

QUALIDADE FISIOLÓGICA E ATIVIDADE DA ENZIMA POLIFENOLOXIDASE EM SEMENTES DE *Coffea arabica* L. SUBMETIDAS A SECAGEM, PRÉ-RESFRIAMENTO E REAQUECIMENTO¹.

Ana Cristina de Souza², Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa³, Nathália Aparecida Bragança Fávaris⁴, Tatiana Botelho Fantazzini⁵, Diego de Souza Pereira⁶, Stefânia Vilas Boas Coelho⁷, Ana Luiza de Oliveira Vilela⁸

¹Trabalho financiado pelo Consórcio Pesquisa Café, Embrapa Café e INCT Café.

²DSc, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, acstina@yahoo.com.br

³Pesquisadora, Embrapa Café, Brasília-DF, sttela.rosa@embrapa.br

⁴Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras – MG, nath-braganca@hotmail.com

⁵Pesquisadora, Dra, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, tatiana_botelho@hotmail.com

⁶Pesquisador, DSc, Barenbrug do Brasil Sementes Ltda, Guaira, SP, diegobizi@gmail.com

⁷Pesquisadora, Dra., Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, stefaniavbc@gmail.com

⁸Doutoranda, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, anavilela_bio@hotmail.com

RESUMO: A criopreservação é uma alternativa para conservar a diversidade genética de espécies sensíveis à dessecação e ao armazenamento, como é o caso de *Coffea arabica* L., considerada uma espécie com característica intermediária. Entretanto, a metodologia para criopreservação dessa espécie ainda não está completamente elucidada, necessitando de mais estudos relacionados ao tema. Logo, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade fisiológica e a atividade da enzima polifenoloxidase (PPO) relacionados aos efeitos da desidratação, pré-resfriamento e reaquecimento de sementes de *Coffea arabica* L. Frutos maduros cultivar Catuaí amarelo IAC 62, foram colhidos e após o processamento, as sementes foram submetidas à determinação do teor de água. As sementes foram submetidas a duas velocidades de secagem: rápida em sílica gel e lenta em solução salina saturada, até os teores de água de 20% e 17% bu, pré-resfriadas em biocongelador. Posteriormente foi realizado o reaquecimento em temperatura ambiente 25 °C e em banho-maria a 40 °C, durante 2 minutos. A qualidade fisiológica foi avaliada pelo teste de germinação. A expressão da isoenzima PPO foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida. A quantificação da atividade da PPO foi determinada conforme metodologia descrita por Kar e Mishra (1976). A enzima polifenoloxidase apresenta menor expressão eletroforética em sementes de *Coffea arabica* L. reaquecidas em temperatura de 25 °C do que em banho-maria a 40 °C, após pré-resfriamento, em taxa de 1°C min⁻¹ até -40 °C. Atividade da polifenoloxidase é superior em sementes secadas em solução salina saturada de sulfato de amônio, pré-resfriada e reaquecidas em banho-maria a 40 °C. Entre as sementes secadas a 17% em sílica gel e pré-resfriadas, aquelas reaquecidas em banho-maria a 40 °C apresentam maior atividade da polifenoloxidase.

PALAVRAS-CHAVE: Catuaí Amarelo IAC 62, Eletroforese, Quantificação enzimática.

PHYSIOLOGICAL EVALUATION AND ACTIVITY OF POLYPHENOLOXIDASE ENZYME IN *Coffea arabica* L. SEEDS SUBMITTED TO DRYING, PRE-COOLING AND REHEATING.

ABSTRACT: Cryopreservation is an alternative for conserving the genetic diversity of species sensitive to desiccation and storage, such as *Coffea arabica* L., considered a species with intermediate characteristics. However, the methodology for cryopreservation of this species is not yet fully elucidated, requiring further studies related to the subject. Thus, the objective of this study was to evaluate the physiological quality and activity of the polyphenoloxidase enzyme (PPO) related to the effects of dehydration, pre-cooling and reheating of *Coffea arabica* L. seeds. Mature fruits cultivar Catuaí amarelo IAC 62 were harvested and after processing, as seeds were subjected to determination of water content. The seeds were subjected to two doses of water: fast and slow in saturated saline solution, until the water contents of 20% and 17% bu, pre-cooled in a freezer. Temperature and temperature of 25°C and in a water bath at 40°C for 2 minutes. Physiological quality was evaluated by germination test. The expression of the PPO isoenzyme was evaluated by polyacrylamide gel electrophoresis. The quantification of PPO activity was determined according to the methodology described by Kar and Mishra (1976). Polyphenoloxidase enzyme shows lower electrophoretic expression in *Coffea arabica* L. seeds reheated at 25 °C than in a water bath at 40 °C, after pre-cooling, at a rate of 1 °C min⁻¹ to -40 °C. Polyphenoloxidase activity is superior in seeds dried in saturated ammonium sulfate saline, pre-cooled and reheated in a water bath at 40 °C. Among the seeds dried at 17% in silica gel and pre-cooled, those reheated in a water bath at 40 °C presented higher activity of polyphenoloxidase.

KEY WORDS: Catuaí Amarelo IAC 62, Electrophoresis, Enzyme Quantification

INTRODUÇÃO

Devido a sua grande importância econômica da espécie, a conservação da diversidade genética de espécies de café torna-se fundamental para programas de melhoramento. Para o gênero *Coffea* a implantação de bancos de sementes é improvável, visto que as sementes apesar de tolerarem níveis significativos de desidratação, são sensíveis ao frio, sendo classificadas como sementes intermediárias (DUSSERT et al., 1997). A criopreservação é uma das alternativas para a conservação de diversas espécies, tendo como vantagens a segurança e a possibilidade de armazenamento por longos períodos. Pesquisas estão sendo desenvolvidas com objetivo de identificar os processos biológicos envolvidos durante o armazenamento do material e, posteriormente, a retomada do seu crescimento (CHEN et al., 2011). A sílica gel é o dessecante mais utilizado para secagem de pequenas amostras de sementes mantidas em recipientes selados (PROBERT; HAY, 2000). Para a secagem de sementes a menores velocidades, soluções salinas saturadas têm sido utilizadas e segundo Hay et al. (2008), essas soluções mantêm a umidade relativa constante na atmosfera ao seu redor. A desidratação induzida pelo resfriamento extracelular acontece em protocolos de criopreservação baseados no resfriamento lento. Este processo envolve um resfriamento lento até uma temperatura previamente definida (temperatura de pré-resfriamento, por volta de -40 °C a uma velocidade de resfriamento controlada 1 a 10 °C/hora) usando um congelador programável (SANTOS, 2001). O reaquecimento em temperatura ambiente não é o procedimento clássico de criopreservação, porém, tem sido realizado com sucesso (SILVA, et al., 2014). Avaliações bioquímicas são de grande importância para esclarecer os efeitos dos danos celulares causados por estresses, como a manutenção das sementes a baixas temperaturas e, é fundamental estudar os mecanismos de defesa capazes de reverter ou minimizar os efeitos prejudiciais dos diferentes estresses aplicados durante o processo de dessecação e resfriamento. As polifenoloxidasas (PPO) fazem parte de um grande grupo de enzimas conhecidas como oxidorredutases, que oxidam fenóis a o-quinonas na presença de oxigênio molecular. É apontada como uma das enzimas importantes contra danos nos tecidos causados por danos mecânicos (LORENZETTI et al., 2018). Assim, objetivou-se com este trabalho avaliar a qualidade fisiológica e a atividade de enzima polifenoloxidade (PPO) relacionados com os efeitos das etapas da criopreservação, ou seja, a desidratação, pré-resfriamento e reaquecimento de sementes de *Coffea arabica* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Frutos em estágio de maturidade fisiológica cereja da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí amarelo IAC 62, foram colhidos seletivamente em lavoura da Fazenda Experimental da Fundação Procafé, em Varginha (MG) e mecanicamente despulpados, sendo as sementes desmuciladas por fermentação em água, durante 24 horas. Posteriormente, as sementes foram secadas superficialmente à sombra, em camada única sobre telado.

Os protocolos investigados combinaram diferentes teores de água (20 e 17% bu), diferentes métodos de secagem: rápida em sílica gel e secagem lenta em solução salina saturada de sulfato de amônio, etapa de pré-resfriamento em biocongelador e reaquecimento das sementes em temperatura ambiente 25 °C ou em banho-maria 40 °C.

As sementes secadas em sílica gel foram acondicionadas em embalagens de papel alumínio e aquelas secadas em solução salina saturada em criotubos e pré-resfriadas em biocongelador *Icecube*, modelo 14S-B, *software* SY-LAB, Minitub do Brasil®, a uma velocidade de -1°C min.⁻¹ até temperaturas de -40°C ou -50 °C.

Após pré-resfriamento as sementes foram reaquecidas em banho-maria a 40°C por 2 minutos e em bancada de laboratório em temperatura de 25°C, conforme descrito na Tabela 1. As sementes foram submetidas as análises fisiológicas pelo teste de germinação e bioquímicas pela análise de eletroforese de isoenzimas, além de quantificação da enzima antioxidante PPO.

Tabela 1 - Métodos de secagem, pré-resfriamento e reaquecimento em sementes de *Coffea arabica* L.

Secagem	Pré-Resfriamento	Reaquecimento
Solução saturada (NH ₄) ₂ SO ₄ 17% bu	1°C min. ⁻¹ até -50°C	Ambiente 25°C
Sílica gel 17% bu	1°C min. ⁻¹ até -40°C	Ambiente 25°C
Sílica gel 20% bu	1°C min. ⁻¹ até -40°C	Ambiente 25°C
Sílica gel 20% bu	1°C min. ⁻¹ até -40°C	Banho-maria 40°C/2 min
Sílica gel 17% bu	1°C min. ⁻¹ até -40°C	Banho-maria 40°C/2 min
Solução saturada (NH ₄) ₂ SO ₄ 17% bu	1°C min. ⁻¹ até -50°C	Banho-maria 40°C/2 min

Avaliação fisiológica foi realizada com oito repetições de 25 sementes para a avaliação dos efeitos do reaquecimento. As sementes foram semeadas em rolos de papel de germinação umedecidos com água destilada e acondicionadas em germinador, regulado a 30°C, na presença de luz, conforme metodologia prescrita nas RAS (BRASIL, 2009) com modificações. Foram determinadas a porcentagem de protrusão radicular aos 15 dias e a porcentagem de plântulas normais aos 30 dias após a semeadura, sendo computadas as sementes que apresentaram raiz principal e pelo menos duas raízes laterais. No teste de germinação, determinou-se também a porcentagem de plântulas normais fortes, sendo computadas as plântulas que apresentaram hipocótilos com três centímetros ou mais, e porcentagem de plântulas com

folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias após da semeadura. Ao final do teste de germinação, foi determinada a massa seca da raiz e da massa seca parte aérea das plântulas normais, após secagem em estufa de circulação forçada de ar, a 60°C até massa constante. A massa seca foi determinada em balança de precisão e expressa em mg/plântula.

Para a análise de isoenzimas por meio da técnica de eletroforese, sementes de cada tratamento foram trituradas em moinho refrigerado, na presença de PVP. Para a extração das enzimas foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 320 µL por 100 mg de pó das sementes. O material foi homogeneizado em vórtex e mantido em geladeira por uma hora, seguido de centrifugação a 14.000 RPM por 60 minutos, a 4°C. A corrida eletroforética ocorreu em sistema de géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Foram aplicados 40µL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 150 V por 5 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas polifenoloxidase. Os resultados da expressão de isoenzimas em gel de eletroforese foram analisados e interpretados visualmente.

Para a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes as amostras de sementes foram maceradas sem pergaminho com PVP em nitrogênio líquido. O extrato enzimático foi obtido pela pesagem de 100 mg de material macerado com uso do tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e água. O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 20 minutos a 4°C e o sobrenadante coletado e utilizado nas análises de quantificação da enzima polifenoloxidase (PPO).

A atividade da PPO foi determinada conforme metodologia descrita por Kar e Mishra (1976). Adicionou-se 20 µL do extrato enzimático, ajustado para 200 µL de solução contendo fosfato de potássio 70 mM pH 7,0 e catecol 20 mM. Após incubação a 30°C, por 10 minutos, a absorbância foi medida a 410 nm. O coeficiente de extinção molar de 1,235 mM⁻¹ cm⁻¹ foi usado para calcular a atividade da PPO.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial, para os protocolos de pré-resfriamento (3 tipos de secagem x 2 reaquecimentos) com quatro repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferenças significativas foram observadas nos diferentes métodos de secagem e teores de água sobre os efeitos do reaquecimento. No geral, sementes com 17% (bu) secadas em solução salina obtiveram menores médias nas duas temperaturas de reaquecimento testadas, exceto para as variáveis protrusão radicular. Sementes que tiveram secagem rápida (sílica gel) obtiveram resultados médios superiores ao daquelas com secagem lenta (solução salina) para as duas temperaturas de reaquecimento testadas.

Para o efeito da temperatura de reaquecimento após resfriamento das sementes com teor de água a 20% (bu) secas em sílica gel, não foram observadas diferenças significativas para as variáveis do teste de germinação e vigor.

Tabela 2 - Efeito do pré-resfriamento de sementes de *Coffea arabica* L com diferentes métodos de secagem e teores de água, sobre as porcentagem de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), massa seca da raiz (MSR(mg)), massa seca da parte aérea (MSPA(mg)) avaliadas após pré-aquecimento em banho-maria (40 °C) ou temperatura ambiente (25 °C).

	PR		PN		PNF		FC		MSPA		MSR	
	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C	25°C	40°C
17% Sílica	90 Aa	93 Aa	89 Aa	85 Aa	19 Aa	14 Aa	83 Aa	86 Aa	42 Aa	41 Aa	8 Aa	9 Aa
17% Sal	87 Aa	87 Aa	44 Ba	52 Ba	11 Ba	11 Aa	40 Ba	47 Ba	19 Ba	23 Ba	4 Ba	5 Ba
20% Sílica	95Aa	94Aa	87Aa	86Aa	20Aa	17Aa	83Aa	82Aa	40Aa	39Aa	8Aa	7Ba
CV	7.33		15.54		60.79		18.35		21.11		20.69	

Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha para cada avaliação não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott*, em nível de 5% probabilidade.

O reaquecimento pode ser feito de modo lento em temperatura ambiente ou rapidamente utilizando-se o banho-maria a 40°C (BAJAJ, 1995). O método de reaquecimento utilizado depende do tipo de material que está sendo preservado. Sementes ortodoxas podem ser reaquecidas lentamente em temperatura ambiente e, aparentemente, sem nenhum efeito prejudicial às mesmas (TOWILL, 2002). Sementes de algodoeiro após dias de exposição ao nitrogênio líquido foram reaquecidas em temperatura ambiente e submetidas a teste padrão de germinação e vigor (ROCHA et al, 2009).

Uma menor atividade da PPO foi observada para as sementes que foram secadas até 17%, pré-resfriadas e reaquecidas em temperatura ambiente (FIGURA 1A). A atividade da enzima polifenoloxidase entre as sementes que foram

reaquecidas em temperatura ambiente foi maior naquelas que foram secadas em solução salina saturada de sulfato de amônio até 17% bu e aquelas que foram secadas em sílica gel a 20% bu, diferindo estatisticamente das sementes que foram secadas em sílica gel até 17% bu. Para as sementes que foram reaquecidas em banho-maria a 40 °C foram observadas diferenças significativas para aquelas que foram secadas em solução salina saturada apresentando, uma maior atividade da enzima (FIGURA 1B).

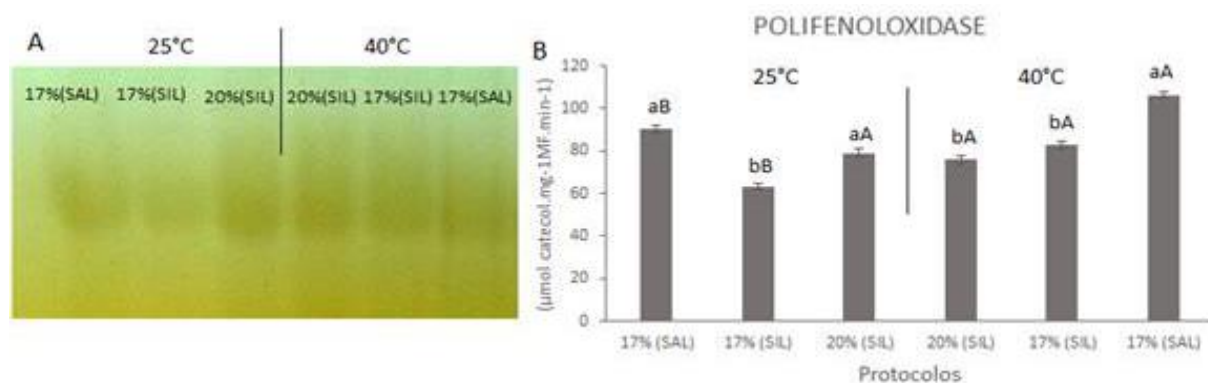


Figura 1 - A) Padrão eletroforético e atividade da enzima polifenoloxidase em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem, pré-resfriamento e reaquecimento. B) Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes. Secagem em solução saturada de (NH₄)₂SO₄ até 17% (bu), resfriada em biocongelador e reaquecida em temperatura ambiente a 25°C; Secagem em sílica gel até 17% (bu) resfriada em biocongelador e reaquecida em temperatura ambiente a 25°C; Secagem em sílica gel até 20% (bu) resfriada em biocongelador e reaquecida em temperatura ambiente a 25°C; Secagem em sílica gel até 20% (bu) resfriada em biocongelador e reaquecida em banho-maria a 40°C; Secagem em sílica gel até 17% bu resfriada em biocongelador e reaquecida em banho-maria a 40°C; Secagem em solução saturada de (NH₄)₂SO₄ até 17% (bu), resfriada em biocongelador e reaquecida em banho-maria a 40°C. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula entre e minúscula dentre as temperaturas de reaquecimento não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% probabilidade.

A secagem pode causar danos em sistemas de membrana, desencadeando mecanismos enzimáticos, com alterações nos constituintes celulares. O comprometimento da estrutura celular facilita o contato da enzima polifenoloxidase com compostos fenólicos armazenados nos vacúolos, tornando inevitável a oxidação de fenóis que, convertidos a quinonas, podem reagir com proteínas, inclusive a própria polifenoloxidase, explicando sua menor atividade (AMORIM; JOSEPHSON, 1975). Normalmente, nas células, as espécies reativas de oxigênio atuam como sinalizadoras das respostas das plantas, desde o crescimento até a resposta a estresses. No entanto, a ocorrência de estresses leva a um aumento na geração de EROs, causando um desequilíbrio na homeostase celular e podendo levar ao estresse oxidativo. Desta maneira, é necessário um aumento na atividade das enzimas antioxidantes para neutralizar o efeito deletério das EROs (VERMA et al., 2014; SILVEIRA et al., 2015).

CONCLUSÕES

1. O reaquecimento em temperatura de 25 °C ou em banho maria a 40 °C de sementes de *Coffea arabica* L. após pré-resfriamento, em taxa de 1°C min⁻¹ até -40 °C, não altera a qualidade fisiológica.
2. As enzimas polifenoloxidase apresentam menor expressão em gel de eletroforese em sementes de *Coffea arabica* L. reaquecidas em temperatura de 25 °C, do que em banho maria a 40 °C, após pré-resfriamento, em taxa de 1 °C min⁻¹ até -40 °C.

AGRADECIMENTOS

À UFPA, CAPES, FAPEMIG, CNPQ e Fundação Procafé.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H. V.; JOSEPHSON, R. V. Water-soluble protein and non-protein components of brasilian green coffes beans. *Journal of Food Science*, v. 40, p. 1179-1185, 1975.
- BAJAJ, Y. P. S. Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: *Cryopreservation of plant germplasm I*. Berlin: Springer, 1995. p. 3-28.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Regras para análise de sementes. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- CHEN, X. L.; LI, J. H.; XIN, X.; ZHANG, Z. E.; XIN, P. P.; LU, X. X. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of *Lilium* by droplet-vitrification. *South African Journal of Botany*, v. 77, p. 397-403, 2011.
- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. *CryoLetters*, Cambridge, v. 18, n. 7, p. 269-276, 1997.

- FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 38, n.2, p. 109-112, 2014.
- HAY, F.R.; ADAMS, J.; MANGER, K.; PROBERT, R. The use of non saturated lithium chloride solutions for experimental control of seed water content. *Seed Science and Technology*, v. 36, p. 737-746, 2008.
- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology*, v. 57, p. 315-319, 1976.
- LORENZETTI, E. et al. Induction of resistance to *Macrophomina phaseolina* in soybean treated with rosemary extract. *Summa Phytopathologica*, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.
- PROBERT, R. J.; HAY, F. R. Keeping seeds alive. In: BLACK, M.; BEWLEY, J. D. *Seed technology and its biological basis*. Boca Raton: CRC Press, 2000. P. 375-410.
- ROCHA, M. S. Crioconservação de sementes de algodão. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. v.13, n. 3, p. 312–318, 2009.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para conservação a longo prazo. *Biotechnology, ciência e desenvolvimento*, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001.
- SILVA, L. C. et al. Cryopreservation of *Byrsonima intermedia* embryos followed by room temperature thawing. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v. 36, n. 3, p. 309-315, July-Sept., 2014.
- SILVEIRA, H. R. O. et al. Gas exchange and carbohydrate partitioning in coffee seedlings under waterlogging. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 39, n. 2, p. 138-146, mar./abr. 2015.
- TOWILL, L. E. Cryopreservation of plant germplasm. In: TOWILL, L. E.; BAJAJ, Y. P. S. (Ed.). *Cryopreservation of plant germplasm II*. Berlin: Springer, 2002. p. 4-21
- VERMA, K. K. et al. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence, antioxidant enzymes, and growth responses of *Jatropha curcas* during soil flooding. *Turkish Journal of Botany*, Ankara, v. 38, p. 130-140, mar. 2014.