



**ROBERTO LUIZ DE AZEVEDO**

**INCREMENTO GERMINATIVO DA SEMENTE  
DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.): APLICAÇÃO DE  
UM CAMPO MAGNÉTICO UNIFORME COM  
MONITORAMENTO PELO BIOSPECKLE LASER**

**LAVRAS – MG  
2018**

**ROBERTO LUIZ DE AZEVEDO**

**INCREMENTO GERMINATIVO DA SEMENTE DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.): APLICAÇÃO DE UM CAMPO MAGNÉTICO UNIFORME COM MONITORAMENTO PELO BIOSPECKLE LASER**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Instrumentação, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior  
Orientador

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães  
Dr. Peter Edwin Toorop  
Coorientadores

**LAVRAS – MG  
2018**

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

Azevedo, Roberto Luiz de.

Incremento germinativo da semente do café (*Coffea arabica* L.):  
aplicação de um campo magnético uniforme com monitoramento  
pelo biospeckle laser / Roberto Luiz de Azevedo. – 2018.

140 p. : il.

Orientador: Roberto Alves Braga Júnior.

Coorientadores: Renato Mendes Guimarães, Peter Edwin Toorop.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Magnetismo. 2. Germinação. 3. Café. I. Braga Júnior, Roberto  
Alves. II. Guimarães, Renato Mendes. III. Toorop, Peter Edwin. IV.  
Título.

**ROBERTO LUIZ DE AZEVEDO**

**INCREMENTO GERMINATIVO DA SEMENTE DO CAFÉ (*Coffea arabica* L.): APLICAÇÃO DE UM CAMPO MAGNÉTICO UNIFORME COM MONITORAMENTO PELO BIOSPECKLE LASER**

**COFFEE (*Coffea arabica* L.) SEED GERMINATION INCREMENT: THE USE OF A UNIFORM MAGNETIC FIELD THROUGH BIOSPECKLE LASER MONITORING**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, área de concentração em Instrumentação, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 22 de outubro de 2018.

Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães	UFLA
Dr. Caio César Salgado	KLABIN
Prof. Dr. Leandro Carlos Paiva	IFSULDEMINAS - Câmpus Machado
Prof. Dr. José Luiz Contado	UFLA
Dra. Ellen W. N. Contado	UFLA

Prof. Dr. Roberto Alves Braga Júnior  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2018**

*A DEUS,  
que, durante toda a minha existência, jamais me abandonou,  
caminhando, sempre, ao meu lado, norteando-me em minha caminhada,  
fortalecendo-me nos momentos difíceis e  
me erguendo nas quedas.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre prover maravilhas e bênçãos em minha vida, por me dar a oportunidade de realizar esse meu grande sonho, por revigorar minhas forças nos infortúnios, por conceder-me saberes e competências para conduzir este trabalho e por ter e ser presença irrefragável.

Ao meu pai João, exemplo de honestidade, garra e companheirismo, à minha mãe Ariadine, pelas longas horas de orações, minha irmã Roseli, sempre com um bom aconselhamento para dar, meu filho Guilherme, pela paciência e compreensão pela minha ausência, minha esposa Meire, pela cumplicidade e comprometimento com minha causa.

Agradeço ao meu orientador professor Roberto, pelos ensinamentos que foram muito além dos acadêmicos, pela paciência, dedicação e comprometimento com a orientação. Pela sua capacidade de sempre ver o lado bom das coisas. Você é uma pessoa ímpar.

Aos meus coorientadores, professores Renato e Peter, sempre disponíveis e próximos para ajudar com ideias e sugestões, compartilhando seus conhecimentos.

Aos meus amigos(as)/irmãos(ãs) da família CEDIA, Ellen, sempre muito solícita; Elizangela, com sua ternura e meiguice nos contagiava; Thiago Paiva, cruzeirense, não precisa falar mais nada; Bianca, sempre serena; Henrique, sempre com uma saída engenhosa para sugerir; José Eduardo, sempre disposto a ajudar; Ana, nome pequeno, mas de um coração grandioso; Fernando, ajudou-me enormemente com as rotinas do Mat Lab. Pelo companheirismo e parceria dos amigos Dione, Thiago Ribeiro, Daniel, Alcebíades, Alessandro. Pela convivência harmoniosa com os amigos que estão, agora, desbravando outros horizontes: Diego Costa, Renan, Baiano, Diego Catalano, Diego Aranha, Rodrigo, Paulianni.

À ajuda incondicional e determinante do Caio, uma das engrenagens fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais – Campus Machado que, inicialmente, flexibilizou meus horários de aulas e, posteriormente, concedeu liberação integral para a realização do doutorado. E por permitir a participação do professor Dr. Leandro como membro da banca, agradeço.

Ao, agora aposentado, Sr. Antônio e, ao botafoguense Sérgio, sempre muito dispostos a ajudar, figuras emblemáticas do CEDIA.

À Dona Josélia, sempre zelosa com as dependências do CEDIA, sem contar seu cafezinho delicioso.

Aos mestrandos Marcos Vinício, Laís e ao doutorando Leandro, pela imperiosa ajuda nas análises fisiológicas das sementes.

Ao Departamento de Sementes, por permitir a utilização de toda a infraestrutura para a realização das pesquisas.

Aos funcionários do Laboratório de sementes LAS, Geraldo e Dalva sempre dispostos a ajudar na medida do possível.

À Fazenda Experimental de Varginha, Fundação Pró-Café, na cidade de Varginha, pelo fornecimento das sementes para o experimento.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudo durante um ano e meio para auxiliar no desenvolvimento desse projeto, meu muito obrigado.

À banca, composta pelos doutores: Caio César Salgado, Leandro Carlos Paiva, Ellen Waleska da Fonseca Contado, José Luiz Contado que aceitaram o convite que lhes foi feito e, dessa forma, colaboraram para a conclusão deste projeto.

À KLABIN, por flexibilizar a participação de seu funcionário, Caio, como membro da banca de avaliação.

À Helem, secretária da pós-graduação, pela paciência e competência nas inúmeras dúvidas esclarecidas.

À Universidade Federal de Lavras pela estrutura e oportunidade de desenvolver este projeto.

**QUE DEUS  
OS ABENÇOE...**

*“..... Cristo, no qual estão escondidos todos os  
tesouros da sabedoria e da ciência.”  
Colossenses 2.2,3*

## RESUMO

Um dos grandes empecilhos na formação e produção de mudas de café (*Coffea arabica* L), reside no fato de as sementes apresentarem uma germinação lenta e não uniforme, o que impacta diretamente na qualidade dessas mudas e no tempo hábil de seu plantio no campo. Pesquisas sobre tratamentos pré-germinativos das sementes de café (*Coffea arabica* L.), têm sido realizadas no sentido de minimizar o tempo de germinação ou melhorar a uniformidade das mudas e, conseqüentemente, repercutindo na eficiência das lavouras. Dessa forma, o objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos sobre a germinação das sementes de café, pela aplicação de um campo magnético constante como um condicionamento pré-germinativo. As análises pós-tratamento magnético foram por meio do Biospeckle Laser (BSL) consorciadamente aos testes tradicionais de viabilidade de sementes. Foram utilizadas 3000 sementes submetidas a campos magnéticos de intensidade constante e valores de 10 mT e 28 mT por um mesmo intervalo de tempo de 6 dias, durante seu processo de germinação em germinadores. Iluminou-se com luz laser a região do embrião e as imagens obtidas pelo Biospeckle Laser (BSL) foram processadas e os resultados dos níveis de atividade dessa região foram, posteriormente, comparados com os dados obtidos pela análise fisiológica tradicional de sementes. Além dos resultados de atividade do BSL, foram obtidos outros resultados das análises de sementes, durante o processo de germinação, tais como: IVE, isoenzimático (SOD, CAT, EST, MDH e endobetamanase), integridade de membranas, germinação, IVG e protrusão. Concluiu-se que o pré-tratamento magnético com ambas as intensidades de campo, durante os primeiros 6 (seis) dias de germinação, propiciou uma melhora na permeabilidade das membranas celulares, uma ativação precoce do sistema antirradicular, além de promover uma germinação mais rápida e uniforme das sementes.

**Palavras-chave:** Magnetismo. Germinação. Café. BSL.

## ABSTRACT

One of the main obstacles in producing coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings is the fact that coffee seeds present low germination rates as well as irregular germination, which directly affect seedling quality and planting time in the field. Research on coffee (*Coffea arabica* L.) seed pre-germination treatments has been conducted to decrease germination time and improve seedling uniformity in order to increase efficiency in the field. The objective of the present study was to evaluate the effect of stationary magnetic field pre-germinative conditioning on coffee seed germination. Three thousand seeds were placed in germinators, where they were subjected to magnetic fields at constant intensities of 10 mT and 28 mT for a time interval of 6 days during germination. The embryonic region of the seeds was illuminated by a laser and images were captured by a Biospeckle Laser (BSL). After processing the images, activity levels in the embryonic region were compared with the data obtained through traditional seed physiological analysis, including Emergence Speed Index, isozymes (SOD, CAT, EST, MDH, and endo- $\beta$ -mannanase), membrane integrity, germination, Speed Germination Index (SGI), and protrusion. The magnetic field pre-treatments of both intensities over the six-day period improved both cell membrane permeability and were associated with early activation of the anti-radicle system, in addition to promoting faster and more uniform seed germination.

**Keywords:** Magnetism. Germination. Coffee. BSL.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Força magnética atuando em um íon de cálcio e um próton. ....	32
Figura 2 - Canais iônicos. ....	37
Figura 3 - Corte transversal e longitudinal de uma semente de café.....	39
Figura 4 - Intensidade de um pixel de padrão speckle espalhado a partir de um objeto inanimado e de um tecido biológico.....	40
Figura 5 - Imagem do <i>speckle</i> de uma maçã. ....	42
Figura 6 - Graduações dos níveis de cinza. ....	44
Figura 7 - Construção de uma imagem THSP. A linha central é registrada em momentos sucessivos. ....	45
Figura 8 - Resultado da aplicação do método de contraste no conjunto de imagens de uma semente de café. ....	48
Figura 9 - Resultado da aplicação do método da homogeneidade no conjunto de imagens de uma semente de café.....	49
Figura 10 - Semente de café com a região embrionária em destaque (região de interesse). Região com iluminação normal. ....	50
Figura 11 - Disposição dos equipamentos experimentais durante a captura de imagens e iluminação pelo laser. ....	51
Figura 12 - Imagem de uma semente de café pré-processada (AVD) com a região embrionária de interesse em destaque. ....	52
Figura 13 - Dimensões do ímã. ....	61
Figura 14 - Identificação dos polos do ímã (a). Associação de dois ímãs (b). ....	62
Figura 15 - Aspecto geral da fita de papel “germitest” e posicionamento das sementes na mesma antes de serem levadas ao ímã.....	63
Figura 16 - Posicionamento das sementes para serem submetidas ao campo magnético. ....	63

Figura 17 - Posicionamento das sementes entre os ímãs. ....	64
Figura 18 - Esquema de medição do campo magnético entre os ímãs utilizando o Gaussmeter. ....	65
Figura 19 - Síntese da etapa 1 do processo de magnetização das sementes.....	68
Figura 20 - Síntese da etapa 2 do processo de magnetização das sementes.....	69
Figura 21 - Linha do tempo com as etapas dos experimentos. ....	71
Figura 22 - Desenvolvimento das sementes do cafeeiro no decorrer do tempo.....	88
Figura 23 - Comparação das plântulas para os tratamentos de: (a) 28 mT e (b) 10 mT no septuagésimo sexto dia de semeadura.....	91
Figura 24 - Perfil eletroforético da expressão da enzima catalase. ....	92
Figura 25 - Imagens das bandas de expressão da enzima catalase pós- processamento com o programa Image J. ....	93
Figura 26 - Quantificação da área de expressão da enzima catalase.....	94
Figura 27 - Banda de expressão da enzima SOD. ....	97
Figura 28 - Expressão da enzima SOD. ....	97
Figura 29 - Quantificação da atividade da SOD. ....	98
Figura 30 - Expressão da enzima esterase.....	100
Figura 31 - Imagem processada das bandas de expressão da enzima esterase. ....	102
Figura 32 - Quantificação da enzima esterase.....	102
Figura 33 - Bandas da atividade da enzima malatodesidrogenase. ....	104
Figura 34 - Imagens pós-processadas no ImageJ.....	105
Figura 35 - Quantificação da enzima malatodesidrogenase.....	105
Figura 36 - Diluições utilizadas na endobetamanase. ....	108
Figura 37 - Expressão da enzima endobetamanase. ....	109
Figura 38 - Valores de atividade da enzima endobetamanase.....	110
Figura 39 - Síntese dos resultados.....	122

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Resultados médios de atividade embrionária de sementes de cafeeiro submetidas ao campo magnético uniforme em valores de AVD e MI, adimensionais. UFLA, Lavras, MG, 2018.....83
- Tabela 2 - Índice de velocidade de emergência (plantas/dia) de sementes de cafeeiro submetidas à uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.....85
- Tabela 3 - Número de emergência ( $n^0$  plântulas) de sementes de cafeeiro submetidas à uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018. ....86
- Tabela 4 - Atividade da enzima endobetamananase em  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de sementes de cafeeiro submetidas à uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.....109
- Tabela 5 - Valores médios da condutividade elétrica em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , de sementes de cafeeiro submetidas a uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.....113
- Tabela 6 - Valores médios do índice de velocidade de germinação (plantas/dia), de sementes de cafeeiro submetidas a uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018. ....116
- Tabela 7 - Germinação (%) de sementes de cafeeiro submetidas a uma magnetização de intensidade constante durante 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018. ....118

Tabela 8 - Resultados médios de protrusão radicular (%) de sementes de cafeeiro submetidas à magnetização constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018. ....	120
--	-----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Metodologia de aplicação do campo magnético nas sementes. ....	72
Quadro 2 - Condições do germinador.....	73
Quadro 3 - Localização temporal das entradas das sementes no germinador juntamente com os ímãs.....	77
Quadro 4 - Distribuição temporal da iluminação das sementes.....	78

## LISTA SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
ADH	Álcooldesidrogenase
AVD	Diferença de valores absolutos
BSL	BiospeckleLaser
CAT	Catalase
CECAFÉ	Conselho dos Exportadores de Café do Brasil
CEDIA	Centro de Desenvolvimento de Instrumentação Aplicada à Agropecuária
DG	Diferenças generalizadas
EST	Esterase
IVE	Índice de velocidade de emergência
IVG	Índice de velocidade de germinação
LAS	Laboratório de Análise de Sementes
MDH	Malatodesidrogenase
MOC	Madriz de coocorrência
$\Theta$	Teta
ROS's	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxidodismutase
STS	Speckle espacial no tempo
THSP	História temporal dos padrões de speckle

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{L}$	Microlitro
A/cm	Ampère por centímetro
AC	Corrente alternada
B	Campo magnético
C	Coulomb
DC	Corrente contínua
F	Força magnética
Hz	Hertz
IC	Interferência construtiva
ID	Interferência destrutiva
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mT	MiliTesla
nT	NanoTesta
q	Quantidade de carga elétrica
v	Velocidade

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	25
<b>2.1</b>	<b>Cenário econômico do café no Brasil</b> .....	25
<b>2.2</b>	<b>Desafios a serem superados na formação de mudas</b> .....	26
<b>2.3</b>	<b>Campo magnético aplicado aos organismos vivos</b> .....	28
<b>2.3.1</b>	<b>Alterações em nível celular atribuídas à exposição de campos magnéticos – Íons de cálcio (<math>Ca^{+2}</math>)</b> .....	31
<b>2.3.2</b>	<b>Algumas alterações fenotípicas das plantas quando expostas a campos magnéticos</b> .....	35
<b>2.3.3</b>	<b>Conjecturas sobre as explicações da interação do campo magnético em organismos vivos</b> .....	35
<b>2.3.4</b>	<b>Canais iônicos</b> .....	38
<b>2.4</b>	<b>Anatomia do fruto do café</b> .....	39
<b>2.5</b>	<b>Speckle Laser Dinâmico (Biospeckle Laser-BSL)</b> .....	40
<b>2.5.1</b>	<b>Métodos de Análise do Biospeckle - Utilização do Biospeckle na Avaliação de Sementes</b> .....	42
<b>2.5.2</b>	<b>Time History Speckle Pattern (THSP) e Momento de inércia (MI)</b> .....	44
<b>2.5.3</b>	<b>Matriz de coocorrência (MOC)</b> .....	45
<b>2.5.4</b>	<b>Momento de Inércia (MI)</b> .....	46
<b>2.5.5</b>	<b>Método de Diferenças de Valores Absolutos (AVD)</b> .....	46
<b>2.5.6</b>	<b>Quality Test</b> .....	47
<b>2.5.6.1</b>	<b>Contraste</b> .....	47
<b>2.5.6.2</b>	<b>Homogeneidade</b> .....	49
<b>2.5.7</b>	<b>Testes de iluminação com o café</b> .....	50
<b>2.5.7.1</b>	<b>Região de interesse da semente de café</b> .....	51
<b>2.6</b>	<b>Testes fisiológicos – Germinação</b> .....	52
<b>2.6.1</b>	<b>Análises bioquímicas- Testes isoenzimáticos</b> .....	53
<b>2.6.2</b>	<b>Teste de Condutividade Elétrica</b> .....	57
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	59
<b>3.1</b>	<b>Objetivo geral</b> .....	59
<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	59
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	61
<b>4.1</b>	<b>Processo de magnetização das sementes de café</b> .....	61
<b>4.2</b>	<b>Procedimento de acondicionamento das sementes no campo magnético</b> .....	62
<b>4.3</b>	<b>Medição do campo magnético</b> .....	64
<b>4.4</b>	<b>Sementes de café</b> .....	66
<b>4.4.1</b>	<b>Caracterização das sementes de café</b> .....	72

4.5	Análises das enzimas Superóxido Dismutase, Malatodesidrogenase, Esterase e Catalase.....	73
4.6	Análises da enzima Endo- $\beta$ -mananase.....	74
4.7	Condutividade elétrica.....	75
4.8	Análises fisiológicas realizadas .....	75
4.8.1	Teste de germinação.....	75
4.8.2	Emergência sob condições controladas (Bandeja-IVE).....	78
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	81
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	83
6.1	Biospeckle Laser- BSL.....	83
6.2	Índice de Velocidade de Emergência- IVE .....	85
6.2.1	Número de Emergência .....	85
6.3	Enzimas.....	92
6.3.1	Enzima Catalase.....	92
6.3.2	Enzima superoxidodismutase (SOD).....	96
6.3.3	Enzima esterase (EST).....	100
6.3.4	Enzima malatodesidrogenase (MDH) .....	104
6.3.5	Enzima Endobetamananase .....	108
6.4	Condutividade elétrica.....	112
6.5	Índice de velocidade de germinação (IVG).....	115
6.6	Germinação .....	118
6.7	Protrusão .....	120
7	CONCLUSÃO .....	123
	REFERÊNCIAS .....	125

## 1 INTRODUÇÃO

Os antigos cafezais eram cultivados por um período de tempo muito longo, sem a preocupação com a sua renovação. Atualmente as lavouras de café são exploradas por períodos mais curtos, e quando envelhecem, tornando-se pouco produtivas, são substituídas por novas plantações. A troca da lavoura cafeeira por uma mais eficiente é um processo designado de renovação de cafezais (MATIELLO; GARCIA; ALMEIDA, 2009).

Atualmente, as lavouras de café são exploradas por períodos mais curtos e, quando envelhecem, tornando-se pouco produtivas, são substituídas por novas plantações. A troca da lavoura cafeeira por uma mais eficiente é um processo designado de renovação de cafezais (MATIELLO; GARCIA; ALMEIDA, 2009).

A renovação das lavouras de café no Brasil é uma tendência atual, pois com o aumento do nível tecnológico na cultura cafeeira – com cultivares melhoradas, mecanização agrícola, novos arranjos espaciais e densidades de plantio, entre outros – o agricultor tem que estar atento às novas mudanças, tornando-se mais competitivo.

A nova lavoura deve ter uma boa produção e o sucesso da produção cafeeira depende, primordialmente, da qualidade das mudas que devem ser saudas, vigorosas e possuir uma alta taxa de uniformidade, para que o cafeicultor obtenha os resultados desejados.

À medida que a pesquisa agropecuária avança com o desenvolvimento de novas cultivares, para manter a competitividade, novas tecnologias de produção de mudas também são aperfeiçoadas e requerem a renovação de lavouras de café.

Nesse contexto, as novas mudas de café desenvolvidas devem ser provenientes de sementes com alto potencial produtivo, vigorosas e com uma

germinação uniforme, características que podem incrementar a renda do cafeicultor e reduzir custos de produção, principalmente com o emprego de defensivos agrícolas e controle fitossanitário, além disso, lavouras mais produtivas suprem a demanda externa e atendem a países cada vez mais exigentes com o produto brasileiro, como é o caso da Alemanha e Estados Unidos.

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de café e, para que ele se mantenha na vanguarda da produção, há necessidade da renovação das lavouras já existentes por outras altamente produtivas.

Da produtividade das lavouras depende a qualidade das mudas que formarão os novos cafezais e, conseqüentemente, da qualidade cada vez maior de suas sementes, repercutindo diretamente na redução de custos na formação de novos cafezais, o que garantirá atendimento da demanda externa. Portanto, o setor sementeiro destaca-se, pois da semente depende a qualidade das mudas e o estabelecimento de lavouras saudáveis e com elevado potencial produtivo.

A formação de mudas de café apresenta alguns entraves, um deles é a germinação lenta das sementes, aumentando consideravelmente o período de formação das mudas e a diminuição acentuada do vigor, durante o armazenamento dessas sementes.

A produção de muda de café passa por outros grandes problemas; um deles é conseguir uma germinação uniforme. De acordo com Matiello (1991), a utilização de sementes de café em condições ambientes tem viabilidade de cerca de seis meses, a partir desse período, o poder germinativo declina acentuadamente. Outro é a antecipação do resultado de vigor das sementes em um período de tempo inferior a 30 dias para a formação de mudas.

Advoga-se que os cafezais que ocupam grandes áreas de cultivo no Brasil possam ter seu rendimento aumentado quando formados por mudas oriundas de sementes expostas a um campo magnético uniforme.

Hipotetiza-se que as sementes de café pré-tratadas magneticamente apresentem uma eficiente taxa germinativa reduzindo o intervalo de tempo de germinação e o número de sementes inviáveis, aumentando, conseqüentemente, a uniformidade das sementes germinadas.

Pretende-se, com este trabalho de pesquisa, avaliar os efeitos do pré-tratamento por campo magnético sobre o desempenho germinativo de sementes de café (*Coffea arabica L.*). Para se conseguir tal intento, foi utilizado o Biospeckle Laser (BSL), com o laser focado pontualmente sobre embrião da semente magnetizada, a fim de se mensurar a atividade embrionária. Foram usados, também, métodos de análises fisiológicos para se avaliar os efeitos da estimulação magnética sobre a semente, tais como: ação enzimática das sementes – testes isoenzimáticos; estruturais: como a ação do campo magnético sobre a permeabilidade da membrana plasmática – condutividade elétrica; de vigor: como a análise do índice de velocidade de germinação (IVG) e protrusão, a própria germinação e o índice de velocidade de emergência (IVE).



## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

A renovação das lavouras cafeeiras repercute diretamente nas divisas geradas com a exportação e a mão de obra empregada nas diferentes etapas de produção, fazem do café uma cultura de indiscutível importância socioeconômica para o Brasil.

### **2.1 Cenário econômico do café no Brasil**

Em fevereiro de 2018, o Brasil exportou 2.520.390 sacas de café, com receita chegando a US\$ 377.240.000,00 e preço médio de US\$ 160,14, apesar de um recuo de 9,1% em relação ao ano de 2017, segundo relatório divulgado pelo Conselho dos Exportadores de Café (CECAFÉ, 2018).

Entre as variedades embarcadas, o café arábica representou 89,1% do volume total de exportações, seguido pelo solúvel com 10% e robusta com 0,9%, de acordo com dados do CECAFÉ (2018).

Nas exportações de café no acumulado de janeiro e fevereiro de 2018, o Brasil registrou um total de 5.040.781 sacas, o que representa uma queda de 3,8% na comparação com o mesmo período do ano de 2017. A receita cambial também teve um declínio, alcançando US\$ 807.983.000,00 (CECAFÉ, 2018).

Principais destinos do café brasileiro são a Alemanha e os EUA que permanecem ocupando, respectivamente, o primeiro e segundo lugar no ranking dos principais países consumidores do nosso café, com 18,5% e 17,2%.

A Itália foi o terceiro país que mais importou o café brasileiro, com 11,2% do valor total exportado. No quarto lugar está o Japão, com 8,3% do café exportado para esse país e, no quinto, a Bélgica, com 6%.

Também figuram no ranking: França (139.745 sacas), Turquia (139.363 sacas), Canadá (134.184 sacas), Federação Russa (117.649 sacas) e Reino Unido

(107.333 sacas). Vale destacar que a Itália e o Canadá registraram um relevante crescimento nas exportações de café brasileiro nos dois primeiros meses de 2018, comparado com o mesmo período do ano anterior. As exportações para a Itália cresceram 13,78% no período em relação a 2017, enquanto para o Canadá o aumento foi de 26,8% sacas.

Diante desse cenário de grandes consumidores do café brasileiro, há necessidade de se ter estudos mais aprofundados que maximizem a efetividade das sementes de café e, conseqüentemente, impactem na qualidade da formação de mudas que vão para a renovação dos cafezais.

## **2.2 Desafios a serem superados na formação de mudas**

A formação de mudas de café apresenta alguns gargalos, como o intervalo de trinta dias que decorre entre o início e o término de germinação das sementes, aumentando, consideravelmente, o período de formação das mudas além da rápida perda do potencial germinativo das sementes.

A lenta germinação das sementes de café, aliada à rápida perda do poder germinativo, chega a criar situações em que, quando se obtém o resultado do teste de germinação, por exemplo, este pode não mais refletir o verdadeiro estado fisiológico da semente que será plantada (DIAS; SILVA, 1986); além da predisposição dessas aos ataques de patógenos, prejudicando seriamente a germinação. Além disso, a semeadura fica limitada a um curto intervalo de tempo após a colheita, concentrando a obtenção de mudas em épocas que nem sempre são as mais apropriadas para o plantio (ANDREOLI; GROTH; RAZERA, 1993; DIAS; BARROS, 1993; MIRANDA et al., 1993; PERTEL, 2001).

A principal causa da rápida perda da viabilidade das sementes é a sua grande sensibilidade à desidratação (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Amorin

et al. (1977), citam que a perda do poder germinativo em sementes de café é decorrente das alterações impostas à estrutura das membranas celulares, com consequente perda na permeabilidade seletiva, ocasionadas por exposição a temperaturas elevadas ou muito baixas, por variação na umidade do ar e por injúrias ocasionadas nas sementes. Nesse sentido, tratamentos pré-germinativos têm sido usados como alternativa, visando a aumentar a uniformidade e a velocidade da germinação (GUIMARÃES, 2000).

A otimização no processo de formação de mudas de café perpassa, não somente por técnicas de análises de sementes que antecipem o seu diagnóstico de viabilidade, mas também, por sementes preparadas que possam ter uma germinação mais rápida e uniforme. Alinhando-se tais condições, chega-se a uma situação desejada.

Inúmeros pesquisadores concluíram que a exposição de sementes a campos magnéticos trouxe benefícios relativos ao desenvolvimento das plântulas como confirmado pelos cientistas: Bathnagar e Dev (1977), Gubbels (1982), Kavi (1983), Pittman (1963, 1965, 1977) e Pittman e Ormrod (1970).

Dayal e Singh (1986) expuseram sementes de tomate a diferentes campos magnéticos, variando de 15 a 155 mT (miliTesla) para diferentes tempos de exposição, e eles observaram um aumento na altura e no número de ramos primários em plantas tratadas em comparação com os controles.

Pietruszewski (1993) relatou um aumento no crescimento de plântulas, vigor de sementes e rendimento de colheita quando as sementes foram expostas a um campo magnético. Sementes de várias espécies demonstraram uma eficiente taxa germinativa quando expostas a esse tipo de campo, tais como, sementes de *Oryza sativa* (arroz) (CARBONEL; MARTINEZ; AMAVA, 2000); *Sinapis Alba* (mostarda branca) (EDMISTON, 1972); *Solanum lycopersicum* L. (tomate) (TORRES; DÍAZ; CABAL, 2008); *Zea mays* (milho), (ALADJADJIYAN, 2002), dentre outras.

### 2.3 Campo magnético aplicado aos organismos vivos

Numerosas pesquisas são realizadas com o intuito de explicar, em nível celular, os efeitos biológicos da exposição de organismos eucariotas<sup>1</sup> e procariotas<sup>2</sup> (EL MAY et al., 2009), ao campo magnético. Alguns pesquisadores dizem que o campo magnético pode modificar funções biológicas dos organismos, por meio de alterações no crescimento, proliferação e viabilidade celular (POTENZA; CUCCHIARINI; PIATTA, 2004; RAYLMAN; CLAVO; WAHL, 1996), na morfologia celular, na indução de mutações pontuais do DNA (ácido desoxirribonucleico) (POTENZA; CUCCHIARINI; PIATTA, 2004), e provocando alterações na quantidade de cálcio (AMARA; ABDELMELEK; SAKLY, 2004).

Inúmeras pesquisas foram realizadas utilizando-se campos magnéticos uniformes, tanto para organismos vegetais quanto animais como é o caso de Khodarahmi, Hamid e Masoumeh (2010), submeteram astrócitos humanos a uma indução magnética forte de 2,1 T (Tesla), concluindo que, para essa intensidade, não houve alterações na viabilidade celular. Outros pesquisadores, como Jajte et al. (2002), com um valor de campo magnético cerca de mil vezes menor, 7 mT, aplicou aos linfócitos de rato, observando a formação de radicais livres e um aumento da morte celular.

O campo magnético tem efeitos não só em células animais, mas também em organismos vegetais, por Alscher, Erturk e Heath (2002) e Breusegem et al. (2001), onde suas pesquisas com magnetismo conduziram a um aumento das espécies reativas de oxigênio (ROS's), como peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e radicais hidroxilas (OH<sup>-</sup>). Essas espécies são produzidas pelas

---

<sup>1</sup> Células mais complexas e maiores com um núcleo bem definido pela carioteca (membrana nuclear), presentes nos animais, vegetais, protozoários e fungos.

<sup>2</sup> Células mais simples não há núcleo definido pela membrana nuclear, presentes em indivíduos unicelulares como bactérias e algas.

reações metabólicas no interior das células que, em grande quantidade podem provocar inúmeros danos celulares, inclusive sua morte.

O campo magnético a depender de sua intensidade, intervalo de tempo de aplicação e de sua natureza (variável no tempo ou contínuo), pode constituir um fator de estresse para as plantas. Por outro lado, ajustando-se a magnitude da indução magnética, o intervalo de tempo de exposição da amostra e escolhendo o tipo de campo magnético, pode-se obter resultados positivos sob diversos aspectos, tanto na semente quanto na planta adulta.

Campos magnéticos contínuos ou uniformes, como aqueles gerados por ímãs permanentes ou por bobinas percorridas por corrente elétrica contínua, foram aplicados aos organismos vegetais. Como é o caso de Novitsky et al. (2001), especificamente em *Allium cepa* (sementes de cebolas), onde foi aplicado um campo magnético de intensidade de 505 mT, obtendo após a formação das plântulas, variedades com folhas mais desenvolvidas, aumento de concentração de clorofila e de proteínas.

Edmiston (1972) obteve melhoria da germinação, colocando as sementes de *Sinapsis alba* (mostarda branca) próximas a um ímã permanente, enquanto que Aladjadjyan (2002), estimulou a germinação e o crescimento das raízes de *Zea mays* (milho) quando submeteu as plântulas a uma indução magnética de 150 mT. Essa exposição magnética conduziu a um aumento não só da germinação, mas do aumento do peso fresco de 72% em relação ao controle, bem como um aumento do comprimento da parte aérea da plântula de 25%. Outro pesquisador, Shang, Wu e Yuan (2004), trabalhando com *Taxus chinensis* var. *marei* submetidas a um campo magnético uniforme de 3,5 mT obteve um aumento no crescimento celular.

Sob uma condição de campo magnético variante no tempo, com frequência de 16 Hz, Torres, Díaz e Cabal (2008), por sua vez, chegaram a um aumento no índice de germinação das espécies *Oryza sativa* L. (arroz) e

*Solanum lycopersicum* L (tomate), quando inferiu-se que tanto campos magnéticos constantes quanto campos variantes temporalmente induzem, para essa espécie, um aumento na eficiência de germinação de suas sementes.

Existem pesquisadores que estudaram os efeitos de campos magnéticos consorciados, com a aplicação simultânea de campos variantes no tempo e constantes, como é o caso Pittman e Ormrod (1970), onde submeteram as plântulas de *Triticum aestivum* (trigo) à exposição simultânea de um campo magnético de intensidade alternada e outro de valor constante, 180 mT, o que promoveu um aumento do crescimento e elevado conteúdo em açúcares.

A aplicação de campos magnéticos, tanto variáveis como contínuos, em sementes ou em plântulas nem sempre promovem efeitos positivos sobre os organismos vivos, foi o que revelou Peñuelas et al. (2004), quando três espécies de plântulas, *Lens culinaris* (lentilha), *Glycine soja* (soja) e *Triticum aestivum* (trigo), foram submetidas às mesmas intensidades de campo magnético, 17,6 mT, ocasionando inibição no crescimento das raízes.

Estudos da aplicação de campos magnéticos em sementes e plântulas de café ainda são incipientes, na revisão bibliográfica realizada para esta pesquisa, foram encontrados dois trabalhos pertinentes ao assunto. O primeiro, trata-se de um estudo realizado pelos pesquisadores Alemán et al. (2014a, 2014b), onde plântulas de café cultivadas *in vitro* foram avaliadas em três fases distintas de desenvolvimento: estabelecimento, multiplicação e aclimatização. Uma semana após a fase de estabelecimento e multiplicação iniciou-se o tratamento eletromagnético. Consoante os autores, houve um aumento da absorção do meio nutritivo por parte da plântula, o que justifica o incremento dos comprimentos das regiões aéreas e, mais pronunciadamente, na região radicular, em relação ao controle.

Outro trabalho relacionado à aplicação de campo magnético às plântulas de café, os mesmos autores Alemán et al. (2014a, 2014b), submeteram as plantas

de café a um campo magnético variante temporalmente com uma frequência de 60 Hz. Os resultados obtidos permitiram concluir que esse tipo de campo magnético promoveu uma melhora na qualidade das plântulas pela modificação de alguns processos fotossintéticos, fisiológicos e moleculares; aumentando o vigor e garantindo um melhor desenvolvimento das plantas em estádios futuros. Os efeitos magnéticos sobre os organismos vivos é fato, porém a explicação da interação desses campos ainda é uma incógnita.

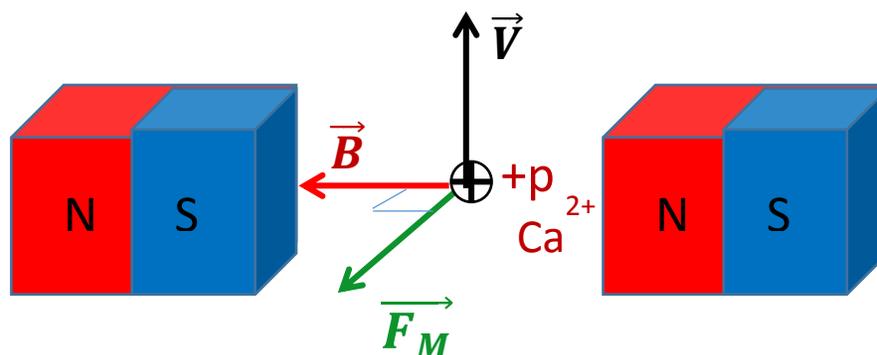
Diversas teorias são sugeridas a fim de explicar, efetivamente, como ocorre a interação dos campos magnéticos com os organismos vivos, uma vez que, os efeitos do magnetismo são notórios e evidentes, contudo, ainda não há consonância entre os pesquisadores quanto à real explicação dessa interação.

### **2.3.1 Alterações em nível celular atribuídas à exposição de campos magnéticos – Íons de cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ )**

A força magnética atua em cargas elétricas em movimento no interior do campo magnético, como os íons são portadores de uma determinada quantidade de carga elétrica ( $q$ ) expressa de Coulomb (C) e se eles estão em movimento, então sobre eles atuará uma força de natureza magnética que é diretamente proporcional à sua quantidade de carga elétrica e à sua velocidade de deslocamento.

A movimentação iônica em meios fluidos faz com que forças magnéticas passem a atuar sobre os íons, Figura 1, sendo, por isso, considerada por vários pesquisadores um dos principais alvos de atuação desses tipos de forças em diversos modelos experimentais (CHIONNA et al., 2003; FANELLI et al., 1999; ROSEN; ROSEN, 1990; TEODORI et al., 2002b).

Figura 1 - Força magnética atuando em um íon de cálcio e um próton.



Legenda:  $\vec{V}$ - vetor velocidade da partícula em m/s;  $\vec{B}$ - vetor campo magnético em T;  $\vec{F}_M$ - força magnética em Newton (N).

Fonte: Do autor (2018).

A atuação dos campos magnéticos nos sistemas biológicos pode estar ligada a propriedades da estrutura molecular da membrana plasmática como a anisotropia magnética<sup>3</sup> (DINI; ABBRO, 2005) ou propriedades diamagnéticas (ex: rotação das moléculas de fosfolipídios da membrana) (ROSEN, 2003).

Pesquisadores apontam que um dos efeitos proporcionados pelos campos magnéticos na estrutura molecular das membranas, pode estar relacionado com uma modificação da função dos canais iônicos (ROSEN, 2003).

Um dos canais iônicos é do íon de cálcio,  $Ca^{+2}$ , que participa da estrutura da célula e de vários processos fisiológicos nos diferentes estádios de desenvolvimento das plantas. Sua atividade depende de sua concentração e localização na célula (TREWAVAS et al., 1999). Entretanto, uma das principais atividades do íon de  $Ca^{+2}$  nas células vegetais é referente à via de transdução de sinais, atuando como mensageiro secundário nas respostas das plantas para um número variado de sinais ambientais e hormonais (BETHKE et al., 1995).

<sup>3</sup> Anisotropia de uma grandeza física está relacionada com a sua variação quando a mesma é medida em uma determinada direção.

Enfatizando ainda mais o papel da interação dos íons de cálcio com o campo magnético, coloca-se a seguinte citação: “*Our knowledge about  $\text{Ca}^{2+}$  is still increasing; the more we learn about  $\text{Ca}^{2+}$ , the more impressed we are by a wide variety of the mode of action of  $\text{Ca}^{2+}$ . It is almost like life it self*”<sup>4</sup> (EBASHI, 1983, p. 20).

Os íons de cálcio  $\text{Ca}^{+2}$  agem diretamente nos fitohormônios, no caso das citocininas, o íon potencializa sua ação na expansão de cotilédones e, por inibir a produção de etileno, retarda a senescência (processo de envelhecimento dos seres vivos) e abscisão foliar (queda das folhas por adaptação a uma determinada estação do ano) (HEPLER, 2005).

Dini e Abbro (2005), após uma década de pesquisa sobre os efeitos dos campos magnéticos nos sistemas biológicos, conseguiram reunir dados que mostram o envolvimento das vias de sinalização dos íons de  $\text{Ca}^{+2}$ , esta é uma das principais vias de sinalização intracelular, o que torna essa descoberta de elevada relevância fisiológica.

Os efeitos fisiológicos das alterações dos íons de  $\text{Ca}^{+2}$  em razão da aplicação de campos magnéticos variam de pesquisa para pesquisa. Já foram comprovadas alterações na função ciliar (ROSEN; ROSEN, 1990), nas alterações da taxa de proliferação celular (DINI; ABBRO, 2005), nas alterações da frequência de apoptose (BIAN et al., 1997; BUEMI et al., 2001; CHIONNA et al., 2003; FANELLI et al., 1999; TENUZZO et al., 2006; TEODORI et al., 2002a, 2002b), nas alterações morfológicas (SANTORO et al., 1997) e no aumento na sobrevivência das células por inibição da apoptose, por meio da modulação da entrada  $\text{Ca}^{+2}$  na célula (CHIONNA et al., 2003; FANELLI et al., 1999; TEODORI et al., 2002a, 2002b).

---

<sup>4</sup> Tradução nossa: “Nosso conhecimento sobre  $\text{Ca}^{2+}$  ainda está aumentando; quanto mais aprendemos sobre  $\text{Ca}^{2+}$ , mais impressionados ficamos por uma grande variedade do modo de ação de  $\text{Ca}^{2+}$ . É quase que ele fosse a própria vida.

Quando as sementes de ervilha foram cultivadas sob um campo magnético de baixa intensidade, 0,5 - 2 nT (nanoTesla) durante 3 dias, Belyavskaya (2001), observou algumas perturbações em nível celular na extremidade da raiz das plântulas. Além das alterações ultraestruturais, como o acúmulo de corpos lipídicos, o desenvolvimento do compartimento lítico e a redução da fitoferritina em plastídios; foram observadas mitocôndrias maiores com matriz de elétrons transparentes e cristas reduzidas. Além disso, o balanço de  $\text{Ca}^{+2}$  da célula foi interrompido e a sua localização mudou.

Esse pesquisador concluiu, então, que os íons de  $\text{Ca}^{+2}$  foi o componente potencialmente sensível do efeito do campo magnético fraco, assumindo que os íons cálcio conectados aos sítios de ligação de  $\text{Ca}^{+2}$  das proteínas eram responsáveis pelos processos desencadeados, confirmando a teoria desenvolvida por Binhi (2001), da "ressonância paramétrica de íons", nos efeitos magnetobiológicos.

Belyavskaya et al. (1992), Fomicheva, Govoroun e Danilov (1992) e Paul, Ferl e Meisel (2006), compactuam da mesma explicação para a interação do campo magnético com os sistemas biológicos. Segundo esses pesquisadores, o campo magnético modifica o metabolismo celular das células meristemáticas, tendo um efeito significativo sobre a mitose e mudanças da fase  $G_1$  do ciclo celular da planta. Além disso, mudanças nas reações metabólicas, sistemas de sinalização celular, ciclo celular, transcrição e síntese de proteínas, causam diferentes respostas biológicas sobre a planta.

### **2.3.2 Algumas alterações fenotípicas das plantas quando expostas a campos magnéticos**

Os efeitos provenientes da exposição de plantas a campos magnéticos, não ficam restritos somente em nível celular. As consequências positivas desse pré-tratamento se refletem, também, sobre a planta adulta.

Reina, Pascual e Fundora (2001) mostraram que campos magnéticos promovem um aumento na absorção de água pela planta, o que pode representar um maior rendimento da planta depois de adulta.

Pesquisadores demonstraram que o campo magnético tem efeitos positivos sobre o número de flores do tomateiro e, conseqüentemente, sobre rendimento da planta e, também, sobre os nutrientes da mesma (DUARTE-DIAZ et al., 1997; ESITKEN; TURAN, 2004).

Outras alterações fenotípicas foram observadas nas plantas como sugerem as pesquisas de Shine, Guruprasad e Anan (2011) e Vashisth e Nagaraja (2010), relataram que campos magnéticos moderados são úteis para aumentar a germinação de sementes e crescimento de plantas na fase adulta.

### **2.3.3 Conjecturas sobre as explicações da interação do campo magnético em organismos vivos**

O grande desafio dos pesquisadores é elaborar uma teoria que seja simples e ao mesmo tempo abrangente que explique o mecanismo de interação do campo magnético com os organismos vivos. Acredita-se que os cientistas estão muito perto desse feito, pois existem muitas hipóteses acerca do assunto. A elaboração de uma teoria convincente para a explicação do fenômeno perpassa pela utilização de ferramentas e metodologias capazes de detectar modificações oriundas pela aplicação de campos magnéticos nos organismos vivos. Por esse

motivo, inúmeras pesquisas são também conduzidas no sentido de se conseguir tais intentos.

Pesquisadores têm proposto modelos primários hipotéticos ou tipos de processos físicos de interação do campo magnético com sistemas biológicos (BINHI, 2001). A saber:

- a) Modelos de osciladores clássicos e quânticos;
- b) Modelo de ressonância ciclotrônica;
- c) Interferência de estados quânticos de íons ligados e elétrons;
- d) Excitações quânticas coerentes;
- e) Efeitos biológicos dos campos de torção que acompanham o campo magnético fraco;
- f) Estados metaestáveis biologicamente ativos da água líquida;
- g) Reações de radicais livres e outros mecanismos de “spin”;
- h) Modelo de ressonância paramétrica;
- i) Ressonância estocástica como mecanismo amplificador em magnetobiologia e outros processos aleatórios;
- j) Transições de fase em sistemas biofísicos com ordenação de cristais líquidos;
- k) Comportamento de bifurcação de soluções de equações de cinética química não linear;
- l) Modelos “radios-técnicos”, nos quais as estruturas e os tecidos biológicos são retratados como circuitos elétricos;
- m) Vórtices macroscópios carregados no citoplasma.

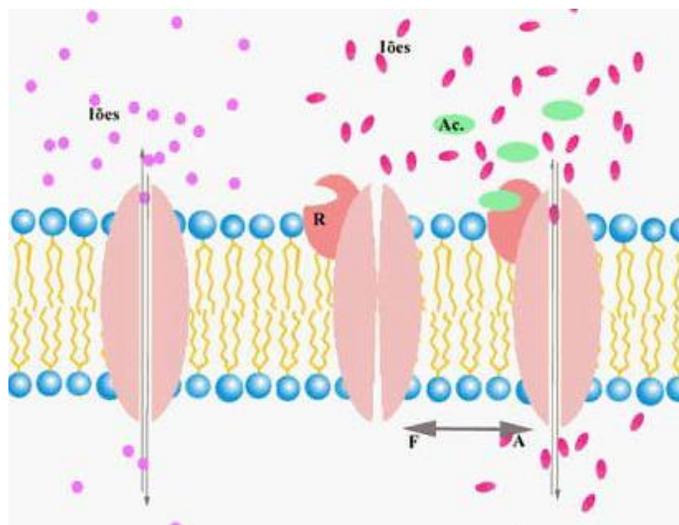
Existe evidência considerável para cada um desses mecanismos, embora existam casos claros em que alguns modelos parecem improváveis, também pode haver situações em que tal mecanismo pode se tornar significativo.

Finalmente, não se pode excluir mecanismos que combinem esses conceitos e modelos (BELYAVSKAYA, 2004).

Nossa teoria de interação magnética em sementes está fundamentada no modelo “efeitos biológicos dos campos de torção que acompanham o campo magnético fraco”, onde o elo dessa interação, é força magnética atuante nos íons, sendo seletiva a depender da quantidade de carga elétrica de cada íon, da velocidade do efluxo iônico e da orientação do vetor velocidade em relação ao vetor campo magnético, podendo variar de um valor nulo para a força magnética (vetor campo magnético paralelo ao vetor velocidade) até um valor máximo (vetor campo magnético perpendicular ao vetor velocidade).

A seletividade da força magnética na atuação sobre os íons controla o efluxo iônico, por meio dos canais iônicos, permitindo maior ou menor entrada/saída de um determinado íon para as células. Na Figura 2, representam-se os canais iônicos de  $K^+$ ,  $Na^+$  e de  $Ca^{2+}$ , presentes da membrana plasmática das células.

Figura 2 - Canais iônicos.



Fonte: Araújo (2002).

#### 2.3.4 Canais iônicos

Os canais iônicos são proteínas transmembranares, atravessando a biomembrana na forma de hélice, Figura 2. Esses canais são capazes de facilitar a difusão de um íon específico em uma direção entre dois compartimentos celulares separados por biomembrana (ZIMMERMANN; SENTENAC, 1999).

Em razão da elevada capacidade de condução iônica ( $10^4$  -  $10^8$  íons  $s^{-1}$ ) geralmente não é necessária a presença de muitos canais de um mesmo íon para atender às necessidades da célula vegetal. Vários canais iônicos são construídos conforme a demanda. O tamanho do poro, a densidade e as cargas no interior do canal determinam a alta especificidade iônica e a direção do transporte, e se canal é de entrada ou de saída (ZIMMERMANN; SENTENAC, 1999).

Os canais iônicos quando abertos apresentam um poro que atravessa totalmente a biomembrana. Canais de  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Cl^-$  e de dicarboxilatos como o malato foram identificados em plantas. O controle da abertura do canal iônico depende da magnitude da diferença de potencial elétrico entre os compartimentos conectados pelo canal como no canal de  $K^+$ . Nas células-guarda a hiperpolarização da plasmalema (maior que -100 mV) abre os canais de entrada de  $K^+$  e a despolarização abre os canais de saída de potássio (ZIMMERMANN; SENTENAC, 1999).

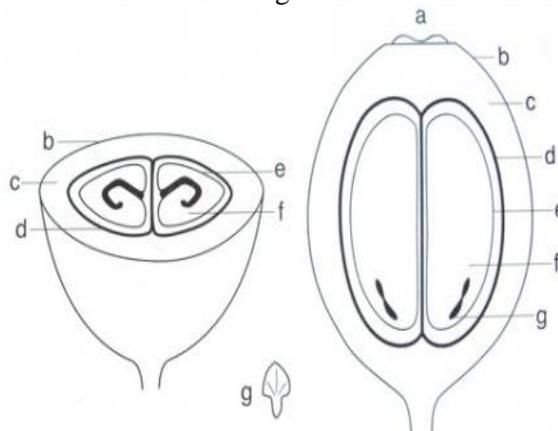
A abertura dos canais também pode ser determinada por ligantes como o  $Ca^{2+}$  ou pela fosforilação do canal. Dependendo do canal iônico a abertura é mantida por apenas alguns milésimos de segundo ou por vários segundos (ZIMMERMANN; SENTENAC, 1999).

## 2.4 Anatomia do fruto do café

O fruto do café é uma drupa, normalmente com dois lóculos e duas sementes. Além do epicarpo e do mesocarpo, apresenta o endocarpo, mais conhecido como pergaminho, que envolve a semente. A semente é plana convexa, elíptica ou oval, sulcada longitudinalmente na face plana e é constituída por embrião, endosperma e um envoltório, representado por uma “película prateada” ou espermoderma constituído por células esclerenquimatosas (DEDECCA, 1957).

De acordo com Shimizu e Mazafera (1999), o endosperma é o tecido de reserva da semente de café e representa 95% da massa seca da semente, contendo cerca de 10 a 14% de proteínas e 0,5 a 2% de aminoácidos (FIGURA 3).

Figura 3 - Corte transversal e longitudinal de uma semente de café.

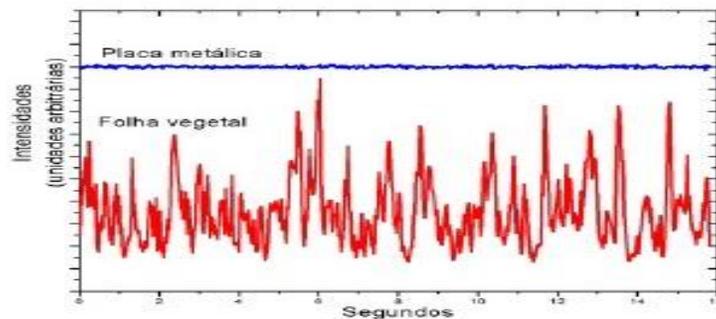


Legenda: a) Disco, b) Epicarpo (pele), c) Mesocarpo (polpa), d) Endocarpo (pergaminho), e) Espermoderma (pel. prateada), f) Endosperma, g) Embrião.  
Fonte: Clifford e Willson (1985).

## 2.5 Speckle Laser Dinâmico (Biospeckle Laser-BSL)

O fenômeno do speckle dinâmico resulta das múltiplas interferências sofridas pelos feixes luminosos refletidos por uma superfície opticamente áspera<sup>5</sup> que apresenta uma atividade distinta da biológica como, por exemplo, secagem de uma superfície recém-pintada, evaporação de água etc, ou pela reflexão da luz que incide em um material biológico; neste caso o fenômeno é designado de Biospeckle Laser – (BSL), em ambas as situações é exibida uma atividade, ou seja, qualquer superfície ativa deverá apresentar algum padrão speckle dinâmico (FIGURA 4).

Figura 4 - Intensidade de um pixel de padrão speckle espalhado a partir de um objeto inanimado e de um tecido biológico.



Legenda: Azul- objeto sem atividade física ou biológica.

Vermelho- material biológico.

Fonte: Silva (2007).

A origem do BSL tem seu cerne fundado em um princípio físico fundamental: princípio de Huygens que, em linhas gerais, enuncia que nas frentes de onda, onde cada ponto dessa frente se comporta como uma nova fonte de ondas elementares, que se propagam para além da região já atingida pela onda original e com a mesma frequência que ela.

<sup>5</sup> Entende-se por “opticamente áspera” aquela superfície cujas irregularidades sejam da ordem de grandeza do comprimento de onda ( $10^{-9}$  m) da luz incidente.

A luz refletida por uma superfície, cada ponto desta funciona como um emissor de pequenas ondas secundárias. No caso em que tal superfície seja opticamente rugosa, com centros espalhadores distribuídos a esmo, essas pequenas ondas são espalhadas com fases iniciais, variando ao acaso e temporalmente.

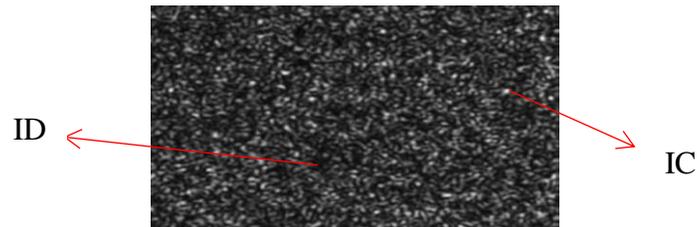
Os caminhos ópticos percorridos por essas frentes de onda são diferentes para cada ponto do plano de observação e a superposição coerente dessas ondas dá origem a um padrão de interferência cujas intensidades também variam aleatoriamente.

Assim, o BSL é um fenômeno físico de interferência luminosa. Quando um feixe de luz coerente (mesma frequência), colimado (raios luminosos paralelos) e de mesma fase (mesma evolução temporal) incide sobre uma superfície opticamente rugosa e que esboçe algum tipo de atividade biológica, tem-se, neste caso, uma reflexão irregular da luz que ao se refletir dessa maneira ocorrem interferências construtivas e destrutivas em diferentes pontos do espaço circunvizinho.

Por essas características, o granulado óptico obtido tem caráter estatístico, de maneira que sua análise segue uma abordagem análoga àquela dada para o passeio aleatório no plano complexo.

O aspecto da imagem de interferência, que remete a um granulado, é semelhante ao de um televisor (antigo) sem sintonia, ou seja, “uma televisão fora do ar”, Figura 5, onde os pontos escuros correspondem às interferências destrutivas (ID) enquanto que os pontos claros referem-se às interferências construtivas (IC).

Figura 5 - Imagem do *speckle* de uma maçã.



Legenda: ID: Interferência destrutiva. IC: Interferência construtiva.  
Fonte: Zdunek et al. (2014).

### 2.5.1 Métodos de Análise do Biospeckle - Utilização do Biospeckle na Avaliação de Sementes

As pesquisas para a utilização do BSL em sementes estão relacionadas com a avaliação do teor umidade, diferenciação dos níveis de atividade metabólica do tecido vegetal e identificação de atividade fúngica, dentre outras.

Enes (2006) afirma que tais pesquisas, analisadas em conjunto, conduzem às informações importantes acerca do fenômeno de interação da luz com o material, contribuindo para o aprimoramento da técnica do biospeckle como meio de análise da viabilidade de sementes.

A atividade metabólica de uma semente está intimamente relacionada com seu teor de umidade que, por sua vez, tem influência direta na variação temporal dos dispersores de luz responsáveis pelo fenômeno do biospeckle, conforme observado por Rodrigues (2007), em estudos realizados com sementes. Dessa forma, pode-se relacionar a umidade do material biológico com as medidas de Momento de Inércia MI (uma das ferramentas utilizadas para a análise dos dados fornecidos pelo BSL), a exemplo do trabalho realizado por Enes (2006).

Trabalhos de pesquisa foram conduzidos com sementes de feijão (*Phaseolus Vulgaris* L.). Braga Júnior (2000) obteve resultados promissores no

tocante à utilização do laser em materiais que apresentam alguma atividade metabólica. Suas pesquisas foram feitas em diferentes níveis de umidade, comprovando a influência da umidade e da evaporação nos resultados do BSL. O autor utilizou a técnica de Diferenças Generalizadas (DG).

Posteriormente, o mesmo autor utilizou o laser para diferenciar tecidos vivos de tecidos mortos em sementes utilizando as técnicas conhecidas como Asakura e MI, respectivamente.

A aplicação do laser na análise de sementes permitiu que outras variáveis pudessem ser analisadas, ampliando, dessa maneira, a aplicabilidade e o aperfeiçoamento da técnica do BSL.

Picolotto, Vidal e Silva (2010), realizaram estudos da técnica do BSL em sementes de soja com o intuito de se definir um nível ótimo de umidade para que se pudesse obter bons resultados com a técnica. A pesquisa apresentou a comparação entre diferentes períodos de tempo e temperatura para definir a umidade ideal das amostras para análise pelo fenômeno biospeckle. Com os resultados obtidos conclui-se que a umidade ideal para atingir a atividade biológica necessária para as capturas de imagem com BSL deve estar em torno de 40% a 50%, esse valor pode ser atingido com a temperatura de 40 °C por um tempo que pode variar de 16 h a 24 h com substrato para germinação.

Dessa maneira, os fenômenos físicos oriundos do BSL, que outrora eram tidos como ruídos em holografias, estão sendo amplamente aproveitados nas mais diferentes áreas da agricultura como um método não invasivo e que não requer um contato físico com a amostra em estudo (RABELO, 2000).

O BSL pode ser utilizado como uma forma de se obter informações acerca da amostra iluminada como, por exemplo, informações sobre os níveis de atividades de diferentes regiões de uma amostra iluminada pelo laser. O que se usa são procedimentos de processamento de imagens que geram um mapa

indicando em tons de cinza (FIGURA 6). As informações serão analisadas graficamente utilizando o AVD, diferença de valores absolutos.



Por outro lado, saindo da subjetividade da análise gráfica, quando a informação requerida é uma análise numérica da mudança do padrão do BSL, ou seja, do nível de atividade de uma amostra, é utilizado o método de Momento de Inércia (MI).

### 2.5.2 Time History Speckle Pattern (THSP) e Momento de inércia (MI)

Para se obter uma análise quantitativa da atividade de um determinado material biológico é necessário estudar a evolução temporal de cada pixel da imagem obtida da amostra em questão.

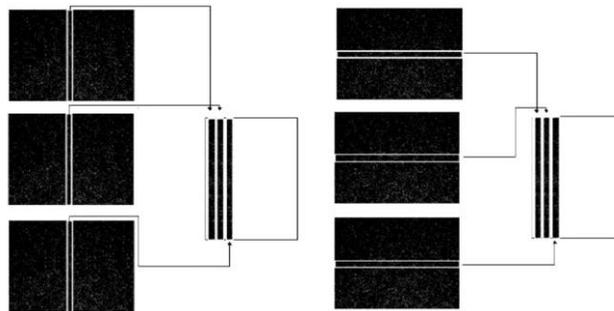
Uma metodologia empregada é o Spatial Temporal Speckle (STS) ou Time History Speckle Pattern (THSP). O comportamento temporal da evolução dos pixels constitui uma manipulação das inúmeras imagens obtidas da superfície do objeto iluminado pela luz laser.

A técnica consiste em registrar a história temporal de um padrão de speckle no tempo em uma imagem bidimensional denominada THSP, a qual corresponde à coleta de uma mesma linha de pixels na imagem em instantes sucessivos e organizá-los horizontal ou verticalmente, lado a lado, em uma imagem intermediária (THSP).

O eixo das abscissas apresenta informações sobre a evolução temporal dos pixels selecionados e, no eixo das ordenadas, há o registro da distribuição espacial dos padrões de interferência (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999).

Para Faccia et al. (2009), essa técnica permite a ordenação dos dados obtidos para análise quantitativa. Na Figura 7, está ilustrada a construção de uma imagem THSP.

Figura 7 - Construção de uma imagem THSP. A linha central é registrada em momentos sucessivos.



Fonte: Adaptado de Costa (2011).

### 2.5.3 Matriz de coocorrência (MOC)

Arizaga, Trivi e Rabal (1999), definem a matriz de coocorrência como sendo o número de ocorrências de um valor em 8 bits (0-255) de intensidade  $i$ , seguidos por um valor de intensidade  $j$  presente no THSP, expressa pela Equação 1.

$$\text{MOC} = [N_{i,j}] \quad (1)$$

Onde:

$N_{i,j}$  corresponde ao número de ocorrências de um valor de intensidade  $i$ , seguido por um valor de intensidade  $j$ , ao se deslocar pelas linhas do THSP.

#### 2.5.4 Momento de Inércia (MI)

O Momento de Inércia consiste na quantificação da variação de um THSP e, para isso, uma matriz de coocorrência (MOC) deve ser construída. A MOC foi proposta por Haralick, Shanmugan e Dinstein (1973), para análise de textura de imagens.

Para a análise do speckle dinâmico Arizaga, Trivi e Rabal (1999), propuseram que a matriz de concorrência fosse calculada sobre o THSP, para a posterior determinação do momento de inércia.

O MI é também designado como Momento de Intensidades ou simplesmente de Nível de Atividade e é calculado como sendo a distância de cada ponto da MOC até a diagonal principal multiplicada pelo peso de cada ponto, que representa o número de ocorrências. Na Equação 2, traduz-se essa ideia:

$$MI = \sum_{ij} M_{ij}(i - j)^2 \quad (2)$$

Com o cálculo do MI, afasta-se da subjetividade visual da análise das imagens e se ganha uma quantificação para a atividade de uma determinada amostra.

#### 2.5.5 Método de Diferenças de Valores Absolutos (AVD)

Diferença dos valores absolutos a partir da matriz de coocorrência modificada, Braga et al. (2001), propuseram um método para quantificar a atividade biológica, denominado Diferença dos Valores Absolutos (AVD), que indica com que frequência ocorreram mudanças bruscas de intensidade na matriz THSP.

Na Equação 3, descreve-se matematicamente a diferença dos valores absolutos.

$$AVD = \sum_{ij} M_{ij} |i - j| \quad (3)$$

Essa técnica exibe altos valores quando a amostra apresentar alta atividade e, baixos valores, em situação contrária. Esse cálculo é uma ferramenta importante para estimar a atividade global em diversas aplicações biológicas e não biológicas.

### **2.5.6 Quality Test**

Para se obter as imagens do Biospeckle Laser, é conveniente fazer uma análise prévia da uniformidade da iluminação sobre a amostra para se garantir que todas as regiões que estiverem sobre a iluminação laser estejam recebendo a mesma quantidade de luz.

#### **2.5.6.1 Contraste**

Essa metodologia de análise do padrão de speckle foi proposta por Briers e Webster (1996), em que se baseia no tempo de integração que cada imagem leva para ser capturada pela câmara CCD, (Dispositivo de Carga Acoplada). Dessa maneira, durante esse intervalo de execução, a informação no tempo que possibilita a análise da atividade está presente no período e que cada imagem for construída. Assim sendo, é importante a compatibilidade entre as velocidades de atividade apresentada pela amostra analisada e a velocidade de captura da câmara CCD, e é essa avaliação que se utiliza no teste de qualidade utilizando o contraste.

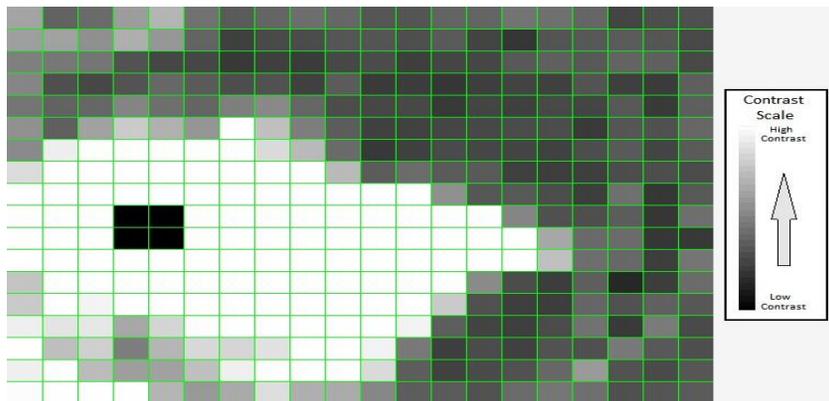
É crucial ter os grãos (granulado) de speckle muito bem definidos para se realizar uma boa análise do padrão de speckle no tempo, e isso é conseguido compatibilizando a velocidade de aquisição das imagens pela câmara CCD e a velocidade do fenômeno analisado. O contraste é definido matematicamente pela Equação 4.

$$C = \frac{\sigma_{X,Y}}{\langle I \rangle} \quad (4)$$

Onde:  $\sigma_{X,Y}$ , é o desvio padrão dos níveis de atividade;  
 $\langle I \rangle$ , é o nível médio de intensidade.

Na Figura 8, é mostrada a aplicação do método de contraste no conjunto de imagens de uma semente de café, utilizando uma janela de tamanho  $20 \times 20$  pixels.

Figura 8 - Resultado da aplicação do método de contraste no conjunto de imagens de uma semente de café.



Fonte: Do autor (2018).

### 2.5.6.2 Homogeneidade

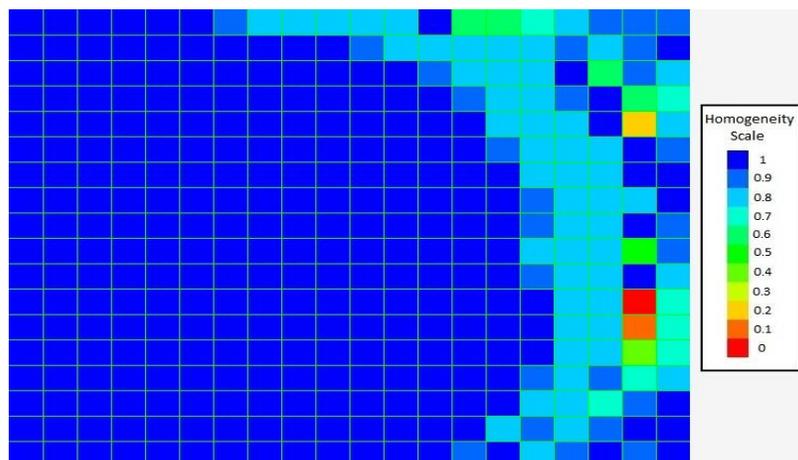
A homogeneidade é um método de análise de qualidade do speckle laser e é realizado sobre uma coleção de imagens divididas em pequenas janelas  $M \times N$  pixels. Consiste medir a variabilidade espacial da atividade, observando o valor do momento de inércia (MI) ou alguma outra análise quantitativa em cada uma das janelas em estudo, por similaridade entre cada momento de inércia e sua vizinhança (CARDOSO; MOREIRA; BRAGA, 2014).

A homogeneidade é dada pela Equação 5.

$$\text{Homogeneidade} = 100 \frac{\sigma(IM_2, IM_4, IM_5, IM_6, IM_8)}{\mu(IM_2, IM_4, IM_5, IM_6, IM_8)} \quad (5)$$

Na Figura 9, é apresentado o resultado do método de homogeneidade no conjunto de imagens de uma semente de café, utilizando uma janela de tamanho  $20 \times 20$  pixels.

Figura 9 - Resultado da aplicação do método da homogeneidade no conjunto de imagens de uma semente de café.

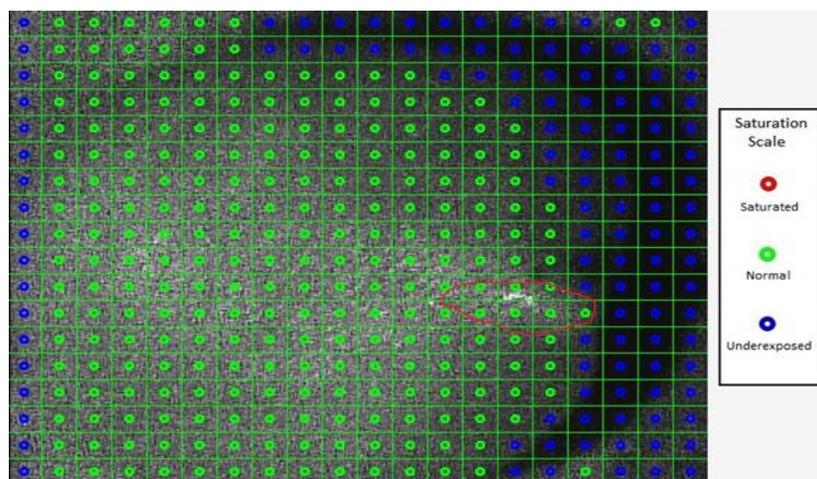


Fonte: Do autor (2018).

Para a análise de homogeneidade, foi definido como quantificador numérico o MI analisado em cada janela. Quanto mais próximo do azul escuro mais homogênea é a iluminação laser na área de análise.

Foi feito ainda, para as sementes de café antes de serem capturadas as imagens, outro teste, o de saturação, que fornece a região cuja intensidade de iluminação tenha uma incidência de luz normal. Na Figura 10, refere-se à região circunvizinha ao embrião (destaque em vermelho) onde foram capturadas as imagens.

Figura 10 - Semente de café com a região embrionária em destaque (região de interesse). Região com iluminação normal.



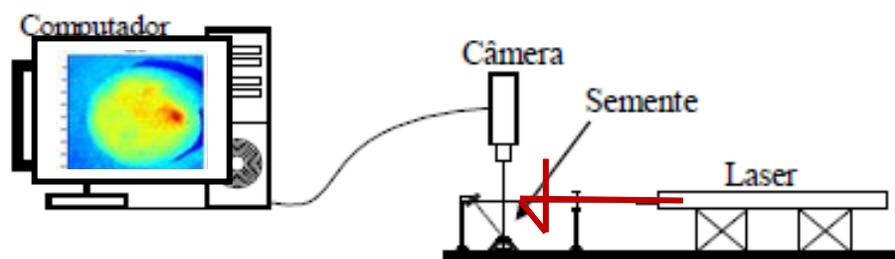
Fonte: Do autor (2018).

### 2.5.7 Testes de iluminação com o café

No sétimo dia de germinação dos grupos de semente da etapa 1, foi realizada a iluminação com a luz laser de cada tratamento, 50 sementes do controle, 50 sementes de 10 mT e 50 sementes de 28 mT, correspondendo à cada análise fisiológica feita dessa etapa, incluindo as cinco repetições, totalizando

750 iluminações realizadas. As sementes foram iluminadas, no CEDIA, laboratório 5, com o arranjo experimental mostrado na Figura 11.

Figura 11 - Disposição dos equipamentos experimentais durante a captura de imagens e iluminação pelo laser.



Fonte: Enes (2011).

Nos experimentos, foram utilizados uma câmera CCD, um microcomputador para captura dos dados e outro para o processamento das imagens com processador, um laser He-Ne vermelho (632 nm) de 10 mW de potência e uma mesa óptica com sistema antivibração.

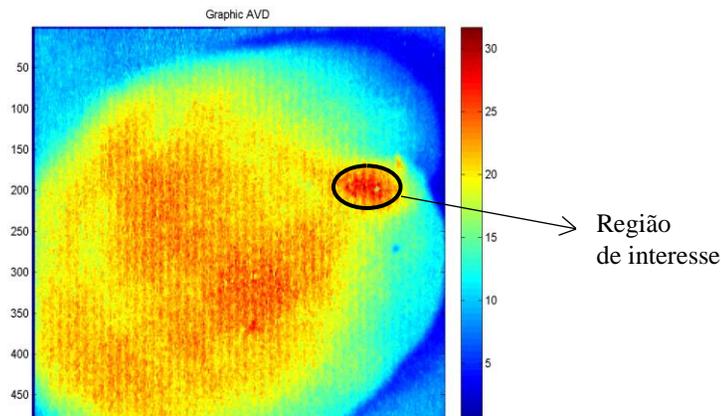
Ao término da iluminação, para o processamento do biospeckle, foram utilizadas as técnicas gráficas AVD (BRAGA et al., 2000) e, para uma análise quantitativa, foi utilizado o MI (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999).

#### 2.5.7.1 Região de interesse da semente de café

No processamento das imagens, foi analisada a região do embrião da semente, utilizando-se o MatLab e rotinas retiradas do site [www.nongnu.org/bsl/](http://www.nongnu.org/bsl/) para implementar dois índices do BSL; um gráfico AVD (BRAGA et al., 2000) e o outro numérico MI (ARIZAGA; TRIVI; RABAL, 1999). Na Figura 12, de uma semente de café com sua imagem pré-processada,

está representado o embrião da semente esboçando uma maior atividade, em virtude da cor avermelhada, em relação às demais regiões da semente.

Figura 12 - Imagem de uma semente de café pré-processada (AVD) com a região embrionária de interesse em destaque.



Fonte: Do autor (2018).

## 2.6 Testes fisiológicos – Germinação

O processo germinativo, do ponto de vista fisiológico, pode ser dividido em três fases: embebição, alongamento celular e divisão celular em tecidos. No entanto, por meio de uma classificação mais detalhada, agora em nível fisiobioquímico, o processo de germinação é dividido nas fases de reidratação, aumento da respiração, formação de enzimas, digestão enzimática de reservas, mobilização e transporte de reservas, assimilação metabólica e crescimento e diferenciação dos tecidos (POPINIGIS, 1985).

Bewley e Black (1994) propõem um padrão trifásico de absorção de água para as diferentes espécies. Na primeira fase, a absorção de água pelas sementes é rápida, em decorrência da diferença de potencial matricial encontrada nos tecidos da semente. Nessa fase, até as sementes mortas absorvem

água. Há também, nessa fase, a retomada do crescimento do embrião, motivada pelo início da degradação de reservas.

Já na fase II, há indicações de que esteja ocorrendo um transporte ativo de substâncias desdobradas na fase anterior, do tecido de reserva para o tecido meristemático. Nessa fase, os potenciais hídricos do substrato e das sementes são semelhantes, fazendo com que a absorção de água seja quase nula. Nesse momento, o teor de água das sementes endoespermáticas chega a valores entre 25% e 30% e para as cotiledonares entre 35% a 40% (BEWLEY; BLACK, 1994).

No final da fase II, há acréscimo repentino do teor de água das sementes, chegando as sementes endoespermáticas a possuírem valores de 35% a 40% e as cotiledonares entre 50% a 60%.

A fase III é caracterizada pela germinação visível e pelo início do crescimento do eixo embrionário. Porém, para chegar à protrusão, mudanças no nível bioquímico acontecem, ou seja, as substâncias desdobradas na fase I e transportadas na fase II são reorganizadas em substâncias mais complexas que formam o citoplasma, o protoplasma e as paredes celulares (BEWLEY; BLACK, 1994).

Além da germinação, foram realizados os testes de protrusão, índice de velocidade de germinação (IVG) e índice de velocidade de emergência (IVE).

### **2.6.1 Análises bioquímicas - Testes isoenzimáticos**

O oxigênio é um composto vital para a produção de energia tanto nos animais como para os vegetais, sendo essencial para a vida. Entretanto, pode originar danos reversíveis e, até mesmo, irreversíveis aos seres vivos, em razão da oxidação nos componentes celulares.

A oxidação gera radicais livres que estão envolvidos em uma série de processos degenerativos. A formação desses compostos é baseada pela perda ou ganho de um elétron, por um átomo ou molécula, ficando este com um elétron desemparelhado, o que o torna potencialmente reativo.

A formação dessas espécies reativas de oxigênio (ROS's) ocorre de maneira natural nos organismos como, por exemplo, a formação do radical superóxido ( $O_2^-$ ), durante a respiração celular. No entanto, em um primeiro momento, logo após atingida a maturidade fisiológica das sementes, a produção de ROS's é ainda controlada. Entretanto, em uma situação de estresse como: desidratação, altas temperaturas, envelhecimento ou armazenamento, ocorrem distúrbios no balanço metabólico das sementes culminando com a geração descontrolada de ROS's (OKUDA et al., 1991). Esse distúrbio metabólico vem acompanhado ainda, da redução da eficiência dos sistemas antioxidantes, resultando na peroxidação de lipídios das membranas, seguido de sua desestruturação e morte celular (LEPRINCE; BUTINK; HOEKSTRA, 1999).

A grande variedade de proteínas e enzimas estruturais é responsável pela integridade de membrana e pelo metabolismo celular e, dessa forma, a atividade de certas enzimas, associadas com a quebra de reservas ou biossíntese de tecidos novos, pode determinar o estágio de deterioração de sementes (CARVALHO; VIEIRA; PINHO, 2000).

A superóxido dismutase (SOD) é um grupo de enzimas que catalisam a reação de dismutação de radicais livres ( $O_2^-$ ) produzidos em diferentes locais na célula, para oxigênio molecular ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), esta isoenzima está localizada no citoplasma celular e matriz mitocondrial (SCANDALIOS, 1993).

Halliwell e Gutteridge (1989), descreveram que a SOD exerce um importante papel ao proteger a célula contra os efeitos deletérios de radicais superóxidos livres, sendo considerada chave na regulação de concentrações

intracelulares de radicais superóxidos e peróxidos. Nos glioxissomos e peroxissomos (WILLEKENS et al., 1995) está localizada a catalase (CAT), enzima responsável pela eliminação do peróxido de hidrogênio e produção de H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>. Se a ação de radicais livres não for controlada, eles podem alterar a funcionalidade das membranas e promover a peroxidação de lipídios, a inativação de enzimas e a degradação de ácidos nucleicos (GREGGAINS et al., 2000).

A esterase (EST) está envolvida em reações de hidrólise de ésteres, participando diretamente do metabolismo de lipídios (SANTOS; MENEZES; VILELA, 2005; VEIGA et al., 2010). Segundo Henning et al. (2009), a redução da atividade da esterase está ligada a perda da proteção dos fosfolipídios das membranas.

A enzima malato desidrogenase (MDH) está diretamente ligada à respiração celular, essa enzima catalisa a conversão de malato a oxaloacetato no ciclo de Krebs. A enzima álcool desidrogenase (ADH) catalisa a reação de formação do etanol, durante a respiração anaeróbica (TAIZ; ZEIGER, 2004). Veiga et al. (2010), citam que enzimas ligadas ao processo de respiração, tal como a malato desidrogenase (MDH) e a álcool desidrogenase (ADH), podem caracterizar a qualidade fisiológica de sementes.

O início do desenvolvimento da plântula é marcado pela emergência da radícula que caracteriza o término da germinação (BEWLEY, 1997), porém, algumas sementes apresentam germinação mais lenta em virtude, dentre outros fatores, a composição química da parede celular dos tecidos das sementes. Na espécie *C. arabica*, bem como em outras, o endosperma apresenta paredes celulares grossas e rígidas, contendo hidratos de carbono insolúveis na forma de galactomananas, que atuam como um fator limitador do crescimento e desenvolvimento do embrião e, conseqüentemente, dificultando a protrusão da radícula.

Para que a protrusão radicular possa ocorrer, é necessário hidrolisação das galactomananas na região micropilar, principalmente pela atividade da enzima endo- $\beta$ -1,4-mananase. A atividade da endo- $\beta$ -1,4-mananase é necessária no estágio inicial da germinação induzindo a degradação do endosperma e, conseqüentemente, conduzindo à protrusão da radícula (BEWLEY et al., 2012; SILVA et al., 2005). A atuação dessa enzima é regulada pela presença de fitormônios, como o ácido abscísico (ABA).

A endo- $\beta$ -1,4-mananase é a principal enzima desse processo, atuando especificamente na hidrólise da ligação  $\beta(1\rightarrow4)$  do galactomanano presente na parede celular. A síntese dessa enzima ocorre durante a germinação ou senescência da semente e está relacionada com a degradação das paredes celulares do endosperma, associada ao enfraquecimento do tecido e mobilização de reservas. Entretanto, existe pouca informação sobre a atividade dessa enzima em relação ao mecanismo de germinação e sua regulação (BEWLEY et al., 2012).

Os marcadores isoenzimáticos têm sido empregados em estudos de viabilidade de sementes, pois são eficientes para o conhecimento de eventos importantes do tempo de vida, das mudanças deteriorativas e da morte das sementes (BASU, 1995). Segundo Rosa et al. (2011), a análise de isoenzimas tem possibilitado o desenvolvimento de métodos rápidos, sensíveis e específicos na determinação da qualidade fisiológica de sementes.

Chauhan, Gopinathan e Babu (1985), descreveram que a variação nos perfis de proteínas e enzimas específicas, mais precisamente as relacionadas à respiração, peroxidação de lipídios e remoção de radicais livres, são métodos eficientes no monitoramento de alterações bioquímicas resultantes dos processos de deterioração.

### **2.6.2 Teste de Condutividade Elétrica**

O teste de condutividade elétrica avalia indiretamente o grau de estruturação da membrana plasmática das sementes, em razão da quantidade de lixiviados durante o processo de embebição, quanto menor for o resultado da condutividade, melhor será o vigor presente nesse lote de sementes, comprovando a integridade nas membranas celulares, por outro lado, quando o resultado for alto comparado com outros lotes de sementes, significa que essas sementes estão bastante deterioradas, com baixo vigor (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

Nesse teste, a duração do período de embebição das sementes tem também grande efeito sobre a capacidade do teste de distinguir diferenças de qualidade entre os lotes (DIAS; MARCOS FILHO, 1995). O período que se recomenda é de 24 horas de embebição (VIEIRA; KRZYZANOWSKI, 1999).

Quanto à temperatura de embebição, Hampton e Tekrony (1995) informam que sua influência é verificada na velocidade de embebição e de lixiviação de eletrólitos do interior das células para o meio externo. Nesse sentido, Loeffler (1981) constatou que a diminuição na temperatura causa aumento na viscosidade da solução, seguida por um decréscimo na mobilidade de íons e conseqüente redução da condutividade, por outro lado, as altas temperaturas aumentam a dissociação de íons e reduzem a viscosidade da solução, o que resulta em alta condutividade.



### **3 OBJETIVOS**

O pré-condicionamento das sementes é uma prática recorrente para a grande maioria dos produtores de mudas, objetivando a formação de lavouras mais saudáveis e produtivas para uma eventual renovação das lavouras cafeeiras. A utilização do pré-condicionamento magnético de sementes é uma nova vertente para o tratamento das sementes, chamada de magnetopriming.

#### **3.1 Objetivo geral**

Desenvolver método de estimulação da germinação de sementes de café (*Coffea arabica L.*) por aplicação de campo magnético controlado, com monitoramento dos efeitos usando métodos tradicionais e complementares de análise de sementes.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Propor um sistema de magnetização das sementes de café;
- b) Sugerir uma metodologia para tratamento magnético pré-germinativo de sementes;
- c) Verificar o efeito na germinação das sementes submetidas a campos magnéticos distintos;
- d) Usar testes tradicionais e complementares (BSL) para avaliar o efeito do campo magnético nas sementes de café;
- e) Antecipar o período de formação de mudas.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

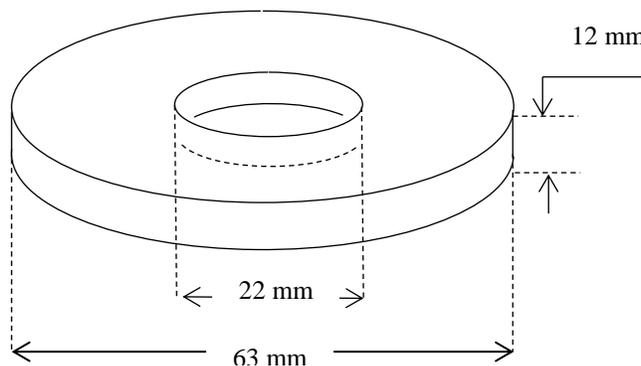
O trabalho de pesquisa foi realizado, em parte, no Centro de Desenvolvimento à Instrumentação aplicado à Agropecuária (CEDIA) no Departamento de Engenharia Agrícola, onde foram feitas as iluminações das sementes e processamento das imagens.

Foi utilizada, também, a infraestrutura do Laboratório Central de Análise de Sementes (LAS) no Departamento de Agricultura, com o uso de germinadores, além do suporte técnico dos laboratoristas que fizeram a preparação das sementes, bem como as análises pertinentes à fisiologia das sementes. Tanto o CEDIA como o LAS situam-se no campus da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais.

### 4.1 Processo de magnetização das sementes de café

Para magnetizar as sementes utilizaram-se ímãs circulares vazados centralmente que foram retirados de fornos micro-ondas, mais precisamente do magnetron desses equipamentos. As dimensões desses ímãs estão na Figura 13.

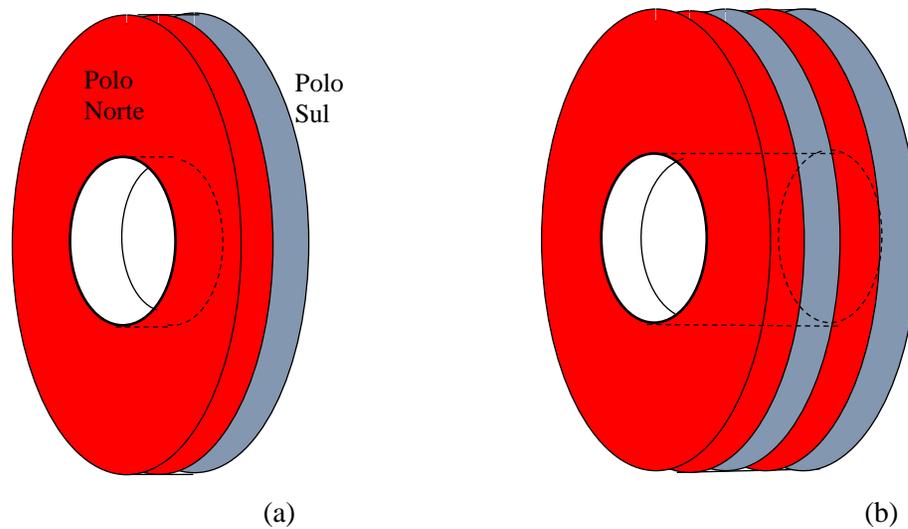
Figura 13 - Dimensões do ímã.



Fonte: Do autor (2018).

Para obter-se as intensidades de indução magnéticas desejadas, 10 mT e 28 mT, foram associados mais de um ímã para cada grupo de sementes, essa associação é realizada colocando-se os polos sul e norte juntos. Os polos dos ímãs estão situados nas fases opostas, como visto na Figura 14.

Figura 14 - Identificação dos polos do ímã (a). Associação de dois ímãs (b).

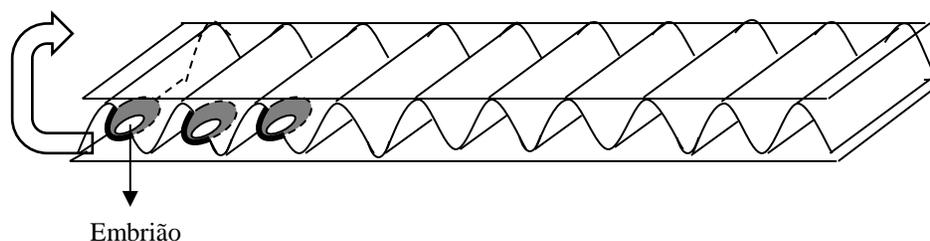


Fonte: Do autor (2018).

#### 4.2 Procedimento de acondicionamento das sementes no campo magnético

Foram cortadas três fitas de  $70 \times 3$  cm de papel “germitest” e posicionadas uma sobre a outra, sendo que na fita central foram feitas ondulações de dimensões próximas às da semente de café. Essa fita foi colada com cola quente na fita da base, ficando aproximadamente, com o aspecto da Figura 15.

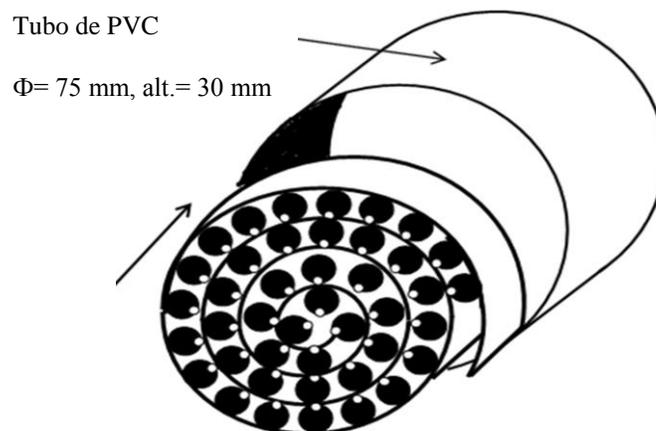
Figura 15 - Aspecto geral da fita de papel “germitest” e posicionamento das sementes na mesma antes de serem levadas ao ímã.



Fonte: Do autor (2018).

Em seguida, as sementes foram colocadas dentro de cada ondulação observando os embriões sempre voltados para o mesmo lado, totalizando 50 sementes. Essa fita foi enrolada e colocada dentro de um tubo de cano PVC de 75 mm de diâmetro por 30 mm de altura. Nesse momento, o rolo com as sementes foram umedecidos com água destilada em uma quantidade 2,5 vezes o peso da fita seca (FIGURA 16).

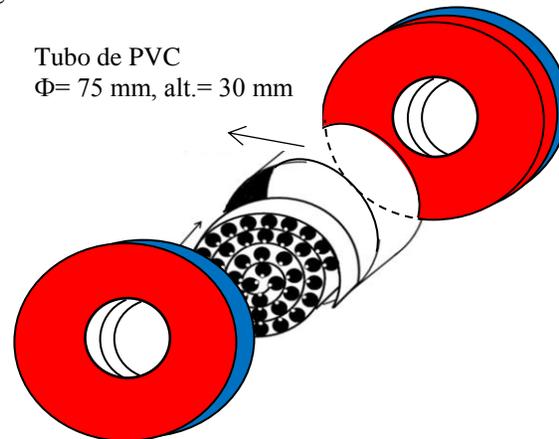
Figura 16 - Posicionamento das sementes para serem submetidas ao campo magnético.



Fonte: Do autor (2018).

O tubo foi posicionado entre os ímãs com os embriões voltados para o polo sul. De acordo com a Figura 17 explodida.

Figura 17 - Posicionamento das sementes entre os ímãs.



Fonte: Do autor (2018).

### 4.3 Medição do campo magnético

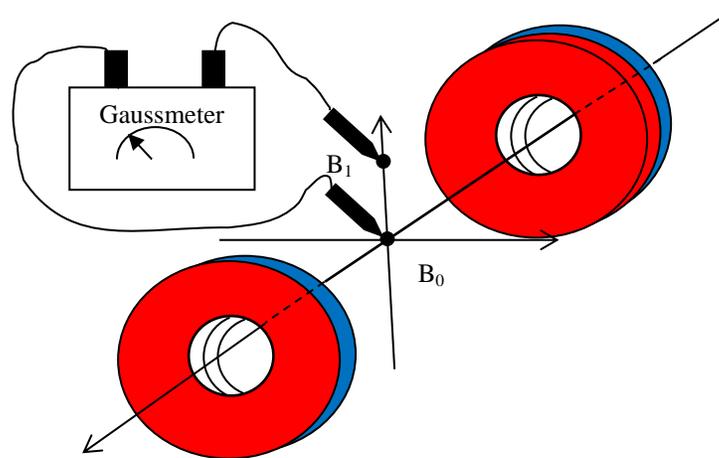
O campo magnético foi mensurado no espaço entre os ímãs, onde as sementes ficaram posicionadas. Essa medida foi realizada por um gaussmeter, (Medidor de Campo Magnético) – MGM 20, que pode ser utilizado para detecção de magnetismo residual em peças ou equipamentos e medidas de campo magnético em materiais magnéticos ou bobinas. Podendo medir a intensidade de campos magnéticos variáveis no tempo (AC) ou constantes no tempo (DC).

Descrição: Display Cristal Liquido 3.½ dígitos, medidas em Gauss e A/cm (indica também valores positivos e negativos), faixa de trabalho até 20.000 Gauss, resolução: 0,1 Gauss até 1.000 Gauss, 1 Gauss entre 1.001 e

2.000 Gauss, 10 Gauss entre 2001 e 20.000 Gauss, precisão: 3% temperatura de operação: 0 a 50°C alimentação – 1 bateria alcalina de 9V.

Na Figura 18, representa-se o esquema que foi utilizado para a medição do campo magnético entre os ímãs.

Figura 18 - Esquema de medição do campo magnético entre os ímãs utilizando o Gaussmeter.



Fonte: Do autor (2018).

O campo magnético no interior dos ímãs apresentou uma variação de aproximadamente 2%, utilizando-se a Equação 6.

$$B\% = \frac{B_0 - B_1}{B_0} \times 100\% \quad (6)$$

Onde:

$B_0$  é a intensidade do campo magnético no centro dos ímãs em mT;

$B_1$  é a intensidade do campo magnético na periferia dos ímãs em mT;

$B_{\%}$  é a variação percentual da intensidade do campo magnético no centro dos ímãs.

Com essa pequena variação da intensidade do campo magnético pode-se considerar que, no volume de ar entre os ímãs, o campo magnético é uniforme.

#### **4.4 Sementes de café**

As sementes de café (*Coffea arabica* L.), foram cedidas pela Fazenda Experimental de Varginha, Fundação Pró-Café, na cidade de Varginha, Minas Gerais, estes foram colhidos em lavoura, nesta cidade localizada a, aproximadamente, 110 Km de Lavras.

Varginha apresenta como características geográficas uma altitude de 980 m, sendo o clima classificado como tropical de altitude Cwb. Após a colheita, os frutos foram novamente selecionados para uniformização do estágio de maturação, descascados mecanicamente e as sementes desmuciladas por fermentação em água e pré-secadas à sombra para a retirada da água superficial. A variedade da cultivar Catuaí Vermelho, 144, colheita 2017, peneira 19.

As sementes foram mantidas durante seis (6) dias (VIVAS, 2015) em germinadores com temperatura de 30 °C (BRASIL, 1992) e umidade de 100% controladas, com dois grupos de sementes, um submetido ao campo magnético por meio de ímãs e o outro grupo de controle.

Os experimentos foram conduzidos em duas etapas, a etapa 1, com um lote de 750 sementes dividido em 2 grupos: grupo 1 (controle  $G_1$ ) com 250 sementes equivalendo a 5 repetições e o grupo 2 (sementes pré-tratadas pelo campo magnético  $G_2$ ), com 500 sementes.

O grupo 2 foi subdividido em dois subgrupos, A e B, sendo que o subgrupo A, com 250 sementes submetidas ao campo magnético de intensidade magnética de 10 mT. As sementes do subgrupo B, com 250 sementes foram

tratadas com campo magnético de intensidade de 28 mT. Todos os subgrupos foram divididos em 5 repetições com 50 sementes.

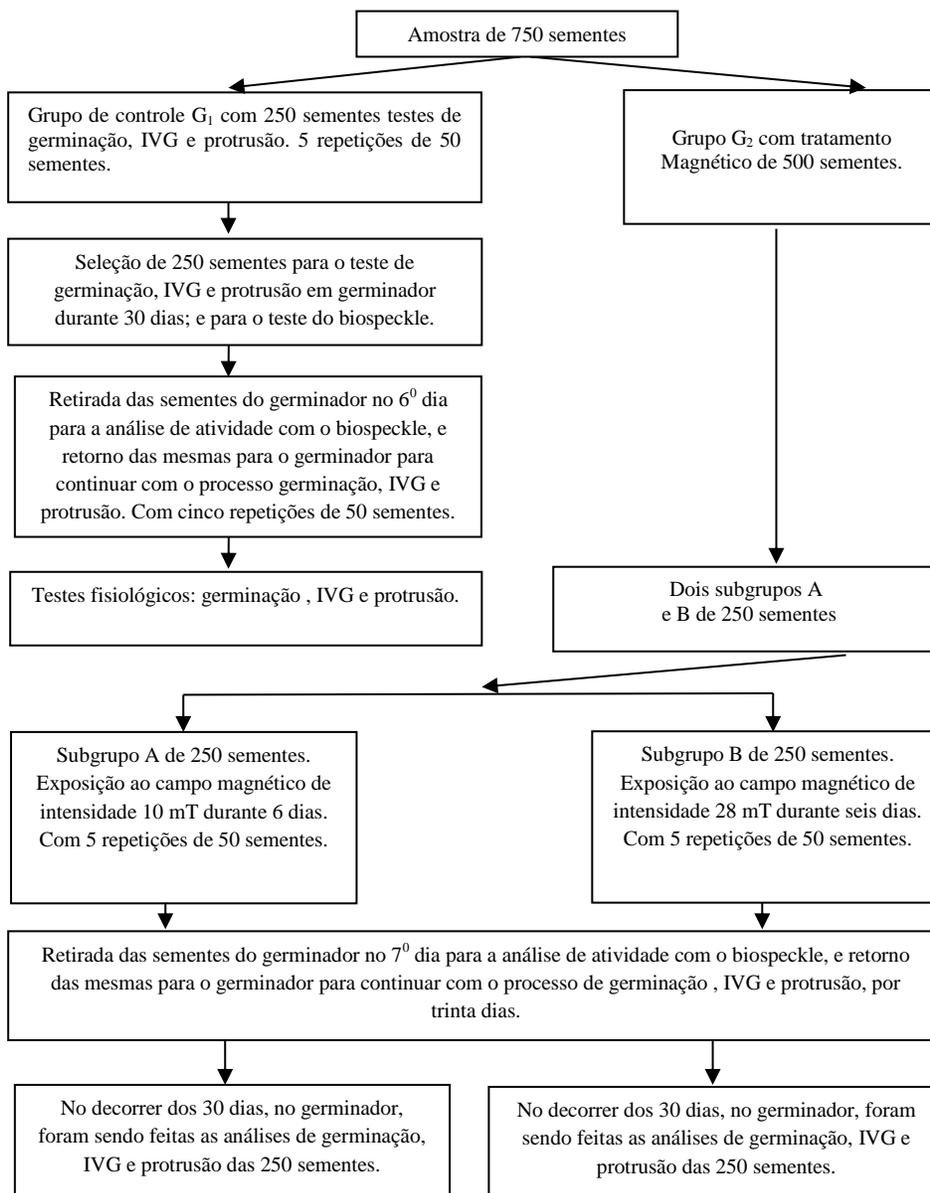
As sementes do grupo  $G_1$  e  $G_2$  foram submetidas ao processo de germinação em germinadores, durante 30 dias, lastreado pelas prescrições das Regras para Análises de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

No sétimo dia de germinação, procedeu-se análise do potencial germinativo das sementes por meio do biospeckle e retorno das mesmas ao germinador para as análises futuras do IVG, teste de germinação e protrusão, que findou no trigésimo dia.

Houve a necessidade da divisão da pesquisa em duas etapas em razão das análises realizadas na segunda etapa serem destrutivas, não havendo aproveitamento das sementes para análises subsequentes. Isso não aconteceu com as análises da primeira etapa, onde, para mensurar a germinação das sementes, pode-se utilizá-las para o levantamento da protrusão e IVG.

O fluxograma da Figura 19 sistematiza o processo da etapa 1.

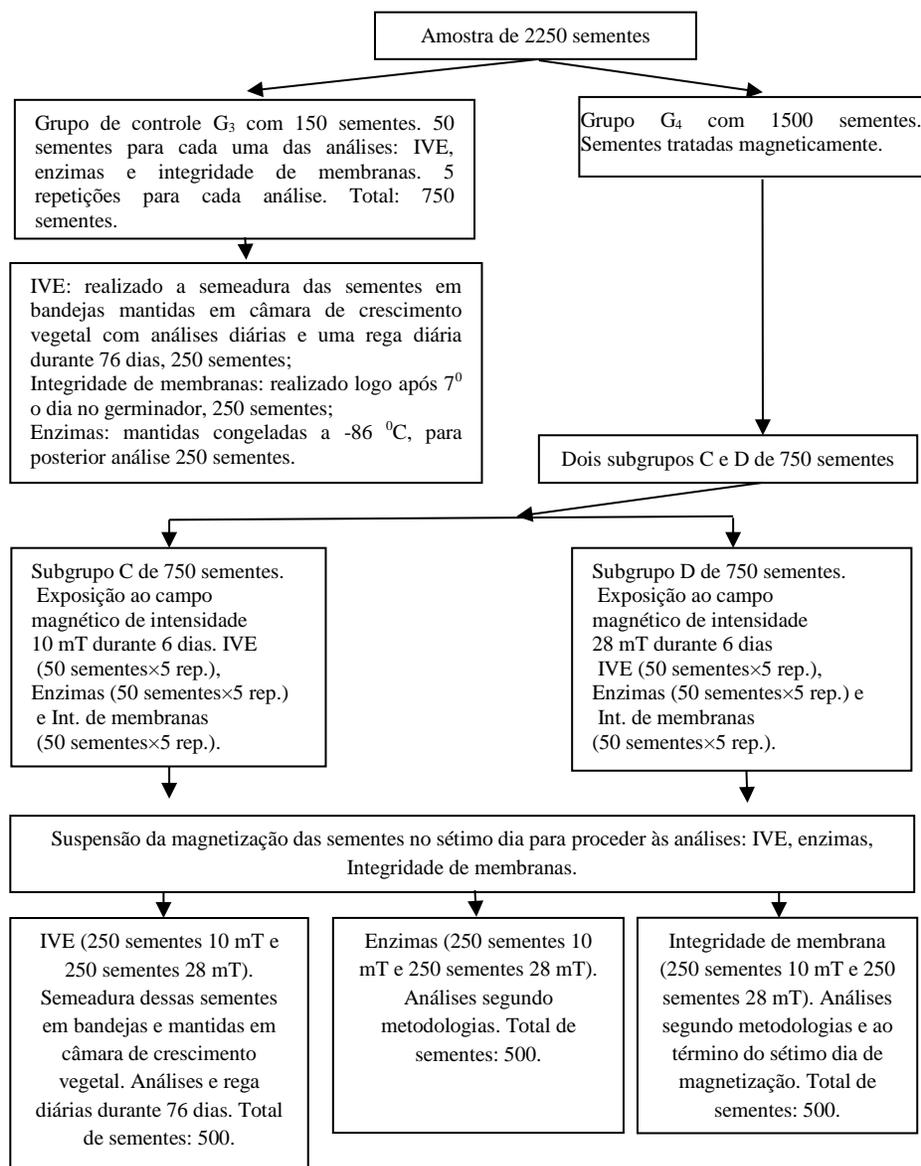
Figura 19 - Síntese da etapa 1 do processo de magnetização das sementes.



Fonte: Do autor (2018).

Na etapa 2, foram realizadas análises de IVE, enzimas e integridade de membranas usando outro lote de 2250 sementes. Figura 20.

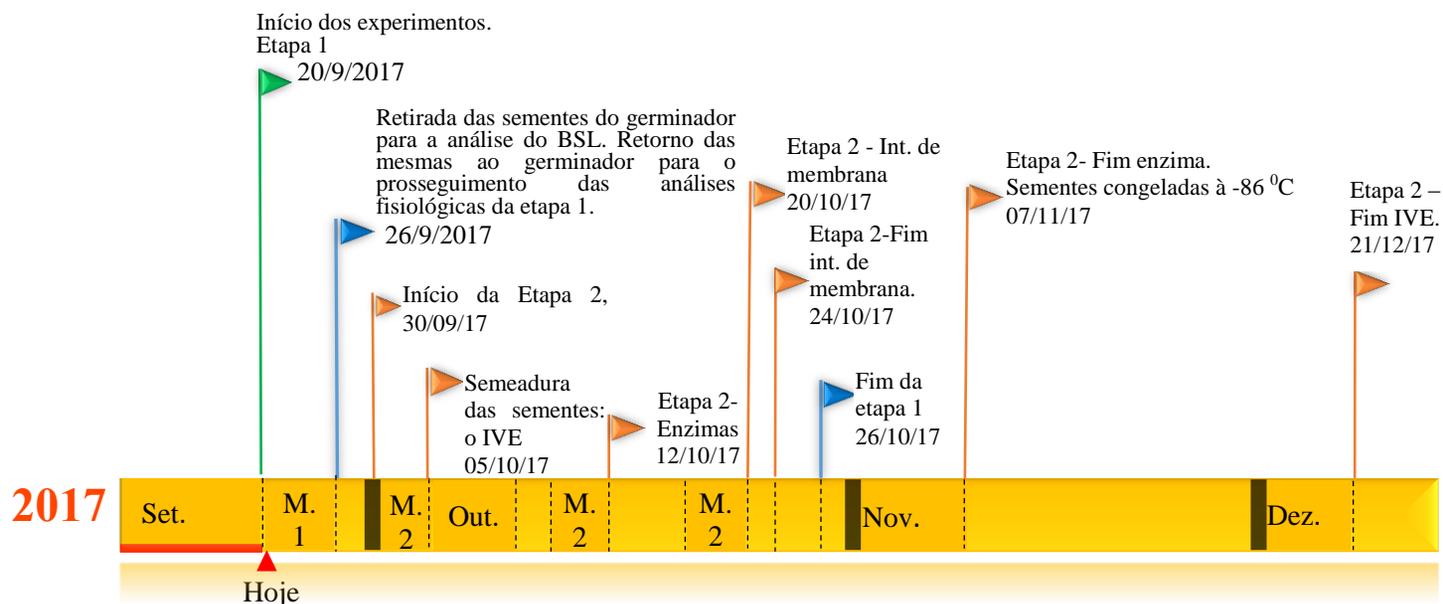
Figura 20 - Síntese da etapa 2 do processo de magnetização das sementes.



Fonte: Do autor (2018).

Na Figura 21, está representada a linha do tempo que localiza, temporalmente, as duas etapas da pesquisa.

Figura 21 - Linha do tempo com as etapas dos experimentos.



M. 1: Magnetização das sementes de café da etapa 1  
M. 2: Magnetização das sementes de café da etapa 2

**ETAPA 1:** Magnetização das sementes que serão analisadas quanto a germinação, IVG, protrusão e Biospeckle Laser. 20/9/2017 - 26/10/2017

**ETAPA 2:** Magnetização das sementes que serão analisadas quanto as mudanças enzimáticas, int. de membranas e IVE. 05/10/2017 – 21/12/2017

Fonte: Do autor (2018).

O processo de magnetização ocorreu durante os seis primeiros dias do período de germinação das sementes. Foram escolhidos dois germinadores; em um, ficaram as sementes do controle e noutro ficaram as sementes que foram magnetizadas pelas duas intensidades de campo magnético. Adotou-se tal expediente para que o campo magnético dos ímãs não influenciasse as sementes do controle, caso em que ocorreria se todos os tratamentos ficassem em um único germinador. No Quadro 1, resume-se a metodologia de aplicação do campo magnético às sementes.

Quadro 1 - Metodologia de aplicação do campo magnético nas sementes.

<b>Subgrupos</b>	<b>Intensidade do Campo Magnético (mT)</b>	<b>Intensidade do Campo Magnético (Gauss)</b>	<b>Intervalo de tempo de aplicação do Campo Magnético (dias)</b>
A e C (etapa 1)	10	100	6
B e D (etapa 2)	28	280	6

Fonte: Do autor (2018).

#### **4.4.1 Caracterização das sementes de café**

As sementes de café foram submetidas à determinação do grau de umidade, antes da realização do experimento, realizada pelo método da estufa a 105 °C, durante 24 horas, e os resultados expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes, de acordo com as recomendações das RAS (BRASIL, 2009) (QUADRO 2).

Quadro 2 - Condições do germinador.

Grupo de sementes	Período (dias)	Condições do germinador Temperatura (°C) e Umidade (%)
750 sementes (etapa 1)	30	30 e 100
2250 sementes (etapa 2)	6	30 e 100

Fonte: Do autor (2018).

#### 4.5 Análises das enzimas Superóxido Dismutase, Malatodesidrogenase, Esterase e Catalase

Coletadas as sementes, foram retiradas duas amostras de 50 sementes de cada tratamento e armazenadas à temperatura de -86°C, para a análise de enzimas por meio da técnica de eletroforese.

Para a análise eletroforética de enzimas, as sementes sem pergaminho, foram trituradas em moinho a 22.500 rpm, refrigerado a 4 °C, na presença de PVP (polivinilpirrolidona) e armazenadas a 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 280 µL por 100 mg de pó das sementes. O material foi homogeneizado em vortex e mantido em *overnight*, em geladeira, 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 50 µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 120 V por 5 horas.

Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas superóxido dismutase, catalase, esterase, malato desidrogenase, conforme metodologia descrita por Alfenas (2006).

#### 4.6 Análises da enzima Endo- $\beta$ -mananase

Para as análises da enzima endobetamananase, foram utilizadas 50 sementes de cada tratamento. Usaram-se 300  $\mu$ L do tampão de extração (0,1 M Hepes; 0,5 M de NaCl, pH 8,0; ácido ascórbico na proporção de 5 mg do ácido para cada 1 mL de tampão) em cada microtubo com 100 mg do macerado de cada amostra. Em seguida, os microtubos contendo as amostras foram agitados em agitador tipo vortex por 1 minuto e centrifugados, a 14.000 rpm por 30 min. a 4 °C. O sobrenadante foi aplicado em gel contendo 6 mL de *locust bean gum*, ou LBG (Sigma), 0,24 g de agarose (Qbiogene) e 24 mL de tampão pH 5,0 (11 mL de ácido cítrico 1M, 50 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 149 mL de água destilada). As alíquotas foram aplicadas em furos de 2 mm feitos no gel com auxílio de um furador. O gel foi incubado por 21 h e revelado segundo metodologia proposta de Silva et al. (2005). A atividade da enzima endobetamananase foi calculada de acordo com Downie, Hilhorst e Bewley (1994).

Para a revelação, o gel foi inicialmente lavado em água destilada, lavado em tampão (tampão do gel), por 30 minutos e novamente lavado em água destilada. Logo após, o gel foi coberto com o corante vermelho congo a 0,5% por 30 minutos e colocado em etanol por 10 minutos para a remoção do corante. Removido o etanol com água destilada, foi adicionada uma solução de 1M de NaCl até a observação visual da formação de halos brancos nos furos que continham as amostras. Nesse momento, foi feita a medição do diâmetro das amostras em duas direções com um paquímetro resultando em uma média. Para o cálculo da atividade da enzima, foi feita uma comparação com a curva padrão gerada pela endo- $\beta$ -mananase comercial de *Aspergillus niger* (Megazyme).

#### **4.7 Condutividade elétrica**

Tomados esses cuidados, o teste foi conduzido em cinco repetições de 50 sementes, que foram pesadas, colocadas em copo com 75 ml de água deionizada e mantidas a uma temperatura de 25 °C, protegidos da luz, em câmara tipo BOD.

Após 24 horas de embebição, foi realizada a leitura da condutividade elétrica em um condutivímetro Digimed CD-21, de acordo com metodologia descrita por Vieira (1994). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ .

#### **4.8 Análises fisiológicas realizadas**

Foram realizadas seis análises, a saber: IVG, teste de germinação, e protrusão, na primeira etapa; IVE, testes enzimáticos, condutividade elétrica, na segunda etapa.

##### **4.8.1 Teste de germinação**

O teste de germinação foi conduzido com as 250 sementes (5 repetições) do grupo de controle mais as 500 sementes (5 repetições), sementes sem pergaminhos, extraídos manualmente, para cada tratamento, semeadas em rolos de papel toalha tipo "germitest" umedecidos com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel seco e colocado em germinadores, por um período de 30 dias sob temperatura de  $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ . O grupo de 500 sementes recebeu o pré-tratamento com o campo magnético de intensidade 10 mT e 28 mT.

As avaliações de plântulas normais e as análises fisiológicas do IVG foram realizadas de acordo com o recomendado pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Foram utilizadas placas de acrílico para realizar a semeadura sobre o papel “germitest”. As sementes foram acondicionadas em germinador, regulado a 30 °C, na presença de luz. Foi realizada a determinação da porcentagem de protrusão radicular aos 15 dias após semeadura, em que foram computadas as sementes que apresentaram raiz principal e pelo menos 2 raízes laterais; a determinação de plântulas normais em cada repetição, aos 30 dias após semeadura, foi realizada conforme os critérios estabelecidos pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Germinação (G): calculada pela Equação 7:

$$G=(N/\text{total de sementes}) \times 100 \quad (7)$$

Em que:

N = número de sementes germinadas ao final do teste. Unidade: %.

Índice de velocidade de germinação (IVG): calculado pela Equação 8:

$$IVG=\sum(n_i/t_i) \quad (8)$$

Em que:

$n_i$  = número de sementes que germinaram no tempo ‘i’;

$t_i$  = tempo após instalação do teste;

$i = 1 \rightarrow 30$  dias. Unidade: plantas/dia.

No sétimo dia, as sementes (controle e magnetizadas) foram levadas ao laboratório 5 do Cedia para serem iluminadas com luz laser e realizar a aquisição das imagens. Após a captura das imagens, as sementes retornaram ao

LAS para se completarem os 30 dias e realizarem as demais análises pertinentes à fisiologia de sementes.

As sementes foram preparadas pelo Laboratório de Análise de Sementes seguindo uma logística de modo que, cada subgrupo de sementes foi preparado com uma defasagem de tempo de 1 dia. Tal procedimento se fez necessário para que fosse possível iluminar as sementes do controle e as sementes pré-tratadas magneticamente (grupos de 150 sementes por dia) em um único dia.

Completando-se os trinta dias no germinador, foram realizados os testes fisiológicos propostos tanto do grupo controle,  $G_1$  e  $G_3$  quanto do grupo das sementes pré-tratadas magneticamente,  $G_2$  e  $G_4$ .

No Quadro 3, está representada a logística empregada na entrada das sementes no germinador juntamente com a magnetização.

Quadro 3 - Localização temporal das entradas das sementes no germinador juntamente com os ímãs.

Tratamentos e suas repetições levadas aos germinadores	Dia 1 Sementes no germinador e magnetização	Dia 2 Sementes no germinador e magnetização	Dia 3 Sementes no germinador e magnetização	Dia 4 Sementes no germinador e magnetização	Dia 5 Sementes no germinador e magnetização
Controle + 10 mT + 28 mT	150 sementes				
Controle + 10 mT + 28 mT		150 sementes			
Controle + 10 mT + 28 mT			150 sementes		
Controle + 10 mT + 28 mT				150 sementes	
Controle + 10 mT + 28 mT					150 sementes

Fonte: Do autor (2018).

Decorridos seis dias de magnetização e germinação, procedeu-se a iluminação das sementes e retorno das mesmas ao germinador para se

completarem os 30 dias da etapa 1. No Quadro 4, encontra-se a síntese dessa fase.

Quadro 4 - Distribuição temporal da iluminação das sementes.

Tratamentos	Dia 7 Iluminação das sementes do dia 1	Dia 8 Iluminação das sementes do dia 2	Dia 9 Iluminação das sementes do dia 3	Dia 10 Iluminação das sementes do dia 4	Dia 11 Iluminação das sementes do dia 5
Controle	50 sementes	50 sementes	50 sementes	50 sementes	50 sementes
10 mT	50 sementes	50 sementes	50 sementes	50 sementes	50 sementes
28 mT	50 sementes	50 sementes	50 sementes	50 sementes	50 sementes

Fonte: Do autor (2018).

#### 4.8.2 Emergência sob condições controladas (Bandeja-IVE)

Foi realizado o teste do índice de velocidade de emergência da semente de café, diariamente durante 76 dias em bandejas e em câmara de crescimento vegetal (ou vegetação). Considerar-se-ia como início da germinação quando as plântulas apresentassem os dois primórdios foliares e uma radícula desenvolvida conforme a descrição das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

O IVE foi avaliado segundo a metodologia sugerida por Krzyzanowski et al. (1999) e pela Equação (9) proposta por Maguirre (1962):

$$IVE = \frac{E_1}{N_1} + \frac{E_2}{N_2} + \frac{E_3}{N_3} + \dots + \frac{E_n}{N_n} \quad (9)$$

Onde:

IVE = índice de velocidade de emergência;

$E_1, E_2, \dots, E_n$  = número de plântulas emergidas, computadas na primeira, segunda, ..., última contagem;

$N_1, N_2, \dots, N_n$  = número de dias da semeadura á primeira, segunda, ..., última contagem.

A semeadura foi realizada em bandejas plásticas contendo como substrato solo + areia na proporção 2:1. Foram realizadas cinco repetições de 50 sementes. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas em câmara de crescimento vegetal à temperatura de 30°C, na penumbra.

A partir da emergência da primeira plântula foram realizadas avaliações diárias, computando-se o número de plântulas emergidas até a estabilização. Foi considerada a porcentagem de plântulas normais aos 14 dias (%E) e o índice de velocidade de emergência, determinado segundo a equação de Maguirre (1962).



## **5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

O delineamento experimental utilizado neste trabalho foi o inteiramente casualizado (DIC). Foram comparados três tratamentos de exposição a campo magnético (controle, intensidades de 10 mT e 28 mT), com cinco repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com o auxílio do software estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2014) a 5% de probabilidade, pelo teste F, e a comparação das médias foi realizada pelo teste de Scott-Knott com significância de 5%.



## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram analisados e discutidos todos os resultados obtidos nos experimentos. Para cada análise realizada, fez-se uma conclusão individual e, no final das discussões, foi feita uma conclusão geral, incluindo-se todos os resultados de cada análise.

### 6.1 Biospeckle Laser- BSL

Pelos resultados do Biospeckle Laser observa-se que na região embrionária existe uma atividade diferenciada quando se comparam as sementes magnetizadas com as do controle. A quantificação dessa atividade embrionária quando se utiliza o Momento de Inércia, foi mais significativa com uma diferença de atividade entre os tratamentos.

Na Tabela 1, estão relacionadas às médias de cada tratamento em relação ao controle, com valores de Momento de Inércia e o AVD.

Tabela 1 - Resultados médios de atividade embrionária de sementes de cafeeiro submetidas ao campo magnético uniforme em valores de AVD e MI, adimensionais. UFLA, Lavras, MG, 2018.

Tratamentos	AVD	Tratamentos	MI
Controle	16,726 a	Controle	460,712 a
10 mT	22,729 b	10 mT	673,473 b
28 mT	22,795 b	28 mT	857.816 c

Fonte: Do autor (2018).

Médias seguidas de letras iguais na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5%. C.V(%) AVD 16,780; C.V (%) MI 11,220.

De acordo com Vivas (2015), a atividade evidenciada pelo Biospeckle Laser é um parâmetro para detecção não invasiva da qualidade de sementes de café e, também, para a diferenciação da atividade do embrião. Com a

quantificação da atividade infere-se a respeito da qualidade fisiológica das sementes. Em sua pesquisa, onde se comparou a eficiência do Biospeckle Laser em relação às análises fisiológicas tradicionais de viabilidade de sementes, o embrião foi iluminado com luz laser e a sua atividade mensurada.

Nas sementes pré-tratadas pelo campo magnético, houve uma atividade embrionária maior quando se compara com as sementes do grupo do controle. Naquelas sementes magnetizadas com uma indução de 28 mT, observou-se maior atividade, quando comparadas com a magnetização de 10 mT. Há, portanto, indicação de uma influência do campo magnético, em termos de atividade, sobre o embrião das sementes.

Pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância, na variável AVD, o tratamento controle difere dos outros tratamentos por possuir a menor média de atividade, enquanto que na variável MI no tratamento de 28 mT se destaca dos outros tratamentos por possuir um nível médio de atividade maior.

Esses resultados corroboram com nossa hipótese de que o campo magnético exerce alguma influência nas sementes em suas fases iniciais de germinação e, além disso, o Biospeckle Laser foi capaz de detectar, antecipada e indestrutivelmente, o nível dessa atividade em relação aos testes fisiológicos, que demandam um intervalo de tempo maior. Cabe, agora, aos testes de fisiologia de sementes, revelar em quais aspectos intrínsecos às sementes ocorreram tais mudanças.

Com os resultados obtidos pela a técnica do Biospeckle Laser, pode-se concluir sua eficiência na verificação de atividade embrionária diferenciada proporcionada pela magnetização das sementes, sendo o Momento de Inércia a ferramenta mais eficiente na quantização do nível de atividade embrionária.

## 6.2 Índice de Velocidade de Emergência- IVE

As análises dos dados do índice de velocidade de emergência das sementes de café revelaram que houve significativa diferença para aquelas magnetizadas por uma indução de 28 mT, com  $P \leq 0,05$ , entre a magnetização de 10 mT e o controle, com um coeficiente de variação de 15,08 % (TABELA 2).

Tabela 2 - Índice de velocidade de emergência (plantas/dia) de sementes de cafeeiro submetidas à uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.

Tratamentos	Índice de Velocidade de Emergência
Controle	0,485 a
10 mT	0,557 a
28 mT	0,777 b

Fonte: Do autor (2018).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade. C.V (%) 15,080.

### 6.2.1 Número de Emergência

Observando as análises do número de emergência das sementes, nota-se que para a indução magnética de 28 mT, obteve-se uma maior quantidade de sementes emergidas em um mesmo intervalo de tempo com um coeficiente de variação de 8,76%, quando se compara com o controle e o tratamento magnético de 10 mT (TABELA 3).

Tabela 3 - Número de emergência (n<sup>o</sup> plântulas) de sementes de cafeeiro submetidas à uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.

Tratamentos	Número de emergência
Controle	52,000 a
10 mT	60,500 a
28 mT	80,500 b

Fonte: Do autor (2018).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. C.V (%) 8,760.

A magnetização das sementes de café com a intensidade de 28 mT proporcionou um maior índice de velocidade de emergência e, conseqüentemente, um maior número de plântulas emergidas.

Correlacionando com os dados do Biospeckle Laser, a maior atividade na região embrionária detectada pelo BSL pode estar relacionada com algum processo energético desencadeado pela magnetização que culminou com um maior “arranque” das plântulas pré-tratadas com a magnitude de 28 mT de campo magnético.

Elencar todos os eventos que tiveram seus efeitos potencializados por ocasião da magnetização é ainda prematuro sem analisar e sedimentar os resultados das outras análises. Outras pesquisas realizadas com a magnetização de plântulas de café já detectaram quais foram os efeitos maximizados pela magnetização nessas plântulas, porém, são trabalhos em números reduzidos.

O pré-tratamento magnético de sementes de café para fins de otimização de germinação ainda é insipiente, há alguns trabalhos de aplicação em plântulas de café como é o caso de Alemán et al. (2014a, 2014b), que analisaram os efeitos do magnetismo sobre as plântulas em diferentes fases de seu desenvolvimento e, concluíram que a aplicação do campo eletromagnético promoveu um aumento na absorção dos nutrientes do meio de cultura. Essa conclusão está diretamente correlacionada com o metabolismo das células e a

produção de energia necessária para a divisão celular para aumentar o tamanho e o desenvolvimento das plântulas.

O resultado obtido por nossa pesquisa na magnetização de sementes está alinhado com o desenvolvimento mais rápido das plântulas de café quando suas sementes foram tratadas com a indução magnética de 28 mT, onde, possivelmente, houve maior absorção de nutrientes do endosperma, garantindo a essas plântulas um maior arranque na protrusão e, por consequência, maior índice de velocidade de emergência.

O efeito promotor de campos magnéticos no alongamento do tecido vegetativo foi observado em muitas outras espécies. Cakmak, Dumlupinar e Erdal (2010) e Rochalska e Orzeszko (2005), trabalhando com a magnetização de mudas de trigo e feijão obtiveram o alongamento celular induzido por campo eletromagnético.

Na Figura 22, é mostrado o desenvolvimento das plântulas de café no decorrer do tempo.

Figura 22 - Desenvolvimento das sementes do cafeeiro no decorrer do tempo.

(Continua)

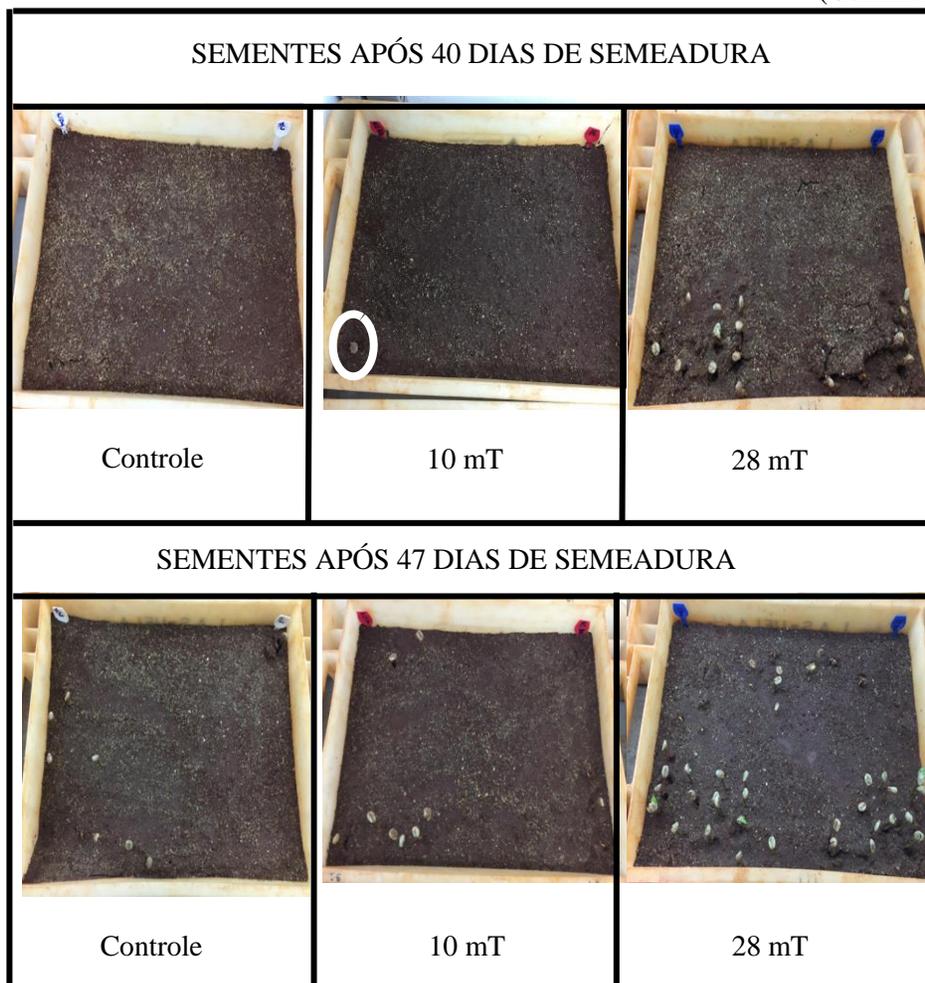


Figura 22 - Desenvolvimento das sementes do cafeeiro no decorrer do tempo.  
(Continuação)

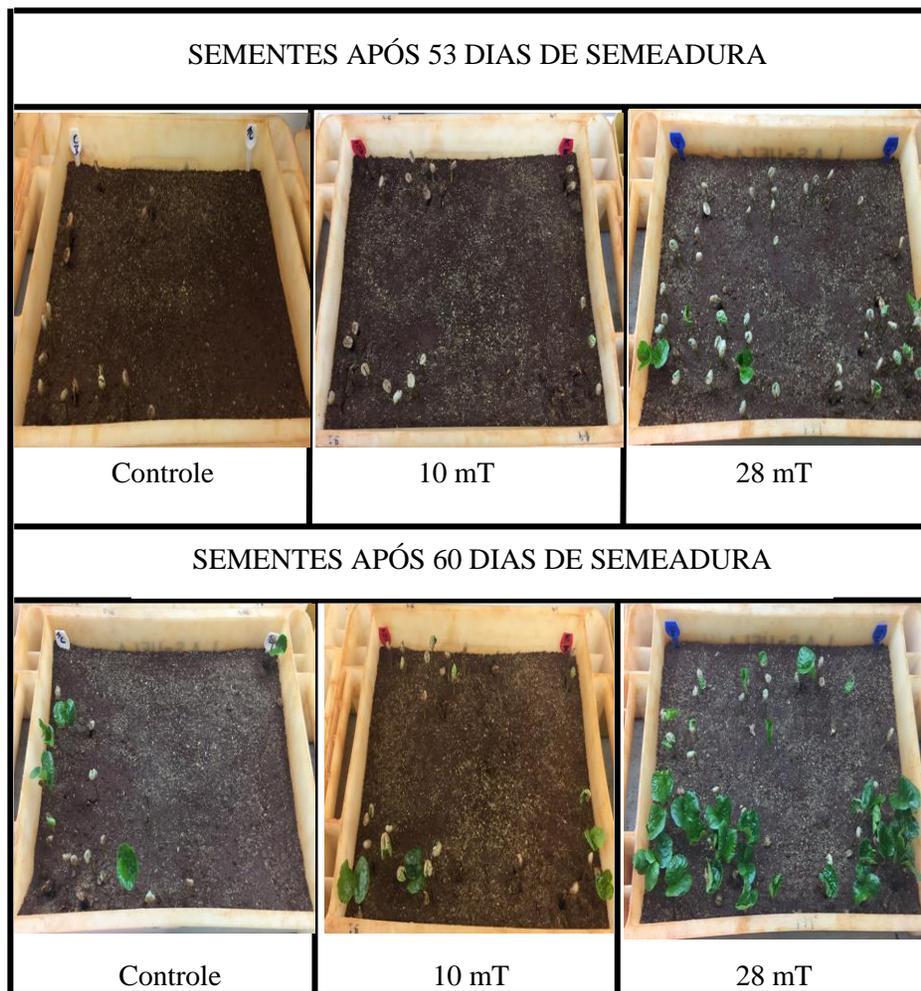
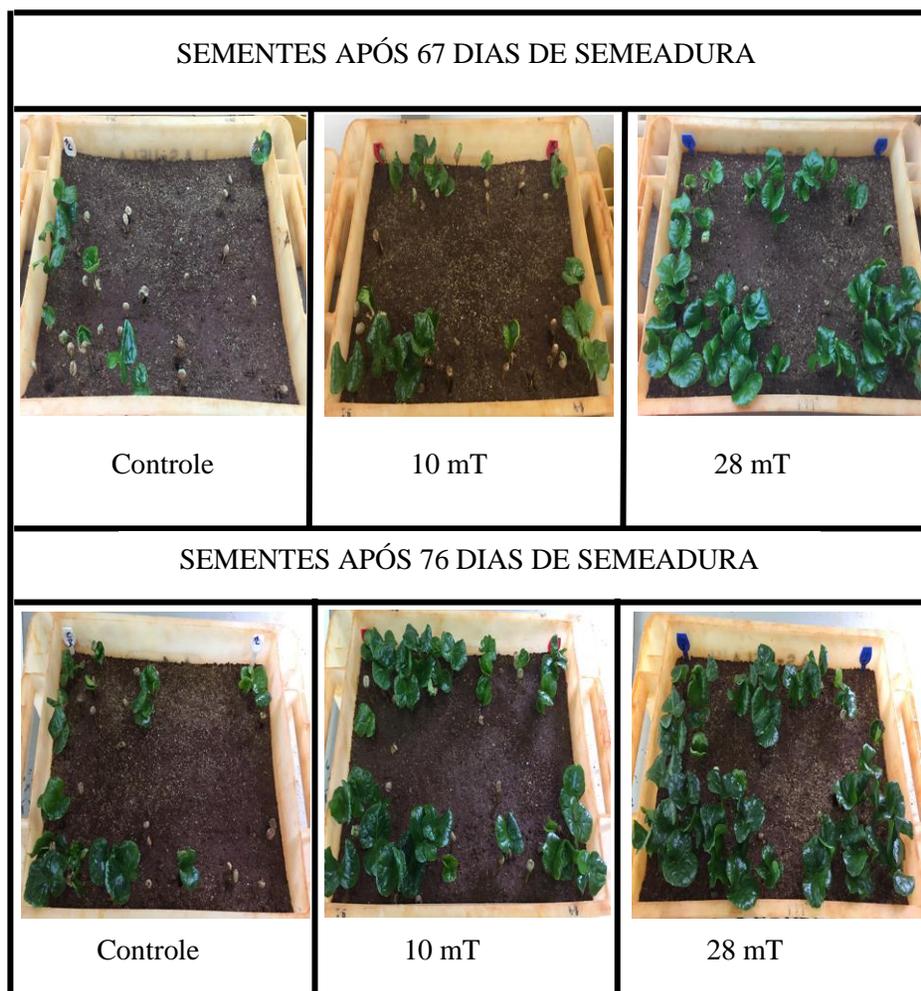


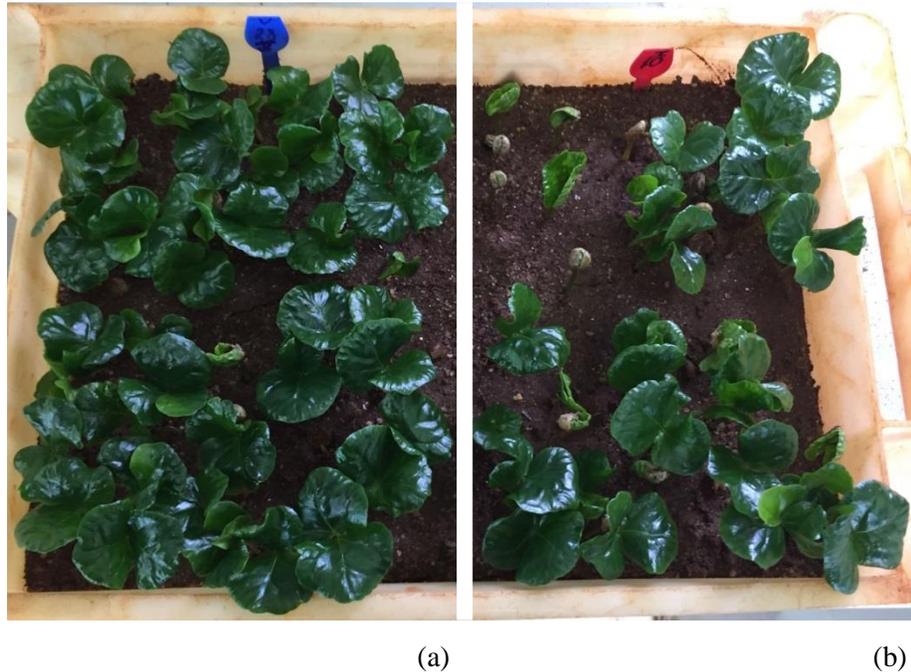
Figura 22 - Desenvolvimento das sementes do cafeeiro no decorrer do tempo.  
(Conclusão)



Fonte: Do autor (2018).

Na Figura 23, compara-se em uma mesma bandeja o desenvolvimento das plântulas dos tratamentos com indução magnética de 28 mT e de 10 mT, respectivamente.

Figura 23 - Comparação das plântulas para os tratamentos de: (a) 28 mT e (b) 10 mT no septuagésimo sexto dia de semeadura.



Fonte: Do autor (2018).

Comparando-se os resultados do BSL com os do IVE, nota-se que o melhor desenvolvimento das plântulas se deu para a maior intensidade de campo magnético exatamente para as sementes que esboçaram maior nível de atividade no BSL. O BSL evidenciou a ocorrência de  $n$  eventos pertinentes aos processos fisiológicos que ocorreram na germinação das sementes tratadas magneticamente com uma indução de 28 mT.

Conclui-se, portanto que, o pré-tratamento magnético com uma indução de 28 mT proporcionou um maior arranque das plântulas de café em um menor intervalo de tempo quando se compara com o controle e o tratamento com a indução de 10 mT. Além disso, a magnitude de 28 mT promoveu um maior número de emergência em relação aos demais tratamentos.

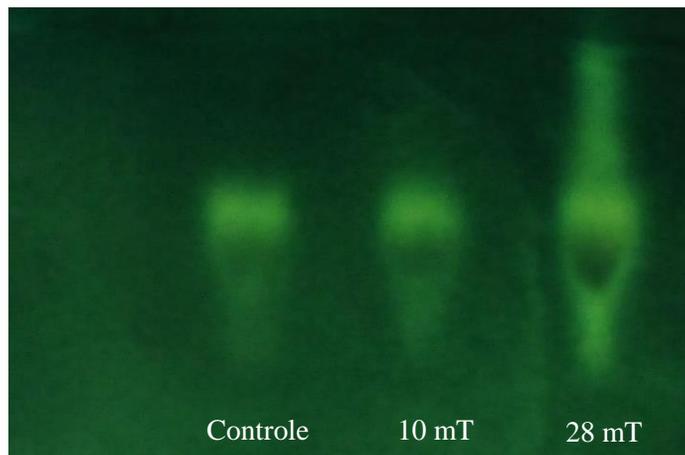
### 6.3 Enzimas

As análises e discussões sobre as enzimas teve foco sobre a principal atuação de cada uma delas no processo de germinação das sementes de cafeeiro. Após as discussões de cada resultado, individualmente, foi feita uma conclusão geral sobre o tópico enzimas.

#### 6.3.1 Enzima Catalase

A enzima catalase teve um padrão eletroforético mais acentuado nas sementes magnetizadas quando comparadas com o controle. Observando as bandas de expressão dessa enzima, Figura 24, nota-se sua maior expressão para as sementes submetidas a uma indução magnética de 28 mT.

Figura 24 - Perfil eletroforético da expressão da enzima catalase.

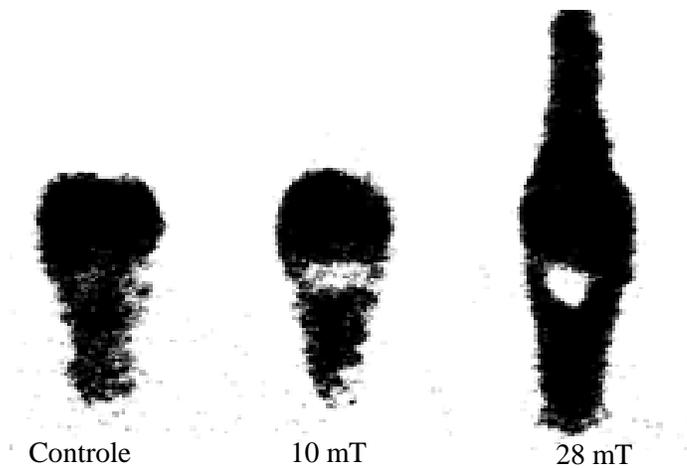


Fonte: Do autor (2018).

Essa análise subjetiva foi confirmada pela quantificação de sua área de expressão com o auxílio do software Image J. Com esse programa, foi possível

mensurar a quantidade de pixels da imagem, ou seja, a área de expressão da enzima em  $\text{pixel}^2$ , fornecendo uma análise menos subjetiva das bandas de atividade. Na Figura 25, são mostradas as áreas de expressão da enzima, tanto para o controle como para ambas as magnitudes de campo magnético.

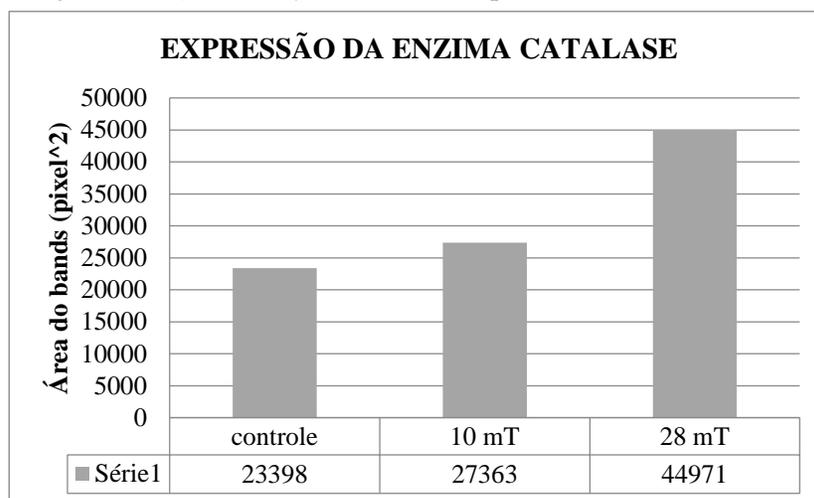
Figura 25 - Imagens das bandas de expressão da enzima catalase pós-processamento com o programa Image J.



Fonte: Do autor (2018).

Observa-se, de fato, uma maior atividade da enzima catalase para um valor de campo magnético de 28 mT, pelo maior valor numérico de sua área de expressão (FIGURA 26).

Figura 26 - Quantificação da área de expressão da enzima catalase.



Fonte: Do autor (2018).

Pela grande diferença em termos de atividade dessa enzima em relação ao controle, pode-se inferir que o campo magnético de maior magnitude, 28 mT, propiciou uma ativação precoce desse sistema de defesa prevenindo contra outros estresses oxidativos naturalmente desencadeados durante o processo de germinação.

A magnitude do campo magnético de 10 mT promoveu, também, uma maior ativação da enzima catalase quando comparada com o controle.

A diminuição da atividade eletroforética dessas enzimas “limpadoras”, pressupõe-se uma maior deterioração das sementes pelo fato de ficarem expostas à ação de radicais livres e, por conseguinte, em uma menor viabilidade das sementes.

Os sistemas antioxidativos estão presentes nos diferentes tecidos das plantas, com a função de impedir o acúmulo de substâncias tóxicas gerado pela oxidação. Esses sistemas protetores são formados de constituintes enzimáticos e não enzimáticos, sendo os enzimáticos de fundamental importância, pois são os

primeiros a agir, evitando o acúmulo do radical superóxido ( $O_2^-$ ) e do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ).

No sistema enzimático, merecem destaque, além da catalase, a enzima superóxido dismutase (SOD), que são enzimas removedoras de radicais livres e de peróxidos, denominadas *scavenging*.

O pré-tratamento magnético das sementes de café atuou como uma ‘vacina’, ativando antecipadamente a produção da catalase em um período anterior à protrusão radicular, essa inferência está de acordo com o que Bailly et al. (1996) e Jeng e Sung (1994), pesquisaram. Segundo eles, essas enzimas podem reduzir ou prevenir os danos celulares causados pela peroxidação de lipídios oriundos de estresse oxidativo bióticos ou abióticos.

A atuação da catalase visa a diminuir o efeito tóxico do peróxido de hidrogênio removendo-o, Halliwell e Guteridge (1989), estando presente nos peroxissomas das células com a função de catalisar a decomposição do peróxido de hidrogênio em oxigênio molecular e água sem a produção de radicais livres, desempenhando, dessa maneira, um papel de fundamental importância na desintoxicação celular.

Um dos efeitos adversos de atuação de campos magnéticos em organismos vivos é o estresse oxidativo por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS's). O estresse oxidativo afeta a estrutura da membrana e o crescimento celular e pode mesmo causar a morte celular (GREEN et al., 1999). Essa interação magnética durante o processo de germinação estimula ou induz o sistema de enzimas antioxidantes.

Em diversos estudos, tem sido demonstrada uma correlação entre a perda da viabilidade das sementes e queda na atividade dessa enzima. Sung e Chiu (1995) observaram redução na atividade de enzimas *scavenging*, entre elas a catalase com o aumento do período de armazenamento de sementes de soja.

Resultados semelhantes foram observados por Goel, Goel e Sheoran (2003), em sementes de algodão; por Bailly et al. (1996), em sementes de girassol e por Sung (1996), em sementes de amendoim.

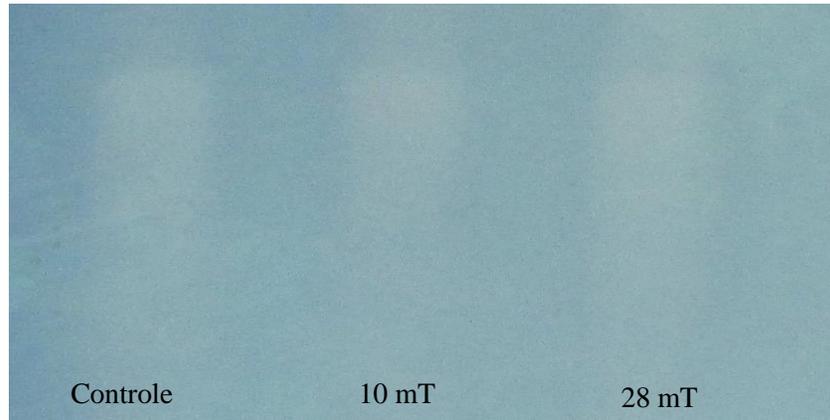
O armazenamento de sementes é um fator de estresse oxidativo que ocorre de maneira natural durante o processo, tais sementes submetidas ao pré-tratamento magnético, antes da armazenagem, poderiam aumentar a quantidade da enzima catalase, já antevendo sua futura diminuição.

A atividade dessa enzima tende a cair com o aumento do envelhecimento das sementes, conduzindo a uma ineficiência do sistema de proteção das sementes Sung (1996), Sung e Chin (1995) e Sung e Jeng (1994). Na contramão dessa tendência, Puntarulo e Boveris (1990), observaram um aumento da atividade das catalases em embriões de soja durante o envelhecimento.

### **6.3.2 Enzima superoxidodismutase (SOD)**

A atividade da enzima superoxidodismutase é também mais expressiva para um valor maior de campo magnético, fato esse comprovado pela quantificação, em pixel<sup>2</sup>, da área de expressão da referida enzima. Na Figura 27, tem-se a banda de expressão obtida pela eletroforese de gel agarose.

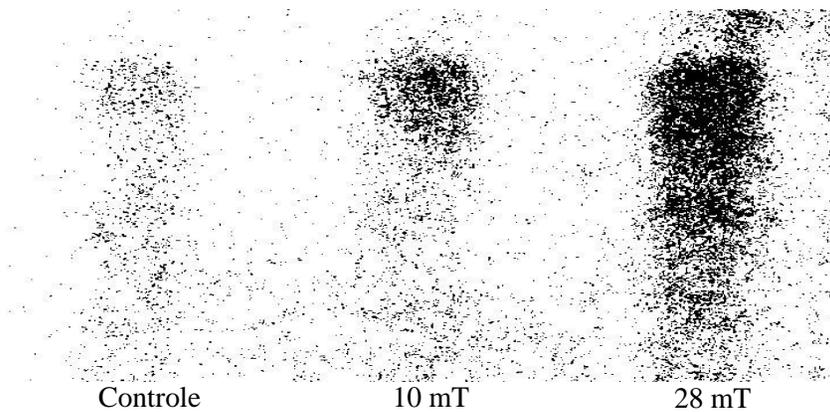
Figura 27 - Banda de expressão da enzima SOD.



Fonte: Do autor (2018).

Como para esse tipo de enzima a simples observação de sua banda acolor de expressão não permite inferir com precisão sobre a magnitude de sua expressão, faz-se necessária a utilização do Image J. Obteve-se a imagem processada da qual foi possível mensurar a quantidade de pixels de cada banda de expressão da enzima (FIGURA 28).

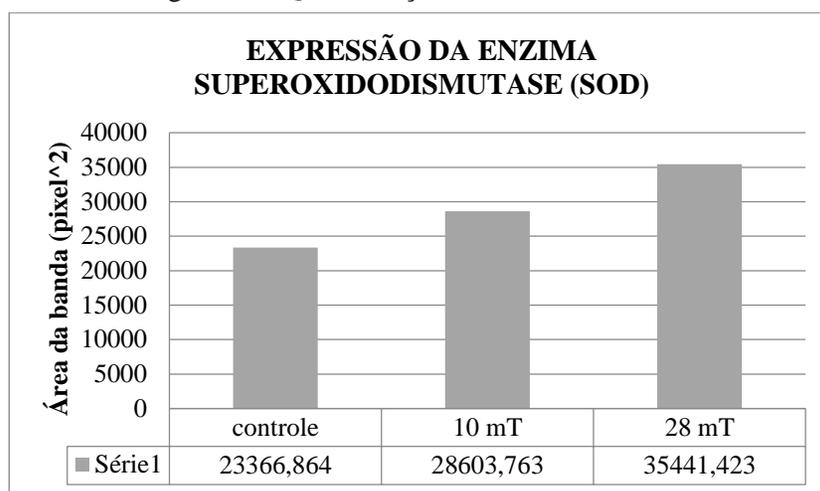
Figura 28 - Expressão da enzima SOD.



Fonte: Do autor (2018).

Com esses resultados numéricos foi possível compará-los, onde ficou evidente sua maior atividade enzimática para a magnetização de 28 mT (FIGURA 29).

Figura 29 - Quantificação da atividade da SOD.



Fonte: Do autor (2018).

Um aumento da expressão da enzima catalase é acompanhado por um aumento correspondente da enzima superoxidodismutase, uma vez que ambas atuam complementando a atuação da outra, isto é, a SOD atua na dismutação de radicais livres do tipo superóxido ( $O_2^-$ ), transformando-o em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, como o  $H_2O_2$  é nocivo à semente, a enzima catalase o converte em água e  $O_2$ .

Analogamente, o campo magnético de maior intensidade promoveu uma acentuada produção de espécies reativas de oxigênio o que culminou na maior expressão eletroforética da SOD, inferindo-se sobre a maior viabilidade das sementes de café quando submetidas a uma indução magnética de 28 mT.

A exposição das sementes de café ao campo magnético, mesmo que isso constitua para as sementes um estresse oxidativo, seu efeito é majoritariamente benéfico para o valor de campo 28 mT e um período de exposição de 6 dias em germinadores. Aparentemente, essa indução magnética antecipou a ativação das enzimas 'limpadoras' sem, entretanto, provocar efeitos nocivos importantes às sementes, como ficou comprovado pelos resultados das análises do IVE.

As superóxidos dismutase são um grupo de metaloenzimas que catalisam a desproporcionalização de duas moléculas de superóxidos livres ( $O_2^-$ ), produzidos em diferentes locais na célula, em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (SCANDALIOS, 1993).

De acordo com Halliwell e Gutteridge (1989), a SOD exerce um importante papel em proteger a célula contra os efeitos deletérios de radicais superóxidos livres, sendo considerada chave na regulação de concentrações intracelulares de radicais superóxidos e peróxidos, os quais podem reagir nas reações de Haber-Weiss para formar radicais hidroxil (BOWLER; MONTAGU; INZÉ, 1992).

O papel primário da SOD é transformar o superóxido em peróxido de hidrogênio cujo composto é muito menos reativo. Entretanto, o acúmulo de peróxido na célula também é tóxico a ela, podendo levá-la à morte, principalmente na presença de ferro cuja toxicidade pode aumentar de 10 a 1000 vezes (EATON, 1991). Além disso, o peróxido de hidrogênio pode atravessar facilmente as membranas celulares e, ao receber mais um elétron, normalmente proveniente do ferro ou do cobre, origina o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ). Esse último é, entre as espécies radicalares conhecidas, uma das mais reativas, pois necessita somente de mais um elétron para se estabilizar.

Espécies reativas de oxigênio, para estabilizarem-se, devem doar ou receber elétrons de uma ou outra molécula, tornando essa última uma espécie também radicalar, cuja consequência é a oxidação dos fosfolipídios de

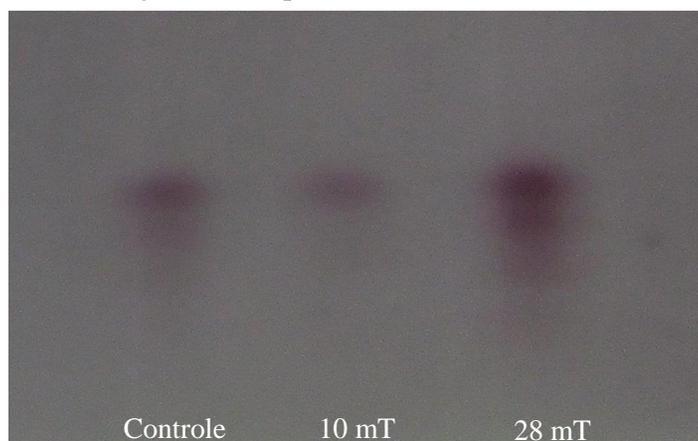
membranas celulares e subcelulares, do DNA, e das proteínas (DURAN; CADENAS, 1987).

Goel, Goel e Sheoran (2003), verificaram que a perda da viabilidade de sementes de algodão está associada ao decréscimo na atividade da superóxido dismutase. Resultados semelhantes foram encontrados por Sung e Jeng (1994), em sementes de amendoim e por Bailly et al. (1996), em sementes de girassol. A viabilidade das sementes pode ser aumentada com o pré-condicionamento magnético das mesmas, uma vez que, com o campo magnético de 28 e 10 mT obteve-se uma maior expressão eletroforética para a enzima superoxidodismutase.

### 6.3.3 Enzima esterase (EST)

A atividade da enzima esterase no gel apresentou um padrão de bandas diferente em relação às outras enzimas para todos os tratamentos (FIGURA 30).

Figura 30 - Expressão da enzima esterase.



Fonte: Do autor (2018).

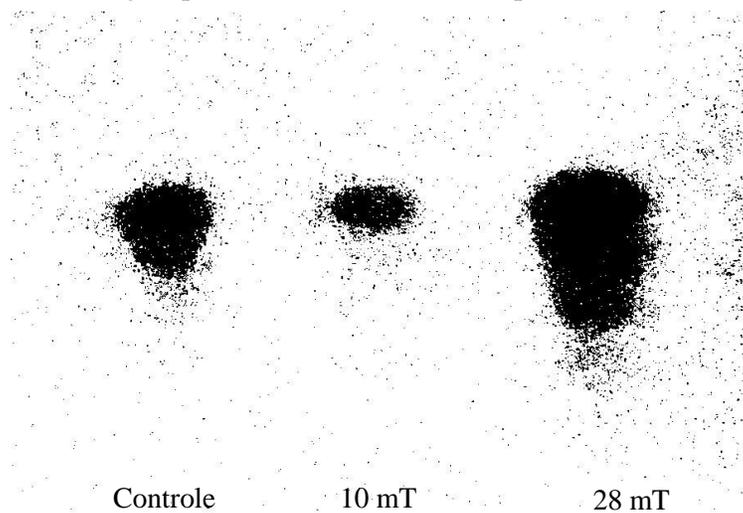
A esterase é uma das enzimas responsáveis pelo metabolismo de lipídios de membrana durante a germinação da semente. Como houve alterações nos padrões dessa enzima fica evidenciada a ocorrência de eventos deteriorativos, pois a esterase é uma enzima envolvida em reações de hidrólise de ésteres, estando diretamente ligada ao metabolismo de lipídios e aos processos degenerativos de membrana (SANTOS; MENEZES; VILELA, 2005).

Observou-se, em relação a esterase, menor expressão para as sementes submetidas ao campo magnético de 10 mT e uma maior expressão para sementes submetidas a um campo magnético de 28 mT onde o estresse magnético oxidativo, possivelmente, foi maior, conforme mostrado na Figura 29.

Em comparação com os resultados do controle, a exposição ao campo magnético de 10 mT promoveu, aparentemente, uma maior estruturação à camada dupla de fosfolípidios, deixando-a mais íntegra e organizada, aumentando a viabilidade dessas sementes quando expostas à essa intensidade de campo magnético.

A expressão dessa enzima, em termos de área, foi quantificada pelo software Image J, permitindo uma análise numérica. Na Figura 31, fica evidente a magnitude da expressão eletroforética da enzima catalase.

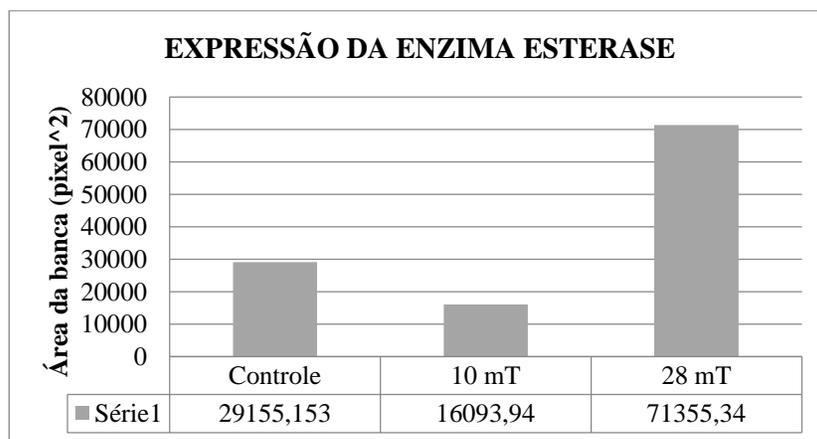
Figura 31 - Imagem processada das bandas de expressão da enzima esterase.



Fonte: Do autor (2018).

Com os dados numéricos chega-se a uma atividade para essa enzima muito maior na magnetização de 28 mT em comparação com o controle e a aplicação do campo magnético de 10 mT (FIGURA 32).

Figura 32 - Quantificação da enzima esterase.



Fonte: Do autor (2018).

Dessa maneira, nas sementes tratadas magneticamente, houve possivelmente um maior dano às membranas fosfolípídicas para o tratamento de 28 mT, resultando em uma desestruturação das membranas e maior quantidade de lipídeos essenciais às funções de germinação e desenvolvimento da planta.

Segundo Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), sendo a peroxidação de lipídios um evento associado a danos de membrana fosfolipídica das células das sementes, alterações podem levar à ocorrência de eventos deteriorativos, que podem contribuir para a redução na germinação das sementes. Assim sendo, a esterase é uma eficiente indicadora da deterioração das sementes.

De acordo McDonald (1999), a peroxidação de lipídios é uma das principais causas da deterioração em sementes. Santos, Menezes e Vilela (2005), observaram aumento na atividade de esterase, durante o armazenamento de sementes de feijão. De acordo com os autores, esse aumento foi mais expressivo na cultivar de menor qualidade fisiológica quando comparado ao observado nas outras cultivares estudadas. Segundo Roberts (1973), enzimas hidrolíticas têm sua atividade incrementada com a perda da viabilidade das sementes.

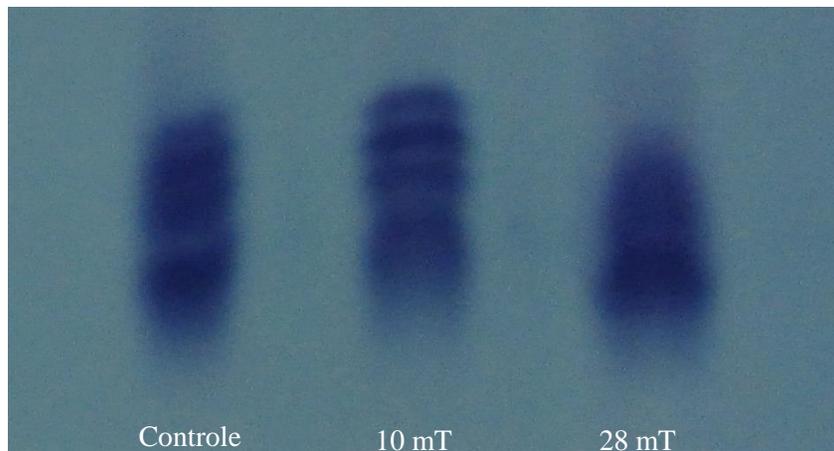
A menor expressão da enzima catalase para a intensidade de 10 mT, permite inferir que tais sementes pré-magnetizadas estão em menor risco de iniciar o processo de deterioração ao passarem por algum estresse, durante a germinação, haja vista que, alguns autores destacam o aumento no padrão dessa enzima como um indicador da ocorrência de deterioração.

Em pesquisas com sementes de soja (*Glycine max*) e cevada (*Hordeum vulgare*) (CHAUHAN; GOPINATHAN; BABU, 1985), e com algodão (RIBEIRO, 2000), também evidenciou-se uma correlação positiva entre a atividade de esterase e o processo deteriorativo. Por outro lado, Brandão Junior (1996), trabalhando com sementes de milho verificaram decréscimo na atividade dessa enzima com o avanço da deterioração das sementes.

#### 6.3.4 Enzima malatodesidrogenase (MDH)

Analisando-se as bandas de expressão eletroforética da enzima malatodesidrogenase, percebe-se uma sutil elevação da atividade dessa enzima à medida que aumenta a intensidade do campo magnético (FIGURA 33).

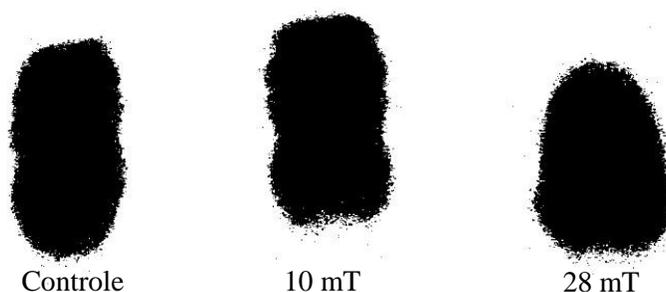
Figura 33 - Bandas da atividade da enzima malatodesidrogenase.



Fonte: Do autor (2018).

Analogamente aos procedimentos adotados às demais enzimas, fez-se o processamento das imagens para ter uma quantificação de sua atividade (FIGURA 34).

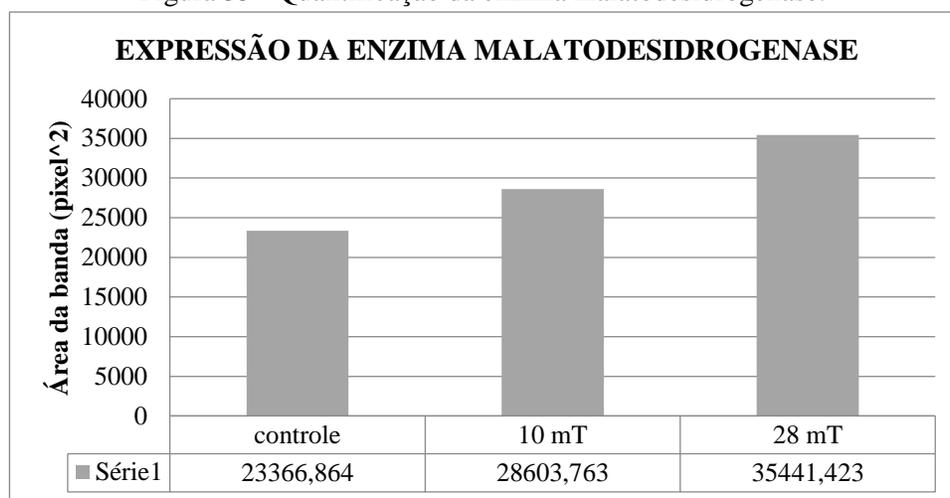
Figura 34 - Imagens pós-processadas no ImageJ.



Fonte: Do autor (2018).

Com os dados numéricos chega-se a uma atividade um pouco maior para a enzima malatodesidrogenase com a magnetização de 28 mT revelando sua maior expressão para essa enzima em comparação com o controle e a magnetização de 10 mT (FIGURA 35).

Figura 35 - Quantificação da enzima malatodesidrogenase.



Fonte: Do autor (2018).

As sementes de café não foram imersas em água, ou seja, não foram expostas à condição anaeróbica e predominou a rota aeróbica, com maior atividade dessa enzima. A intensificação da respiração dessas sementes possivelmente desencadeou maior produção de radicais livres de superóxidos ( $O_2^-$ ), quando as sementes foram expostas ao campo magnético de intensidade de 28 mT. Essa taxa de respiração foi crescente com o aumento do valor do campo magnético.

Uma das funções da enzima malato desidrogenase é catalisar a conversão de malato a oxaloacetato, tendo uma importante função de produção de NADH para o Ciclo de Krebs. Por se tratar de uma enzima importante, durante o processo respiratório celular, o aumento da sua atividade pode ser decorrente do aumento da expressão desta em diferentes compartimentos celulares e/ou pela indução da atividade da enzima expressa pela maior intensidade das bandas, isto pode ter ocorrido, em razão do aumento da respiração nas sementes (SHATTERS; ABDELGHANY; ELBAGOURY, 1994), fato esse que vai ao encontro dos resultados obtidos para a magnetização das sementes de café. A magnetização das sementes com uma intensidade de 28 mT promoveu uma maior respiração das sementes o que refletiu, também, na maior produção de radicais livres que, por consequência, fez com que as enzimas antirradicalares tivessem maior expressão como ocorreu com as enzimas catalase e a superoxidodismutase.

Por outro lado, conforme Salinas et al. (1998), as mitocôndrias dos eixos embrionários são responsáveis pelo fornecimento de energia usada no alongamento dos eixos raiz/caule e, se a taxa respiratória aumentar nos eixos, a emergência e crescimento das plântulas também aumentarão.

Estudos realizados por Basavarajappa, Shetty e Prakash (1991), com o teste de tetrazólio demonstraram gradual diminuição na atividade das desidrogenases em sementes envelhecidas de milho, indicando que essa perda

poderia estar associada ao baixo nível de produção de ATP. Os resultados dessas pesquisas compactuam com aqueles que foram obtidos com o índice de velocidade de emergência, onde as plântulas de café se desenvolveram mais rápidas para o tratamento com o campo magnético de 28 mT, exatamente onde obteve-se uma expressão maior para a enzima malatodesidrogenase.

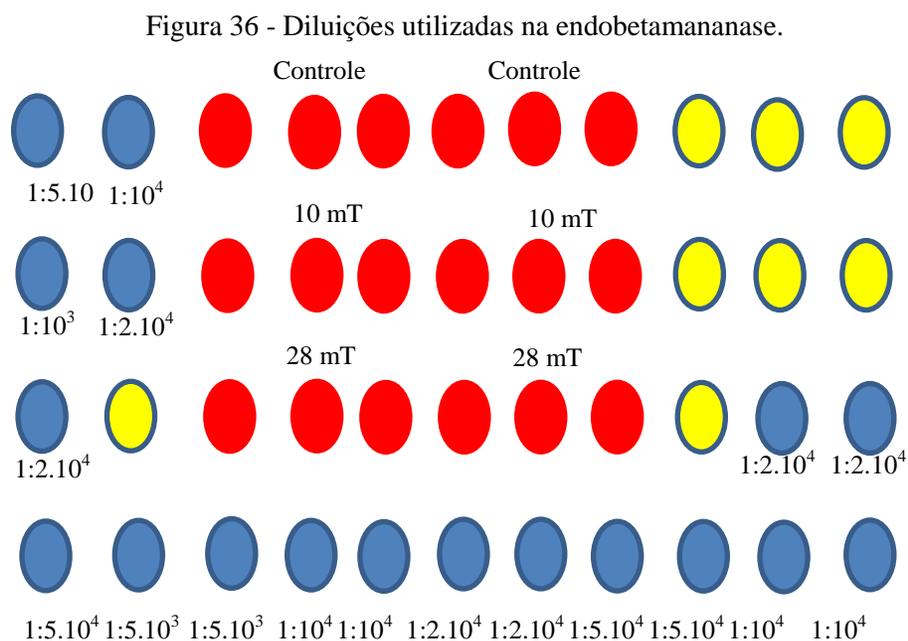
Vieira (1996), verificou que a MDH, por ser uma enzima envolvida na respiração celular, provocou aumento do número e ou intensidade de coloração de bandas em sementes de algodão. Submetidas a períodos mais longos de envelhecimento artificial, o que pode ser decorrente do aumento da respiração.

A enzima malato deshidrogenase (MDH) é associada com a biossíntese de oxalacetato (OAA), pela interconversão do malato para oxalacetato, durante o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs) em plantas (WEEDEN; WENDEL, 1990). Assim, MDH assume uma função importante em uma ampla variedade de reações biossintéticas, tais como: síntese de aminoácidos, gluconeogênese, manutenção dos potenciais redox e intercâmbio de metabólitos entre o citoplasma e as organelas (LIN et al., 2003). Contudo, espera-se que a atividade de MDH seja intensa nos primeiros estádios do processo de germinação onde a síntese de novos tecidos da semente requer mais energia para o crescimento.

A enzima malatodesidrogenase revelou outro efeito desencadeado pela magnetização das sementes, o aumento da taxa de respiração em um momento precoce da germinação em virtude da necessidade de uma dose maior de energia para a formação de novos tecidos. No entanto, esse efeito benéfico superou os efeitos deletérios pela formação dos ROS's em razão da respiração.

### 6.3.5 Enzima Endobetamananase

Na Figura 36, estão representadas as diluições utilizadas na análise da enzima endobetamananase para cada tratamento.



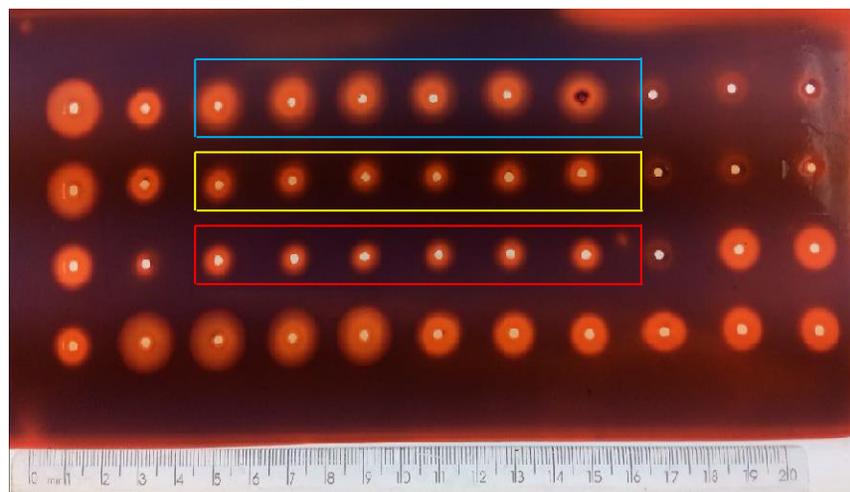
Legenda: Azul: padrão; vermelho: amostra; amarelo: sem nada.

Fonte: Do autor (2018).

Na Figura 37, é mostrado o perfil de atividade da enzima endobetamananase em  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ . Após a revelação do gel, foi feita a captura da imagem com uma câmera digital e a mensuração do diâmetro dos halos padrões. De acordo com Assis (2017), a atividade da enzima endobetamananase é indiretamente proporcional ao diâmetro do halo formado.

No retângulo azul está representado o resultado de expressão do controle, no retângulo amarelo o do campo magnético de intensidade de 10 mT enquanto que no retângulo vermelho o de intensidade de 28 mT.

Figura 37 - Expressão da enzima endobetamananase.



Legenda: Retângulo azul- controle. Retângulo amarelo- magnetização 10 mT  
Retângulo vermelho- magnetização 28 mT.

Fonte: Do autor (2018).

Analisando os diâmetros dos halos para cada tratamento, observa-se uma maior expressão da enzima para a magnetização de 28 mT e, aparentemente, a mesma expressão para os demais tratamentos. Esses valores estão quantificados na Tabela 4.

Tabela 4 - Atividade da enzima endobetamananase em  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$  de sementes de cafeeiro submetidas à uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.

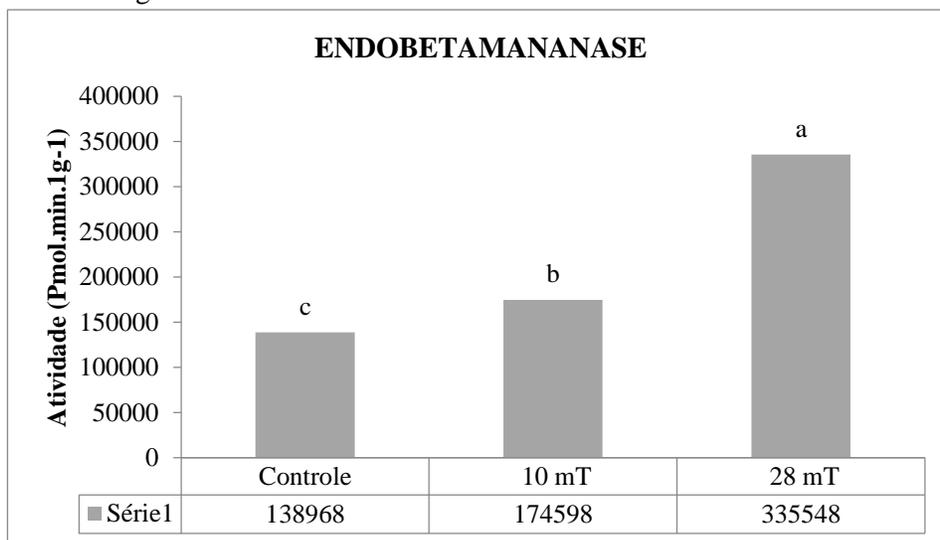
Tratamentos	Atividade
Controle	140179.056 a
10 mT	200980.573 b
28 mT	335546.313 c

Fonte: Do autor (2018).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, a 5% de probabilidade. C.V (%) 20,146.

Na Figura 38, é mostrado o comportamento das médias obtidas nos diâmetros dos halos de atividade.

Figura 38 - Valores de atividade da enzima endobetamananase.



Fonte: Do autor (2018).

Pode-se observar que nas sementes submetidas ao campo magnético com intensidade de 28 mT, houve atividade maior em comparação ao controle e a magnitude de 10 mT. Intui-se que a magnetização com intensidade maior desencadeou antecipadamente o processo de germinação das sementes de café, uma vez que, enzima endobetamananase participa diretamente da germinação de sementes em um estágio anterior. Sua atuação está no amolecimento da região do endosperma cap (micrópila) que é composta por uma substância que oferece resistência à protrusão da radícula e, além disso, hidrolisa reservas do endosperma para a nutrição do embrião.

A enzima endobetamananase possui a capacidade de hidrolisar ligações internas de polímeros de mananas, causando degradação das paredes celulares que envolvem o embrião, facilitando a emergência da radícula, mas também

pode estar relacionada ao processo de deterioração. Apesar de estar ligada à germinação, a atividade dessa enzima não é o fator limitante para a protrusão radicular (KONTOS; SPYROPOULOS, 1996; STILL; BRADFORD, 1997; TOOROP; BEWLEY; HILHORST, 1996; VOIGT; BEWLEY, 1996).

Silva et al. (2005) e Takaki e Dietrich (1980), observaram que a atividade da endobetamanase em sementes de café aumenta somente 10 dias após a embebição, estando esta associada ao amolecimento do endosperma e à disponibilização de carboidratos para o crescimento do embrião, durante o processo de germinação.

No experimento com as sementes de café, a extração da endobetamanase foi realizada em um período anterior à protrusão radicular, isto é, anterior à fase do aumento da expressão da mesma, por isso sua atividade estaria vinculada à germinação. De acordo com Santos et al. (2011), para que a atividade dessa enzima seja associada à germinação de sementes com melhor desempenho fisiológico, a extração das enzimas e detecção de sua atividade deve ser realizada nas sementes em processo de germinação. Assim, para a magnetização de 28 mT, houve maior expressão da enzima endobetamanase, o que desencadeou um amolecimento precoce da região da micrópila o que conduz a uma possível antecipação da protrusão radicular.

A magnetização de 10 mT promoveu, também, hidrolização das estruturas circunvizinhas à radícula, antecipando a protrusão radicular, porém, essa intensidade magnética possui menos efeitos colaterais como o desencadeamento da formação de radicais livres em virtude do estresse oxidativo.

Por outro lado, o saldo de efeitos benéficos desencadeado pela a intensidade magnética de 28 mT, foi maior, isto é, promoveu o estresse oxidativo das células e, por isso, a indução precoce do sistema e defesa celular contra radicais livres oriundo desse estresse, como revelaram as expressões das

enzimas catalase e superoxidodismutase, todavia, esse estresse não trouxe efeitos deletérios à germinação como ficou comprovado pelos resultados do índice de velocidade de emergência das sementes.

Além disso, a maior taxa de respiração que as sementes esboçaram quando magnetizadas com a intensidade de 28 mT, propiciou uma maior geração das espécies ROS's. Não obstante a isso, uma maior taxa de respiração pode estar ligada a uma maior produção de ATP's por parte das mitocôndrias das células dos eixos embrionários do embrião (raiz/caule), promovendo maior produção de energia para uma protrusão mais rápida da plântula como revelaram as análises de arranque das plântulas do IVE e a alta atividade embrionária evidenciada pelo BSL.

A magnetização das sementes com a indução magnética de 28 mT desencadeou a ativação da enzima endobetamananase que atuou diretamente na facilitação da protrusão radicular e na hidrolização de reservas para o embrião, antecipando a germinação das sementes. Além disso, propiciou prematuramente a formação das enzimas antirradicalares. Para intensidade de 28 mT de campo magnético, seus efeitos foram, majoritariamente, benéficos.

#### **6.4 Condutividade elétrica**

Pelo teste de condutividade elétrica, que avalia a permeabilidade seletiva de membranas duplas de fosfolipídios, verificou-se uma diminuição da lixiviação de exsudatos das sementes à medida que a intensidade do campo magnético foi diminuindo. Portanto, houve um aumento da qualidade fisiológica das sementes em termos de integridade de membranas, em virtude da magnetização de 10 mT. Tal fato pode estar relacionado com uma maior organização do sistema de membranas das sementes, resultando em um volume menor de lixiviados de metabólitos essenciais aos processos de germinação e

crescimento. Esse resultado é coerente com aquele obtido com a enzima catalase, onde foi obtido uma menor expressão eletroforética dessa enzima para a magnetização de 10 mT, indicando uma melhor organização da membrana plasmática dessas sementes (TABELA 5).

Tabela 5 - Valores médios da condutividade elétrica em  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$ , de sementes de cafeeiro submetidas a uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.

Tratamentos	Médias de condutividade elétrica
Controle	22,002 a
10 mT	12,460 b
28 mT	17,264 a

Fonte: Do autor (2018).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade. C.V (%) 17,510.

No estudo de Vieira e Krzyzanowski (1999), ficou constatado que o aumento no teor de lixiviados das sementes, está diretamente relacionado com o nível de degradação das membranas e perda do controle da permeabilidade. Para Delouche e Baskin (1973), a degradação das membranas celulares constitui no primeiro processo de deterioração das sementes.

De acordo com a Association of Official Seed Analysts (AOSA, 1983), diversos compostos inorgânicos (íons fosfatos,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{H}^{+}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  e  $\text{Na}^{+}$ ) são lixiviados quando as sementes sofrem danos na membrana, sendo a quantidade e o tipo de lixiviados na solução, os determinantes no valor da condutividade elétrica.

A presença e o tipo de cada lixiviado na solução possui uma relação direta com o valor da força magnético. Pela expressão matemática de Lorentz<sup>6</sup>, a força magnética é tanto maior quanto maior for a carga elétrica sujeita ao campo,

<sup>6</sup> Força de Lorentz: produto vetorial entre o vetor velocidade da carga elétrica e o vetor campo magnético,  $\vec{F} = q \cdot \vec{V} \times \vec{B}$ .

então nos compostos inorgânicos, aqueles íons com maior quantidade de cargas elétricas como é o caso do  $\text{Ca}^{++}$  e  $\text{Mg}^{++}$ , por exemplo, possuem maior participação no cômputo geral das substâncias presentes na solução lixiviada, pois, a força magnética atuante nos mesmos é maior, garantindo maior valor da condutividade. Contudo, a força de Lorentz é diretamente proporcional ao valor do campo magnético, o que justificaria, também, a maior lixiviação de exudados pelas sementes submetidas ao campo magnético de 28 mT.

Ming et al. (1995), trabalhando com sementes de repolho (*Brassica oleracea*), verificaram correlação significativa entre o teste de condutividade elétrica e o teste de emergência em campo. No caso das sementes de café pré-tratadas magneticamente, foi obtida a mesma relação direta entre os resultados do índice de velocidade de emergência e a condutividade elétrica, isto é, para a indução magnética de 28 mT foram alcançados os melhores valores para o IVE. Entretanto, em outra pesquisa o mesmo teste não foi eficiente para diferenciar lotes de sementes de mamona com diferente qualidade fisiológica (FONSECA et al., 2004).

Para Martins, Bovi e Nakagawa (2003), entre os testes de vigor empregados em sua pesquisa, o de condutividade elétrica foi o mais eficiente em detectar a deterioração de sementes de palmeira real australiana (*Archontophoenix alexandrae*).

Vashisth e Nagarajan (2008), submetendo sementes de grão-de-bico a campos magnéticos de diferentes intensidades e períodos de exposição, 50 mT por 2 h, 100 mT por 1h e 150 mT por 2 h, obtiveram redução da condutividade elétrica do lixiviado das sementes expostas a campos em relação ao controle, indicando uma maior integridade da membrana.

Os resultados obtidos por esses autores condizem com aqueles obtidos para a magnetização das sementes de café, onde para magnetizações de 10 mT e 28 mT, obteve-se uma redução dos lixiviados extravados das células, sendo que

para a menor indução magnética teve-se um valor mais significativo em relação ao grupo de controle, no entanto, para outro tipo de semente, como no caso de cevada, sua exposição a um campo magnético de 37,5 mT não afetou o extravasamento de eletrólitos celulares (GUSTA; KIRKLAND; AUSTENSON, 1978).

Os resultados do BSL são compatíveis com os da condutividade elétrica, pois, a maior atividade esboçada pelo biospeckle laser foi para a magnetização de 28 mT, podendo ser em parte atribuída ao efluxo de exudados iônicos extravasados das células, por meio da membrana plasmática. Analogamente, pode-se dizer que para a indução magnética de 10 mT, onde a atividade do BSL foi menor para um menor efluxo de exudados.

A condutividade elétrica das sementes de café pré-tratadas magneticamente com uma indução de 10 mT revelou que essa magnitude de campo impactou menos na desorganização da membrana fosfolipídicas, deixando-as possivelmente mais íntegras e organizadas em relação ao controle, não constituindo, por esse motivo, em um estresse oxidativo para essas sementes.

### **6.5 Índice de velocidade de germinação (IVG)**

Pode-se observar que as sementes que ficaram sujeitas ao campo magnético, independentemente do valor da magnetização, emergiram em menos tempo, pois sua velocidade de germinação foi maior, quando comparadas às sementes do controle. Infere-se que a exposição ao campo magnético foi uma característica que, possivelmente, influenciou no resultado. Não houve diferenças significativas entre as intensidades de 10 mT e 28 mT a um nível de significância de 5% (TABELA 6).

Tabela 6 - Valores médios do índice de velocidade de germinação (plantas/dia), de sementes de cafeeiro submetidas a uma indução magnética constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.

Tratamentos	Médias IVG
Controle	4,185 a
10 mT	4,991 b
28 mT	5,155 b

Fonte: Do autor (2018).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade. C.V (%) 6,01.

Os resultados apresentados pelo índice de velocidade de germinação para as sementes pré-tratadas magneticamente foram melhores em razão da melhor organização da membrana plasmática, deixando-as mais seletivas à entrada e saída de substâncias, fato este comprovado pelo teste de condutividade elétrica para a magnetização de 10 mT.

De acordo com Popinigis (1985), a rapidez de germinação, que tem efeito direto sobre o IVG, é determinada por diversos fatores, dentre eles, a velocidade de absorção de água e a superfície de contato, fatores estes diretamente ligados a granulometria do substrato.

Os efeitos benignos advindos do campo magnético sobre as sementes de café submetidas às intensidades de 28 mT e 10 mT, provocaram maior índice de velocidade de germinação que repercutiu diretamente sobre os resultados do índice de velocidade de emergência, que foi maior para o tratamento de 28 mT.

A explicação para tais resultados pode estar relacionada à maior taxa de absorção de nutrientes do substrato, talvez pela maior quantidade de raízes das plântulas tratadas com o campo magnético. Esse dado não foi levantado por essa pesquisa, porém, outros trabalhos correlatos endossam essa explicação, como é o caso do trabalho de Alemán et al. (2014a, 2014b), que atribuíram o maior desenvolvimento das plântulas de café oriundas de sementes magnetizadas à maior absorção de nutrientes do substrato.

Vashisth e Nagarajan (2008), estudando os efeitos da aplicação do campo magnético em sementes de grão-de-bico, observaram que as características radiculares das plantas mostraram aumento significativo no seu comprimento, na área superficial e em seu volume. A melhora dos parâmetros funcionais da raiz sugere que as sementes de grão-de-bico tratadas magneticamente podem apresentar melhor situação sob condições de chuva (sem irrigação), onde exista um solo restritivo ao regime de umidade. Além disso, os pesquisadores verificaram ainda que as sementes de grão-de bico pré-tratadas magneticamente e plantadas no solo, tiveram o índice de emergência no campo aumentado marginalmente em comparação com o controle.

Semelhante aumento da velocidade de germinação, em razão da exposição ao campo magnético, foi relatada em milho por Florez, Carbonell e Martinez (2007) e em arroz por Carbonel, Martinez e Amava (2000). Enquanto Podlesny, Pietruszewski e Podlesna (2004, 2005), confirmaram o efeito positivo do tratamento magnético (30 e 85 mT) na germinação e velocidade de emergência de cultivares de feijão e ervilha.

O tratamento das sementes com o campo magnético propiciou maior velocidade de germinação para aquelas submetidas ao pré-tratamento magnético, conferindo, às mesmas, uma maior velocidade de germinação. Não houve diferenças significativas, em nível de 5%, entre as sementes tratadas com a indução magnética de 10 mT e 28 mT.

A diferença no índice de velocidade de germinação pode ser atribuída, dentre outros fatores, às melhores condições fisiológicas das sementes de café expostas ao campo magnético como, por exemplo, maior integridade de membranas e as melhores condições de germinação proporcionadas pela ativação antecipada do sistema de defesa contra os ROS's. Por sua vez, as intensidades de campo magnético utilizadas não constituíram, por si só, fator de deterioração das membranas.

## 6.6 Germinação

As sementes tratadas magneticamente tiveram, em média, maior germinação quando comparadas com as do controle, não havendo diferenças significativas, em nível de 5%, entre as sementes submetidas à indução magnética de 10 mT e 28 mT e com um C.V de 16,55 % (TABELA 7).

Tabela 7 - Germinação (%) de sementes de cafeeiro submetidas a uma magnetização de intensidade constante durante 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.

Tratamentos	Médias germinação
Controle	39,500 a
10 mT	66,500 b
28 mT	70,500 b

Fonte: Do autor (2018).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade. C.V (%) 21,86.

O magnetismo proporcionado pelas intensidades de campo promoveram melhores taxas de germinação em relação ao grupo de controle. Esses dados estão alinhados aos resultados obtidos pelas análises de enzimas, onde para as sementes submetidas ao campo magnético, independentemente da magnitude, tiveram uma precoce ativação do sistema de defesa contra os efeitos nocivos dos radicais livres oriundos do processo natural de germinação.

Para a magnetização de 10 mT ocorreu menor expressão da enzima ligada à deterioração das membranas e, paralelamente a esses resultados, uma menor quantidade de exsudados extravasados das células, fato esse comprovado pela condutividade elétrica. Esses resultados combinados culminaram em uma melhora do índice de velocidade de emergência e, conseqüentemente, em melhoria da taxa de germinação.

Para a exposição das sementes de café com a indução magnética de 28 mT, houve diferença no percentual de germinação em relação ao controle. Esse resultado está de acordo com aqueles obtidos pelo índice de velocidade de emergência, onde as sementes tiveram maior velocidade de emergência, antecipação da atuação das enzimas antirradicais e melhora da organização das membranas e relação ao controle e, além disso, maior expressão da enzima endobetamananase. O somatório desses efeitos promoveu uma melhor taxa de germinação das sementes de café, para esse valor de campo magnético.

Resultado semelhante foi obtido por Aladjadjiyan (2002), trabalhando com sementes de milho quando detectou que a exposição a um campo magnético de 150 mT estimulou o aumento da germinação, do peso fresco e do comprimento da haste das plântulas.

Nessa mesma linha de pesquisa, García-Reina e Arza-Pascual (2001), realizaram um estudo experimental sobre absorção de água por sementes de alface previamente tratadas com campo magnético estacionário de 1 a 10 mT. Eles relataram aumento na taxa de absorção de água, em razão do campo magnético aplicado, o que pode ser a explicação para o aumento da germinação das sementes de alface tratadas.

Majd e Shabrangi (2009), concluíram que, o pré-tratamento do campo magnético aumentou a taxa de germinação das sementes de lentilha e a sua porcentagem de emergência das plântulas, tendo um efeito positivo em mudas de lentilhas, como estimular o crescimento e desenvolvimento de plântulas.

Em se tratando de aplicação de campo magnético em sementes de café, Alemán et al. (2014a, 2014b), concluíram que um campo magnético senoidal de 60 Hz aplicado às plantas de café obtidas *in vitro* pode melhorar a qualidade das mudas modificando alguns processos fisiológicos e moleculares fotossintéticos, aumentando seu vigor e garantindo melhor desenvolvimento das plantas em estádios posteriores de desenvolvimento. Comparando-se os resultados obtidos,

tanto o campo magnético constante com o de intensidade variante no tempo, ambos promovem efeitos benéficos às sementes de café pré-tratadas magneticamente no tocante à germinação.

A aplicação do campo magnético constante teve, para ambas as magnitudes, um efeito positivo sobre a taxa de germinação das sementes de café, promovendo um maior percentual de sementes germinadas.

### 6.7 Protrusão

Pelos resultados obtidos, nota-se uma maior protrusão para as sementes de café submetidas ao campo magnético quando comparadas ao controle. Entre as sementes que foram levadas ao campo magnético, 10 e 28 mT, não ocorreram diferenças significativas entre os tratamentos com o campo magnético (TABELA 8).

Tabela 8 - Resultados médios de protrusão radicular (%) de sementes de cafeeiro submetidas à magnetização constante por 6 dias em germinadores. UFLA, Lavras, MG, 2018.

<b>Tratamentos</b>	<b>Protrusões médias</b>
Controle	71,500 a
10 mT	83,500 b
28 mT	87,000 b

Fonte: Do autor (2018).

Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade. C.V (%) 7,510.

Esse resultado obtido pela protrusão radicular vem sedimentar todos aqueles que estão diretamente relacionados com a germinação. Inicialmente, os resultados da enzima endobetamananase revelou que a magnetização de intensidade de 28 mT contribuiu para a sua maior expressão, atuando diretamente no amolecimento antecipado dos tecidos circunvizinho ao embrião,

ou seja, na região da micrópila e, além disso, atuou na hidrolização das reservas para o embrião. Essa ação enzimática atuou para que se tivesse um maior percentual de sementes germinadas, maior velocidade de germinação e emergência, repercutindo na minimização no tempo de germinação.

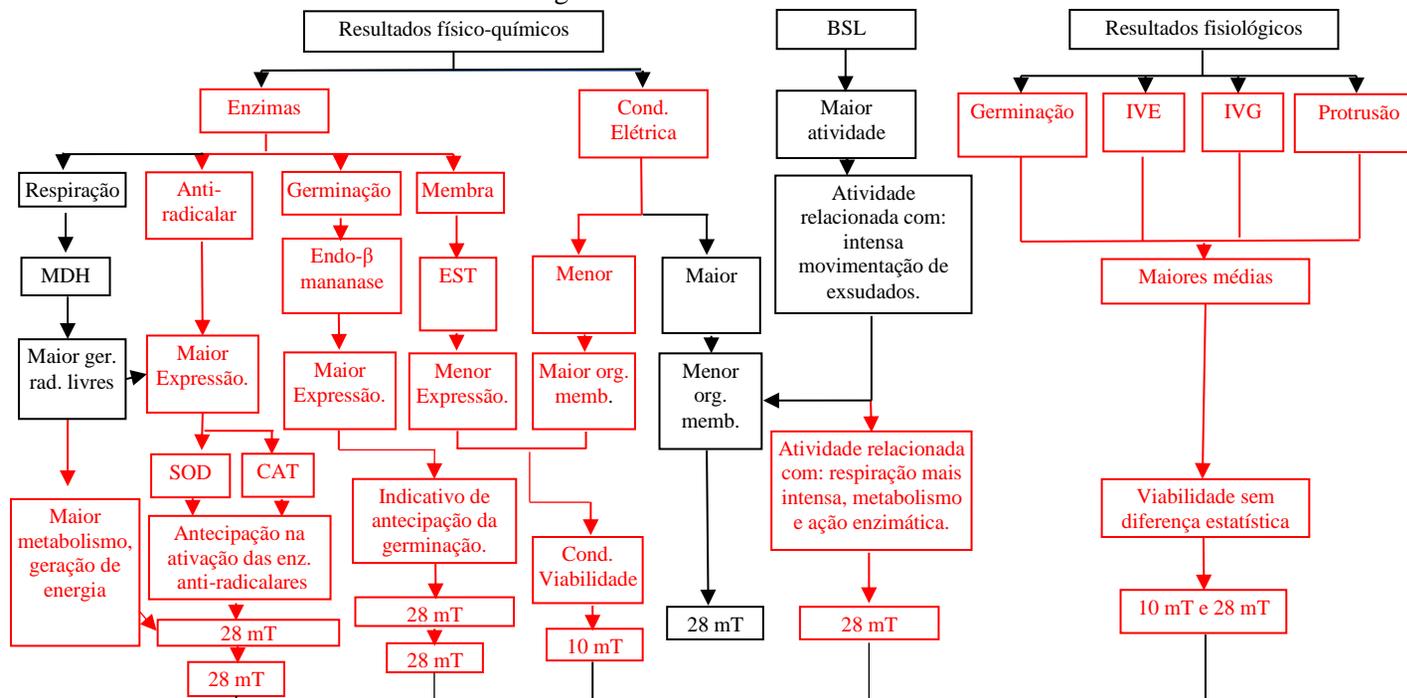
A atuação do campo magnético em diversas regiões das sementes, bem como seus efeitos, é alvo de inúmeras pesquisas que visam a explicar a interação magnética em tecidos vivos.

Resultados de outros estudos revelaram que o campo magnético é um fator que afeta o metabolismo celular de células meristemáticas, tem um efeito significativo na mitose e altera a fase G1 do ciclo celular da planta, o que impacta diretamente no processo de protrusão radicular. Alterações nas reações metabólicas, em sistemas sinalização celular, ciclo celular, transcrição e síntese protéica causam diferentes respostas biológicas em sistemas de plantas (BELYAVSKAYA et al., 1992; PAUL; FERL; MEISEL, 2006).

Para a protrusão embrionária, a magnetização trouxe efeitos benéficos, proporcionando maior percentual de sementes protrundidas em um intervalo de tempo menor em relação ao controle.

Na Figura 39, representa-se um fluxograma da síntese dos resultados obtidos.

Figura 39 - Síntese dos resultados.



A magnetização das sementes por ambas as intensidades de campo durante seis dias promove:

- Maior índice de velocidade de emergência das sementes;
- Ativação do sistema de defesa contra radicais livres;
- Melhores médias para a germinação, IVG e a protrusão.
- O BSL mostrou-se eficiente na detecção de uma atividade acentuada na região embrionária que atribuí-se: movimentação exsudados; respiração, atividade metabólica e ação enzimática.

Legenda: rota desejável para o processo germinativo \_\_\_\_\_

Fonte: Do autor (2018).

## 7 CONCLUSÃO

Considerando-se a hipótese inicial de que a exposição das sementes de café, por um período de tempo, a um campo magnético uniforme poderia melhorar as condições de germinação dessas sementes e, até mesmo, antecipar o processo de formação de mudas. Conclui-se que:

- a) O monitoramento com Biospeclke Laser foi eficiente na detecção da atividade embrionária diferenciada em virtude da exposição das sementes ao campo magnético;
- b) A magnetização das sementes de café mostra-se, independentemente dos valores de campo magnético, eficiente para a diminuição do período de germinação;
- c) É um processo promissor no condicionamento pré-germinativo para sementes dessa espécie;
- d) Para ambas as intensidades de campo magnético, ocorreram tantos efeitos benéficos como deletérios ao processo de germinação, entretanto, os efeitos maléficos não foram capitais no processo germinativo;
- e) O processo de magnetização tem condições de ser barato, funcional e replicável em outras situações que não sejam as laboratoriais.



## REFERÊNCIAS

- ALADJADJIYAN, A. Study of the influence of magnetic field on some biological characteristics of *Zea mays*. **Journal of Central European Agriculture**, Zagreb, v. 3, n. 2, p. 89-94, 2002.
- ALEMÁN, E. I. et al. Effects of 60 Hz sinusoidal magnetic field on In Vitro establishment, multiplication, and acclimatization phases of *Coffea Arabica* seedlings. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 35, p. 414-425, 2014a.
- ALEMÁN, E. I. et al. Effects of EMFs on some biological parameters in coffee plants (*Coffea arabica* L.) obtained by *in vitro* propagation. **Polish Journal of Environmental Studies**, London, v. 23, n. 1, p. 95-101, 2014b.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. ed. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2006.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331, 2002.
- AMARA, S.; ABDELMELEK, H.; SAKLY, M. Effect of acute exposure to magnetic field on ionic composition of frog sciatic nerve. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, Carachi, v. 20, p. 91-96, 2004.
- AMORIN, H. V. et al. Transformações químicas e estruturais durante a deterioração da qualidade de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 5., 1977, Guarapari. **Resumos...** Rio de Janeiro: IBC/GERCA, 1977. p. 15-18.
- ANDREOLI, D. M. C.; GROTH, D.; RAZERA, L. F. Armazenamento de sementes de café (*Coffea canephora*, P. cv. Guarini) acondicionadas em dois tipos de embalagens após secagem natural e artificial. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 15, p. 87-95, 1993.
- ARAÚJO, J. **Nutrição celular**. 2002. Disponível em: <<http://www.dbio.uevora.pt/biologia1-novo/>>. Acesso em: 10 jan. 2018.
- ARIZAGA, R.; TRIVI, M.; RABAL, H. J. Speckle time evolution characterization by the co-occurrence matrix analysis. **Optics and Laser Technology**, Surrey, v. 31, n. 2, p. 163-169, Mar. 1999.

ASSIS, J. G. R. de. **Expressão de enzimas durante a germinação de sementes de sempre-vivas**. 2017. 51 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2017.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. **Seed vigor testing handbook**. East Lansing, 1983. 93 p.

BAILLY, C. et al. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 1, p. 104-110, May 1996.

BASAVARAJAPPA, B. S.; SHETTY, H. S.; PRAKASH, H. S. Membrane deterioration and other biochemical changes, associated with accelerated ageing of maize seeds. **Seed Science & Technology**, Zurich, v. 19, p. 279-286, 1991.

BASU, R. N. Seed viability. In: BASRA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: The Haworth, 1995. p. 1-42. 1995.

BELYAVSKAYA, N. A. Biological effects due to weak magnetic field on plants. **Advances in Space Research**, Oxford, v. 34, p. 1566-1574, 2004.

BELYAVSKAYA, N. A. Ultrastructure and calcium balance in meristem cells of pea roots exposed to extremely low magnetic fields. **Advances in Space Research**, Oxford, v. 28, p. 645-650, 2001.

BELYAVSKAYA, N. A. et al. Structural-functional organization of the meristem cells of pea, lentil and flax roots in conditions of screening the geomagnetic field. **Biophysics**, Oxford, v. 37, p. 657, 1992.

BETHKE, A. et al. Abscisic acid-induced thermotolerance in maize seedlings is mediated by calcium and associated with antioxidant systems. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 153, n. 3/4, p. 488-496, 1995.

BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. **Plant Cell**, Rockville, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, July 1997.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445 p.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. New York: Springer, 2012.

BHATNAGAR, D.; DEV, A. R. Some effect of pregermination exposure of wheat seeds to magnetic fields: effect on some physiological process. **Seed Research**, New Delhi, v. 5, n. 2, p. 129-137, 1977.

BIAN, X. et al. Roles of cytoplasmic  $\text{Ca}^{+2}$  and intracellular  $\text{Ca}^{+2}$  stores in induction and suppression of apoptosis in S49 cells. **American Journal of Physiology**, Baltimore, v. 272, p. C1241-C1249, 1997.

BINHI, V. N. Theoretical concepts in magnetobiology. **Electro and Magnetobiology**, London, v. 20, p. 43-58, 2001.

BOWLER, C.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D. Suoeroxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 83-116, 1992.

BRAGA, R. A. et al. Evaluation of activity through dynamic laser speckle using the absolute value of the differences. **Optics Communication**, Amsterdam, v. 284, n. 2, p. 646-650, 2011.

BRAGA, R. A. et al. Potencial do biospeckle laser para avaliação da viabilidade de sementes. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 646-649, maio/jun. 2001.

BRAGA JÚNIOR, R. A. "**Bio-speckle**": desenvolvimento de uma tecnologia aplicada a análise de sementes. 2000. 117 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)-Faculdade em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

BRANDÃO JUNIOR, D. S. **Eletroforese de proteína e isoenzima na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF, 1992. 365 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 399 p.

BREUSEGEM, F. van et al. The role of oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Shannon, v. 161, p. 405, 2001.

BRIERS, J. D.; WEBSTER, S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full field technique for monitoring capillary blood flow. **Journal of Biomedical Optics**, New York, v. 1, p. 174-179, 1996.

BUEMI, M. et al. Cell proliferation /cell death balance in renal cell cultures after exposure to a static magnetic field. **Nephron**, Basel, v. 87, p. 269-273, 2001.

CAKMAK, T.; DUMLUPINAR, R.; ERDAL, S. Acceleration of germination and early growth of wheat and bean seedlings grown under various magnetic field and osmotic conditions. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 31, p. 120, 2010.

CARBONEL, M. V.; MARTINEZ, E.; AMAVA, J. M. Stimulation of germination in rice (*Oryza sativa* L.) by a static magnetic field. **Electromagnetic Biology and Medicine**, London, v. 19, n. 1, p. 121-128, 2000.

CARDOSO, R. R.; MOREIRA, J.; BRAGA, R. A. Quality test protocol to dynamic laser speckle analysis. **Optics and lasers in Engineering**, London, v. 61, p. 8-13, 2014.

CARVALHO, M. L. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; PINHO, E. R. von. Técnicas moleculares em sementes: aplicação de técnicas moleculares no controle de qualidade de sementes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 17, p. 44-47, 2000.

CHAUHAN, K. P. S.; GOPINATHAN, M. C.; BABU, C. R. Electrophoretic variations of proteins and enzymes in relation to seed quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 13, p. 629-641, 1985.

CHIONNA, A. et al. Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. **European Journal of Histochemistry**, Pavia, v. 47, p. 299-308, 2003.

CLIFFORD, M. N.; WILLSON, K. C. **Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage**. London: Croom Helm, 1985.

CONSELHO DOS EXPORTADORES DE CAFÉ. **Relatório mensal**. Disponível em: <<https://www.cecafe.com.br/publicacoes/brasil>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

COSTA, A. G. **Predição e identificação de danos internos em batata por meio do biospeckle laser**. 2011. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

DAYAL, S.; SINGH, R. P. Effect of seed exposure to magnetic field on the height of tomato plants. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 56, p. 483-486, 1986.

DEDECCA, D. M. Anatomia de Coffea. **Bragantia**, Campinas, v. 16, n. 23, p. 315-355, 1957.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.

DIAS, D. C. F. S.; MARCOS FILHO, J. Testes de vigor baseados na permeabilidade das membranas celulares: I., condutividade elétrica. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 5, n. 1, p. 26-41, 1995.

DIAS, M. C. L. L.; BARROS, A. S. R. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) em diferentes embalagens. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 15, p. 197-202, 1993.

DIAS, M. C. L. L.; SILVA, W. R. Determinação da viabilidade de sementes de café através do teste de tetrazólio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, n. 11, p. 1139-1145, nov. 1986.

DINI, L.; ABBRO, L. Bioeffects of moderate-intensity static magnetic fields on cell cultures. **Micron**, New York, v. 36, p. 195-217, 2005.

DOWNIE, B.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 829-835, July 1994.

DUARTE-DIAZ, C. E. et al. Effects of magnetic treatment of irrigation water on the tomato crop. **Horticultural Abstracts**, Farnham Royal, v. 69, p. 494, 1997.

DURAN, N.; CADENAS, E. The role of singlet oxygen and triplet carbonyls in biological systems. **Reviews of Chemical Intermediates**, Amsterdam, v. 8, p. 147-187, 1987.

EATON, J. W. Catalases and peroxidases and glutathione and hydrogen peroxide: mysteries of the bestiary. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Saint Louis, v. 118, n. 1, p. 3-4, July 1991.

EBASHI, S. Regulation of contractility. In: STRACHER, A. (Ed.). **Muscle and nonmuscle motility**. New York: Academic, 1983. p. 217-232.

EDMISTON, J. The effect of the field of a permanent magnet on the germination and growth of white mustard (*Brassica alba* L.) seeds. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v. 16, p. 13-24, Jan. 1972.

EL MAY, A. et al. Effects of static magnetic field on cell growth, viability, and differential gene expression in Salmonella. **Foodborne Pathogens and Disease**, New Rochelle, v. 6, p. 547-552, 2009.

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

ENES, A. M. **Análise de frequência do Biospeckle Laser aplicada ao mapeamento de fenômenos em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2006. 115 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

ENES, A. M. **Análise de frequência do Biospeckle Laser aplicada ao mapeamento de fenômenos em sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 2011. 115 p. Dissertação (Doutorado em Engenharia Agrícola)-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

ESITKEN, A.; TURAN, M. Alternating magnetic field effects on yield and plant nutrient element composition of strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Camarosa). **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science**, Copenhagen, v. 54, p. 135-139, 2004.

FACCIA, P. A. et al. Differentiation of the drying time of paints by dynamic speckle interferometry. **Progress in Organic Coatings**, Lausanne, v. 64, n. 4, p. 350-355, Mar. 2009.

FANELLI, C. et al. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca<sup>2+</sup> influx. **FASEB Journal**, New York, v. 13, p. 95-102, 1999.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 38, n. 2, p. 109-112, mar./abr. 2014.

FLOREZ, M.; CARBONELL, M. V.; MARTINEZ, E. Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: effects on germination and early growth. **Science Direct**, New York, v. 59, p. 68-75, 2007.

FOMICHEVA, V. M.; GOVOROUN, R. D.; DANILOV, I. Ploriferative activity and cell reproduction in the root meristems of the pea, lentil and flax in the conditions of screening the geomagnetic field. **Biophysics**, Oxford, v. 37, p. 645, 1992.

FONSECA, N. R. et al. Testes de avaliação da viabilidade e do vigor em sementes de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande, 2004. v. 1, p. 52-57.

FREITAS, P. L. S. **Análise do comportamento de métodos de classificação de padrão de speckle dinâmico**. 2010. 93 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Sistemas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

GARCÍA-REINA, F.; ARZA-PASCUAL, L. Influence of a stationary magnetic field on water relations in lettuce seeds: part I, theoretical considerations. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 22, p. 589-595, 2001.

GOEL, A.; GOEL, A. K.; SHEORAN, I. S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 160, n. 9, p. 1093-1100, Sept. 2003.

GREEN, L. M. et al. Childhood leukaemia and personal monitoring of residential exposures to electric and magnetic fields in Ontario, Canada. **Cancer Causes & Control**, Boston, v. 10, p. 233-243, 1999.

GREGGAINS, V. et al. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, Cambridge, v. 148, p. 267-276, 2000.

GUBBELS, G. H. Seedling growth and yield response of flax, buckwheat, sunflower and field pea after presowing magnetic treatment. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 62, p. 61-64, 1982.

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

GUSTA, L. V.; KIRKLAND, K. J.; AUSTENSON, H. M. Effects of a brief magnetic exposure on cereal germination and seedling growth. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 58, p. 79-86, 1978.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In: HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Ed.). **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon, 1989. p. 86-123.

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. **Handbook of vigor test methods**. Zurich: ISTA, 1995. 117 p.

HARALICK, R. M.; SHANMUGAN, K.; DINSTEN, I. Textural features for image classification. **IEEE Trans. Systems, Man and Cybernetics**, New York, v. 3, n. 6, p. 610-621, 1973.

HENNING, F. A. et al. Qualidade fisiológica, sanitária e análise de isoenzimas de sementes de aveia-preta tratadas com diferentes fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 31, n. 3, p. 63-69, 2009.

HEPLER, P. K. Calcium: a central regulator of plant growth and development. **American Society of Plant Biologists**, Rockville, v. 17, n. 8, p. 2142-2155, 2005.

JAJTE, J. et al. Protective effect of melatonin against in vitro iron ions and 7 mT 50Hz magnetic field-induced DNA damage in rat lymphocytes. **Mutation Research**, New York, v. 483, p. 57-64, 2002.

JENG, T. L.; SUNG, J. M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially age peanut seed. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1994.

KAVI, P. S. The effect of non-homogeneous gradient magnetic field susceptibility values in situ ragi seed material. **Mysore Journal of Agricultural Sciences**, Bangalore, v. 17, p. 121-123, 1983.

KHODARAHMI, Í.; MOBASHERI, H.; FIROUZI, M. The effect of 2.1 T static magnetic field on astrocyte viability and morphology. **Magnetic Resonance Imaging**, Chicago, v. 28, p. 903-909, 2010.

KONTOS, F.; SPYROPOULOS, C. C. (Production and secretion of  $\alpha$ -galactosidase and endo- $\beta$ -mannanase by carob (*Ceratonia siliqua* L.) endosperm protoplasts. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 46, p. 577-583, 1996.

KRZYZANOWSKI, F. C. et al. (Coord.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. 218 p.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. Radicles 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. 338, p. 1515-1524, 1999.

LIN, C. F. et al. Cloning and prokaryotic expression of a Cdna encoding a putative mitochondrial malate dehydrogenase in *Oryza sativa*. **DNA Sequence**, Cambridge, v. 14, n. 1, p. 75-77, 2003.

LOEFFLER, T. M. **The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality**. 1981. 181 f. Thesis (Master of Science)-University of Kentucky, Lexington, 1981.

MAGUIRRE, J. D. Speed of germination: aid seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MAJD, A.; SHABRANGI, A. Effect of seed pretreatment by magnetic fields on seed germination and ontogeny growth of agricultural plants. In: **ELECTROMAGNETICS RESEARCH SYMPOSIUM, 2009, Beijing. Proceedings...** Beijing, 2009. 1 CD-ROM.

MARTINS, C. C.; BOVI, M. L. A.; NAKAGAWA, J. Desiccation effects on germination and vigor of King palm seeds. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 21, n. 1, p. 88-92, jan./mar. 2003.

MATIELLO, J. B. **O café: do cultivo ao consumo**. São Paulo: Globo, 1991. 320 p.

MATIELLO, J. B.; GARCIA, W. R.; ALMEIDA, S. R. **Renovar mais, nossos cafezais**. 2009. Disponível em:

<<http://fundacaoprocafe.com.br/downloads/Folha009Renovar.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessments. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MING, S. et al. Methods of seed vigour testing for cabbage (*Brassica capitata* L.). **Journal of Southwest Agricultural University**, Beijing, v. 17, n. 6, p. 506-508, 1995.

MIRANDA, J. M. et al. Estudos de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 15, p. 215-220, 1993.

NOVITSKY, Y. I. et al. Growth of onions in a weak permanent magnetic field. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 48, n. 6, p. 709-715, 2001.

OKUDA, T. et al. Abrupt increase in the level of hydrogen peroxide in leaves of wheat is caused by cold treatment. **Plant Physiology**, Rockville, v. 97, n. 3, p. 1265-1267, Nov. 1991.

PAUL, A. L.; FERL, R. J.; MEISEL, M. W. Height magnetic field induced changes gene expression in Arabidopsis. **BioMagnetic Research and Technology**, London, v. 4, n. 1, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1764872/>>. Acesso em: 10 mar. 2018.

PEÑUELAS, J. et al. Diamagnetic susceptibility and root growth responses to magnetic fields in *Lens culinaris*, *Glycine soja*, and *Triticum aestivum*. **Electromagnetic Biology and Medicine**, London, v. 23, n. 2, p. 97-112, 2004.

PERTEL, J. **Efeito do condicionamento fisiológico na germinação, no vigor e nas alterações enzimáticas em sementes de café (*Coffea arabica* L.)**. 2001. 101 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

PICOLOTTO, F. C.; VIDAL, F. T.; SILVA, F. T. C. Preparo de sementes de soja (*Glycine Max*) para análise em biospeckle. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2010, Cuiabá. **Anais...** Cuiabá, 2010. 1 CD-ROM.

PIETRUSZEWSKI, S. Effect of magnetic seed treatment on yields of wheat. **Seed Science Technology**, Zurich, v. 21, p. 621-626, 1993.

PITTMAN, U. J. Effects of magnetic seed treatment on yields of barley, wheat and oats on Southern Alberta. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 57, p. 37-45, 1977.

PITTMAN, U. J. Magnetism and plant growth: I., effect on germination and early growth of cereal seeds. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 43, p. 512-518, 1963.

PITTMAN, U. J. Magnetism and plant growth: III., effect on germination and early growth of corn and beans. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 45, p. 549-555, 1965.

PITTMAN, U. J.; ORMROD, D. P. Physiological and chemical features of magnetically treated winter wheat seedling. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 50, n. 3, p. 211-217, 1970.

PODLESNY, J.; PIETRUSZEWSKI, S.; PODLESNA, A. Efficiency of the magnetic treatment of broad bean seeds cultivated under experimental plot conditions. **International Agrophysics**, Lublin, v. 18, p. 65-71, 2004.

PODLESNY, J.; PIETRUSZEWSKI, S.; PODLESNA, A. Influence of magnetic stimulation of seeds on the formation of morphological features and yielding of the pea. **International Agrophysics**, Lublin, v. 19, p. 1-8, 2005.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília, DF: AGIPLAN, 1985.

POTENZA, L.; CUCCHIARINI, L.; PIATTA, E. Effects of high static magnetic field exposure on different DNAs. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 25, p. 352-355, 2004.

PUNTARULO, S.; BOVERIS, A. Effect of natural and accelerated aging on the hydroperoxide metabolism of soybean embryonic axes. **Plant Science**, Clare, v. 68, n. 1, p. 27-32, 1990.

RABELO, G. F. **Avaliação da aplicação do “Speckle” dinâmico no monitoramento da qualidade da laranja**. 2000. 149 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)-Faculdade em Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

RAYLMAN, R.; CLAVO, C.; WAHL, R. L. Exposure to strong static magnetic fields slows the growth of human cancer cells *in vitro*. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 17, p. 358-363, 1996.

REINA, G. F.; PASCUAL, L. A.; FUNDORA, I. A. Influence of a stationary magnetic field on water relations in lettuce seeds: part II, experimental results. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 22, p. 596-602, 2001.

RIBEIRO, U. P. **Condicionamento fisiológico de sementes de algodão: efeitos sobre a germinação, vigor, atividade enzimática e armazenabilidade**. 2000. 79 p. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2000.

ROBERTS, E. H. Loss of seed viability: chromosomal and genetic aspects. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 3, p. 515-527, 1973.

ROCHALSKA, M.; ORZESZKO-RYWKA, A. Magnetic field treatment rzeszko-Rywka, improves seed performance. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 33, p. 669, 2005.

RODRIGUES, S. **Efeito Estocástico em Speckle Dinâmico**. 2007. 113 f. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)-Faculdade de Engenharia Agrícola, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

ROSA, S. D. V. F. et al. Perfil isoenzimático em sementes de café produzidas sob manejo orgânico. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais...** Araxá, 2011. 1 CD-ROM.

ROSEN, A. D. Mechanism of action of moderate intensity static magnetic fields on biological systems. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Totowa, v. 39, p. 163-174, 2003.

ROSEN, S.; ROSEN, D. Magnetic field influence on Paramecium motility. **Life Science**, Elmsford, v. 46, p. 1509-1515, 1990.

SALINAS, A. R. et al. Fisiologia da deterioração em sementes de soja durante o armazenamento. **Revista Científica Rural**, Bagé, v. 3, p. 106-118, 1998.

SANTORO, N. et al. Effect of extremely low frequency (ELF) magnetic field exposure on morphological and biophysical properties of human lymphoid cell line (Raji). **Biochimica et Biophysica Acta**, Alberta, n. 1357, p. 281-290, 1997.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILELA, F. V. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

SANTOS, F. C. et al. Atividade de endo-  $\beta$ - mananase em sementes de café colhidas em diferentes estádios fenológicos. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais...** Araxá, 2011. p. 39-45.

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

SHANG, G. M.; WU, J. C.; YUAN, Y. J. Improved cell growth and Taxol production of suspension-cultured *Taxus chinensis* var. *mairei* in alternating and direct current magnetic fields. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, p. 875-878, 2004.

SHATTERS, R. G. J. R.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O. Soybean seed deterioration and response to priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 33-41, 1994.

SHIMIZU, M. M.; MAZZAFERA, P. Mudanças na composição de proteínas e aminoácidos durante a germinação de sementes de café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA VEGETAL, 7., 1999, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF, 1999. 1 CD-ROM.

SHINE, M. B.; GURUPRASAD, K. N.; ANAN, A. Enhancement of germination, growth, and photosynthesis in soybean by pre-treatment of seeds with magnetic field. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 32, p. 474-484, 2011.

SILVA, E. A. A. et al. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* L.; cv. Rubi) seed germination. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 251-261, Dec. 2005.

SILVA, E. R. da. **Estudo das propriedades do Biospeckle e suas aplicações**. 2007. 120 p. Dissertação (Mestrado em Física)-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

STILL, D. W.; BRADFORD, K. J. Endo-P-Mannanase activity from individual tomato endosperm caps and radicle tips in relation to germination rates'. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 113, p. 21-29, 1997.

SUNG, J. M. Lipid peroxidation and peroxide scavenging in soybean seeds during ageing. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, n. 1, p. 85-89, May 1996.

SUNG, J. M.; CHIU, C. C. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes of naturally aged soybean seed. **Plant Science**, Clare, v. 110, n. 1, p. 45-52, Sept. 1995.

SUNG, J. M.; JENG, T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated ageing of peanut seed. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 91, n. 1, p. 51-55, May 1994.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKAKI, M.; DIETRICH, S. M. C. Effect of GA<sub>3</sub> and light on polysaccharide levels and metabolism in germinating coffee seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 31, p. 1643-1649, 1980.

TENUZZO, B. et al. Biological effects of 6 mT static magnetic fields: a comparative study in different cell types. **Bioelectromagnetics**, New York, v. 27, n. 7, p. 560-577, 2006.

TEODORI, L. et al. Exposure of cells to static magnetic fields accelerates loss of integrity of plasma membrane during apoptosis. **Cytometry**, Hoboken, v. 49, p. 113-118, 2002a.

TEODORI, L. et al. Static magnetic fields affect calcium fluxes and inhibit stress-induced apoptosis in human glioblastoma cells. **Cytometry**, Hoboken, v. 49, p. 143-149, 2002b.

TOOROP, P. E.; BEWLEY, J. D.; HILHORST, H. W. M. Endo- $\beta$ -mannanase isoforms are present in the endosperm and embryo of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. **Planta**, Berlin, v. 200, p. 153-158, 1996.

TORRES, C.; DÍAZ, J. E.; CABAL, P. A. Magnetic fields effect over seeds germination of rice (*Oryza sativa* L.) and tomato (*Solanum lycopersicum* L.). **Agromía Colombiana**, Bogota, v. 26, n. 2, p. 177-185, 2008.

TREWAVAS, A. J. et al. **Stimulation of the blue light phototropic receptor NPH1 causes a transient increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup>**. Stanford: Carnegie Institute of Washington, 1999.

VASHISTH, A.; NAGARAJA, S. Effect on germination and early growth characteristics in sunflower (*Helianthus annuus*) seeds exposed to static magnetic field. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 167, p. 149-156, 2010.

VASHISTH, A.; NAGARAJAN, S. Exposure of seeds to static magnetic field enhances germination and early growth characteristics in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Bioelectromagnetics**, New York, v. 29, p. 571-578, 2008.

VEIGA, A. D. et al. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 953-960, 2010.

VIEIRA, M. G. C. G. **Utilização de marcadores moleculares no monitoramento da qualidade sanitária e nível de deterioração de sementes de algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.)**. 1996. 127 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Ed.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 103-132.

VIEIRA, R. D.; KRZYZANOWSKI, F. C. Teste de condutividade elétrica. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 4, p. 1-26.

VIVAS, P. G. **Uso do biospeckle como ferramenta de diagnóstico precoce na avaliação da qualidade de sementes de café**. 2015. 61 p. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

VOIGT, B.; BEWLEY, J. D. Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiple forms of germinative and post-germinative endo- $\beta$ -mannanase: responses to desiccation, abscisic acid and osmoticum. **Planta**, Berlin, v. 200, p. 71-77, 1996.

WEEDEN, N. F.; WENDEL, J. F. Genetics of plant isozymes. In: SOLTIS, D. E.; SOLTIS, P. S. (Ed.). **Isozymes in plant biology**. London: Chapman and Hall, 1990. p. 46-72.

WILLEKENS, H. et al. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, Dordrecht, v. 1, p. 207-288, 1995.

ZDUNEK, A. et al. The biospeckle method for the investigation of agricultural crops: a review. **Optics & Lasers in Engineering**, Surrey, v. 52, n. 1, p. 276-285, 2014.

ZIMMERMANN, S.; SENTENAC, H. Plant ion channels: from molecular structures to physiological functions. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 2, p. 477-482, 1999.