, como os das sementes de café, os processos utilizados para vitrificação, como a diminuição do volume de solvente, o acúmulo de soluto ou a queda da temperatura abaixo da qual ocorre a transição vítrea, dentre outros, podem ser prejudiciais (PAMMENTER; BERJAK, 2014).

O estresse no processo de criopreservação geralmente ocorre durante a dessecação e formação de cristais de gelo, e sua aplicação deve ser mais rápida que a ocorrência do dano potencial resultante, que em resposta a mudanças nas propriedades da água são causados por alterações mecânicas, estruturais e bioquímicas (WALTERS et al., 2008).

O sistema de membranas é afetado negativamente pela formação de cristais de gelo, o que compromete a sua semipermeabilidade (ENGELMANN, 2011). Além disso, os processos de resfriamento e reaquecimento podem levar à desnaturação de enzimas e à geração de espécies reativas a oxigênio ou EROs (BENSON; BREMNER, 2004; BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011; ROACH et al., 2008; WHITAKER et al., 2010). Essas EROs incluem o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e ânion superóxido (O_2^-) (ASADA, 2006).

Reduzir os danos oxidativos mediados por EROs através do aumento endógeno de antioxidantes ou pelo fornecimento de antioxidantes exógenos pode contribuir para o sucesso da criopreservação. O uso de água catódica gerada por eletrólise de uma solução contendo eletrólitos tem demonstrado efeitos antioxidantes (SHIRAHATA et al., 1997; HANAOKA, 2001;

HANAOKA et al., 2004; HIRAOKA et al., 2004), com grande potencial para melhorar as respostas ao estresse relacionado aos procedimentos de criopreservação em materiais vegetais (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011).

Pesquisando trabalhos sobre a secagem, resfriamento e reaquecimento relacionados à conservação do gênero *Coffea*, observam-se muitos resultados discordantes em relação a esses parâmetros, seja pelo teor de água final, temperatura (alta ou baixa) ou pela velocidade (lenta ou rápida) de realização de cada etapa (DUSSERT; ENGELMANN, 2006; VIEIRA et al., 2007; ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015). Assim, os efeitos dessas etapas em conjunto podem influenciar a qualidade final das sementes submetidas à criopreservação.

O objetivo com o presente trabalho foi investigar diferentes procedimentos de criopreservação de sementes de *Coffea arabica* L., avaliando efeitos após a imersão em nitrogênio líquido, sobre as características fisiológicas, bioquímicas e ultraestruturais das sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das sementes

Frutos em estágio de maturidade fisiológica (cereja), da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí amarelo IAC 62, foram colhidos em lavouras da Fazenda Experimental da Fundação Procafé, em Varginha (MG) e foram mecanicamente despolidos, sendo as sementes desmuciladas por fermentação em água, por período de 24 horas em temperatura ambiente, na Universidade Federal de Lavras (UFLA). Posteriormente, as sementes foram secadas superficialmente à sombra, em camada única sobre telado.

Após o processamento, as sementes foram submetidas à determinação do teor de água e avaliação da qualidade fisiológica inicial por meio do teste de germinação, de tetrazólio e de condutividade elétrica, no Laboratório Central de Sementes, da UFLA. No teste de germinação foram avaliadas, além da porcentagem de germinação (plântulas normais), a porcentagem de protrusão radicular, de plântulas normais fortes, de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, além da massa seca de plântulas.

Procedimentos de criopreservação

Foram investigados neste trabalho, oito protocolos de criopreservação, variando-se o teor de água, os métodos de secagem e as formas de resfriamento, de imersão em nitrogênio líquido e de reaquecimento das sementes de café, após a imersão em nitrogênio líquido. Destes protocolos, alguns foram definidos de acordo com resultados de experimentos preliminares realizados com as sementes de café, nesta pesquisa, e foram, também, utilizados outros protocolos encontrados na literatura para sementes desta espécie, os quais, embora se divirjam quanto aos protocolos de criopreservação, apresentaram resultados

satisfatórios (DUSSERT et al., 1997a; 1998; 2000; DUSSERT; ENGELMANN, 2006; EIRA et al., 2005). Os oito protocolos investigados nesta pesquisa combinaram dois diferentes teores de água e diferentes procedimentos de secagem, resfriamento, imersão no nitrogênio líquido e reaquecimento das sementes, conforme descrição na Tabela 1.

Tabela1 Descrição dos procedimentos utilizados nos 8 protocolos de criopreservação de sementes de *Coffea arabica* L.

ETAPAS DA CRIOPRESERVAÇÃO				
Protocolo	SECAGEM	RESFRIAMENTO	IMERSÃO	REAQUECIMENTO
1	Sílica gel até 20% bu	-1°C min. ⁻¹ até -40°C	Envelopes trifoliados de alumínio e imersão direta	Banho-maria, 40±1°C por 2 min.
2	Sílica gel até 20% bu	-1°C min. ⁻¹ até -40°C	Envelopes trifoliados de alumínio e imersão direta	Banho-maria, 40±1°C por 4 min.
3	Sílica gel até 20% bu	-1°C min. ⁻¹ até -40°C	Envelopes trifoliados de alumínio e imersão direta	Banho-maria, 40±1°C por 6 min.
4	Sílica gel até 17% bu	-1°C min. ⁻¹ até -40°C	Envelopes trifoliados de alumínio e imersão direta	Banho-maria, 40±1°C por 2 min.
5	Sílica gel até 17% bu	-1°C min. ⁻¹ até -40°C	Envelopes trifoliados de alumínio e imersão direta	Banho-maria, 40±1°C por 4 min.
6	Sílica gel até 17% bu	-1°C min. ⁻¹ até -40°C	Envelopes trifoliados de alumínio e imersão direta	Banho-maria, 40±1°C por 6 min.
7	Solução saturada de (NH ₄) ₂ SO ₄ (81% UR) até 17% bu	-1°C min. ⁻¹ até -50°C	Criotubos e imersão direta	Banho-maria, 40±1°C, por 2 min.
8	Solução saturada de NaCl (75% UR) até 17% bu	Sem resfriamento	Envelopes trifoliados de alumínio e imersão direta	Banho-maria, 40±1°C, por 2 min.

Procedimento de secagem em sílica gel

Para a secagem rápida em sílica, as sementes foram colocadas em recipiente hermético juntamente com 60 gramas de sílica gel ativada e mantidas em câmaras B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*), reguladas à 25°C, na ausência de luz. A perda de água durante a secagem foi monitorada até as amostras atingirem os teores de água de 20 e 17% (base úmida - bu).

Procedimento de secagem em solução salina saturada

Para a secagem lenta foram utilizados os mesmos tipos de recipientes e mesma temperatura e a secagem foi realizada em solução salina saturada, sendo que no protocolo 7 foi utilizado o sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄) e no protocolo 8, o cloreto de sódio (NaCl). A perda de água durante a secagem foi monitorada até as amostras atingirem os teores de água de 17% (base úmida).

Procedimento de resfriamento (pré-congelamento)

O resfriamento lento é uma etapa preparatória para a imersão no nitrogênio líquido e, neste experimento, as sementes de todos os protocolos, exceto o protocolo 8, foram acondicionadas em embalagens trifoliadas de papel alumínio ou em criotubos (TABELA 1). Posteriormente, foram resfriadas em um biocongelador *Icecube*, modelo 14S-B, *software* SY-LAB, Minitub do Brasil, a uma velocidade de -1°C min.⁻¹ até as temperaturas de -40°C ou -50°C. Após o resfriamento, as embalagens contendo as sementes foram imersas no nitrogênio líquido (-196°C). As amostras de sementes do procedimento 8 não foram submetidas ao resfriamento, sendo imersas diretamente no nitrogênio líquido após a secagem.

Procedimento de reaquecimento

Após 36 horas de criopreservação, as embalagens foram retiradas, rapidamente, do criotank e as sementes foram reaquecidas em contato direto com a água, em equipamento de banho-maria a $40^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, variando-se o tempo de imersão, de 2, 4 ou 6 minutos, em cada protocolo, conforme descrito na Tabela 1.

Imersão em água catódica

Após cada procedimento ser concluído parte das sementes foi submetida a tratamento antioxidante, que consistiu em reidratação das sementes em 250mL de água catódica durante 60 minutos, na presença de luz e em temperatura ambiente, segundo metodologia descrita por Berjak; Sershen; Pammenter (2011), com modificações: 1L de solução contendo os eletrólitos, 0,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi dividido e acondicionado em uma cuba horizontal, própria para corrida eletroforética. O circuito foi completado utilizando-se uma ponte salina à base de ágar contendo cloreto de potássio e a solução foi eletrolisada aplicando-se uma diferença de potencial de 60V. A eletrólise foi realizada durante uma hora, em temperatura ambiente, produzindo 500 mL de água anódica (oxidada) com pH próximo a 3-4, e 500 mL de água catódica (reduzida) com pH próximo a 11-12, a qual foi utilizada no experimento.

As sementes com e sem tratamento de água catódica foram secadas superficialmente em papel toalha, tiveram os pergaminhos retirados, manualmente, e foram submetidas à determinação do teor de água e às avaliações fisiológicas, bioquímicas e estruturais.

Determinação do teor de água

Realizado 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 das sementes.

Avaliações fisiológicas

- Teste de germinação:

Realizado com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, semeadas em rolos de papel tipo germitest umedecidos com água destilada na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Placas de acrílico foram utilizadas para a semeadura e as sementes foram acondicionadas em germinador, regulado a 30°C, na presença de luz (BRASIL, 2009). Foram determinadas a porcentagem de protrusão radicular aos 15 dias e a porcentagem de plântulas normais aos 30 dias após a semeadura, sendo computadas as sementes que apresentaram raiz principal e pelo menos duas raízes laterais. No teste de germinação determinou-se também a porcentagem de plântulas normais fortes, sendo computadas as plântulas que apresentaram hipocótilos com três centímetros ou mais, e porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias após a semeadura.

- Massa seca de plântulas:

Ao final do teste de germinação, foi determinada a massa seca da raiz e da parte aérea das plântulas normais, após secagem em estufa de circulação forçada de ar à 60°C por 4 a 5 dias ou até massa constante. A massa seca foi determinada em balança de precisão.

- Teste de tetrazólio:

Realizado em quatro repetições de 10 sementes embebidas em água por 36 horas para a extração dos embriões, os quais foram mantidos em solução

antioxidante de polivinilpirrolidona (PVP) até o momento da imersão em solução de tetrazólio 0,5% utilizando-se frascos escuros, em temperatura de 30°C por 3 horas (BRASIL, 2009; CLEMENTE et al., 2011). A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de uma lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para melhor visualização das estruturas internas e externas dos mesmos. Para isso, realizou-se um corte longitudinal ao meio dos embriões, os quais foram classificados em viáveis e inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (BRASIL, 2009).

- Teste de condutividade elétrica:

Realizado no sistema de massa com quatro repetições de 25 sementes, segundo metodologia de Krzyzanowsky; França Neto; Henning (1991), modificada. As sementes foram pesadas com precisão de duas casas decimais e em seguida, colocadas em copos plásticos descartáveis com 37,5 mL de água destilada. Após 24 horas de embebição a temperatura de 25 °C, a condutividade elétrica foi determinada em condutivímetro, sendo os resultados expressos em $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Análises bioquímicas

- Expressão de isoenzimas em géis de eletroforese:

Duas repetições de 50 sementes de cada tratamento foram armazenadas em temperatura de - 86°C até a realização das análises de enzimas por meio da técnica de eletroforese. As sementes, sem pergaminho, foram trituradas em moinho refrigerado a 4° C, a 22.500 RPM, na presença de PVP (polivinilpirrolidona) e armazenadas em temperatura de -86°C. Para a extração das enzimas foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 320 μL por 100mg de pó das sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido em geladeira por uma hora,

seguido de centrifugação a 14.000 RPM por 60 minutos, a 4°C. A corrida eletroforética ocorreu em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 40µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 150 V por 5 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), esterase (EST), peroxidase (PO), isocitrato liase (ICL), ascorbato peroxidase (APX) e glutathiona redutase (GR) (MITTLER; ZILINSKAS, 1993; LEE; LEE, 2000; ALFENAS et al., 2006).

- Integridade de proteínas resistentes ao calor em gel de eletroforese:

Para análise eletroforética das proteínas resistentes ao calor foram pesados em microtubos 100mg de sementes moídas de cada tratamento. A extração das proteínas foi efetuada adicionando-se 1000µL do tampão de extração (tris-HCl 50mM, pH=7,5; 500 mM NaCl; 5mM MgCl₂; 1mM PMSF) em 100mg do pó moído das sementes. Em seguida, os microtubos foram agitados em Vortex e centrifugados a 14.000 RPM por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi incubado em banho-maria a 85°C, por 15 minutos e, sendo novamente, centrifugado por 30 minutos a 14.000 RPM. Posteriormente, 70µL do sobrenadante foi vertido em microtubos, ao qual foi adicionado 40µL do tampão da amostra (5mL de glicerol, 2,5mL de solução tampão do gel concentrador, 2,5mg de azul de bromofenol e completado o volume para 25mL com água destilada). Em seguida, foram levados ao banho-maria em ebulição por 5 minutos, sendo 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 com tampão de corrida Tris-glicina + SDS pH 8,0 a 150 V por 4 horas e os géis foram corados em *Coomassie Blue* (0,5g *Coomassie Blue* R-250; 250mL de etanol; 50 mL de ácido

acético glacial, completando o volume até 500mL com água destilada), durante 12 horas e descorados em solução de ácido acético 10% e etanol 5%, conforme Alfenas; Brune (1998).

Análise ultraestrutural

As sementes foram imersas em solução fixativa *Karnovsky* modificado (glutaraldeído 25%, formaldeído 10% em tampão cacodilato de sódio 0,2M, pH 7,2), pH 7,2 e armazenadas em câmara fria a 10°C até o preparo para a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para o preparo, os materiais (sementes e embriões) foram lavados em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10min.), pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% por 1 hora e subsequentemente desidratados em uma série ascendente de concentração de acetona (30, 50, 70, 90 e 100% por três vezes). A desidratação final foi realizada em um aparelho de ponto crítico (BAL-TEC CPD 030). Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, com fita de carbono de dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro em um aparelho de Sputter (BAL-TEC SCD 050) e observados no microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40XVP. Imagens foram geradas e registradas digitalmente, com aumentos variáveis, para cada amostra, nas condições de trabalho de 20Kv e distância de trabalho entre 7 e 8mm.

Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 8 x 2, sendo oito protocolos de criopreservação e dois tratamentos de água catódica, com e sem imersão, com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram

comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, sementes foram submetidas à determinação de umidade e avaliação fisiológica, cujos resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Valores médios de teor de água (θ), de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MR), de massa seca da parte aérea (MPA), de embriões viáveis no sal de tetrazólio (EV) e de condutividade elétrica (CE) de sementes recém-colhidas de *Coffea arabica* L..

	θ (% bu)	PR (%)	PN (%)	PNF (%)	FC (%)	MR (cg)	MPA (cg)	EV (%)	CE ($\mu\text{S cm}^{-1}\text{g}^{-1}$)
Sementes	38	97	93	49	92	23,1	110,4	100	10,53

De acordo com estes resultados (TABELA 2), pode-se constatar a boa qualidade fisiológica das sementes recém-colhidas, com viabilidade de 93%.

Avaliação do teor de água

Após imersão em nitrogênio líquido e posterior reaquecimento, determinou-se o teor de água das sementes dos diferentes protocolos, com e sem imersão em água catódica e os valores foram comparados aos teores de água antes da criopreservação (TABELA 3).

Tabela 3 Teor de água (% bu) de sementes de café, antes (Ti) e após (Tf) diferentes protocolos de criopreservação. Protocolos: **1, 2 e 3**) Secagem em sílica gel até 20%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min.}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6min., respectivamente; **4, 5 e 6**). Secagem em sílica gel até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min.}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6min., respectivamente; **7**) Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min.}^{-1}$ até -50°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min.; **8**) Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, sem resfriamento controlado, e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min.. Sementes sem (**S**) e com (**C**) tratamento com água catódica.

Protocolo	Ti (% bu)	Tf (% bu)	Incremento de teor de água (% bu)
1S	20,5	25,7	5,2
1C	20,5	28,2	7,7
2S	20,5	26,1	5,6
2C	20,5	28,3	7,8
3S	20,5	25,7	5,2
3C	20,5	28,6	8,1
4S	17,1	22,9	5,8
4C	17,1	25,9	8,8
5S	17,1	22,1	5,0
5C	17,1	24,5	7,4
6S	17,1	23,5	6,4
6C	17,1	24,8	7,7
7S	17,4	19,1	1,7
7C	17,4	19,4	2,0
8S	17,5	19,2	1,7
8C	17,5	20,4	2,9

Sementes secadas em sílica gel até, aproximadamente, 20% e 17% bu tiveram um incremento de teor de água maior que as sementes secadas até 17% em soluções salinas saturadas. O maior aumento de teor de água (8,8%) ocorreu nas sementes do protocolo 4 (secadas em sílica gel até 17%, resfriadas à taxa de $-1^{\circ}\text{C min.}^{-1}$ até -40°C e reaquecidas por 2 min.), as quais foram imersas em água catódica. Já o menor aumento (1,7%) foi observado nas sementes dos protocolos 7 e 8, sem imersão em água catódica. Na embebição das sementes a água é inicialmente, atraída pelas paredes celulares e macromoléculas e, além disso, é

absorvida pela diferença de concentração entre a semente e a solução, mostrando assim, que os potenciais mátrico e osmótico são os responsáveis iniciais deste processo (CASTRO; HILHORST, 2004).

Avaliando-se as alterações nos teores de água, observa-se que o maior incremento ocorreu nos protocolos em que as sementes foram imersas por uma hora em água catódica, porém, para as sementes dos procedimentos submetidos à secagem lenta esse incremento foi menor. Esse resultado mostra que o tipo de secagem pode influenciar a velocidade de embebição da água pela semente, ou seja, se a secagem é rápida, a semente terá uma embebição mais rápida e vice-versa.

A diferença de velocidade de embebição pode influenciar a qualidade das sementes, pois há desorganização das estruturas das membranas celulares quando a água é retirada na secagem. Assim, na reidratação das sementes são necessários cuidados, pois a entrada muito rápida de água pode ocasionar danos por embebição. Estes danos podem ocorrer pela falta de tempo das membranas se reorganizarem e se converterem do estado cristalino para o líquido (FERREIRA; BORGHETTI, 2004), podendo provocar rompimento e consequentemente, liberação de exsudados.

Avaliações fisiológicas

De acordo com a análise de variância dos dados das avaliações da qualidade fisiológica das sementes submetidas à criopreservação, não foi constatada interação significativa entre os fatores investigados, protocolos de criopreservação e utilização da água catódica. A qualidade fisiológica das sementes imersas em água catódica não diferiu estatisticamente das que não receberam esse tratamento. Apenas houve efeito significativo do fator protocolos de criopreservação (FIGURA 1), indicando que a água catódica não atuou como

antioxidante nas sementes após criopreservação com reaquecimento e, portanto, pode não ter alterado a qualidade fisiológica das sementes quando imersas nessa solução.

O processo de reaquecimento é um fator determinante para tolerância de sementes de café à exposição em nitrogênio líquido (DUSSERT; ENGELMANN, 2006) e neste trabalho, os diferentes tipos de reaquecimento estudados não proporcionaram diferenças significativas entre os resultados (FIGURA 1).

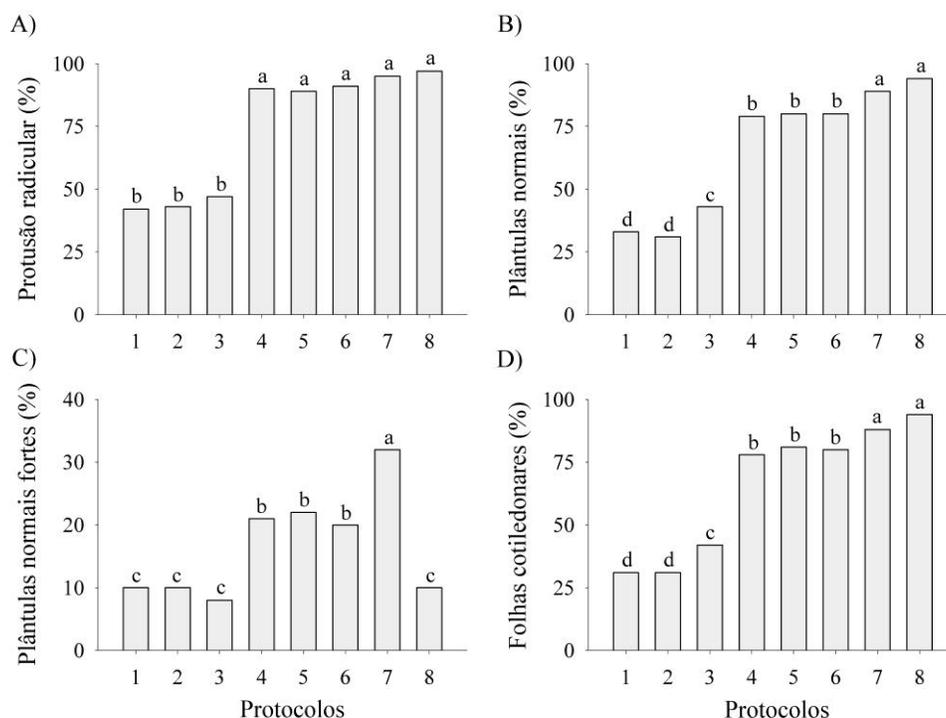


Figura 1 Resultados das avaliações da qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. Protocolos: **1, 2 e 3**) Secagem em sílica gel até 20%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6 min., respectivamente; **4, 5 e 6**). Secagem em sílica gel até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6 min., respectivamente; **7**) Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -50°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2 min.; **8**) Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, sem resfriamento controlado, e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2 min.. (Continua)

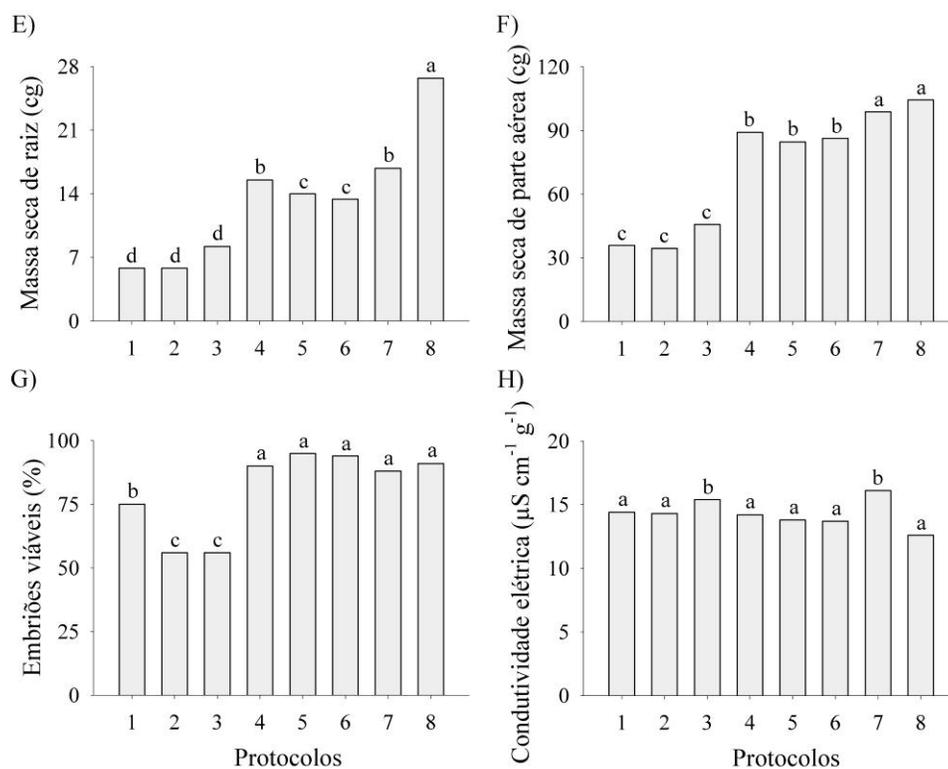


Figura 1 Resultados das avaliações da qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. Protocolos: **1, 2 e 3**) Secagem em sílica gel até 20%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6 min., respectivamente; **4, 5 e 6**). Secagem em sílica gel até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6 min., respectivamente; **7**) Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -50°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2 min.; **8**) Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, sem resfriamento controlado, e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2 min.. (Conclusão)

No teste de germinação, após 15 dias da sementeira, foi avaliada a porcentagem de protrusão radicular (FIGURA 1A) e as sementes que apresentaram maior vigor foram aquelas submetidas aos protocolos 4, 5, 6, 7 e 8.

Nestes protocolos, as sementes foram secadas, resfriadas e reaquecidas de formas variadas, porém todas foram secadas até o mesmo teor de água ($\approx 17\%$).

Na avaliação de plântulas normais aos 30 dias, as sementes dos protocolos 7 e 8 apresentaram maior porcentagem de plântulas normais, com 89% e 94%, respectivamente (FIGURA 1B), indicando que a forma de secagem em soluções salinas saturadas ou o tipo de resfriamento podem ter beneficiado estas sementes. Assim como as sementes recém-colhidas, estas sementes apresentaram alta germinação após criopreservação (TABELA 2). A viabilidade mais baixa ocorreu para os protocolos com teor de água mais elevado ($\approx 20\%$) (FIGURA 1B). Dussert; Engelmann (2006) também observaram que a tolerância à exposição em nitrogênio líquido foi maior quando sementes de café foram secadas em solução saturada de sal (81% UR). Graiver; Califano; Zaritzky (2011) constaram que após a criopreservação, as sementes de *Citrus*, de comportamento similar às de café, secadas em soluções salinas saturadas com intervalo de 64-85% de umidade relativa de equilíbrio também apresentaram maior viabilidade. Já Zhang et al. (2014) constataram resultado contrário, sendo que sementes de *Citrus* secadas em sílica gel apresentaram melhor viabilidade após a criopreservação.

Com relação aos resultados de porcentagem de plântulas normais fortes (FIGURA 1C), observa-se que o protocolo 7, em que as sementes foram secadas em solução saturada de sulfato de amônio e submetidas ao resfriamento controlado, proporcionou melhor resultado em relação ao protocolo 8, em que as sementes foram secadas em solução saturada de cloreto de sódio e não foram resfriadas.

Analisando os resultados de porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FIGURA 1D), observa-se maiores valores nos protocolos com sementes com teor de água de 17%, principalmente nos

protocolos 7 e 8, em que as sementes foram secadas em soluções salinas saturadas. A massa seca de raiz (FIGURA 1E) das sementes secadas em cloreto de sódio, até 17% e imersas diretamente no nitrogênio líquido (protocolo 8) se destacou em relação aos demais, assim como massa seca de parte aérea (FIGURA 1F) também apresentou destaque nas sementes secadas em soluções salinas saturadas em relação às sementes secadas em sílica gel. Segundo Berjak; Sershen; Pammenter (2011), diminuição na produção e desenvolvimento de raízes em espécies tropicais/subtropicais que produzem sementes recalcitrantes pode ocorrer devido à presença de espécies reativas ao oxigênio. De acordo com estas variáveis indicativas de vigor, nota-se redução da qualidade fisiológica quando as sementes foram submetidas à secagem até 20% bu.

Assim como observado nas sementes, a viabilidade dos embriões no teste de tetrazólio (FIGURA 1G) se manteve alta nos protocolos de sementes com teor de água de 17%. Sisunandar et al. (2010b) também observaram que a dessecação aumenta a viabilidade de embriões zigóticos de coco criopreservados e que o uso de rápida desidratação, congelamento e reaquecimento é um método eficiente para preservar o germoplasma dessa espécie (SISUNANDAR et al.; 2010a). Pukacki; Juszczak (2015) relataram que eixos embrionários de sementes recalcitrantes de *Acer pseudoplatanus* foram criopreservados com sucesso quando estes eram dessecados a um teor de água entre 15-20%.

Os resultados da condutividade elétrica (FIGURA 1H) foram maiores nas sementes submetidas aos protocolos 3 e 7. Como não existiu uma tendência lógica para este resultado, o dano às membranas celulares pode ter sido ocasionado pelos diferentes estresses aplicados a estas sementes, seja ele por meio da dessecação, resfriamento e reaquecimento, de forma isolada ou em conjunto.

De maneira geral, é possível afirmar que as sementes com menor conteúdo de água apresentaram melhor desempenho fisiológico, quando comparadas às que foram secadas até teor de água de 20% (protocolos 1, 2 e 3). Isso mostra que uma pequena variação no conteúdo de água da semente pode alterar a tolerância de sementes de café à criopreservação. Dussert; Engelmann (2006) afirmaram que, independentemente da taxa de secagem, existe um limite inferior absoluto de teor de água, abaixo do qual as sementes de café não sobrevivem. Moreira et al. (2014) também constataram melhora na viabilidade de sementes *Xyris cipoensis* (Xyridaceae) criopreservadas com menor teor de água. Graiver; Califano; Zaritzky (2011) afirmaram que a sobrevivência de sementes de *Citrus* à criopreservação depende de teor de água a um limite que evite a formação de gelo intracelular.

Avaliações bioquímicas

Eletroforese de isoenzimas

Analisando-se os perfis eletroforéticos de isoenzimas (FIGURA 2), observa-se que houve um aumento da atividade da enzima catalase nas sementes mais secas, ou seja, naquelas dos protocolos 4 em diante, sendo as sementes do protocolo 7 as que apresentaram maior atividade dessa enzima, independentemente da imersão em água catódica. Percebe-se que, na maioria dos protocolos testados, a atividade desta enzima diminuiu quando as sementes foram imersas nesta solução. Isso pode ter acontecido porque a água catódica pode atuar como antioxidante de espécies reativas a oxigênio, diminuindo assim, o conteúdo do substrato necessário para a atuação da catalase. Esta enzima decompõe H_2O_2 em H_2O e não é facilmente saturada por substratos, sendo um importante oxirredutor (SCANDALIOS, 2005). Como essas enzimas são removedoras de radicais livres, a maior atividade destas pode ser indicativo de

boa qualidade fisiológica. Neste trabalho, isso pôde ser confirmado, pois a maior atividade destas enzimas ocorreu em sementes com menor conteúdo de água e que, conseqüentemente, apresentaram melhor qualidade fisiológica.

A catalase é um bom indicador de qualidade fisiológica em sementes de café, como observado em outros trabalhos (SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013; ABREU et al., 2014; SANTOS et al., 2014; COELHO et al., 2015).

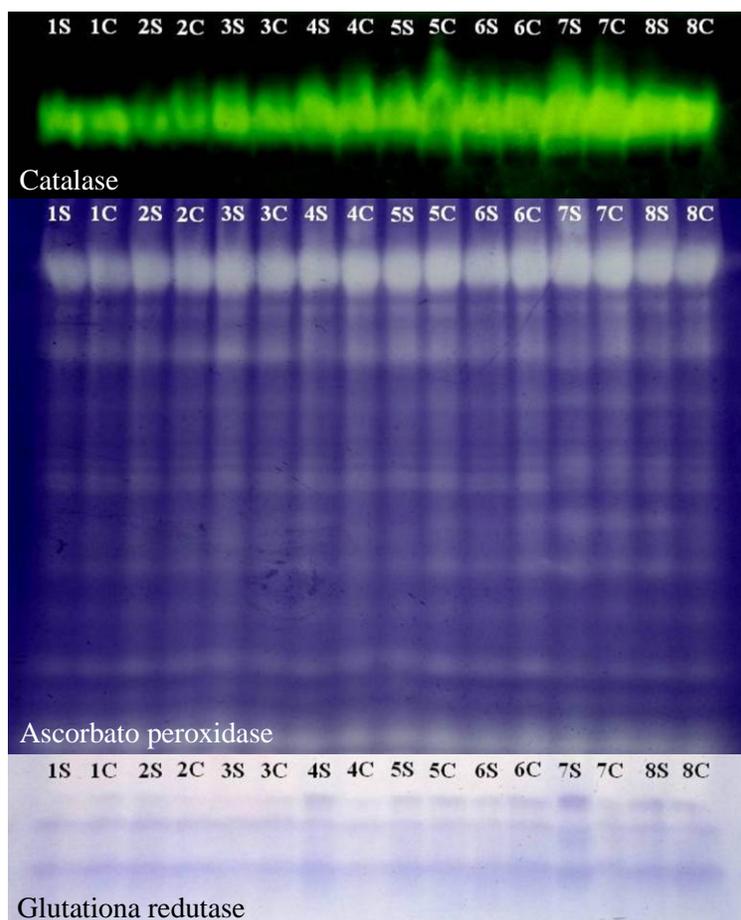


Figura 2 Padrão eletroforético de isoenzimas em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. Protocolos: **1, 2 e 3)** Secagem em sílica gel até 20%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6 min., respectivamente; **4, 5 e 6)** Secagem em sílica gel até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6 min., respectivamente; **7)** Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -50°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2 min.; **8)** Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, sem resfriamento controlado, e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2 min.. Avaliações realizadas sem (S) e com (C) água catódica.

Nas sementes de todos os protocolos, percebe-se uma alta atividade da enzima ascorbato peroxidase, com alta intensidade de bandas (FIGURA 2). Porém, não há diferenças aparentes na atividade desta entre os protocolos testados. Varghese; Naithani (2008) também observaram alta atividade dessa enzima em sementes de nim indiano criopreservadas. Segundo Mittler (2002), esta enzima é mais responsável pela fina modulação de espécies reativas ao oxigênio para sinalização do que pela remoção do excesso destes durante o estresse.

Maior intensidade de bandas da enzima glutathione redutase foram observadas em sementes dos protocolos 4, 7 e 8, não submetidas à imersão em água catódica (FIGURA 2). A enzima glutathione redutase reage com o oxigênio singlete e radicais hidroxila, regenera o ascorbato e protege os grupos tiol das enzimas (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002). De acordo com Wen et al. (2012), em amostras desidratadas de embriões de palmeira (*Livistona chinensis*) a atividade das enzimas ascorbato peroxidase e glutathione redutase diminuiu após o congelamento.

Em sementes com 17% (bu) secadas em sílica gel ou em solução saturada de sais, observou-se um aumento da intensidade de bandas da enzima peroxidase, com exceção das sementes do protocolo 8, que apresentaram baixa atividade (FIGURA 3). Este resultado pode estar relacionado à ausência de resfriamento destas sementes, as quais foram imersas diretamente em nitrogênio líquido, após a secagem. Além da função antioxidante, as peroxidases atuam na formação da parede celular, contribuindo para a integridade estrutural destas (GIJSEN, 1997). Assim, este protocolo pode ter beneficiado as sementes, as quais podem não ter sofrido com os danos de resfriamento e formação de cristais de gelo, sendo capazes de vitrificarem apenas com a dessecação que lhes foi imposta e não necessitando da intensa atuação desta enzima.

A baixa atividade da enzima peroxidase nas sementes dos protocolos 1, 2 e 3 pode ser explicada pelo menor dano ocasionado pela secagem. No entanto, pior qualidade fisiológica observada nestas sementes pode estar relacionada ao maior teor de água presente, ocasionando danos pela formação de cristais de gelo durante o processo de resfriamento destas. Desse modo, pode-se inferir que as sementes secadas até 17% bu, com exceção das que não foram resfriadas, sofreram danos devido à secagem e ao resfriamento, o que explica a maior expressão da peroxidase nestes tratamentos. Abreu et al. (2014) e Coelho et al. (2015) também constataram que a secagem de sementes de café aumenta a atividade desta enzima.

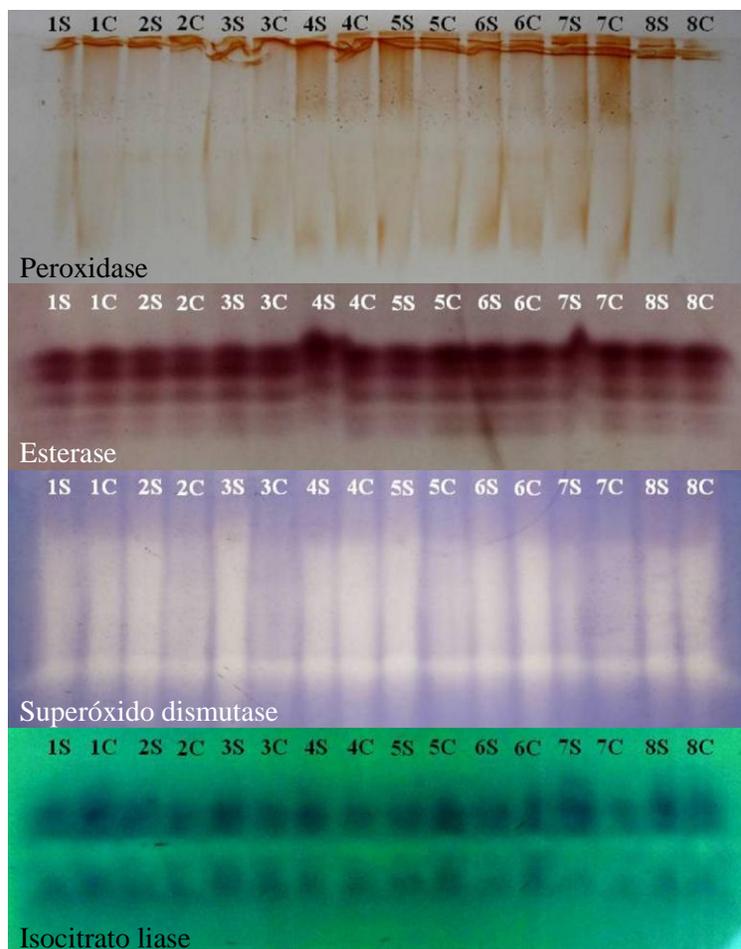


Figura 3 Padrão eletroforético de isoenzimas em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. Protocolos: **1, 2 e 3)** Secagem em sílica gel até 20%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6 min., respectivamente; **4, 5 e 6).** Secagem em sílica gel até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6 min., respectivamente; **7)** Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -50°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2 min.; **8)** Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, sem resfriamento controlado, e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2 min.. Avaliações realizadas sem (S) e com (C) água catódica.

A atividade da enzima esterase nas sementes de café também aumentou a partir do protocolo 4, mas foi maior nos protocolos 4 e 7, que não foram imersos em água catódica (FIGURA 3). Coelho et al. (2015) também observaram maior expressão dessa enzima em sementes de café secadas a menores teores de água, independentemente do método de secagem utilizado. A esterase é indicativo de deterioração em sementes (NAKADA et al., 2010), porém, neste trabalho o aumento da sua expressão em sementes mais secas não coincide com baixa qualidade fisiológica.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi menor nas sementes do protocolo 7, imersas ou não em água catódica e em outros tratamentos em que as sementes foram imersas na solução antioxidante, como os protocolos 2, 3 e 5 (FIGURA 3). Sementes de nim indiano (*Azadirachta indica* A. Juss) apresentaram alta atividade da enzima SOD após 24 horas criopreservadas e baixa quantidade de espécies reativas ao oxigênio (VARGHESE; NAITHANI, 2008). Coelho et al. (2015) também constataram baixa atividade dessa enzima em sementes de café com intervalo de 15-20% de teor de água (bu), indicativo de boa qualidade fisiológica.

Independentemente do protocolo adotado, a enzima isocitrato liase apresentou atividade nas sementes de todos os tratamentos, mas foi observado menor intensidade das bandas nas sementes secadas em soluções salinas saturadas dos protocolos 7 e 8 (FIGURA 3). A atividade dessa enzima é relacionada à germinação, obtendo-se valores máximos quando ocorre a maior taxa de degradação de lipídios e síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994). Kramer et al. (2010) observaram um declínio da expressão da isocitrato liase com o decréscimo do teor de água em sementes de café.

Analisando-se todos os perfis eletroforéticos, com exceção da catalase, observa-se que a água catódica não apresentou resultados consistentes. Isto é,

para uma mesma enzima, hora a água catódica proporcionou maior atividade enzimática nas sementes de um protocolo, hora proporcionou menor atividade. Este resultado está de acordo com os resultados da qualidade fisiológica, indicando que a água catódica não teve efeito antioxidante nas sementes de café submetidas à criopreservação, da forma como foi realizado neste trabalho, uma vez que os resultados da sua atuação não foram consistentes.

Eletroforese de proteínas resistentes ao calor

Nas avaliações das proteínas termo estáveis, observa-se maior quantidade de bandas em sementes submetidas aos protocolos 3 em diante (FIGURA 4). Segundo Santos et al. (2014), o acúmulo de proteínas resistentes ao calor pode estar associado com a qualidade fisiológica das sementes de café, o que corrobora os resultados observados neste trabalho. Apesar das sementes do protocolo 3 apresentarem 20% de teor de água, o maior número de bandas constatado pode estar relacionado ao fato dessas sementes terem sido submetidas a um maior tempo de reaquecimento (6 minutos), o que pode ter levado à síntese de proteína resistentes ao calor.

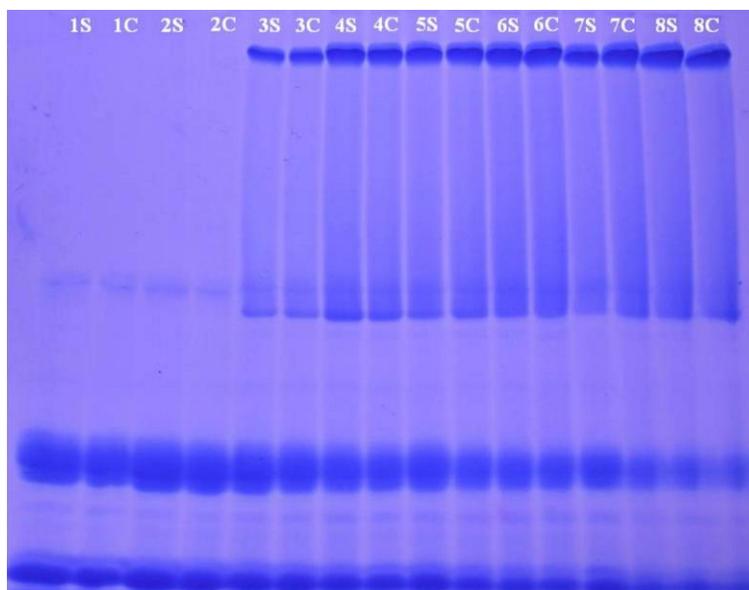


Figura 4 Padrão eletroforético de proteínas resistentes ao calor em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. Protocolos: **1, 2 e 3**) Secagem em sílica gel até 20%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6min., respectivamente; **4, 5 e 6**). Secagem em sílica gel até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2, 4 e 6min., respectivamente; **7**) Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -50°C , e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min.; **8**) Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, sem resfriamento controlado, e reaquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min.. Avaliações realizadas sem (S) e com (C) água catódica.

Abreu et al. (2014) constataram que o perfil de bandas da proteínas resistentes ao calor foi mais intenso em sementes de café submetidas à secagem mais lenta e que a redução do teor de água induziu à síntese dessas proteínas. No entanto, no presente trabalho percebe-se que apesar do número de bandas ser maior em sementes mais secas, a intensidade das bandas diminuiu na ordem crescente dos protocolos e que a imersão em água catódica também propiciou a diminuição da intensidade destas em todos os protocolos estudados.

Proteínas LEA são mais flexíveis estruturalmente em condições aquosas e mais estáveis em menor teor de água e podem apresentar várias isoformas em um organismo, sendo capaz de executar diversas funções (HAND et al., 2011), tais como, atuar na estabilidade de membranas, no balanço redox e na homeostase de proteínas e ácidos nucleicos (TUNNACLIFFE et al., 2010). Assim, torna-se difícil a análise da interação de sua atividade com o desempenho fisiológico de sementes.

Avaliações ultraestruturais

O resultado das análises ultraestruturais em células do endosperma e do embrião de sementes de café submetidas a diferentes protocolos de criopreservação pode ser observado nas Figuras 5, 6 e 7.

Os protocolos de criopreservação escolhidos para serem analisados em microscopia eletrônica de varredura foram aqueles, cujas sementes apresentaram resultados fisiológicos e bioquímicos contrastantes. Como o tempo de reaquecimento não influenciou a qualidade fisiológica e bioquímica das sementes optou-se por analisar as sementes submetidas ao menor tempo de reaquecimento, com diferentes formas de secagem e resfriamento. Portanto, os protocolos escolhidos foram o 1, 4 e 8, em que as sementes não foram imersas em água catódica, uma vez que o efeito deste tratamento foi menos relevante.

Na Figura 5, observa-se a estrutura geral das células do embrião e do endosperma das sementes dos protocolos escolhidos, bem como as alterações provocadas pela criopreservação. Observa-se que a integridade da membrana celular foi influenciada pelo protocolo testado e que a membrana celular das células das sementes do protocolo 1 (FIGURA 5A) apresentou maior degradação quando comparada às sementes dos outros protocolos (FIGURA 5B e 5C). Esta

degradação mais acentuada facilita a visualização de maior quantidade de glóbulos de óleo presentes no embrião do que no endosperma.

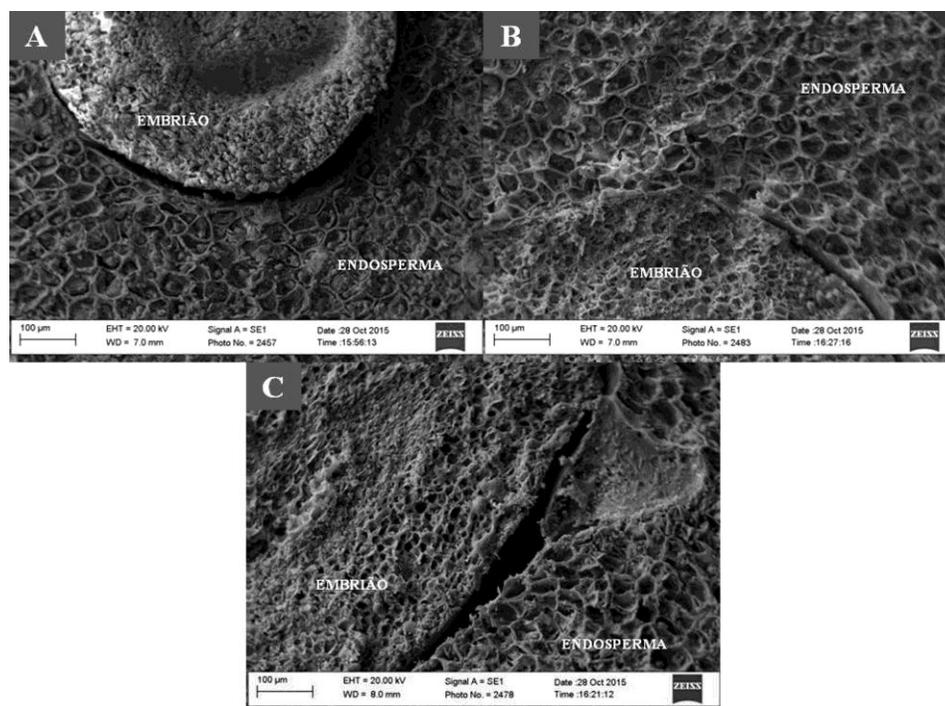


Figura 5 Microscopia eletrônica de varredura em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. Protocolos: 1. Secagem em sílica gel até 20%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e aquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min. (A); 4. Secagem em sílica gel até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e aquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min. (B); 8. Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, sem resfriamento controlado, e aquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min. (C). Estes protocolos não foram tratados com água catódica. Detalhes das células do embrião e das células do endosperma.

Analisando-se as eletromicrografias das células dos endospermas das sementes de café (FIGURA 6), verifica-se que no protocolo 1 (FIGURA 6A), as células se apresentam mais túrgidas, porém, nota-se que a integridade da

membrana plasmática de algumas células foi comprometida, resultando no extravasamento do citoplasma. O teor de água presente nestas sementes era maior, por isso, podem ter sofrido mais danos, ocasionados pela formação de cristais de gelo durante o resfriamento. Nos trabalhos de Saath et al. (2010), em grãos de café secados até teores de água entre 30-20% (bu) houve também, comprometimento da estrutura celular das células do endosperma.

Nas células das sementes submetidas aos protocolos 4 e 8 (FIGURAS 6B e 6C, respectivamente), nota-se que a parede celular retraiu e uma diminuição no conteúdo celular é constatada, entretanto apresentam-se íntegras. Há menor degradação da membrana plasmática celular e por consequência, observa-se menor quantidade de glóbulos de óleo. Esse resultado pode estar relacionado à maior dessecação imposta nestas sementes, propiciando maior tolerância à criopreservação. Saath et al. (2010) também constataram redução do volume celular de células do endosperma de grãos de café à medida que o teor de água foi reduzido.

Assim como foi observado na qualidade fisiológica das sementes, não foi possível detectar uma diferença discrepante na estrutura celular do endosperma entre estes dois últimos protocolos (FIGURA 6B e 6C), apesar de terem sido submetidos a diferentes formas de secagens e de resfriamento.

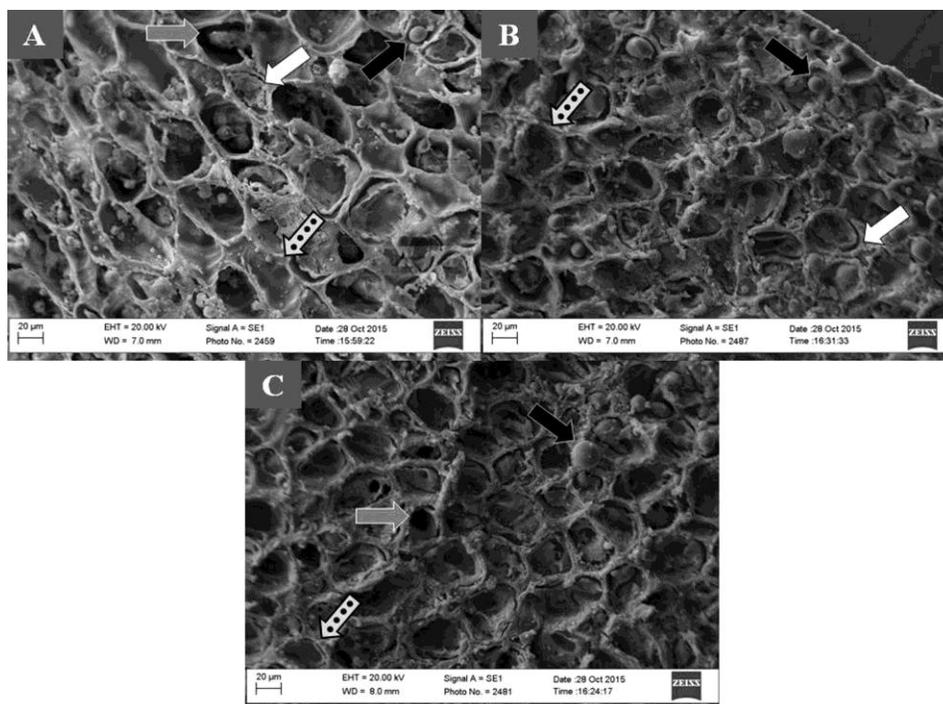


Figura 6 Microscopia eletrônica de varredura em endospermas de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. Protocolos: 1. Secagem em sílica gel até 20%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e aquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min. (A); 4. Secagem em sílica gel até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e aquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min. (B); 8. Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, sem resfriamento controlado, e aquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min. (C). Estes protocolos não foram tratados com água catódica. Detalhes de células contraídas (setas brancas), gotas de óleo (setas pretas), espaços celulares vazios (setas cinzas) e espaços intercelulares preenchidos (setas com círculos).

As estruturas das células dos embriões dos diferentes protocolos analisados se mantiveram similares (FIGURA 7). Em todas as eletromicrografias é possível observar células contraídas, presença de glóbulos de óleo, células túrgidas e íntegras e também extravasamento de conteúdo celular. Este resultado

pode ser indicativo de que os danos da criopreservação são menos drásticos nas células de embriões que nas de endospermas, sendo os embriões mais tolerantes a esse tipo de estresse. Este resultado corrobora com os de outros autores que realizaram trabalhos de secagem e criopreservação de sementes de café (DUSSERT; ENGELMANN, 2006; COELHO et al., 2015).

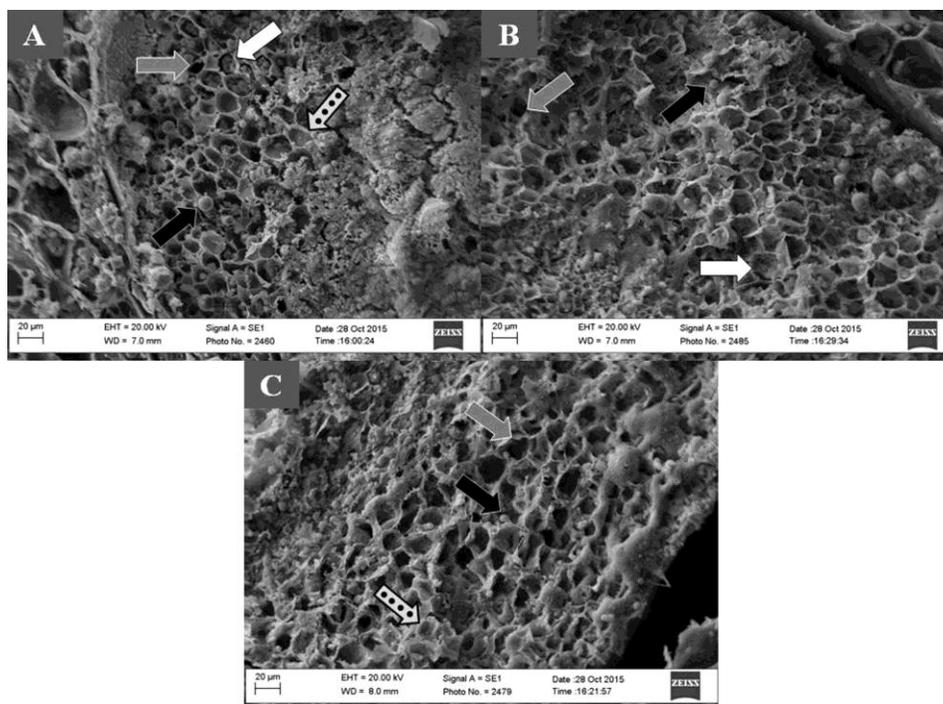


Figura 7 Microscopia eletrônica de varredura em embriões de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes protocolos de criopreservação. Protocolos: 1. Secagem em sílica gel até 20%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e aquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min. (A); 4. Secagem em sílica gel até 17%, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até -40°C , e aquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min. (B); 8. Secagem em solução saturada de NaCl até 17%, sem resfriamento controlado, e aquecimento a $40\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 2min. (C). Estes protocolos não foram tratados com água catódica. Detalhes de células contraídas (setas brancas), gotas de óleo (setas pretas), extravazamento do conteúdo celular (setas cinzas) e células intactas (setas com círculos).

A velocidade de secagem e o teor final de água, assim como o resfriamento utilizado tiveram efeito significativo sobre a qualidade fisiológica, bioquímica e estrutural das sementes de café. Coelho et al. (2015) também

observaram efeito da taxa de secagem e teor final de água sobre a qualidade fisiológica de sementes de café, quando submetidas a temperaturas sub-zero.

Analisando todas as avaliações realizadas neste trabalho, constata-se melhores resultados fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais em sementes submetidas aos protocolos de criopreservação 7, ou seja, secagem em solução saturada de sulfato de amônio até 17% bu, resfriamento a $-1^{\circ}\text{C min.}^{-1}$ até -50°C , e reaquecimento a $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 2min. e protocolo 8 com a secagem em solução saturada de cloreto de sódio até 17% bu, sem resfriamento controlado, e reaquecimento a $40 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 2min.. Porém, o biocongelador utilizado no protocolo 7, onera o custo da conservação de sementes de café em nitrogênio líquido, além de acrescentar uma complicação metodológica. Assim, o melhor protocolo de criopreservação de sementes de *Coffea arabica* L. analisado neste trabalho é o procedimento 8.

Em outras espécies, também sensíveis à dessecação e ao resfriamento, a imersão direta é a melhor opção. Michalak; Plitta-Michalak; Chmielarz (2015) observaram que sementes de cereja toleram criopreservação quando são secadas a um intervalo de teor de água entre 17-20% (bu) e são imersas diretamente em nitrogênio líquido.

4 CONCLUSÕES

O tempo de reaquecimento após imersão em nitrogênio líquido e a imersão em água catódica não influenciam a qualidade fisiológica de sementes de café criopreservadas para os tratamentos testados. No entanto, os diferentes métodos de secagem e formas de resfriamento influenciam, consideravelmente, a qualidade fisiológica, bioquímica e ultraestrutural das sementes.

As sementes de café criopreservadas com teor de água de 17% bu respondem melhor à criopreservação, quando comparadas às sementes com teor de água de 20% bu.

Sementes de *Coffea arabica* L. secadas até 17% bu em 75% de umidade relativa e imersas diretamente em nitrogênio líquido, têm a qualidade preservada.

AGRADECIMENTOS

À Capes, ao CNPq, à Fapemig, à Embrapa e à UFLA pelo financiamento do estudo e pela concessão de bolsas.

REFERÊNCIAS

- 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, Oct./Dec. 2014.
- 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 Microrganismos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1998, p. 201-328.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 627 p.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidant system in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, May 2002.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 391-396, June 2006.
- BENSON, E. E.; BREMNER, D. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap. 6, p. 205-241.
- BENSON, E.E. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory and practice. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Apopka, v. 27, n. 3, p. 141-219, July 2008.
- BERJAK, P.; SERSHEN, B. V.; PAMMENTER, N. W. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 21, n. 3, p. 187-203, Sept. 2011.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994, 445 p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

CASTRO, R. D.; HILHORST, R. H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: Do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, p. 149-162.

CHEN, X. L. et al. Cryopreservation of *in vitro*-grow apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. **South African Journal of Botany**, Amsterdam, v. 77, n. 2, p. 397-403, Apr. 2011.

CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 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, jun. 2015.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de café**, Safra 2015 - Primeiro levantamento, Janeiro 2015. Brasília: Conab, v. 1, n. 3, p. 1-41, 2015.

DULLOO, M. E. et al. Cost efficiency of cryopreservation as a long-term conservation method for coffee genetic resources. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2123-2138, 2009.

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, May/June 2006.

DUSSERT, S. et al. Beneficial effect of post-thawing osmoconditioning on the recovery of cryopreserved coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. **CryoLetters**, Cambridge, v. 21, n. 1, p. 47-52, Jan./Feb. 2000.

_____. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **CryoLetters**, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 269-276, 1997a.

_____. Cryopreservation of seed of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 8, n. 1, p. 9-15, Feb. 1998.

EIRA, M. T. S. et al. **Banco de sementes de café em criopreservação: experiência inédita do Brasil**, Circular Técnica 42, Brasília, DF, 6 p, 2005.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, Sept. 1990.

ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, New York, v. 40, n. 5, p. 427-433, Sept. 2004.

_____. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, New York, v. 47, n. 1, p. 5-16, Feb. 2011.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004, 324 p.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, Nov./Dec. 2011.

GIJSEN, M. A deletion mutation at the *ep* locus causes low seed coat peroxidase activity in soybean. **The Plant Journal**, Oxford, v. 12, n. 5, p. 991-998, Nov. 1997.

GRAIVER, N.; CALIFANO, A.; ZARITZKY, N. Partial dehydration and cryopreservation of *Citrus* seeds. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 91, n. 14, p. 2544–2550, Nov. 2011.

HANAOKA, K. Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride solutions. **Journal of Applied Electrochemistry**, Heidelberg, v. 31, n. 12, p. 1307-1313, Dec. 2001.

HANAOKA, K. et al. The mechanism of enhanced antioxidant effects against superoxide anion radicals of reduced water produced by electrolysis. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 107, n. 1, p. 71-82, Jan. 2004.

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.

HIRAOKA, A. et al. Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of 'active hydrogen'. **Journal of Health Science**, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 456-465, 2004.

KRAMER, D. et al. Stress metabolism in green coffee beans (*Coffea arabica* L.): expression of dehydrins and accumulation of GABA during drying. **Plant and Cell Physiology**, Tokyo, v. 51, n. 4, p. 546-553, Apr. 2010.

KRZYŻANOWSKY, 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, mar. 1991.

LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Shannon, v. 159, n. 1, p. 75-85, Oct. 2000.

MICHALAK, M.; PLITTA-MICHALAK, B. P.; CHMIELARZ, P. A new insight in desiccation tolerance and cryopreservation of mazzard cherry (*Prunus avium* L.) seeds. **Central European Journal of Biology**, Louisville, v. 10, n. 1, p. 354-364, May 2015.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, Cambridge, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 212, n. 2, p. 540-546, Aug. 1993.

MONDEGO, J. M. C. et al. An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. **BMC Plant Biology**, London, v. 11, n. 30, p. 1-23, Feb. 2011.

MOREIRA, F. C. et al. Dehydration and cryopreservation of *Xyris Cipoensis* seeds. **Acta Horticulturae**, Leuven, v. 1039, p. 243-246, 2014.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p. 42-051, 2010.

PAMMENTER, N. W; BERJAK, P. Physiology of desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 21-28, Jan. 2014.

PUKACKI, P. M.; JUSZCZYK, K. Desiccation sensitivity and cryopreservation of the embryonic axes of the seeds of two *Acer* species. **Trees**, Heidelberg, v. 29, n. 2, p. 385–396, Apr. 2015.

ROACH, T. et al. An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 133, n. 2, p. 131-139, June 2008.

_____. Microscopia eletrônica de varredura do endosperma de café (*Coffea arabica* L.) durante o processo de secagem. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 1, p. 196-203, jan./fev. 2010.

SANTOS, F. C. et al. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2014.

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, Dec. 2013.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 38, n. 7, p. 995-1014, July 2005.

SHIRAHATA, S. et al. Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 234, n. 1, p. 269–274, May 1997.

SISUNANDAR et al. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings. **Planta**, Berlin, v. 232, n. 2, p. 435-447, July 2010.

_____. Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryobiology**, Amsterdam, v. 61, n. 3, p. 289-296, Dec. 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.

VARGHESE, B.; NAITHANI, S. C. Oxidative metabolism-related changes in cryogenically stored neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 165, n. 7, p. 755-765, May 2008.

VIEIRA, A. R. et al. Armazenamento de sementes de cafeeiro: ambientes e métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 76-82, abr. 2007.

WALTERS, C. et al. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008, p. 465-484.

WEN, B. et al. Cytological and physiological changes in recalcitrant Chinese fan palm (*Livistona chinensis*) embryos during cryopreservation. **Protoplasma**, Wien, v. 249, n. 2, p. 323-335, Apr. 2012.

WHITAKER, C. et al. Production of reactive oxygen species in excised and cryopreserved explants of *Trichilia dregeana* Sond. **South African Journal of Botany**, Matieland, v. 76, n. 1, p. 112-118, Jan. 2010.

ZHANG, N.; WEN, B.; J. I. M.; YAN, Q. Low-temperature storage and cryopreservation of grapefruit (*Citrus paradisi* Macfad.) seeds. **CryoLetters**, Cambridge, v. 35, n. 5, p. 418-426, Sept./Oct. 2014.

APÊNDICE A - Tabela da análise de variância do artigo 4

Tabela 1 Resumo da análise de variância dos dados referentes a porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA), de embriões viáveis (EV) e de condutividade elétrica (CE) de sementes de café criopreservadas por diferentes protocolos, imersas ou não em água catódica após o reaquecimento.

FV	GL	Quadrados Médios							
		PR	PN	PNF	FC	MSR	MSPA	EV	CE
Protocolos (P)	7	5115,4286**	5355,2857**	561,6786**	5499,9643**	384,6310**	6678,3021**	2110,7143**	8,9131**
Água catódica (AC)	1	36,0000	49,0000	2,2500	2,2500	1,9252	4,9506	6,2500	0,0352
P x AC	7	102,2857	63,8571	67,3929	68,5357	1,4716	57,9442	141,9643	2,2432
Erro	48	65,6667	75,3333	47,0833	77,9167	5,5029	127,9218	70,8333	2,1918
CV (%)	-	10,95	13,18	42,06	13,52	17,68	15,62	10,44	10,36

** e *. Significativo aos níveis de 1 e 5% de probabilidade, respectivamente, pelo teste F.