



**THAMIRES LOPES RIBEIRO**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE  
PEROXIRREDOXINAS EM SEMENTES DE *Coffea arabica*  
SUBMETIDAS À SECAGEM E AO ARMAZENAMENTO**

**LAVRAS - MG  
2020**

**THAMIRES LOPES RIBEIRO**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE PEROXIRREDOXINAS EM  
SEMENTES DE *Coffea arabica* SUBMETIDAS À SECAGEM E AO  
ARMAZENAMENTO**

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

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

Dra. Elise de Matos Pereira  
Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2020**

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

Ribeiro, Thamires Lopes.

Qualidade fisiológica e expressão de peroxirredoxinas em  
sementes de *coffea arabica* submetidas à secagem e ao  
armazenamento / Thamires Lopes Ribeiro. - 2020.

53 p. : il.

Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Coorientador(a): Elise de Matos Pereira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Produção de plantas. 2. Peroxirredoxina. 3. Tolerância à  
dessecação. I. Von Pinho, Édila Vilela de Resende. II. Pereira, Elise  
de Matos. III. Título.

**THAMIRES LOPES RIBEIRO**

**QUALIDADE FISIOLÓGICA E EXPRESSÃO DE PEROXIRREDOXINAS EM  
SEMENTES DE *Coffea arabica* SUBMETIDAS À SECAGEM E AO  
ARMAZENAMENTO**

**PHYSIOLOGICAL QUALITY AND EXPRESSION OF PEROXYREDOXINS IN  
*Coffea arabica* SEEDS SUBMITTED TO DRYING AND STORAGE**

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

APROVADA em 28 de agosto de 2020.

Dra. Heloisa Oliveira dos Santos UFLA

Dra. Renata Silva Mann UFS

Profa. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho  
Orientadora

Dra. Elise de Matos Pereira  
Coorientadora

**LAVRAS - MG  
2020**

*Aos meus pais, Edson e Isabel, fonte inesgotável de inspiração e força.  
Aos meus irmãos, Thaís e Thiago, pelo incentivo, cuidado e cumplicidade.*

*Com todo amor e carinho.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, minha família, por esta conquista e por me guiar sempre pelo melhor caminho.

À minha mãe, Isabel, por ser minha maior inspiração, por toda a paciência, por nunca permitir que eu desista, por sempre me apoiar e sonhar os meus sonhos, e pelo amor incondicional.

Ao meu pai, Edson, por ser um exemplo de pessoa, por sempre ter uma palavra de conforto e por me ensinar a enxergar o lado bom de cada acontecimento, e por todo o apoio e amor.

Aos meus irmãos, Thaís e Thiago, por todo o amor, carinho, cuidado e dedicação, vocês foram essenciais para que eu chegasse ao final de mais uma etapa da minha vida.

À minha eterna e amada vó Inês, por todo o amor e proteção. À minha vó Irani, pelo carinho, por estar presente em minha vida e por todas as orações.

Ao meu namorado, Fabriccio, por todo o amor, paciência, apoio, persistência, e por estar comigo em todos os momentos da minha vida e nunca medir esforços para me ajudar e me ver sempre feliz.

Aos meus cunhados, Fausto e Samantha, por tantos anos de convivência, carinho e cuidado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela oportunidade de realização do curso.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Café (INCT CAFÉ) pelo apoio financeiro.

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

À minha orientadora, Prof. Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, por todos os ensinamentos transmitidos, por toda a paciência, pela dedicação, pelo incentivo, e por me acolher de uma forma tão generosa durante essa trajetória.

À minha coorientadora e grande amiga, Dra. Elise de Matos Pereira, por todo o carinho, companheirismo, por me ajudar a desenvolver esse experimento com maestria, e por estar sempre ao meu lado.

À Prof. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos, por todo o conhecimento, pelo apoio, pela amizade e por estar sempre disposta a me ajudar.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Moura, do Departamento de Ciências da Saúde (DSA), por toda a ajuda, apoio, paciência e disponibilidade, principalmente na realização de uma das etapas mais importantes do experimento. Com certeza, sem seus ensinamentos e conhecimento, a conclusão desse trabalho não seria possível.

Aos membros da banca examinadora Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho, Dra Heloisa Oliveira dos Santos e Dra. Renata Silva Mann pela disponibilidade, e por terem aceitado o convite.

A todos os membros do grupo de pesquisa da professora Édila, por toda a ajuda e assistência durante a realização do experimento, por todos os momentos de alegria e descontração e, principalmente, pela amizade.

Aos professores, técnicos e funcionários do Setor de Sementes, por toda a disponibilidade e auxílio.

Às minhas amigas de Uberaba, Aninha, Mayla, Mila, Moni, Thaís e Teresa, por todo o amor, carinho, e por sempre se fazerem presentes, independente da distância física. Vocês sempre foram meu ponto de partida, mas também de chegada.

Aos meus amigos, Nunca, Iolanda, Ana, Melô e Nariga, por me acompanharem durante toda essa caminhada e serem meu porto seguro e alegria.

À república Saia Justa, moradoras e ex-moradoras, que são a minha família em Lavras, pelos melhores momentos vividos. Obrigada por me escolherem e por me permitirem fazer parte dessa história durante 8 anos, vocês foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional, meu eterno amor por vocês e por tudo que vivemos.

A todos que de alguma forma, contribuíram para a realização e concretização desse trabalho.

Muito obrigada!

## RESUMO

A baixa longevidade de sementes de *Coffea arabica* tem sido atribuída também à sensibilidade destas à dessecação. Assim, compreender os aspectos fisiológicos destas sementes durante o processo de secagem e ao longo do armazenamento é de grande importância, uma vez que a qualidade das sementes influencia o vigor das mudas utilizadas para a formação das lavouras. Objetivou-se nessa pesquisa, avaliar a qualidade fisiológica e a expressão da proteína 1-Cys PRX em sementes de café submetidas à secagem e ao armazenamento, visando o estabelecimento de métodos de secagem associados aos teores de água das sementes, para a preservação da qualidade das sementes durante o armazenamento. Foram utilizadas sementes de *Coffea arabica* L. da cultivar Catuaí Amarelo (IAC 62) produzidas na fazenda Bom Jardim, localizada em Bom Sucesso, Minas Gerais. Os frutos foram colhidos no estágio de maturação cereja e beneficiados. As sementes passaram pelo processo de degomagem natural e pré secadas até 46% de teor de água. Após, as sementes foram secadas até atingirem os teores de água de 40%, 20% e 10% e posteriormente armazenadas por 60, 120 e 180 dias em câmara fria ( $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  e UR 70%). Foram utilizadas sementes com 46% de teor de água e sem armazenamento como tratamento controle. A qualidade fisiológica das sementes foi avaliada por meio dos testes de primeira contagem de germinação, germinação, plântulas normais fortes aos 30 dias da semeadura, plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias da semeadura, emergência e índice de velocidade de emergência (IVE). Foi avaliada também, a expressão da proteína 1-Cys PRX pela técnica de Western Blot. As avaliações foram realizadas em quatro épocas, antes do armazenamento das sementes e após 60, 120 e 180 dias de armazenamento. Foi observada redução do vigor em sementes secadas a 10% de teor de água. Foi verificada maior expressão da proteína PRX em sementes de café secadas com 20% e 10% de teor de água ao longo do armazenamento e não houve expressão da proteína em sementes com 46% de teor de água (tratamento controle) e em sementes secadas a 40% de teor de água a partir de 60 dias de armazenamento. Pode-se concluir que a qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* é influenciada pelo teor de água e período de armazenamento. Pela técnica de Western Blot foi possível detectar maior expressão da proteína peroxirredoxina em sementes de café secadas com 20 e 10% de teor de água. Há redução do vigor das sementes quando são secadas, principalmente com 20 e 10% de teor de água.

Palavras-chave: Eletroforese. Sistema antioxidante. Tolerância à dessecação. Vigor. Western Blot.

## ABSTRACT

The low longevity of *Coffea arabica* seeds has also been attributed to their sensitivity to desiccation. Thus, understanding the physiological aspects of these seeds during the drying process and during storage is of great importance, since the quality of the seeds influences the vigor of the seedlings used to form the crops. The objective of this research was to evaluate the physiological quality and the expression of the 1-Cys PRX protein in coffee seeds submitted to drying and storage, aiming at the establishment of drying methods associated with the water content of the seeds to preserve the quality of the seeds during storage. Seeds of *Coffea arabica* L. from the cultivar Catuaí Amarelo (IAC 62) produced on the Bom Jardim farm located in Bom Sucesso, Minas Gerais, were used. The fruits were harvested at the cherry ripening stage and peeled. The seeds went through the process of natural degumming and pre-dried up to 46% water content. Afterwards, the seeds were dried until reaching the water content of 40%, 20% and 10% and later stored for 60, 120 and 180 days in a cold room ( $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$  and 70% RH). Seeds with 46% water content and no storage were used as a control treatment. The physiological quality of the seeds was evaluated by first germination test, germination test, normal seedlings at 30 days of sowing test, cotyledonary leaves expanded at 45 days of sowing test, emergence test and rate of emergence (IVE). The expression of the 1-Cys PRX protein was also evaluated by the Western Blot technique. The evaluations were carried out at four periods, before seed storage and after 60, 120 and 180 days of storage. Reduced vigor was observed in seeds dried at 10% water content. Higher expression of the PRX protein was verified in dried coffee seeds up to 20% and 10% water content during storage and there was no expression of the protein in seeds with 46% water content (control treatment) and in dried seeds at 40% water content after 60 days of storage. It can be concluded that the physiological quality of *Coffea arabica* seeds is influenced by the water content and storage period. Using the Western Blot technique, it was possible to detect greater expression of the peroxiredoxin protein in dried coffee seeds up to 20 and 10% water content. There is a reduction in the vigor of the seeds when they are dried, mainly up to 20 and 10% of water content.

Keywords: Electrophoresis. Antioxidant system. Desiccation tolerance. Vigor. Western blot.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>12</b>
<b>2.1</b>	<b>A cultura do café.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2</b>	<b>Tolerância à dessecação em sementes de café .....</b>	<b>12</b>
<b>2.3</b>	<b>Secagem de sementes de café .....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Sistemas antioxidantes (estresse oxidativo em sementes).....</b>	<b>16</b>
<b>2.5</b>	<b>Peroxirredoxinas.....</b>	<b>19</b>
<b>2.5.1</b>	<b>Cys Peroxirredoxina .....</b>	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.1</b>	<b>Local e materiais .....</b>	<b>23</b>
<b>3.2</b>	<b>Secagem das sementes .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3</b>	<b>Armazenamento das sementes.....</b>	<b>24</b>
<b>3.4</b>	<b>Determinação do teor de água .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise da qualidade fisiológica das sementes .....</b>	<b>24</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Teste de germinação .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Primeira contagem da germinação .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Plântulas normais fortes – 30 dias.....</b>	<b>25</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Plântulas com folhas cotiledonares expandidas – 45 dias .....</b>	<b>25</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Teste de emergência.....</b>	<b>25</b>
<b>3.5.6</b>	<b>Índice de Velocidade de Emergência .....</b>	<b>26</b>
<b>3.6</b>	<b>Análises estatísticas.....</b>	<b>26</b>
<b>3.7</b>	<b>Extração de proteínas totais .....</b>	<b>26</b>
<b>3.8</b>	<b>Determinação da concentração de proteínas totais .....</b>	<b>27</b>
<b>3.9</b>	<b>Estudo do padrão de expressão da proteína por Western-blot .....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A cultura do café (*Coffea arabica* L.) é destaque no cenário agrícola mundial, uma das *commodities* mais importantes para o país, ocupando o primeiro lugar em termos de produção e área cultivada (CONAB, 2017). Logo, novas tecnologias devem ser disponibilizadas para o produtor, visando o aumento da produtividade e a da rentabilidade econômica.

Nesse contexto, a utilização de mudas de qualidade na implantação da lavoura de *Coffea arabica* é de grande importância em função da influência sobre a produtividade da lavoura. As mudas utilizadas na implantação das lavouras são obtidas a partir de sementes, tornando imprescindível o uso de sementes com alta qualidade fisiológica, para a obtenção de mudas vigorosas em condições de campo (ARAUJO *et al.*, 2008; KIKUTI *et al.*, 2002).

As sementes de *coffea arabica* são reconhecidamente complexas quanto à qualidade fisiológica, devido ao seu comportamento intermediário, em relação à tolerância a dessecação. Apresentam germinação lenta, desuniforme e menor potencial de armazenabilidade. Esse fato é importante, uma vez que entre a colheita das sementes e a semeadura para a formação de mudas há a necessidade de armazenar estas sementes. Assim conhecer os mecanismos associados à tolerância à dessecação em sementes de café com o intuito de propor tecnologias que possam estender o período de armazenabilidade dessas sementes, traria benefícios para toda a cadeia produtiva do café.

A tolerância à dessecação é considerada um mecanismo de sobrevivência e, em sementes, se dá por meio de sistemas protetores responsáveis por prevenir danos letais em diferentes componentes das células (BERJAK, 2006; SANTOS *et al.*, 2014). Dentre esses sistemas, três importantes têm sido estudados: a acumulação de açúcares não reduzidos; sistemas enzimáticos capazes de prevenir, tolerar e reparar as ações de radicais livres, conhecidos como sistemas antioxidantes, e ainda a expressão de proteínas resistentes ao calor (GUIMARÃES *et al.*, 2002).

Progressos têm sido alcançados por meio de estudos da morfologia, anatomia e fisiologia de sementes de café. Porém, os resultados de pesquisas têm sido inconsistentes quanto à secagem e armazenamentos destas.

Conhecer as respostas das sementes de *Coffea arabica* durante a secagem, a interação entre o teor de água dessas, e a temperatura ao longo do armazenamento, são importantes para a aplicação em programas de controle de qualidade, visando a formação de mudas vigorosas.

Frente a este cenário, a busca por estratégias que viabilizem a conservação das sementes de café, bem como o entendimento do comportamento destas diante do processo de secagem, é

de suma importância. Sabe-se que durante o processo de secagem ocorrem mudanças do meio celular que promovem alterações de várias vias que compõem diferentes rotas metabólicas (MILLER *et al.* 2010; MITTLER *et al.*, 2006). Nesta condição, são formadas as espécies reativas de oxigênio (ERO's), sendo extremamente danosas às moléculas de proteínas, DNA e lipídeos (APEL; HIRT, 2004), o que pode afetar a qualidade fisiológica das sementes.

No entanto, também tem sido relatado que há um sistema de defesa em plantas e sementes para a desintoxicação das ERO's. Neste sistema há pelo menos cinco diferentes enzimas capazes de remover as ERO's. Elas são codificadas por cinco famílias distintas: peroxidases de ascorbato (APX), catalase, glutathione peroxidase (GPX), peroxidases tipo III e as peroxirredoxinas (MITTLER *et al.*, 2004; RODRIGUEZ *et al.*, 2003; TOGNOLLI *et al.*, 2002; VANDENABEELE *et al.*, 2004).

As peroxirredoxinas da subclasse 1-Cys-PRX merecem destaque por serem específicas de sementes e estão localizadas no núcleo das células do embrião e na camada de aleurona de sementes (STACY *et al.*, 1996; STACY *et al.*, 1999). Além disso, as 1-Cys Prx são codificadas por genes de cópia única, sendo expresso somente em sementes e pertencem a uma família monogênica. Existe a hipótese que a 1-Cys-PRX protegem os tecidos que sobrevivem após o processo de secagem devido a sua atividade peroxidásica *in vitro*.

No entanto, as peroxirredoxinas têm sido pouco estudadas em sementes de café. Entende-se ser importante avaliar a qualidade fisiológica e a expressão da proteína 1-Cys PRX em sementes de café submetidas à secagem e ao armazenamento, visando o estabelecimento de métodos de secagem associados aos teores de água das sementes para a preservação da qualidade das sementes durante o armazenamento, garantindo a produção de mudas vigorosas para a formação das lavouras cafeeiras.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A cultura do café**

Considerado um produto de alto valor comercial, o café é produzido e consumido em diversos países (CLEMENTE; CARVALHO; GUIMARÃES, 2012). No Brasil, a cafeicultura é considerada uma das atividades mais tradicionais e rentáveis da agricultura (FAGAN; HENRIQUE; SOUZA, 2011). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento – CONAB (2019), no ano de 2019, a produção de café no Brasil alcançou um volume de 54,48 milhões de sacas beneficiadas, em área total plantada de 1.842,2 mil hectares, com produtividades de 27,4 a 29,58 sacas por hectare.

A implantação de lavouras de café é realizada por meio de mudas, e a semeadura para a produção destas é feita nos meses de maio/junho. É frequente a utilização de sementes da safra anterior, tornando as condições de armazenamento um fator importante para garantir a qualidade das sementes e das mudas (CARVALHO; ALMEIDA; GUIMARÃES, 2014).

Guimarães *et al.* (2002) concluíram que as sementes de *Coffea arabica* apresentam redução de viabilidade e vigor quando são submetidas à secagem e ao armazenamento. Isto se deve ao fato de as sementes de *Coffea arabica* serem consideradas de tolerância intermediária à dessecação (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Segundo estes autores, estas sementes toleram parcialmente a secagem e não toleram a dessecação a teores baixos de água ou a combinação de secagem com baixos teores de água e armazenamento.

Manter a qualidade fisiológica de sementes de café durante o armazenamento é um desafio para os produtores de sementes, uma vez que estas sementes perdem rapidamente a viabilidade, o que limita o potencial de armazenamento destas (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Por meio de resultados de pesquisas, tem sido observado que o potencial de armazenabilidade das sementes de café é influenciado pelos métodos de secagem, teor de água destas no final do processo de secagem, e também pelas condições de armazenamento.

### **2.2 Tolerância à dessecação em sementes de café**

A tolerância à dessecação é um dos mais importantes processos observados em plantas superiores e tem um papel fundamental na evolução das espécies cultivadas (GONZÁLEZ-MORALES *et al.*, 2016), rara em tecidos vegetais, raízes e caules, entretanto, presentes em sementes e pólen (VERDIER *et al.*, 2013). É descrita como a habilidade das sementes de

resistirem à dessecação (LANG *et al.*, 2017), e também definida como a capacidade para suportar a perda de água e sobreviver após a reidratação sem danos permanentes (DEKKERS *et al.*, 2015). É devido a este mecanismo, que as sementes se mantêm viáveis no estado seco durante anos ou até mesmo séculos (GONZÁLEZ-MORALES *et al.*, 2016). A tolerância à dessecação é considerada pré requisito para que as sementes alcancem a longevidade, o que implica em forte interdependência entre estes caracteres (DEKKERS *et al.*, 2015).

Vários mecanismos estão envolvidos na dessecação, e têm sido descritos em níveis morfológicos, fisiológicos e bioquímicos, envolvendo a expressão coordenada de um grande número de genes (BARTELS; SINGH; SALAMINE, 1988; WALTERS *et al.*, 2001). Portanto, esse é um processo complexo e pouco compreendido, requerendo estudos mais avançados.

Organismos tolerantes à dessecação são tolerantes a perda de água, uma vez que os mesmos possuem moléculas protetivas e entram em quiescência, estado metabólico inativo (ALPERT, 2005), entre o desenvolvimento e a germinação, possibilitando a armazenagem, com perdas mínimas de qualidade, se armazenadas em condições favoráveis (PEREIRA *et al.*, 2017).

As sementes foram classificadas de acordo com a capacidade de tolerar a secagem e possibilitar o armazenamento, sendo inicialmente divididas em dois grupos por Roberts (1973). O primeiro grupo são as sementes capazes de suportar a secagem a baixos teores de água e o armazenamento por longos períodos a baixas temperaturas, sem perda da viabilidade. Este grupo de sementes foi denominado ortodoxas.

O segundo grupo é composto por sementes que não possuem a capacidades de suportar a secagem e o armazenamento a baixas temperaturas e que não mantêm a sua viabilidade por longos períodos. Esse grupo foi denominado de recalcitrantes. Grande número de espécies pertencentes a este grupo são de importância econômica, porém, são de difícil manejo uma vez que são dispersas com alto teor de água, o que inviabiliza o armazenamento das mesmas por longos períodos (ROBERTS, 1973).

Posteriormente, Ellis, Hong e Roberts (1990) introduziram o conceito de intermediárias, grupo no qual as sementes de *C. arabica* estão inseridas. Neste grupo estão as sementes que suportam parcialmente a secagem e não toleram a dessecação a teores baixos de água ou a combinação de secagem com baixos teores de água e armazenamento.

Em sementes de café, a tolerância à dessecação é adquirida tardiamente, na fase final de maturação, não dependendo das condições do ambiente, mas sim, do estágio de desenvolvimento das mesmas (DUSSERT *et al.*, 2018). As de *Coffea arabica* L. são classificadas como intermediárias, ou seja, são capazes de tolerarem níveis de dessecação

consideravelmente mais baixos em comparação com sementes recalcitrantes, porém, não toleram a perda de água extrema como as sementes ortodoxas (ELLIS; HONG; ROBERTS, 1990). Este baixo potencial de armazenamento das sementes de *Coffea arabica* pode ser influenciado por alguns fatores, sendo alguns deles: o teor de água no momento da secagem e após a secagem, as condições de secagem e de armazenamento (COELHO *et al.*, 2015; COELHO *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2002).

Diversos autores afirmam que a secagem e o armazenamento são aspectos fundamentais para a preservação da viabilidade das sementes de café, tendo reflexo na produção de mudas de qualidade (BRAZ; ROSSETTO, 2008).

O teor de água da semente após a secagem possui influência na qualidade fisiológica de sementes de café. O mesmo pode estar associado aos danos de embebição, lixiviação de nutrientes, desorganização dos sistemas envolvidos no estresse oxidativo e hídrico, perda de germinação e degradação do endosperma e das membranas (SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013). Dussert *et al.* (2012) concluíram que há variação em relação ao teor máximo de água que a semente de *Coffea arabica* tolera, podendo variar de 5 a 16%, em resultados de pesquisa.

Apesar dos avanços nos estudos sobre a dessecação de sementes de café, os resultados são controversos, o que justifica mais pesquisas nessa área, uma vez que a sensibilidade à dessecação é o principal entrave para conservação destas sementes (DUSSERT *et al.*, 2012).

A resposta à dessecação em sementes em desenvolvimento compreende um complexo de mecanismos protetores contra estresses fisiológicos causados pela remoção de água, incluindo modificações nas paredes celulares e membranas, citoesqueleto e cromatina, a prevenção de danos causados por radicais livres, quando a atividade metabólica é reduzida e moléculas protetoras (antioxidantes, EROs e *scavengers*) são produzidas.

As enzimas que constituem o sistema de defesa antioxidante em plantas, a exemplo da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidases de ascorbato (APX), glutathione peroxidase (GPX), peroxidases tipo III e as peroxirredoxinas (PRX) (KAYIHAN *et al.*, 2012; BHATT; TRIPATHI, 2011), desempenham papel essencial quando as sementes são expostas a condições ambientais adversas. A remoção de água das células, pode induzir aos processos oxidativos, produção de radicais livres e aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são altamente reativas, e durante a dessecação a sua ocorrência é maior (GONZÁLEZ-MORALES *et al.*, 2016).

### 2.3 Secagem de sementes de café

Um processo de secagem eficiente é aquele que, além de reduzir o teor de água do produto, aumenta seu potencial de conservação pós-colheita e preserva sua qualidade, atribuindo-lhe valor comercial (REINATO, 2006; CORRÊA *et al.*, 2002).

O processamento pós-colheita é, sem dúvida, uma operação de fundamental importância dentre as várias etapas de produção de sementes de café. A obtenção de sementes com elevada qualidade genética, física, fisiológica e sanitária é de extrema importância para implementação de uma lavoura com alta produtividade.

Diante disso, o aprimoramento da conservação de sementes de café tem sido buscado por meio de várias pesquisas, sendo que nos resultados obtidos nestes estudos tem sido observado uma sensibilidade das sementes à desidratação, o que tem acarretado, na maioria dos casos, rápida perda de viabilidade (BACCHI, 1956; VIEIRA *et al.*, 2007; COELHO *et al.*, 2015).

Em revisão dos trabalhos desenvolvidos com tal finalidade, pode-se perceber que os conhecimentos acumulados ainda não são conclusivos. Em alguns trabalhos tem sido observado que sementes de café toleram dessecação até 10% de grau de umidade (menor grau de umidade de segurança), sem prejuízos à viabilidade; o grau crítico de grau de umidade situou-se entre 5,6% e 10%, iniciando a redução da viabilidade; a dessecação até 4% de umidade (grau de umidade letal) reduz o poder germinativo das sementes à zero (BACCHI, 1955, 1956; ELLIS HONG; ROBERTS, 1990; HONG; ELLIS, 1992).

Bacchi (1956) relatou que sementes de café arábica suportam sem desvantagem alguma à sua vitalidade, um teor mínimo de água variando de 8 a 9%. Silva e Dias (1985) relataram que o intervalo entre 36% e 40% foi o mais favorável à manutenção da qualidade fisiológica de sementes de *C. arabica*. Em outros estudos foram observados resultados satisfatórios com graus de umidade de 35% (VASCONCELOS; GROTH; RAZERA 1992; BRACCINI *et al.*, 1998). Rosa *et al.* (2005) estudando o armazenamento de sementes de *Coffea canephora* concluiu que a umidade de 35% favorece a incidência de fungos, independentemente do método de secagem utilizado na pesquisa.

Miglioranza (1982) observou que sementes de *C. arabica* com alto grau de umidade perderam a viabilidade após seis meses de armazenamento, e aquelas com grau de umidade entre 8 e 10% foi observado 90% de germinação ao final de doze meses de armazenamento. Ellis, Hong e Roberts (1990) obtiveram sobrevivência de sementes de *C. arabica* secadas até aproximadamente 10% de teor de água e armazenadas por 12 meses a 15 °C. Vossen (1979),

Miranda (1987), Hong e Ellis (1992) e Gentil (1999) também admitiram como vantajosos, para a qualidade fisiológica de sementes de café, os graus de umidade entre 9% e 11%.

Vieira *et al.* (2007) concluiu que a secagem rápida prejudica o vigor e a viabilidade das sementes de *C. arabica*, independentemente do local de armazenamento. Rosa *et al.* (2005) estudou o efeito de três taxas de secagem (lenta, intermediária e rápida) e observou que todas as taxas influenciaram negativamente a germinação e o vigor de sementes de *C. canéfora*. Entretanto, a maior redução da qualidade foi observada quando as sementes foram submetidas à secagem rápida. Neste estudo, também foi concluído que a redução do teor de água das sementes resultou em redução nos valores de germinação e de vigor. Santos, Von Pinho e Rosa (2013) estudaram o efeito da secagem e dos níveis de grau de umidade em sementes de *C. arabica* e observou maior vigor de plântulas oriundas em sementes com 30% de grau de umidade submetida à secagem lenta, e em sementes submetidas à secagem rápida até 20% de grau de umidade.

A definição do grau de umidade ideal após a secagem, assim como a tecnologia de armazenagem adequada à manutenção da qualidade de sementes de café é um desafio na área de tecnologia de sementes de café, e tem constituído fonte de divergências entre os resultados de pesquisas.

#### **2.4 Sistemas antioxidantes (estresse oxidativo em sementes)**

As sementes estão sujeitas a diversos processos deletérios devido as mudanças fisiológicas e bioquímicas que ocorrem desde a fertilização do óvulo até a semeadura, interferindo no potencial fisiológico (GARCIA *et al.*, 2004). A interação entre o teor de água da semente, as condições em que as sementes são submetidas, e o genótipo, são determinantes na velocidade do processo de deterioração das sementes (DELOUCHE, 2002).

As plantas possuem mecanismos de defesa quando submetidas aos diferentes estresses. De modo geral, as condições adversas desencadeiam alterações metabólicas em diferentes tecidos das plantas, como a intensificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas são geradas em diferentes compartimentos celulares, como consequência tanto do funcionamento defeituoso de vias metabólicas, como dos processos fisiológicos naturais (WANG *et al.*, 2012).

EROs estão envolvidas em vários aspectos da fisiologia de sementes. A produção dessas pode ocorrer durante a dessecação, germinação e envelhecimento, podendo ocasionar estresse oxidativo e danos celulares, resultando em deterioração (WANG *et al.*, 2012).

Estas espécies reativas são formas parcialmente reduzidas de oxigênio ( $O_2$ ), resultantes da excitação eletrônica do  $O_2$  para formar oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) ou da transferência de um, dois ou três elétrons para o  $O_2$  para formar, respectivamente o radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) (SAHA *et al.*, 2015), que são produzidas constantemente como subprodutos de várias vias metabólicas celulares (APEL; HIRT, 2004).

Ao contrário do oxigênio atmosférico, EROs são capazes de oxidar vários componentes celulares (VANDENABEELE *et al.*, 2000), ocasionando dano oxidativo em biomoléculas, como o ácido desoxirribonucléico (DNA), carboidratos, lipídeos e proteínas (CORBINEAU, 2012). Estes danos podem resultar na peroxidação de lípidos da membrana, seguido da desintegração desta levando a morte celular (PUKACKA, 1989; HENDRY *et al.*, 1992; LEPRINCE; BUITINK; HOEKSTRA, 1999).

O ânion superóxido ( $O_2^-$ ) é uma molécula com um elétron não pareado que pode reagir com outras moléculas para estabilizar sua energia (BAILLY, 2004). Esse radical é considerado uma espécie pouco reativa porque não se difunde por distâncias consideráveis a partir do seu sítio de produção, porém, é possível a combinação com outras espécies, formando assim, uma espécie mais reativa (FANG; YANG; WU, 2002; THOMAS, 2003).

O oxigênio singleto ( $^1O_2$ ) é um importante reativo no estresse oxidativo, pelo fato de reagir em duplas ligações, como por exemplo, as ligações dos ácidos graxos poliinsaturados ou nas guaninas em bases de DNA e é formado pela oxidação de outros intermediários reativos de oxigênio (DIPLOCK *et al.*, 1998).

O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é gerado pelas mesmas fontes que produzem o ânion superóxido. As enzimas peroxissomais associadas com o metabolismo de ácidos graxos e as enzimas citoplasmáticas responsáveis pela oxidação de metabólitos celulares, também são responsáveis pela sua formação. É considerado pouco reativo, pois não ataca diretamente os vários componentes celulares, mas pode atravessar facilmente as membranas biológicas e se difundir por distâncias consideráveis (THOMAS, 2003).

O radical hidroxil é considerado a espécie mais reativa de EROs, pois é capaz de reagir com várias biomoléculas produzindo derivados que não podem ser regenerados pelo metabolismo celular. A taxa de reação deste radical é controlada por difusão limitada e, portanto, a vida média deste é muito curta, reagindo no seu próprio sítio de formação (DIPLOCK, 1998; THOMAS, 2003).

Muitas fontes de EROs foram identificadas em plantas e algumas estão envolvidas no metabolismo normal, como respiração e a fotossíntese. Outras estão envolvidas com os

estresses bióticos e abióticos (AALEN *et al.*, 1994).

Os mecanismos de controle das EROs têm sido estudados por meio de técnicas avançadas. Organismos aeróbicos possuem um sistema de defesa antioxidante que combate o estresse oxidativo produzido por EROs, o qual possui substâncias que mesmo presentes em baixas concentrações, quando comparadas à do substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação desse substrato de maneira eficaz, protegendo as células contra a ação dos oxidantes (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989; SIES, 1993).

Em plantas, existem três vias de limpeza das EROs, sendo elas o ciclo água-água, que ocorre nos cloroplastos, o ciclo ascorbato-glutationa que ocorre nos cloroplastos, no citosol, na mitocôndria, no apoplasto e nos peroxissomos e a ação da catalase nos peroxissomos (GOMES *et al.*, 2006).

A eliminação das EROs é feita por meio de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (HORLIN, 2002). As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), glutatona peroxidase (GPX) e peroxirredoxina (PRX) fazem parte do sistema enzimático de defesa antioxidante em plantas (KAYIHAN *et al.*, 2012; BHATT; TRIPATHI, 2011). Juntamente com os antioxidantes ácido ascórbico e glutatona essas enzimas constituem uma maquinaria eficiente na desintoxicação de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ .

O balanço entre SODs e as diferentes enzimas *scavenger* é considerado um determinante crucial na regulação de concentrações intracelulares de radicais superóxidos e peróxidos. A superóxido dismutase é a primeira enzima de defesa contra danos provocados por EROs, essas são responsáveis pela 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 enzima é uma metaloproteína que apresenta três formas distintas, classificadas pelo seu co-fator: SOD-ferro (FeSOD) (cloroplasto), SOD-manganês (MnSOD) (mitocôndria e peroxissomo) e SOD-cobre e zinco (Cu-ZnSOD) (cloroplasto e citosol) (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; BOWLER *et al.*, 1992; SCANDALIOS, 2005).

A catalase possui a função de eliminar o  $H_2O_2$  produzido na fotorrespiração e na  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Possui como sítio ativo um grupo heme ( $Fe^{+2}$ ) que catalisa a reação onde o peróxido de hidrogênio é detoxificado sendo convertido em  $H_2O$  e  $O_2$  (MITTLER, 2002). Em plantas, esta enzima apresenta três isoformas, presentes nos peroxissomas e glioxissomas. CAT1 é responsável pela remoção do  $H_2O_2$  produzido durante a fotorrespiração em tecidos fotossintéticos; CAT2 são produzidas em tecidos vasculares e podem exercer uma função de lignificação, mas sua exata função biológica permanece desconhecida; e CAT3 está presente em sementes e plantas jovens, cuja atividade está relacionada à remoção do  $H_2O_2$

produzido durante a degradação dos ácidos graxos no glioxissoma (BREUSEGEM *et al.*, 2001).

As peroxirredoxinas constituem uma família de tiol-proteínas, que reduzem peróxido de hidrogênio, peróxidos orgânicos e peroxinitrito a água, álcool e nitrito, respectivamente, utilizando equivalentes redutores fornecidos pela tiorredoxina, tiorredoxina redutase e NADPH. As peroxirredoxinas (Prxs) são enzimas abundantes e foram identificadas em diversas espécies de animais, plantas e bactérias, porém, seu papel fisiológico ainda é discutido (BHATT; TRIPATHI, 2011).

## 2.5 Peroxirredoxinas

As peroxirredoxinas (Prxs) constituem uma família de peroxidases baseadas em tiol, que catalisa a desintoxicação de peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, com diferentes eficiências e em diferentes organismos (BHATT; TRIPATHI, 2011). Essas enzimas estão presentes em todos os organismos e localizadas no citosol, núcleo, mitocôndria e no cloroplasto, reduzem tanto  $H_2O_2$  como distintos alquilhidroperóxidos e peroxinitrito (RHEE; CHAE; KIM, 2005; DIETZ *et al.*, 2006).

As peroxirredoxinas são codificadas por vários genes, possuindo uma grande diversidade nas sequências de aminoácidos, mas com estrutura conservada. Prxs apresentam atividade peroxidásica centrada em um resíduo de cisteína, altamente reativo, denominado cisteína peroxidásica, capaz de reduzir, com alta eficiência, peróxidos de hidrogênio, peróxidos orgânicos ou peroxinitrito (RHEE *et al.*, 2005; TRUJILLO, 2007). São caracterizadas pela necessidade de um doador externo de elétrons, que geralmente são as tiorredoxinas (Trx) (KANG; BAINES; RHEE, 1998; RHEE; CHAE; KIM, 2005), mas em alguns casos pode ser a glutarredoxina (Grx) (ROUHIER *et al.*, 2001; ROUHIER; GELHAYE; JACQUOT, 2002) ou a glutathiona (HOFMANN; HECHT; FLOHE, 2002; DIETZ, 2003) ou ainda a ciclofilina (DIETZ *et al.*, 2006).

As peroxirredoxinas são divididas em quatro subclasses, sendo elas 1-Cys Prx, 2Cys Prx, PrxII e PrxQ. Um homólogo em animais, dependente de selênio, tem sido observado em plantas e foi designado para ser a quinta subclasse de Prx (BHATT; TRIPATHI, 2011).

A subclasse 1-Cys Prx foi identificada como sendo uma proteína relacionada à dormência, localizada no embrião e na camada de aleurona de sementes de cevada em desenvolvimento (AALEN *et al.*, 1994). Estas enzimas são monoméricas, contendo apenas uma cisteína catalítica conservada (HASLEKÅS *et al.*, 1998; MOWLA *et al.*, 2002; STACY *et al.*,

1996). Já a subclasse 2-Cys Prx foi primeiramente clonada em espinafre e cevada, é uma enzima homodimérica (subunidades com massas de 30 – 35 kDa), suas subunidades estão ligadas de forma covalente por meio de uma ponte dissulfeto na forma oxidada (CHEONG *et al.*, 1999; GOYER *et al.*, 2002; KONIG *et al.*, 2002). PrxII contém 2 resíduos de cisteínas conservados e foi primeiramente identificada em *Brassica campestris* (CHOI *et al.*, 1999). A quarta subclasse, PrxQ, foi primeiramente reportada em *Sedum lineare* e funciona como um monômero, possuindo uma ligação dissulfeto intramolecular entre os dois resíduos de cisteína catalítica (KONG *et al.*, 2000). A chamada quinta subclasse, GPX da família peroxidases glutationa, contém três resíduos de cisteína conservados, no entanto, apenas dois participam nas reações catalisadas pela enzima (NAVROT *et al.*, 2006).

Em plantas superiores, Prxs são relatadas como codificadas no núcleo (DIETZ, 2003). O genoma de *A. thaliana* codifica 10 Prxs e 8 GPXs, que são alvos para diferentes compartimentos celulares (DIETZ, 2003; ROUHIER; JACQUOT, 2005).

Tem sido previsto que 1-Cys Prx contém um sinal de localização nuclear que exporta a proteína do núcleo (STACY, 1999). A enzima 2-Cys Prx (presente em 2 isoformas 2-Cys PrxA e 2-Cys PrxB em *A. thaliana*) contém uma extensão N terminal que é importante para importar a pré-proteína para o cloroplasto (BAIER; DIETZ, 1997). A subclasse Prx II é desprovida de extensões de sequências e constitui a maior subclasse em *A. thaliana* com 5 genes identificados (DIETZ *et al.*, 2002). Essa subclasse está presente na maioria dos compartimentos celulares, como nos cloroplastos (PrxII E), nas mitocôndrias (PrxII F), e no citosol (PrxII B, PrxII C e PrxII D) (BRÉHÉLIN *et al.*, 2003; DIETZ, 2003; FINKEMEIER *et al.*, 2005; KONIG *et al.*, 2003; KRUFTE *et al.*, 2001).

Assim como 2-Cys Prx, Prx Q também possui uma extensão N-terminal com uma sequência específica/sinalizadora que garante o direcionamento destas proteínas para os cloroplastos (DIETZ *et al.*, 2003). GPX, a quinta provável subclasse de Prx, está localizada no citosol, cloroplasto e mitocôndria (NAVROT *et al.*, 2006).

De acordo com o mecanismo de catálise envolvido, Prxs podem ser divididas em três diferentes grupos. A característica comum entre estes grupos é a existência de uma cisteína na região N-terminal que está diretamente envolvida na redução de hidroperóxidos, sendo por isso denominada cisteína peroxidásica (Cys-Sp). A oxidação da sulfidril da Cys-Sp gera um ácido sulfênico (Cys-SpOH), com a liberação do álcool correspondente ao hidroperóxido reduzido, ou água no caso de peróxido de hidrogênio. O mecanismo de redução do ácido sulfênico nas diferentes subclasses de peroxirredoxinas é distinto. Nas subclasses que apresentam duas cisteínas conservadas um segundo resíduo chamado cisteína resolução (Cys-Sr), se condensa

com o ácido sulfênico para formar uma ligação dissulfeto (intermolecular ou intramolecular) com a Cys-Sp. Esse dissulfeto é reduzido pelo sistema tiorredoxina (RHEE *et al.*, 2001).

Em contraste, para 1-Cys Prx, o ácido sulfênico é diretamente reduzido por um agente redutor. Tiorredoxina, glutathiona e ascorbato têm sido propostos como possíveis redutores biológicos (RHEE; CHAE; KIM, 2005; NETTO *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2007).

Interessantemente, ascorbato é capaz de reduzir ácidos sulfênicos em 1-Cys Prx, mas não dissulfetos em 2-Cys Prx (MONTEIRO *et al.*, 2007). Isso demonstra que a ausência da Cys-Sr e a presença de uma histidina no sítio ativo de 1-Cys Prx são alguns dos fatores importantes para essa propriedade bioquímica (MONTEIRO *et al.*, 2007).

Segundo Haslekås *et al.* (2003), o nível de expressão de 1-Cys Prxs aumenta significativamente durante o desenvolvimento das sementes, sendo mantido durante o armazenamento, impedindo que as sementes germinem em condições adversas e que suportem estas condições quando estão germinando. Estudos relacionados a esta subclasse de peroxirredoxina em sementes são escassos.

### 2.5.1 Cys Peroxirredoxina

A primeira Prx caracterizada em plantas foi PER1, uma 1-Cys Prx específica de sementes que se localiza no núcleo das células do embrião e na camada de aleurona de sementes de cevada (STACY *et al.*, 1996; STACY *et al.*, 1999). Em plantas, as 1-Cys Prx são codificadas por genes de cópia única, até o momento o único caso conhecido com dois genes para esta enzima é do arroz, estando os genes arranjados *in tandem*. A divergência da sequência de aminoácidos de plantas com respeito ao resto de organismos se faz muito evidente na análise filogenética, formando dois grupos bem diferenciados (PULIDO *et al.*, 2009). Geralmente estas proteínas apresentam entre 216 a 220 aminoácidos, uma massa molecular de aproximadamente 24 kDa e um ponto isoelétrico ao redor de 6,0. Na região C-terminal encontram-se vários resíduos conservados, correspondentes a um sinal de localização nuclear (NLS) (BHATT; TRIPATHI, 2011).

O gene da 1-Cys Prx se expressa somente em sementes e pertence a uma família monogênica (STACY *et al.*, 1996; HASLEKÅS *et al.*, 1998). Verificou-se que sua expressão é regulada espacial e temporalmente. Os transcritos aumentam exclusivamente na camada de aleurona e nos embriões embebidos das sementes latentes, o qual sugere um papel para estas Prx no controle da latência das sementes, já que está demonstrado que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é capaz de romper o fenômeno da quiescência (STACY *et al.*, 1996). Para Sacco (1974), o termo latência, relativo

às sementes, equivale ao repouso seminal, devido a toda e qualquer causa. A latência compreende dois estados: o de quiescência, quando o repouso é devido a condições externas desfavoráveis à germinação, e o da dormência, quando é devido a fatores internos das sementes.

Sabe-se que, várias etapas do processo de germinação estão relacionadas com a formação de EROs. Como as 1-Cys Prxs apresentam atividade peroxidásica *in vitro*, existe a hipótese de que as Prx protegem os tecidos que sobrevivem após o processo de dessecação. Pelo fato de outros antioxidantes de sementes se encontrarem em diferentes partes da planta, a especificidade das 1-Cys-Prx nas sementes sugere que esta possui um papel chave neste tecido (HASLEKÅS *et al.*, 1998). Para investigar a função exata do gene da 1-Cys Prx, gerou-se plantas transgênicas de tabaco (LEE *et al.*, 2000) e de *Arabidopsis* (HASLEKÅS *et al.*, 2003) que superexpressavam 1 Cys-Prx de arroz e cevada, respectivamente, e também plantas de *Arabidopsis* com níveis reduzidos de 1-Cys Prx. A germinação das sementes de tabaco transgênicas foi similar às plantas controles, mas as linhagens transgênicas mostraram maior resistência frente ao estresse oxidativo, sugerindo que o papel essencial das 1-Cys Prx está na proteção aos oxidantes (LEE *et al.*, 2000).

Por outro lado, em plantas de *Arabidopsis* com níveis diminuídos de 1-Cys Prx não foram observadas diferenças em relação às plantas selvagens no desenvolvimento e germinação das sementes (HASLEKÅS *et al.*, 2003). Entretanto, nas linhagens de *Arabidopsis* que superexpressavam a 1-Cys Prx observou-se que as sementes germinavam mais lentamente em presença de agentes estressantes como NaCl, manitol ou metilviologeno do que as respectivas plantas selvagens, sugerindo que as 1-Cys-Prx desempenham um papel importante no processo de embebição de sementes durante o processo de germinação em condições desfavoráveis. Sendo assim, uma das técnicas utilizadas para avaliar a expressão de peroxirredoxinas como a 1-Cys-PRX é a de western blot.

A sensibilidade e especificidade da imuno detecção de proteínas pela técnica de western blot podem ser consideradas maiores do que a análise proteômica baseada em eletroforese de gel de poliacrilamida (NISHIZAWA; KOMATSU, 2011). Estes mesmos autores, estudando o comportamento de plântulas de soja sob estresse por inundação, utilizando um anticorpo específico para a 1-Cys PRX, observaram que foi possível detectar a expressão desta proteína. Nesta pesquisa, a expressão foi maior em hipocótilos, raízes e cotilédones de plântulas submetidas ao estresse, quando comparadas àquelas não submetidas ao estresse.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Local e materiais**

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório Central de Sementes da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. Foram utilizadas sementes de *Coffea arabica* L. da cultivar Catuaí Amarelo IAC 62, no estágio de maturação cereja, produzidas na Fazenda Bom Jardim, localizada em Bom Sucesso - MG. Após a colheita, os frutos foram descascados mecanicamente. As sementes foram degomadas naturalmente (sem produtos químicos) e, nesse processo, ficaram por 20 horas em tanque sem água. Após a degomagem as sementes foram pré-secadas à sombra, no terreiro, para a retirada da água superficial por período de 24 horas.

Após esse período as sementes foram secadas até atingirem diferentes teores de água.

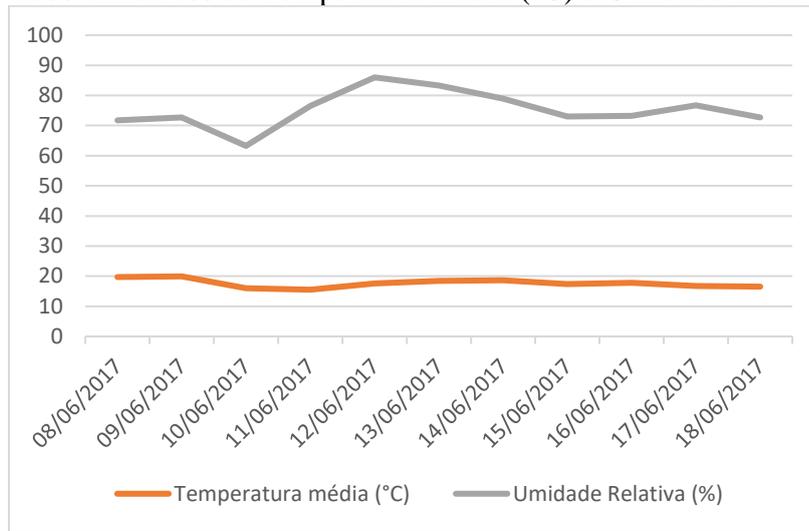
#### **3.2 Secagem das sementes**

As sementes foram distribuídas uniformemente no terreiro de cimento e revolvidas a cada uma hora. Posteriormente, as sementes foram enleiradas e cobertas com lona, para proteger do sereno.

A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,001 g. A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa, até que as sementes atingissem os teores de água de 40, 20 e 10%. O teor de água inicial das sementes era de 46%.

Os dados de temperatura média e umidade relativa do ar durante a secagem das sementes estão apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Dados climáticos de Temperatura média (°C) e Umidade Relativa do ar (%).



Fonte: Dados da Rede do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET, 2019).

### 3.3 Armazenamento das sementes

Após a secagem, as sementes foram acondicionadas em embalagens de rafia e colocadas em sacos de polietileno impermeáveis, com o objetivo de manter os teores de água das sementes durante o armazenamento. Estas foram armazenadas por seis meses em ambiente controlado de câmara fria ( $10\pm 2^{\circ}\text{C}$  e UR 70%).

A qualidade fisiológica das sementes e a expressão da proteína foram avaliadas aos 0, 60, 120 e 180 dias de armazenamento que correspondem as épocas 1, 2, 3 e 4, respectivamente.

### 3.4 Determinação do teor de água

A determinação do teor de água foi realizada pelo método de estufa a  $105^{\circ}\text{C}$ , durante 24 horas. Os resultados foram expressos em porcentagens com base no peso úmido das sementes, de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

### 3.5 Análise da qualidade fisiológica das sementes

Para avaliar a qualidade fisiológica das sementes, foram realizados os testes de germinação, primeira contagem de germinação, porcentagem de plântulas normais fortes, plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias, viabilidade pelo teste de tetrazólio, emergência de plântulas em bandeja e índice de velocidade de emergência de plântulas.

### **3.5.1 Teste de germinação**

Foi realizado com quatro repetições de 50 sementes sem o pergaminho, sendo conduzido conforme os critérios recomendados nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009). As sementes foram dispostas em folhas de papel Germitest, pelo sistema de rolos umedecidos com água destilada, em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco. Os rolos foram colocados em germinadores verticais à temperatura de 30 °C e a porcentagem de plântulas normais foi avaliada após 30 dias.

### **3.5.2 Primeira contagem da germinação**

No teste de germinação, foram contabilizadas as sementes com protrusão radicular aos 15 dias, segundo as prescrições da RAS (BRASIL, 2009).

### **3.5.3 Plântulas normais fortes – 30 dias**

No teste de germinação, foram também avaliadas as plântulas normais fortes, de acordo com o comprimento do eixo hipocótilo e sistema radicular. Foram consideradas como normais fortes as plântulas com eixo hipocótilo e sistema radicular com comprimento igual ou superior a três centímetros e os resultados foram expressos em porcentagem.

### **3.5.4 Plântulas com folhas cotiledonares expandidas – 45 dias**

Aos 45 dias do início do teste de germinação, foram computadas as plântulas que apresentaram as folhas cotiledonares totalmente expandidas, estágio orelha de onça, e os resultados foram expressos em porcentagem.

### **3.5.5 Teste de emergência**

Foi realizado com oito repetições de 25 sementes, com pergaminhos. As sementes foram distribuídas em bandejas plásticas contendo substrato areia e solo na proporção volumétrica de 2:1. Após a semeadura, as bandejas foram mantidas em sala de crescimento vegetal à 30 °C e fotoperíodo de 12 horas. As contagens de plântulas emersas foram realizadas a cada dois dias sendo consideradas como emersas as plântulas que apresentaram os cotilédones totalmente

expostos. A emergência de plântulas em bandeja também foi realizada, considerando a porcentagem de plântulas normais emersas aos sessenta dias, nas mesmas condições relatadas acima. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais emersas.

### 3.5.6 Índice de Velocidade de Emergência

Determinado segundo fórmula proposta por Maguire (1962), em que foi computado o número de plântulas diariamente.

$$IVE = (E1/N1 + E2/N2 + \dots + En/Nn) \quad (1)$$

Onde:

IVE: Índice de velocidade de emergência;

E1, E2 e En: número de plântulas emergidas determinado na primeira, na segunda... e na última contagem;

N1, N2 e Nn: número de dias da semeadura na primeira, na segunda... e na última contagem;

### 3.6 Análises estatísticas

Para a análise dos resultados das avaliações da qualidade fisiológica foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial [(3x4) + controle] sendo, três teores de água (40%, 20% e 10%), quatro épocas de armazenamento (início do armazenamento, 60, 120 e 180 dias) e o controle (Adicional) com 46% de teor de água. Utilizou-se o programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) para a análise dos dados de germinação e vigor, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Por meio do mesmo software, realizou-se o teste de Dunnett para a comparação da interação das médias entre cada tratamento com a média do tratamento controle a 5% de probabilidade.

### 3.7 Extração de proteínas totais

Foram utilizadas sementes de café submetidas a cada tratamento, maceradas em nitrogênio líquido e armazenadas em *deep freezer* à -85 °C. Para cada amostra foram trabalhadas três repetições biológicas. A extração da fração proteica foi efetuada, adicionando, a 100 mg do macerado de sementes de cada tratamento, 660µL do tampão de extração (Trizma HCl: 0,018M, Trizma base: 0,014M, Triton X-100: 0,2%, Thiouréia: 2M, CHAPS: 0,06M, DTT: 0,0175M,

Uréia: 45g), 1µL de inibidor de protease, 6 µL de DNase a 1mg/mL e 20 µL de RNase a 1mg/mL. A mistura foi homogeneizada em agitador do tipo vortex e armazenada por 15 minutos no gelo. Após a homogeneização, a amostra foi centrifugada por 10 min. a 14000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e outra centrifugação (10 min. a 14000 rpm a 4 °C) foi realizada. O sobrenadante foi alíquotado em novos tubos.

Da mesma forma, a extração de proteínas totais foi realizada para sementes de arroz da linhagem elite CMG 1509, oriunda do programa de melhoramento de terras altas da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Essa cultivar foi utilizada como controle positivo, visto que a proteína 1-Cys PRX já foi identificada em sementes dessa cultura, para posterior avaliação da atividade enzimática da peroxirredoxina (PRX) pela técnica de Western blot.

### **3.8 Determinação da concentração de proteínas totais**

Alíquotas foram retiradas dos extratos de cada tratamento e a determinação da concentração de proteínas foi realizada pelo método descrito por Bradford (1976), usando albumina bovina (BSA) como padrão. Utilizou-se um espectrofotômetro com leitura a 595 nm. Primeiramente foi realizada a calibração do aparelho utilizando BSA como padrão em diluições para construção de uma curva de calibração. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 3 min a 14000 rpm a 4 °C e foram pipetados 5 µL em cada lacuna da placa, adicionando-se 250 µL do reagente de Bradford e, em seguida, realizou-se a leitura no aparelho. Tanto para a curva de calibração como para a leitura das amostras foram utilizadas triplicatas técnicas. Por meio da equação gerada na calibração ( $R^2 = 0,99$ ) foi possível obter a concentração de proteínas totais em sementes de cada tratamento. Foi feita a correção do volume final para cada tratamento, de modo que todas as caneletas do gel recebessem a mesma quantidade de proteína independentemente do valor de proteína total extraída em cada tratamento.

Tabela 1 – Concentração de proteínas totais extraída de cada tratamento e o volume final em  $\mu\text{L}$  corrigido para todos os tratamentos utilizados nos géis para a detecção da peroxirredoxina (PRX) por meio da técnica de Western Blot. UFLA, Lavras, 2020.

Época	Teor de água	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Proteína total (75 $\mu\text{g}$ )	Vol. corrigido para 75 $\mu\text{g}$ (20% Laemmli)
	46%	5,565078	13,447	16,2
1	40%	3,924614	19,110	22,9
	20%	3,730541	20,104	24,1
	10%	6,268134	11,965	14,4
2	40%	4,671611	16,054	19,3
	20%	3,460792	21,671	26,0
	10%	4,818081	15,566	18,7
3	40%	3,143441	23,859	28,6
	20%	2,289032	32,765	39,3
	10%	4,710670	15,921	19,1
4	40%	4,237083	17,701	21,2
	20%	6,570839	11,414	13,7
	10%	7,410600	10,121	12,1
Arroz (Controle positivo)		3,6230	12,755	15,3

Fonte: Da autora (2020).

### 3.9 Estudo do padrão de expressão da proteína por Western-blot

A análise do padrão de expressão da proteína foi realizada por meio da técnica de Western blot, utilizando o anticorpo (anti-1-Cys-PRX), que reconhece a enzima 1-Cys-PRX.

Para a visualização do perfil proteico, as amostras foram submetidas ao processo de eletroforese em gel de poliacrilamida (12 %), na presença de SDS (LAEMMLI, 1970). O gel principal (gel de separação) foi montado em placas de vidro de 10 x 13,5 cm, misturando-se: 5,4 mL de água destilada; 6,4 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30 %; 4,0 mL de tampão Tris 1,5 M pH 8,8; 160µL de SDS 10 %; 160µL de persulfato de amônia 10 % e 16µL de TEMED. O gel concentrador foi preparado misturando-se: 3,6 mL de água destilada; 0,8 mL de uma solução de acrilamida/bis-acrilamida 30 %; 4,0 mL de tampão Tris 1,0 M pH 6,8; 60µL de SDS 10 %; 60µL de persulfato 10 % e 12µL de TEMED. O tampão de corrida foi: Tris 250 mM, glicina 192 mM, SDS 1,0 %, pH 8,3. A corrida eletroforética foi de, aproximadamente, 2 horas.

Após a eletroforese, o gel contendo a proteína foi submetido à transferência para membrana de nitrocelulose (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). A transferência ocorreu em sistema semi-seco usando-se tampão Tris 25 mM, glicina 200 mM, pH 8,0 contendo 20% de metanol (tampão de transferência). Foram usadas folhas de papel de filtro, recortadas nas dimensões do gel, umedecidas em tampão juntamente com o gel. A etapa que antecede a transferência, denominada 'sanduíche', foi montada da seguinte maneira: uma esponja, um pedaço de papel de filtro, seguidos do gel e da membrana de nitrocelulose, outro pedaço de papel de filtro e outra esponja umedecidos em tampão de transferência. O sistema foi fechado e a transferência se processou usando uma corrente de 120V durante aproximadamente 1 hora e 30 minutos.

Para certificar-se a transferência foi adicionado Ponceau a membrana. Em seguida esta foi lavada três vezes com TBST, contendo TBS 10x (100 mL) e Twenn – 20 (1 mL) para 1000 mL de solução. A membrana foi acondicionada por uma hora em tampão bloqueador (BSA 3%, 15 mL TBST; 0,45 g BSA), à temperatura ambiente. Após ser bloqueada, a membrana foi incubada com anticorpo anti-peroxirredoxin – SO3 (ab16830), em uma diluição de 1:2000 em tampão bloqueador, overnight, em baixa temperatura. Após esse tempo, a membrana foi lavada por três vezes com duração de cinco minutos cada, com tampão TBST e incubada com anticorpo Goat anti- Rabbit IgG (Biotium – 20402), em uma diluição de 1:10000 em tampão bloqueador por 1:30 horas. A membrana foi novamente lavada três vezes em tampão TBST com Tween 20.

A detecção foi feita utilizando o método de quimioluminescência do kit SuperSignal West Pico – Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific). O mesmo foi realizado com o anticorpo endógeno  $\beta$ -actina anti- Rabbit (Abcam – ab8227), em uma diluição de 1:5000 e foi feita novamente a detecção utilizando o método de quimioluminescência do kit SuperSignal West Pico – Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific).

A atividade enzimática da peroxirredoxina (PRX) foi determinada por meio do software ImageJ® (2018), no qual os filmes fotográficos obtidos por meio do método de quimioluminescência foram avaliados pela intensidade e mensuração das isoformas obtidas.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio dos resultados da primeira contagem da germinação, 15 dias após a semeadura, verificou-se menor vigor das sementes com 10% de teor de água antes de serem armazenadas (Época 1). Na época 1, foi observado maior vigor de sementes secadas até 40% de teor de água. Foi observado ainda que o valor de plântulas normais aos 15 dias na primeira época de armazenamento, Época 1 (90%), não se diferenciou estatisticamente do observado em sementes do tratamento controle, 83%. Para as demais épocas de armazenamento, não houve diferença significativa entre os tratamentos, considerando os resultados observados em sementes com 10%, 20% e 40% de teor de água (TABELA 2).

Quando comparadas as médias de plântulas normais observadas nos tratamentos com a média do tratamento controle, foi observado maior vigor em sementes armazenadas por 60 e 120 dias, Época 2 e Época 3, independentemente do teor de água das sementes e em sementes armazenadas por 180 dias (Época 4) com 20% de teor de água (TABELA 2).

Tabela 2 - Porcentagem média de plântulas normais de *Coffea arabica* L. (15 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água, armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Armazenamento	Primeira Contagem de Germinação (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	59cB $\chi$	75bB	90aA
Época 2	94aA $\chi$	93aA $\chi$	96aA $\chi$
Época 3	93aA $\chi$	94aA $\chi$	92aA $\chi$
Época 4	90aA	94aA $\chi$	87aA
Controle	83		
CV (%)	6,60		

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tuckey.  $\chi$  Médias diferem da testemunha controle, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2020).

Na Tabela 3, quando da avaliação de plântulas normais avaliadas aos 30 dias após a semeadura, observa-se a redução da germinação das sementes secadas à 10% de teor de água. Não houve diferença significativa entre as sementes secadas a 20% e 40% de teor de água.

Guimarães *et al.* (2002) observaram que a secagem influencia negativamente a germinação de sementes de café, sendo essa influência menos drástica quando a semente é secada até teores de água mais altos, evidenciando a intolerância à dessecação destas sementes.

Para essa variável, não houve diferença dos valores de plântulas normais entre os tratamentos nos quais as sementes foram secadas com diferentes teores de água e o observado em sementes submetidas ao tratamento controle (TABELA 3).

Tabela 3 - Porcentagem média de plântulas normais de *Coffea arabica* L. (30 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Teor de água (%)	Germinação (%)
10	78b
20	87a
40	90a
Controle (46%)	89
CV (%)	6,67

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora (2020).

Quando se compara os valores de germinação das sementes submetidas ao tratamento controle com os daquelas sementes secadas a 20% e 40% de teor de água, independentemente da época de armazenamento e com o observado em sementes com 10% de teor de água armazenadas por 60 dias, Época 2, não foi observada diferença estatística. No entanto, menores valores de germinação foram observados em sementes secadas a 10% de teor de água, no início do armazenamento e armazenadas por 120 (Época 2) e 180 dias (Época 3), quando comparados ao observado em sementes com 46% de teor de água (controle) (TABELA 4).

Tabela 4 - Porcentagem média de plântulas normais de *Coffea arabica* L. (30 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água, armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Armazenamento	Germinação (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	75 $\gamma$	86	93
Época 2	83	87	93
Época 3	77 $\gamma$	89	91
Época 4	76 $\gamma$	89	83
Controle (46%)			89
CV (%)			6,67

$\gamma$  Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2020).

Em relação às plântulas normais fortes, avaliadas aos 30 dias após a semeadura, foi observado maior vigor em sementes secadas à 20% de teor de água. Entre os valores de

porcentagens de plântulas normais fortes provenientes de sementes secadas a 10% e 40% de teor de água não houve diferenças estatísticas significativas (TABELA 5).

Santos, Von Pinho e Rosa (2013) observaram menor porcentagem de plântulas normais fortes provenientes de sementes degomadas por fermentação em água e secadas de forma lenta à sombra até atingirem baixos teores de água, incluindo sementes secadas a 20% de teor de água, diferente do que foi observado neste trabalho, quando as sementes que foram degomadas naturalmente, sem uso de água e secadas em terreiro a pleno sol. Ressalta-se que os processos utilizados para a degomagem e os métodos de secagem podem influenciar no vigor das sementes de café. Assim, os resultados dessas pesquisas tornam-se de difícil comparação. No entanto, isso reforça os diversos fatores que podem influenciar na qualidade final das sementes de café.

Para a variável porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, aos 45 dias após a semeadura, verifica-se menor vigor quando as sementes foram submetidas à secagem a 20% e 10% de teor de água (TABELA 5). Este resultado corrobora com o encontrado por Santos, Von Pinho e Rosa (2013), que observaram também a redução da porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas em função da secagem das sementes. Estes autores consideraram esta variável importante para a avaliação do vigor, pois sementes de café possuem cotilédones fotossintéticos que são responsáveis por acelerar o desenvolvimento das plântulas (FERREIRA; BORGUETTI, 2004; SANTOS; VON PINHO; ROSA, 2013).

Tabela 5 - Porcentagem média de plântulas normais fortes de *Coffea arabica* L. (30 dias após semeadura) e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (45 dias após a semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Teor de água (%)	Plântulas Normais Fortes (%)	Plântulas com Folhas Cotiledonares Expandidas (%)
10	34b	57b
20	55 <sup>a</sup>	64b
40	37b	73a
Controle (46%)	49	82
CV (%)	26,67	14,80

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora (2020).

Na Tabela 6, observa-se as porcentagens de plântulas normais fortes, 30 dias após a semeadura e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, 45 dias após a semeadura, em

função da época de armazenamento. Durante as primeiras épocas de armazenamento, 0, 60 e 120 dias não houve diferença estatística entre os valores de vigor. Porém, a porcentagem de plântulas normais fortes reduziu significativamente aos 180 dias de armazenamento. A porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas decresceu aos 120 e 180 dias de armazenamento, não diferenciando estatisticamente entre si.

Estes resultados corroboram com Coelho *et al.* (2015), os quais verificaram que com armazenamento, há redução das porcentagens de plântulas normais fortes e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, prejudicando o vigor de sementes de *Coffea arabica*.

Não houve diferença estatística significativa dos valores observados para essas variáveis respostas quando comparadas aos valores observados no tratamento controle, sementes com 46% de teor de água.

Tabela 6 - Porcentagem média de plântulas normais fortes (30 dias após a semeadura) e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (45 dias após a semeadura) de *Coffea arabica* L. em quatro épocas de armazenamento e proveniente de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Armazenamento	Plântulas Normais Fortes (%)	Plântulas com Folhas Cotiledonares Expandidas (%)
Época 1	53a	70a
Época 2	46a	71a
Época 3	43a	64ab
Época 4	26b	54b
Controle (46%)	49	82
CV(%)	26,67	14,80

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora (2020).

Na Tabela 7 é possível comparar as porcentagens de plantas normais fortes provenientes do tratamento controle com as dos demais tratamentos. Foi observado menor vigor em sementes armazenadas durante 180 dias (Época 4), independentemente do teor de água. Maior vigor foi verificado em sementes secadas a 20% de teor de água e não submetidas ao armazenamento (Época 1).

Tabela 7 - Porcentagem média de plântulas normais fortes de *Coffea arabica* L. (30 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água, armazenadas por diferentes períodos e armazenamento e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Armazenamento	Plântulas Normais Fortes (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	35	72 $\times$	52
Época 2	42	63	35
Época 3	35	56	39
Época 4	26 $\times$	30 $\times$	23 $\times$
Controle	49		
CV (%)	26,67		

$\times$  Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2020).

Os valores observados para a variável folhas cotiledonares expandidas, provenientes de sementes secadas a 10% de teor de água, independentemente do tempo de armazenamento, e as observadas em sementes com 20% de teor de água e armazenadas por 120 e 180 dias (Épocas 3 e 4) e as sementes com 40% do teor de água armazenadas por 180 dias (Época 4) foram estatisticamente inferiores em relação aos observados para as sementes submetidas ao tratamento controle (TABELA 8).

Por meio desta variável, observa-se que há redução do vigor quando as sementes de café são secadas principalmente a 10% de teor de água, mesmo quando não armazenadas, Época 1. Também, mesmo com os teores de água mais altos, 20% e 40% a partir dos 120 dias de armazenamento há redução do vigor, o que pode comprometer a formação de mudas (TABELA 8).

Tabela 8 - Porcentagem média de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de *Coffea arabica* L. (45 dias após semeadura) oriundas de sementes com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Armazenamento	Plântulas com Folhas Cotiledonares Expandidas (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	62 $\times$	68	81
Época 2	57 $\times$	71	86
Época 3	55 $\times$	64 $\times$	73
Época 4	56 $\times$	55 $\times$	52 $\times$
Controle	82		
CV (%)	14,80		

$\times$  Médias diferem da testemunha, no nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2020).

Pela Tabela 9, verificou-se que a emergência de plântulas decresce ao longo do armazenamento e o que o nível dessa redução varia com o teor de água das sementes quando armazenadas. Foi observado menor vigor em sementes armazenadas com 40% de teor de água aos 180 dias de armazenamento. Com exceção das sementes secadas a 10%, 20% e 40% e não armazenadas, Época 1, e das sementes secadas com 10% de teor de água e armazenadas por 60 dias, em sementes submetidas aos demais tratamentos, houve redução do percentual plântulas emergidas quando comparado com ao observado em sementes submetidas ao tratamento controle.

Resultados semelhantes foram encontrados por Vieira *et al.* (2007), os quais observaram que a porcentagem de emergência e o índice de velocidade de emergência decresce em função do armazenamento das sementes.

Tabela 9 - Porcentagem média de emergência de plântulas de *Coffea arabica* L. oriundas de sementes com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Armazenamento	Emergência (%)		
	10%	20%	40%
Época 1	61aA	69aA	84aA
Época 2	48aAB	44aAB $\gamma$	37aB $\gamma$
Época 3	24aB $\gamma$	27aB $\gamma$	14aBC $\gamma$
Época 4	34aAB $\gamma$	37aB $\gamma$	9bC $\gamma$
Controle	74		
CV (%)	6,49		

Médias seguidas da mesma letra minúscula nas linhas e maiúscula nas colunas não diferem entre si, no nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tuckey.  $\gamma$  Médias diferem da testemunha, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2020).

Em relação ao índice de velocidade de emergência de plântulas, é possível verificar que o vigor decresce ao longo do armazenamento, sendo possível observar um decréscimo mais acentuado em sementes armazenadas aos 120 e 180 dias (TABELA 10).

Tabela 10 - Porcentagem média de índice de velocidade de emergência de plântulas de *Coffea arabica* L. oriundas de sementes armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Armazenamento	Índice de Velocidade de Emergência
Época 1	0,39a
Época 2	0,24b
Época 3	0,11c
Época 4	0,13c
Controle (46%)	0,40
CV(%)	11,69

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si, no nível de 1% de probabilidade, pelo teste de Tukey.

Fonte: Da autora (2020).

Quando comparado o índice de velocidade de emergência (IVE) de plântulas proveniente de sementes submetidas ao tratamento controle com o observado em sementes provenientes dos demais tratamentos, observou-se um decréscimo em sementes com 40% de teor de água armazenadas por 60 dias (Época 2), por 120 dias (Época 3) e 180 dias (Época 4) e essas diferiram estatisticamente do tratamento controle com menores valores de IVE desses em relação ao IVE observado em sementes submetidas ao tratamento controle (TABELA 11).

Tabela 11 - Valores médios do índice de velocidade de emergência de plântulas de *Coffea arabica* L. oriundas de sementes com diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos e de sementes submetidas ao tratamento controle. UFLA, Lavras, 2020.

Armazenamento	Índice de Velocidade de Emergência		
	10%	20%	40%
Época 1	0,34	0,37	0,46
Época 2	0,27	0,26	0,20 $\gamma$
Época 3	0,12 $\gamma$	0,14 $\gamma$	0,07 $\gamma$
Época 4	0,17 $\gamma$	0,18 $\gamma$	0,04 $\gamma$
Controle	0,40		
CV (%)	11,69		

$\gamma$  Médias diferem da testemunha, em nível de 5% de probabilidade, pelo teste de Dunnett.

Fonte: Da autora (2020).

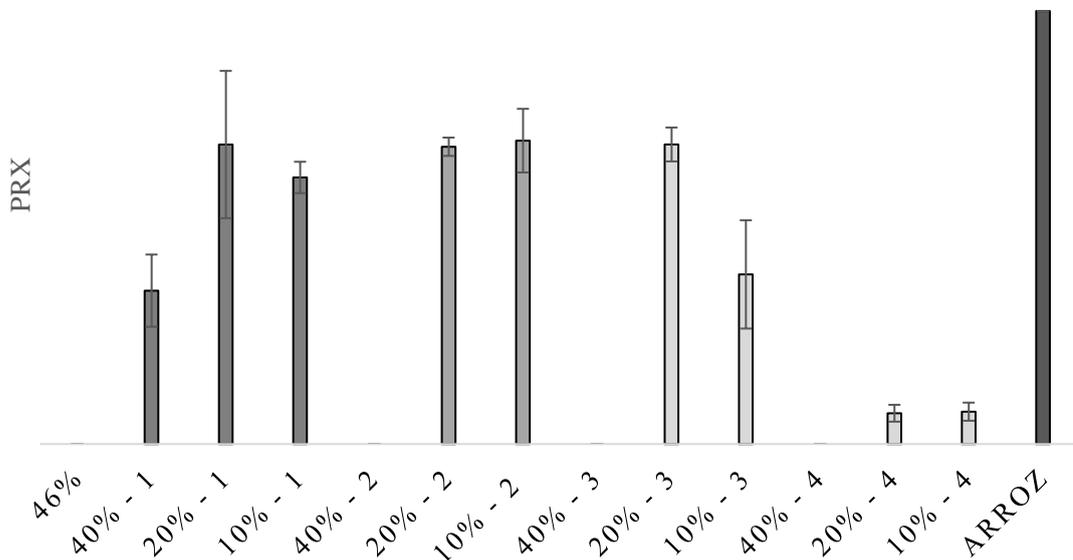
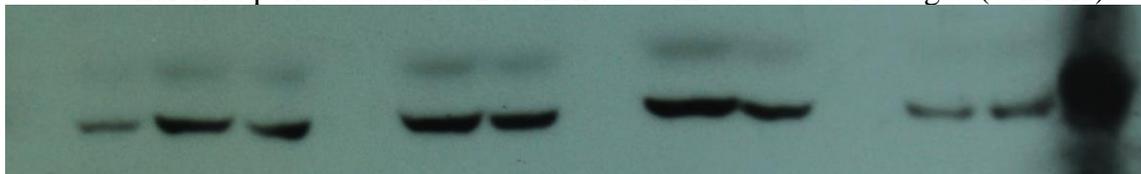
Em relação à enzima peroxirredoxina (PRX) em sementes não submetidas ao armazenamento (Época 1), foi observado maiores valores naquelas secadas à 20% de teor de água, os quais não diferenciaram estatisticamente das sementes secadas até 10% de teor de água. Menor expressão da enzima foi observada em sementes secadas à 40% de teor de água. Na época 2, sementes armazenadas por 60 dias, não houve diferença significativa da expressão desta enzima em sementes com 20% e 10% de teor de água. A partir dos 60 dias de armazenamento, não foi observada expressão dessa enzima em sementes armazenadas com

40% de teor de água (FIGURA 2).

Em sementes armazenadas por 120 dias, Época 3, a maior expressão foi observada em sementes com 20% de teor de água. Houve menor expressão da enzima em sementes secadas à 20% e 10% de teor de água, armazenadas por 180 dias (época 4), quando comparada à expressão observada nessas sementes no início do armazenamento, aos 60 e 120 dias de armazenamento. Não houve diferença estatística entre os valores da expressão da enzima em sementes com 10 e 20% de teor de água armazenadas por 180 dias (FIGURA 2).

É importante ressaltar que, no tratamento controle em que o teor de água das sementes era de 46% não houve expressão da enzima PRX (FIGURA 2).

Figura 2 – Atividade enzimática da peroxirredoxina (PRX) em sementes de *coffea arábica* submetidas à secagem com teores de água 40%, 20% e 10% armazenadas por diferentes períodos de armazenamento e com 46% de teor de água (controle).



Barras verticais representam o desvio padrão das médias.

Fonte: Da autora (2020).

Ao avaliar os resultados de expressão da enzima peroxirredoxina (PRX) observada em sementes de café secadas até diferentes teores de água e armazenadas por diferentes períodos, observa-se diferentes níveis de expressão em sementes submetidas aos diferentes tratamentos.

O fato de as sementes de *Coffea arabica* serem classificadas como intermediárias em relação à tolerância à dessecação, tem sido observado em algumas pesquisas alterações metabólicas, envolvendo provavelmente a intensificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando da secagem das sementes.

EROs estão envolvidas em vários aspectos da fisiologia de sementes. A sua produção pode ocorrer durante a dessecação, germinação e envelhecimento, podendo ocasionar estresse oxidativo e dano celular, resultando em deterioração (WANG *et al.*, 2012).

A eliminação das EROs é feita por meio de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (HORLIN; KÖNIG; DIETZ, 2002). As enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e glutathione peroxidase (GPX) fazem parte do sistema enzimático de defesa antioxidante em plantas (KAYIHAN *et al.*, 2012; BHATT; TRIPATHI, 2011). Essas enzimas constituem uma maquinaria eficiente na desintoxicação de  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ .

As enzimas SOD, CAT e PO estão associadas à remoção de produtos indesejados resultantes da peroxidação de lipídeos (TAVEIRA *et al.*, 2012). A Superóxido dismutase (SOD) é a primeira enzima a agir contra as EROs, essa transforma o superóxido ( $O_2^-$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). Logo após, a enzima Catalase (CAT) é responsável por neutralizar o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), um composto altamente tóxico para as sementes (APEL; HIRT, 2004; SANTOS *et al.*, 2014). A enzima catalase, tem como função converter o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), resultante da ação da enzima superóxido dismutase, em água ( $H_2O$ ) (APEL; HIRT, 2004).

Brandão Junior *et al.* (2002) verificaram atividade enzimática da catalase apenas em sementes submetidas à secagem e maior atividade foi observada em sementes em estágio de desenvolvimento mais avançado e com melhor potencial fisiológico. Porém, a fim de avaliar os perfis proteicos e o desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem, Taveira *et al.* (2012) avaliaram a atividade de várias enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, sendo que maior atividade da enzima catalase foi encontrada em sementes que apresentaram piores desempenhos fisiológicos. Essa maior atividade pode ser explicada pela necessidade de maior atuação dessas enzimas durante a evolução da deterioração de sementes.

Santos *et al.* (2014), observaram que a expressão da enzima catalase é menor em sementes não submetidas à secagem (controle), verificaram também aumento da expressão em sementes que foram submetidas à secagem.

Costa (2019), ao analisar a expressão da enzima catalase em sementes café, observou

menor expressão em sementes com 10% de teor de água e armazenadas por 60 e 120 dias, seguida das sementes que não foram submetidas à secagem (controle). Verificou também maior expressão em sementes submetidas a menor estresse por secagem, com 40% de teor de água, antes de serem armazenadas. Ao longo do armazenamento, notou-se um aumento da expressão da enzima quando há a redução do teor de água das sementes, indicando maior estresse por secagem.

Além das enzimas citadas as peroxirredoxinas (Prxs) constituem uma família de peroxidases baseadas em tiol, que catalisa a desintoxicação de peróxido de hidrogênio e outros peróxidos, com diferentes eficiências e em diferentes organismos (BHATT; TRIPATHI, 2011). Essas enzimas estão presentes em todos os organismos, localizadas no citosol, núcleo, mitocôndria e no cloroplasto (RHEE; CHAE; KIM, 2005; DIETZ *et al.* 2006). Essas proteínas são codificadas por vários genes, possuindo uma grande diversidade nas sequências de aminoácidos, mas com estrutura conservada. Prxs apresentam atividade peroxidásica centrada em um resíduo de cisteína, altamente reativo, denominado cisteína peroxidásica, capaz de reduzir, com alta eficiência, peróxidos de hidrogênio, peróxidos orgânicos ou peroxinitrito (RHEE; CHAE; KIM, 2005; TRUJILLO, 2007).

A primeira Prx caracterizada em plantas foi PER1, uma 1-Cys Prx específica de sementes que se localiza no núcleo das células do embrião e na camada de aleurona de sementes de cevada (STACY *et al.*, 1996; STACY *et al.*, 1999). Em plantas, as 1-Cys Prx são codificadas por genes de cópia única, até o momento o único caso conhecido com dois genes para esta enzima é do arroz, estando os genes arranjados em tandem (PULIDO *et al.*, 2009). Geralmente estas proteínas apresentam entre 216 a 220 aminoácidos, uma massa molecular de aproximadamente 24 kDa e um ponto isoelétrico ao redor de 6,0 (BHATT; TRIPATHI, 2011).

Por meio dos resultados de expressão da enzima PRX (FIGURA 2), observa-se que a secagem das sementes de café induziu a expressão da enzima PRX em níveis diferentes, dependendo do tratamento ao qual as sementes foram expostas. Em sementes que não foram expostas à secagem, com 46% de teor de água, não houve a expressão da enzima PRX. Também foi verificado que a partir da segunda época de armazenamento, 60 dias de armazenamento, não foi observada a expressão da enzima PRX, em sementes com 40% de teor de água.

No entanto, foi observada a expressão da enzima PRX em sementes com 20% e 10% de teor de água até o final do armazenamento, 180 dias.

Importante também ressaltar, que a expressão da enzima PRX em sementes secadas até 20% de teor de água, foi mais estável no início, aos 60 e 120 dias de armazenamento, quando

comparado às expressões em sementes submetidas aos demais tratamentos. Houve redução da expressão da enzima nestas sementes aos 180 dias de armazenamento.

Lee *et al.* (2000) sugeriram, ao trabalhar com linhagens de *Arabidopsis* que superexpressavam a enzima 1-Cys Prx, que a mesma desempenha um papel importante no processo de embebição das sementes sob condições desfavoráveis. Segundo Stacy *et al.*, 1996, Haslekas *et al.*, 1998, o gene da *1-Cys Prx* se expressa somente em sementes e pertence a uma família monogênica.

Nishizawa e Komatsu (2011) estudando o comportamento de plântulas de soja sob estresse por inundação, utilizando um anticorpo específico para a 1-Cys PRX, observaram maior expressão dessa em hipocótilos, raízes e cotilédones de plântulas submetidas ao estresse, quando comparadas àquelas não submetidas ao estresse.

A análise do perfil de enzimas diretamente relacionadas ao processo de deterioração e também aquelas relacionadas ao sistema antioxidante, juntamente com os dados da qualidade fisiológica, propiciam melhor entendimento dos mecanismos envolvidos nos processos de tolerância à dessecação em sementes (COELHO *et al.*, 2017). Sabe-se que vários mecanismos estão envolvidos na tolerância à dessecação.

Durante o processo de secagem, os solutos presentes nas células ficam mais concentrados, aumentando a taxa de reações químicas responsáveis pela degradação das células. Acontece também a cristalização de solutos, alterando o pH da solução intracelular e a desnaturação de proteínas juntamente com o rompimento de membranas (KOSTER, 1991).

Os resultados observados na presente pesquisa em relação à expressão da enzima PRX corroboram com os observados nas pesquisas citadas acima em que a expressão dessa enzima é maior sob condições de estresse. Verifica-se que em sementes com 10 e 20% de teor de água houve maior expressão da enzima PRX, diferente do que foi observado em sementes com 46% de teor de água (tratamento controle) e em sementes secadas com 40% de teor de água.

Sementes de *Coffea arabica* apesar de serem classificadas como intermediárias em relação à tolerância à dessecação, mostraram-se com baixa tolerância à dessecação quando as sementes foram secadas com 20% e 10% de teor de água. Essa baixa tolerância pode ser associada à maior expressão da enzima PRX, também observada nessa pesquisa.

Além da expressão da PRX é importante avaliar a qualidade fisiológica das sementes uma vez que as sementes serão utilizadas para a formação de mudas, as quais serão transplantadas para o campo em época mais propícia em relação às condições climáticas. Dos testes utilizados nessa pesquisa para a avaliação do vigor das sementes submetidas aos

diferentes tratamentos a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares, avaliada aos 45 dias parece se relacionar mais com os resultados observados de expressão da enzima PRX. Para essa variável maior vigor foi observado em sementes armazenadas com 40% de teor de água (TABELA 4). Para essa mesma variável, quando os valores de vigor das sementes armazenadas com 40% de teor de água foram comparados com os observados no tratamento controle, sementes com 46%, não houve diferença significativa até os 120 dias de armazenamento (TABELA 7).

Diante dos resultados descritos acima e a necessidade de apresentar para os produtores de sementes de *Coffea arabica* uma recomendação técnica mais segura, visando a utilização de sementes mais vigorosas para a formação de mudas, será proposto a secagem das sementes até 40% de teor de água e o armazenamento em embalagem impermeável em câmara fria à 10 °C. Importante ressaltar que geralmente há necessidade de armazenar sementes antes da semeadura para a formação de mudas.

A utilização da proteína peroxirredoxina (PRX), determinada pela técnica de western blot, devido a alta sensibilidade e especificidade, é um bom marcador para identificar a perda da qualidade de sementes de café, e estudos sobre a mesma, devem ser aprimorados, para melhor entendimento da fisiologia dessas sementes.

## 5 CONCLUSÕES

A qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* é influenciada pelo teor de água e período de armazenamento.

Pela técnica de Western Blot foi possível detectar maior expressão da proteína peroxirredoxina em sementes de café secadas até 20 e 10% de teor de água, principalmente nas épocas 1, 2 e 3.

Há redução do vigor das sementes quando são secadas, principalmente até 20 e 10% de teor de água.

## REFERÊNCIAS

- AALEN, R.B.; OPSAHL-FERSTAD, H.G.; LINNESTAD, C.; OLSEN, O.A. Transcripts encoding an oleosin and a dormancy-related protein are present in both the aleurone layer and the embryo of developing barley (*Hordeum vulgare* L.) seeds. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 5, p. 385–396, 1994.
- ALPERT, P. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life1. **Integrative and Comparative Biology**, [s.l.], v. 45, n. 5, p. 685-695, 2005.
- ALSCHER, R.G.; ERTURK, N.; HEATH, L.S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 53, p. 1331-1341, 2002.
- APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, [s.l.], v. 55, p. 373–399, 2004.
- ARAÚJO, R.F. *et al.* Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despulpado e não despulpado. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 71–78, 2008.
- BACCHI, O. Novos ensaios sobre a seca de sementes de café ao sol. **Bragantia**, Campinas, v.15, n. 8, p. 83-91, 1956.
- \_\_\_\_\_. Seca da semente de café ao sol. **Bragantia**, Campinas, v.14, n.22, p.225-236, 1955.
- BAIER, M.; DIETZ, K.J. The plant 2-Cys peroxiredoxin BAS1 is a nuclearencoded chloroplast protein: its expressional regulation, phylogenetic origin, and implications for its specific physiological function in plants. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 12, p.179–190,1997.
- \_\_\_\_\_. Alkyl hydroperoxide reductases: the way out of the oxidative breakdown of lipids in chloroplasts. **Trends in Plant Sciences**, [s.l.], v. 4, p. 166–168, 1999.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, [s.l.], v. 14, p. 93–107, 2004.
- BARTELS, D.; SINGH, M.; SALAMINE, F. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. **Planta**, Berlim, v. 175, n. 3, p. 485-492, 1988.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 16, p. 1–15, 2006.
- BHATT, I.; TRIPATHI, B.N. Plant peroxiredoxins: catalytic mechanisms, functional significance and future perspectives. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 29, p. 850-859, 2011.
- BOWLER, C. *et al.* Superoxide dismutase and Stress tolerance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 43, p. 83-11, 1992.

BRACCINI, A.L. *et al.* Conservação de sementes de café-robusta (*Coffea canéfora* Pierre ex Frochner) cultivar conillon em função do grau de umidade e do tipo de embalagem. **Revista Brasileira de Sementes**, [s.l.], v. 20, n. 2, p.160-169, 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO JÚNIOR, D.S. *et al.* Tolerância à dessecação de sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 24, n. 2, p. 17-23, mar./abr. 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Coordenação de Laboratório Vegetal, 2009.

BRAZ, M.R.S.; ROSSETTO, C.A.V. Condicionamento fisiológico na germinação e no vigor de sementes armazenadas de café. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 7, p. 1849–1856, 2008.

BRÉHÉLIN, C.; MEYER, E.H.; DE SOURIS, J.P.; BONNARD, G.; MEYER, Y. Resemblance and dissemblance of Arabidopsis type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 132, p. 2045–2057, 2003.

BREUSEGEM, F.V. *et al.* The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, [s.l.], v. 161, p. 405-414, 2001.

CARVALHO, C.A.M.; ALMEIDA, T.T.; GUIMARÃES, R.M. Plântulas de café originadas de sementes armazenadas e submetidas ao condicionamento fisiológico em matriz sólida. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**, Champaign, v. 2, n. 3, p. 166–169, 2014.

CHEONG, N.E. *et al.* Molecular cloning, expression, and functional characterization of a 2cys-peroxiredoxin in Chinese cabbage. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 40, p. 825–834, 1999.

CHOI, Y.K.; CHEONG, N.E.; LEE, K.O.; JUNG, B.G.; CHANG, H.H.; JEONG, J.H.; CHI, Y.H.; KIM, K.; CHO, M.J.; LEE, S.Y. Cloning and expression of a new isotype of the peroxiredoxin gene of Chinese cabbage and its comparison to 2cys-peroxiredoxin isolated from the some plants. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, [s.l.], v. 258, p. 768-771, 1999.

CLEMENTE, A.C.S.; CARVALHO, M.L. .; GUIMARÃES, R.M. Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para sementes de café recém colhidas e armazenadas. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 4, p. 415–423, 2012.

COELHO, S.V.B. *et al.* Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483–491, 2015.

COELHO, S.V.B. *et al.* Tolerance of coffee arabica L. seeds to sub zero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 41, n. 3, p. 312–321, 2017.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira**. Brasília, 2017.

\_\_\_\_\_. **Acompanhamento da safra brasileira**. Brasília, 2019.

CORBINEAU, F. Markers of seed quality: from present to future. **Seed Science Research**. [s.l.], v. 22, p. S61–S68, 2012.

CORRÊA, P.C. *et al.* Efeito da temperatura de secagem na cor dos grãos de café préprocessado por "via seca" e "via úmida". **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, n. 5, p. 22-27, 2002. (Especial Café).

COSTA, M.C. **Estudos fisiológicos e proteômicos relacionados à dessecação de sementes de café durante o armazenamento**. 2019. 47 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.

DEKKERS, B.J.; COSTA, M.C.D.; MAIA, J.; BENTSINK, L.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H.W. Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. **Planta**, [s.l.], v. 241, n. 3, p. 563-577, 2015.

DELOUCHE, J.C. Germinação, deterioração e vigor da semente. **Seed News**, v. 6, n. 6, p. 24-31, 2002.

DIETZ, K.J. Plant peroxiredoxins. **Annual Review of Plant Biology**, [s.l.], v. 54, p. 93–107, 2003.

DIETZ, K.J.; HORLING, F.; KÖNIG, J.; BAIER, M. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. **Journal Experimental Botany**, [s.l.], v. 53, p. 1321-1329, 2002.

DIETZ, K.J.; JACOB, S.; OELZE, M.L.; LAXA, M.; TOGNETTI, V.; MIRANDA, S.M.N.; BAIER, M.; FINKEMEIER. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 57, n. 8, p. 1697- 1709, 2003.

\_\_\_\_\_. The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 57, p. 1697–1709, 2006.

DIPLOCK, A.T.; CHARULEUX, J.L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F.J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; VINA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. **British Journal of Nutrition**, [s.l.], v. 80, n. 1, p. 77-112, 1998.

DUSSERT, S. *et al.* Coffee seed conservation biology: fundamental aspects and practical implications. A review. **Cahiers Agricultures**, London, v. 21, n. 2/3, p. 106–114, 2012.

DUSSERT, S. *et al.* Integrative analysis of the late maturation programme and desiccation tolerance mechanisms in intermediate coffee seeds. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 69, n. 7, p. 1583–1597, 2018.

ELLIS, R.H.; HONG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behavior? I. COFFEE. **Journal of Experimental Botany**, [s.l.], v. 41, n. 238, p. 1167–1174, 1990.

FAGAN, E.B.; HENRIQUE, C.; SOUZA, E. Efeito do tempo de formação do grão de café (*Coffea* sp) na qualidade da bebida. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, n. 5, p. 729–738, 2011.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, [s.l.], v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FERREIRA, A.G.; BORGUETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FINKEMEIER, I.; GOODMAN, M.; LAMKEMEYER, P.; KANDBINDER, A.; SWEETLOVE, L.J.; DIETZ, K.J. The mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 280, p. 12168–12180, 2005.

GARCIA, D.C. *et al.* A secagem de sementes. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 2, apr. 2004.

GENTIL, D.F.O. **Conservação de sementes de *Coffea arabica* L.: interferências do grau de umidade e da temperatura**. 1999. 41 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, 1999.

GOMES-JUNIOR, R.A.; MOLDES, C.A.; DELITE, F.S.; GRATÃO, P.L.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s.l.], v. 44, n. 5, p. 420-429, 2006.

GONZÁLEZ-MORALES, S.I. *et al.* Regulatory network analysis reveals novel regulators of seed desiccation tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 113, n. 35, p. E5232-E5241, 2016.

GOYER, A.; HASLEKÅS, C.; MIGINIAC-MASLOW, M.; KLEIN, U.; LE MARECHAL, P.; JACQUOT, J. P.; DECOTTIGNIES, P. Isolation and characterization of a thioredoxin-dependent peroxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. **European Journal of Biochemistry**, [s.l.], v. 269, n.1, p. 272-282, 2002.

GUIMARÃES, R.M. *et al.* Tolerância à dessecação em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 1, p. 128–139, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radical in Biology and Medicine**. 2. ed. Oxford: University Press, 1989. 543 p.

HASLEKÅS, C.; STACY, R. A.; NYGAARD, V.; CULIÁÑEZ-MACIÀ, F.A.; AALEN, R. B. The expression of a peroxiredoxin antioxidant gene, AtPer1, in *Arabidopsis thaliana* is seed-specific and related to dormancy. **Plant molecular biology**, [s.l.], v. 36, n. 6, p. 833-845, 1998.

HASLEKÅS, C.; VIKEN, M.K.; GRINI, P.E.; NYGAARD, V.; NORDGARD, S.H.; MEZA, T.J.; AALEN, R.B. Seed 1-cysteine peroxiredoxin antioxidants are not involved in dormancy, but contribute to inhibition of germination during stress. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 133, n. 3, p. 1148-1157, 2003.

HENDRY, G.A.; FINCH-SAVAGE, W.E.; THORPE, P.C.; ATHERTON, N.M.; BUCKLAND, S.M.; NILSSON, K.A.; SEEL, W.E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, [s.l.], v. 122, n. 2, p. 273-279, 1992.

HOFMANN, B.; HECHT, H.J.; FLOHE, L. Peroxiredoxins. **Biological Chemistry**, [s.l.], v. 383, p. 347–364, 2002.

HONG, T.D.; ELLIS, R.H. Optimum air-dry seed storage environments for Arabica coffee. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 20, p. 547-560, 1992.

HORLING, F.; KÖNIG, J.; DIETZ, K.J. Type II peroxiredoxin C, a member of the peroxiredoxin family of *Arabidopsis thaliana*: its expression and activity in comparison with other peroxiredoxins. **Plant Physiology Biochemistry**, [s.l.], v. 40, p. 491–499, 2002.

ImageJ®. Image Processing and Analysis in Java. [s.l.], 2018. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/>. Acesso em: 05 jan. 2020.

INMET. Instituto Nacional de Meteorologia. **BDMEP-Banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa**. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>. Acesso em: 02 out. 2019.

KANG, S.W.; BAINES, I.C.; RHEE, S.G. Characterization of a mammalian peroxiredoxin that contains one conserved cysteine. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 273, n. 11, p. 6303-6311, 1998.

KAYIHAN, C.; EYIDOGAN, F.; AFSAR, N.; OKTEM, H.A.; YUCEL, M. Cu/Zn superoxide dismutase activity and respective gene expression during cold acclimation and freezing stress in barley cultivars. **Biologia Plantarum**, [s.l.], v. 56, n. 4, p. 693-698, 2012.

KIKUTI, A.L.P. *et al.* Application of antioxidant on coffee seeds (*Coffea arabica* L.) aiming at quality preservation. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 663–672, 2002.

KONG, W.; SHIOTA, S.; SHI, Y.; NAKAYAMA, H.; NAKAYAMA, K. A novel peroxiredoxin of the plant *Sedum lineare* is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 351, p. 107–114, 2000.

KONIG, J. *et al.* The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox hierarchy of photosynthetic electron flux. **Proc Natl Acad Sci.**, [s.l.], v. 99, p. 5738–43, 2002.

KÖNIG, J.; LOTTE, K.; PLESSOW, R.; BROCKHINKE, A.; BAIER, M.; DIETZ, K.J. Reaction mechanism of plant 2-cys-peroxiredoxin. **The Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, p. 24409-24420, 2003.

KOSTER, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 96, n. 1, p. 302–304, 1991.

KRUFT, V.; EUBEL, H.; JANSCH, L.; WERHAHN, W.; BRAUN, H.P. Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 127, p. 1694–1710, 2001.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, [s.l.], v. 227, p. 680-685, 1970.

LANG, S. *et al.* Functional characterization of BnHSFA4a as a heat shock transcription factor in controlling the re-establishment of desiccation tolerance in seeds. **Journal of experimental botany**, [s.l.], v. 68, n. 9, p. 2361-2375, 2017.

LEE, K.O.; JANG, H.H.; JUNG, B.G.; CHI, Y.H.; LEE, J.Y.; CHOI, Y O.; LEE, S.Y. Rice 1Cys-peroxiredoxin over-expressed in transgenic tobacco does not maintain dormancy but enhances antioxidant activity. **FEBS letters**, [s.l.], v. 486, n. 2, p. 103-106, 2000.

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

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

MIGLIORANZA, E. **Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuai) com diferentes teores de umidade, armazenadas em embalagens hermeticamente fechadas.** 1982. 60 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 1982.

MILLER, G.A.D.; SUZUKI, N.; CIFTCI-YILMAZ, S.U.L.T.A.N.; MITTLER, R.O.N. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. **Plant, cell & environment**, [s.l.], v. 33, n. 4, p. 453-467, 2010.

MIRANDA, J.M. **Estudo de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuai).** 1987. 60 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1987.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, [s.l.], v. 9, p. 405-410, 2002.

- MITTLER, R.; KIM, Y.; SONG, L.; COUTU, J.; COUTU, A.; CIFTCI-YILMAZ, S.; LEE H.; STEVENSON, B.; ZHU, J.K. Gain and loss of function mutations in Zat10 enhance the tolerance of plants to abiotic stress. **FEBS Letters**, [s.l.], v. 580, p. 6537– 6542, 2006.
- MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, [s.l.], v. 9, p. 490– 498, 2004.
- MONTEIRO, G.; HORTA, B. B.; PIMENTA, D.C.; AUGUSTO, O.; NETTO, L.E. Reduction of 1-Cys peroxiredoxins by ascorbate changes the thiol-specific antioxidant paradigm, revealing another function of vitamin C. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 104, n.12, p. 4886-4891, 2007.
- MOWLA, S.B.; THOMSON, J.A.; FARRANT, J.M.; MUNDREE, S.G. A novel stressinducible antioxidant enzyme identified from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker. **Planta**, [s.l.], v. 215, p. 716–726, 2002.
- NAVROT, N.; COLLIN, V.; GUALBERTO, J.; GELHAYE, E.; HIRASAWA, M.; REY, P.; ROUHIER, N. Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 142, n. 4, p. 1364-1379, 2006.
- NETTO, L.E.S.; OLIVEIRA, M.A. de; MONTEIRO, G.; DEMASI, A.P.D.; CUSSIOL, J.R. R.; DISCOLA, K.F.; HORTA, B.B. Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, [s.l.], v. 146, n.1, p. 180-193, 2007.
- NISHIZAWA, K; KOMATSU, S. Characteristics of soybean 1-Cys peroxiredoxin and its behavior in seedlings under flooding stress. **Plant Biotechnol**, [s.l.], v. 28, p. 83–8, 2011.
- PEREIRA, W.V.S. *et al.* Is the loss of desiccation tolerance in orthodox seeds affected by provenance?. **South African Journal of Botany**, [s.l.], v. 112, p. 296-302, 2017.
- PUKACKA, S. The effect of desiccation on viability and phospholipid composition of *Acer sacharinum* L. seeds. **Trees**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 144-148, 1989.
- PULIDO, P.; CAZALIS, R.; CEJUDO, F.J. An antioxidant redox system in the nucleus of wheat seed cells suffering oxidative stress. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 57, p.132-145, 2009.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011.
- REINATO, C.H.R. **Secagem e armazenamento do café: aspectos qualitativos e sanitários** 2006. 111 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2006.
- RHEE, S.G.; KANG, S.W.; CHANG, T.S.; JEONG, W.; KIM, K. Peroxiredoxin, a Novel Family of Peroxidases. **IUBMB Life**, [s.l.], v. 52, p. 35–41, 2001.

RHEE, S.G.; CHAE, H.Z.; KIM, K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 38, p. 1543-1552, 2005.

ROBERTS, E.H. Predicting the storage of life seeds. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, n. 3, p. 499 – 514, 1973.

RODRIGUEZ-MILLA, M.A.; MAURER, A.; RODRIGUEZ-HUETE, A.; GUSTAFSON, J. P. Glutathione peroxidase genes in Arabidopsis are ubiquitous and regulated by abiotic stresses through diverse signaling pathways. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 36, p. 602–615, 2003.

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

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; JACQUOT, J.P. Glutaredoxin-dependent peroxiredoxin from poplar protein-protein interaction and catalytic mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 277, n. 16, p. 13609-13614, 2002.

ROUHIER, N.; GELHAYE, E.; SAUTIÉRE, P.E.; BRUN, A.; LAURENT, P.; TAGU, D.; DE FAY, E.; MEYER, Y.; JACQUOT, J. P. Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 127, p. 1299–1309, 2001.

ROUHIER, N.; JACQUOT, J.P. The plant multigenic family of thiol peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine**, [s.l.], v. 38, p. 1413–1421, 2005.

SACCO, J.C. **Conceituação e terminologia relacionada à dormência de sementes**. Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 1974. 20 p.

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

SANTOS, G.C.; VON PINHO, E.V.R.; ROSA, S.D.V.F. Gene expression of coffee seed oxidation and germination processes during drying. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 4, p. 6968–6982, 2013.

SAHA, J.; BRAUER, E.K.; SENGUPTA, A.; POPESCU, S.C.; GUPTA, K.; GUPTA, B. Polyamines as redox homeostasis regulators during salt stress in plants. **Frontiers in Environmental Science**, Lausanne, v. 3, p. 21, 2015.

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

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 215, n. 2, p. 213-219, 1993.

SILVA, W.R.; DIAS, M.C.L.L. Interferência do teor de umidade das sementes de café na manutenção de sua qualidade fisiológica. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 5, p. 551-560, 1985.

STACY, R.A.; NORDENG, T.W.; CULIANEZ-MACIA, F.A.; AALEN, R.B. The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 19, p. 1–8, 1999.

STACY, R.A.; MUNTHE, E.; STEINUM, T.; SHARMA, B.; AALEN, R.B. A peroxiredoxin antioxidant is encoded by a dormancy related gene, Per1, expressed during late development in the aleurone and embryo of barley grains. **Plant Molecular Biology**, [s.l.], v. 31, p. 1205–1216, 1996.

TAVEIRA, J.H. *et al.* Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesq. Agropec. Bras.**, [s.l.] v. 47, n. 10, p. 1511-1517, 2012.

THOMAS, J.A. Estresse oxidativo e defesa contra antioxidantes. *In*: SHILS, M.E.; OLSON, J.A.; SHIKE, M.; ROSS, A.C. **Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença**. 9. ed. São Paulo: Manole, 2003. p. 801-812.

TOGNOLLI, M.; PENEL, C.; GREPPIN, H.; SIMON, P. Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in Arabidopsis thaliana. **Gene**, [s.l.], v. 288, p. 129–138, 2002.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TRUJILLO, M. Kinetics of peroxiredoxins and their role in the decomposition of peroxynitrite. **Subcell Biochem**, [s.l.], v. 44, p. 83–113, 2007.

VANDENABEELE, J.D.S. *et al.* Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, Brasil, v. 57, n. 5, p. 779-795, jan. 2000.

VANDENABEELE, S.; VANDERAUWERA S.; VUYLSTEKE, M.; ROMBAUTS, S.; LANGEBARTELS, C.; SEIDLITZ, H.K.; ZABEAU, M.; VAN MONTAGU, M.; INZE, D.E.; VAN BREUSEGEM, F. Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in Arabidopsis thaliana. **The Plant Journal**, [s.l.], v. 39, p. 45–58, 2004.

VASCONCELOS, L.M.; GROTH, D.; RAZERA, L. F. Efeito de processos de secagem, diferentes graus de umidade e tipos de embalagens na conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí Vermelho). **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 14, n. 2, p.181-188,1992.

VERDIER, J. *et al.* A regulatory network-based approach dissects late maturation processes related to the acquisition of desiccation tolerance and longevity of *Medicago truncatula* seeds. **Plant Physiology**, [s.l.], p. 113.222380, 2013.

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

VOSSSEN, H.A.M. Methods of preserving the viability of coffee seed in storage. **Seed Science & Technology**, Zürich, v. 7, p. 65-74, 1979.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, Cambridge, v. 11, p. 135-148, 2001.

WANG, N.; HUA, H.; ENEJI, A. E.; LI, Z.; DUAN, L.; TIAN, X. Genotypic variations in photosynthetic and physiological adjustment to potassium deficiency in cotton (*Gossypium hirsutum*). **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Lausanne, v. 110, n. 2, p. 1–8, 2012.