

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
PÓS-GRADUAÇÃO - PRODUÇÃO VEGETAL

RODRIGO MARQUES NASCIMENTO

VIABILIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SEMENTES DE CAFÉ
SUBMETIDAS AO TESTE LERCAFÉ

DIAMANTINA – MG

2013

RODRIGO MARQUES NASCIMENTO

**VIABILIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SEMENTES DE
CAFÉ SUBMETIDAS AO TESTE LERCAFÉ**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração em Produção Vegetal.

Orientadora

Profa. Dra. Marcela Carlota Nery

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri - UFVJM

DIAMANTINA – MG

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

2013

RODRIGO MARQUES NASCIMENTO

**VIABILIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SEMENTES DE CAFÉ
SUBMETIDAS AO TESTE LERCAFÉ**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, área de concentração Produção Vegetal, da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, como pré-requisito para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 21 de janeiro de 2013.

Profa. Dra. Marcela Carlota Nery - UFVJM

Profa. Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho - UFLA

Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa - Pesquisadora Embrapa Café - UFLA

A DEUS, meu refúgio e fortaleza, pelas bênçãos que recebo todos os dias de Suas mãos
liberais.

OFEREÇO

Aos meus pais, Joel e Isis, pelo incentivo e dedicação;
Aos meus irmãos, Gustavo e Sheila,
pelo apoio e amizade;
A minha namorada, Bárbara, pelo amor e compreensão.

A minha família,
anjos da guarda e mentores espirituais,
A minha orientadora Marcela,
por todos ensinamentos e apoio.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por iluminar meu caminho, realizando sonhos e permitindo que eu alcançasse meus objetivos;

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, pela oportunidade de realizar o curso, também à Universidade Federal de Lavras, ao permitir a realização de parte dos experimentos;

Aos meus conselheiros, professores, Édila Vilela de Resende Von Pinho, Denise Cunha Fernandes dos Santos Dias e André Cabral França, pelas orientações e conselhos durante a elaboração dos experimentos e discussão da dissertação;

À Professora, Maria Laene Moreira de Carvalho e Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, pela disposição e participação na banca examinadora;

À minha orientadora, Marcela Carlota Nery, por toda a dedicação, paciência, confiança, incentivo e, principalmente, pela oportunidade;

Agradeço, também, à Juliana Costa de Rezende (EPAMIG), pelo fornecimento das sementes, sem as quais não seria possível realizar os experimentos e, também pela disponibilidade e participação na banca examinadora;

Ao Fabiano, pela ajuda no laboratório de sementes da UFVJM, sempre nos auxiliando;

A todos do Laboratório de Sementes da UFVJM que me ajudaram no desenvolvimento de todo o projeto;

Ao Wilder e Albert, especialistas do laboratório de Sementes da UFLA, pelo apoio, paciência e ajuda na execução dos experimentos;

Sem esquecer, também, do Cláudio e Andrea, que sempre estiveram ao meu lado, na UFLA, incentivando e apoiando todo o meu trabalho;

Ao César e Vinícius, amigos pioneiros no incentivo profissional.

Aos órgãos CNPq e FAPEMIG, pela concessão da bolsa de estudos e recursos para execução do trabalho;

Aos meus pais, Isis e Joel, pelo amor, dedicação, paciência, incentivo e confiança depositada em mim todos esses anos;

Muito obrigado por toda oportunidade, sou eternamente grato. Amo vocês!

Agradeço também aos meus irmãos, Sheila e Gustavo, pelo companheirismo, paciência e amor, durante todo o curso;

À minha namorada, Bárbara, por toda a ajuda, companheirismo, paciência, amor e confiança;

“Só depois de praticadas, é que as faltas nos ensinam como podiam facilmente ter sido evitadas”.

Emanuel Wertheimer

RESUMO

O teste LERCAFÉ consiste na imersão de sementes de café em solução de hipoclorito de sódio. O cloro ativo, princípio ativo da solução, reage com o endosperma das sementes, identificando regiões mortas ou lesionadas, colorindo-as de verde escuro. A partir da avaliação da localização da região colorida, é possível classificar as sementes como viáveis ou não viáveis. O teste é rápido e de operação simples, mas a metodologia necessita ser testada para obter melhor precisão e exatidão dos resultados. Objetivou-se com este trabalho, adequar a metodologia do teste LERCAFÉ na determinação da viabilidade de sementes de café (*Coffea arabica* L.), além de avaliar o perfil isoenzimático em sementes submetidas ao teste LERCAFÉ. Em um primeiro experimento, avaliou-se a eficiência do teste LERCAFÉ na determinação da viabilidade em sementes de café das cultivares Catuaí Amarelo IAC 44, Mundo Novo IAC 376-4, Travessia MGS, e Rubi MG 1192, para isso utilizaram-se soluções de hipoclorito de sódio com teores de 2,5%; 3,5%; 5,0% e 6% de cloro ativo e os períodos de imersão de 2, 3 e 6 horas, a 30 °C. Observou-se pela caracterização do perfil das cultivares, que a velocidade de germinação não variou entre as cultivares, no entanto houve superioridade na germinação da cultivar Rubi em relação à Catuaí Amarela e Travessia. No entanto, pelo teste LERCAFÉ foi possível apenas a separação das cultivares em dois níveis de qualidade, por meio dos tratamentos 2,5% por 3 h, 3,5% por 2 h e 3 h, sendo as cultivares Rubi, Travessia e Mundo Novo de qualidade superior em relação a cultivar Catuaí Amarelo. Na concentração de 2,5% de hipoclorito de sódio por 2 horas, as sementes não apresentaram coloração esverdeada no endosperma. Já nas concentrações de 2,5% por 6 horas, 5% e 6% por 2h e 3h foi observada coloração intensa dificultando a avaliação das sementes. Na busca da adequação da metodologia do teste LERCAFÉ, foi realizado um segundo experimento, utilizando um lote de sementes de café da cultivar Catuaí Vermelho IAC 99, neste experimento foi realizado a quantificação do teor de cloro ativo da solução de hipoclorito de sódio e posteriormente avaliada a eficiência do teste, utilizando-se concentrações de 1%, 2%, 3%, 4% e 5% de cloro ativo e períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas, a 30 °C, também foi avaliado o perfil isoenzimática para enzimas Esterase (EST), Malato Desidrogenase(MDH), Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Álcool Desidrogenase (ADH). O teste LERCAFÉ permite a determinação do potencial fisiológico das sementes de café, quando se utiliza solução de hipoclorito de sódio quantificada, pelos tratamentos onde as sementes são imersas em solução com teor de 2% de cloro ativo pelo período de 5 horas e 3% de cloro ativo pelo período de 3 horas, a 30°C. As sementes de café submetidas ao teste LERCAFÉ apresentam

alterações na atividade das enzimas EST, MDH, SOD, CAT e ADH, sendo que a ativação ou desativação destes sistemas enzimáticos são variáveis com a concentração e tempo de imersão na solução de cloro ativo.

Palavras-chave: Viabilidade, Hipoclorito de sódio, *Coffea arabica*.

ABSTRACT

The LERCAFÉ test consists in the immergence of coffee seeds in sodium hypochlorite solution. The active chloride, active component of the solution, reacts with the endosperm of the seeds, identifying dead or injured regions, staining them dark green. From the colored region location evaluation, it is possible to classify the seeds as viable or non-viable. The test is quick and of simple transaction, however, the methodology needs to be tested in order to obtain better result precision and accuracy. The objective of this work was to adjust the methodology of the LERCAFÉ test in determining the viability of coffee (*Coffea Arabica* L.) seeds, in addition to evaluating the isoenzymatic profile of seeds submitted to the LARCAFÉ test. A first experiment evaluated the efficiency of the LERCAFÉ test in determining the viability of coffee seeds of cultivars Yellow Catuai IAC 44, Novo Mundo IAC 376-4, Travessia MGS and Rubi MG 1192. In order to do this, we used sodium hypochlorite solutions with active chloride contents of 2.5%, 3.5%, 5.0% and 6.0% and immersion periods of 2, 3 and 6 hours, at 30 °C. By the characterization of the cultivar profiles, we observed that germination speed did not vary between the cultivars, however, there was superiority in cultivar Rubi germination in relation to Yellow Catuai and Travessia. However, by the LERCAFÉ test, only the separation of the cultivars in two quality levels was possible, with the treatments 2.5% for 3 h, 3.5% for 2 h and 3 h, with cultivars Rubi, Travessia and Mundo Novo of superior quality in relation to Yellow Catuai cultivar. At the concentration of 2.5% of sodium hypochlorite for 2 hours, the seeds did not present greenish coloring on the endosperm. In the concentrations of 2.5% for 6 hours, 5% and 6% for 2 h and 3 h, intense coloration was observed, making seed evaluation difficult. Seeking to adjust the LERCAFÉ test methodology, a second experiment was conducted, using a lot of coffee seeds of cultivar Red Catuai IAC 99. This experiment quantified the sodium hypochlorite solution's content of active chloride and, subsequently evaluated the efficiency of the test, using active chloride concentrations of 1%, 2%, 3%, 4% and 5% and the periods of 1,2,3,4 and 5 hours, at 30 °C. The isoenzymatic profile for enzymes Esterase (EST), Malate Dihydrogenase (MDH), Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Alcohol Dehydrogenase (ADH) was also evaluated. The LERCAFÉ test allows the determination of physiological potential of the coffee seeds, when using quantified sodium hypochlorite solution, by the treatments in which the seeds are immersed in solution with 2% active chloride content for the period of 5 hours, and 3% active chloride for the period of 3 hours, at 30 °C. The coffee seeds submitted to the LERCAFÉ test presented alterations in the activity of enzymes EST, MDH, SOD, CAT and

ADH, being that the activation of deactivation of these enzymatic systems vary with the concentration and time of immersion in active chloride solution.

Key-words: Viability, Sodium hypochlorite, *Coffea arabica*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Categorias de sementes de café encontradas no teste LERCAFÉ	20
Figura 2 - Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho	28
Figura 3 - Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho	29
Figura 4 - Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho	30
Figura 5 - Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho	31
Figura 6 - Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados em porcentagem de plântulas normais obtidas na primeira contagem (PC), teste de germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) para as cultivares de café.....	23
Tabela 2 - Estimativas de viabilidade (%) das cultivares de café pelo teste LERCAFÉ.....	24
Tabela 3 - Porcentagem da germinação obtida pelo teste de germinação, das cultivares de sementes de café após serem submetidas ao teste LERCAFÉ.....	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	13
	REFERÊNCIAS.....	15
	ARTIGO 1 VIABILIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SEMENTES DE	
	CAFÉ SUBMETIDAS AO TESTE LERCAFÉ.....	16
1	INTRODUÇÃO.....	16
2	MATERIAL E MÉTODOS	19
2.1	EXPERIMENTO 1 – ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO TESTE LERCAFÉ	19
2.2	EXPERIMENTO 2 – ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO TESTE LERCAFÉ	
	COM O TEOR DE CLORO ATIVO QUANTIFICADO	21
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1	EXPERIMENTO 1	23
3.2	EXPERIMENTO 2	26
4	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO GERAL

A determinação rápida do potencial fisiológico de um lote de sementes é fundamental para o sucesso de empreendimento agrícola, neste contexto, vários são os testes desenvolvidos com o intuito de auxiliar a tomada de decisões dos produtores.

Zonta et al. (2010) descreveram que alguns testes vêm sendo utilizados para determinar a qualidade fisiológica das sementes de café, como os testes de tetrazólio (DELOUCHE e BASKIN, 1973), de condutividade elétrica individual (COSTA e CARVALHO, 2006), de avaliação visual de exsudatos (SERA e MIGLIORANZA, 2000) e de avaliação visual do formato e coloração do embrião (SERA e MIGLIORANZA, 2003); porém, mesmo sendo rápidos, estes testes são trabalhosos, onerosos e demandam mão de obra especializada.

A avaliação da qualidade de sementes de café, dentro dos programas de certificação de sementes, era realizada apenas com base no teste de germinação, o qual prevê a contagem de plântulas normais 30 dias após o início do teste (BRASIL, 2009). Dias e Silva (1986) enfatizaram que neste período, os resultados podem não mais representar o atual estado fisiológico das sementes.

Carvalho & Nakagawa (1986) enfatizaram que a viabilidade das sementes de café é avaliada principalmente pelos testes de germinação e tetrazólio, os mesmos ainda reportaram que o primeiro teste avalia a germinação das sementes sob condições ideais e no segundo determina-se o potencial germinativo das sementes.

Em função disso, torna-se relevante a busca por testes complementares para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café, que sejam confiáveis, reproduzíveis e rápidos. A velocidade na avaliação da qualidade das sementes permite a tomada de decisões antecipadas, minimizando possíveis perdas de produtividade.

Neste contexto tem-se intensificado os estudos com relação ao teste LERCAFÉ, pois este possibilita a obtenção de resultados referentes à viabilidade de sementes de café em um curto período de tempo além de ser de fácil execução.

A metodologia do teste LERCAFÉ consiste na imersão de sementes de café em solução de hipoclorito de sódio. O cloro ativo, o princípio ativo da solução de hipoclorito de sódio, reage com o endosperma das sementes identificando regiões mortas ou lesionadas, colorindo-as de verde escuro. A partir da avaliação da localização da região demarcada, é possível classificar as sementes como viáveis ou não-viáveis (REIS et al., 2010).

A eficiência do teste LERCAFÉ já foi diagnóstica em trabalhos realizados por Reis et al. (2010) e Zonta et al. (2010), mas pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de atuação envolvidos entre o endosperma das sementes de café e o cloro ativo presente na solução de hipoclorito de sódio.

REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes. Secretaria de defesa agropecuária.** Brasília: MAPA, 2009. 399p.
- CARVALHO, N.M. de; NAKAGAWA, J. Vigor de sementes. In: CÍCERO, S.M.; MARCOS FILHO, J.; SILVAR, N.R. **Atualização em produção de sementes.** Campinas: Fundação Cargill, 1986. P.207-223.
- COSTA, P.S.C.; CARVALHO, M.L.M. **Teste de condutividade elétrica individual na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea arabica* L.).** Ciência e agrotecnologia, Lavras, v.30, n.1, p.92-96, 2006.
- DELOUCHE, J.C. & BASKIN, C.C. **Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots.** Seed Science and Technology, Zurich, v.1, p.427-452, 1973.
- DIAS, M. C. L. L.; SILVA, W. R. 1986. Determinação da viabilidade de sementes de café através do teste de tetrazólio. **Pesquisa Agropecuária Brasileira,** Brasília, v.21, n.11, p.1139-1145, 1986.
- REIS, L. S.; ARAÚJO, E. F.; DIAS, D. C. F. dos S.; SEDIYAMA, C. S.; MEIRELES, R. C. **Lercafê: Novo teste para estimar o potencial germinativo de semente de cafeeiro (*Coffea arabica* L.).** Revista Brasileira de Sementes, v. 32, n. 1, p. 09 – 16, 2010.
- SERA, G. H.; MIGLIORANZA, E. **Avaliação visual do potencial germinativo de sementes de café por exsudados.** In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas. Resumos expandidos... Brasília – DF: Embrapa Café Minasplan, 2000.
- SERA, G. H.; MIGLIORANZA, E. **Avaliação visual do potencial germinativo de sementes de café pelo formato e coloração do embrião.** Semina, Londrina, v.24, n.2, p.307-310, 2003.
- ZONTA, J. B.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F.; REIS, M. S.; ZONTA, F. M. G. **Teste lercafê para sementes de cafeeiro com diferentes teores de água.** Revista Brasileira de Sementes. v. 32, n.1, p. 17 – 23, 2010.

ARTIGO 1 VIABILIDADE E ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE SEMENTES DE CAFÉ SUBMETIDAS AO TESTE LERCAFÉ

1 INTRODUÇÃO

Vários são os fatores que contribuem para o sucesso da implantação de uma lavoura cafeeira, dentre os quais, a utilização de mudas sadias e bem desenvolvidas, a base de sustentação para o estabelecimento da cultura, principalmente por se tratar de uma cultura perene (CARVALHO et. al, 2012).

O tempo para formação de mudas torna-se maior, em função das sementes de café possuírem germinação lenta e desuniforme (CLEMENTE et al.; 2012; LIMA et al., 2012), fato este, que dificulta a obtenção das mudas em épocas adequadas para o plantio (ROSA et al., 2007).

A avaliação da qualidade de lotes comerciais de sementes de café é importante, pois permite a formação de mudas em menor tempo. Clemente et al. (2012) e Hilst et. al (2011) descreveram que esta avaliação é dificultada, pois as sementes de café são caracterizadas por serem sensíveis à dessecação e por possuírem lenta germinação, em torno de 30 dias. Sera e Miglioranza (2000) enfatizaram que o setor de produção de sementes no Brasil tem demandado testes que permitam a avaliação rápida do potencial germinativo.

Vários estudos estão sendo desenvolvidos visando reduzir o período para obtenção de resultados da avaliação do potencial fisiológico de lotes de sementes de café (CLEMENTES et al., 2012), como: os testes de tetrazólio (DIAS et al., 1998), de condutividade elétrica individual (COSTA & CARVALHO, 2006), teste de coloração de exsudatos (HILST et al., 2012) e de avaliação visual do formato e coloração do embrião (SERA & MIGLIORANZA, 2003), porém, mesmo sendo rápidos, estes testes são trabalhosos, onerosos e demandam mão de obra especializada (ZONTA et al., 2010).

Favarato et al. (2011) citaram que a rapidez na avaliação da qualidade das sementes, permite a tomada de decisões rápidas durante as operações de colheita, recepção, beneficiamento e comercialização, minimizando assim, riscos e prejuízos. Com isso a pesquisa na área de sementes tem procurado desenvolver ou aperfeiçoar testes que possibilitem avaliar, com eficiência, a qualidade fisiológica das sementes em períodos de tempo relativamente curtos (VANZOLINI & NAKAGAWA, 2003).

Tem-se intensificado os estudos com relação ao teste LERCAFÉ, pois este possibilita a obtenção de resultados referentes à viabilidade de sementes de café em um curto período de tempo além de ser de fácil execução.

A metodologia do teste LERCAFÉ consiste na imersão de sementes de café em solução de hipoclorito de sódio. O cloro ativo, o princípio ativo da solução de hipoclorito de sódio, reage com o endosperma das sementes identificando regiões mortas ou lesionadas, colorindo-as de verde escuro. A partir da avaliação da localização da região demarcada, é possível classificar as sementes como viáveis ou não-viáveis (REIS et al., 2010). Reis et al. (2010) concluíram que o tratamento em que as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio com teor de 2,5% de cloro ativo pelo período de 3 horas a 25 °C foi eficiente na estimação da viabilidade pelo teste, já Zonta et al. (2010) concluiu que os tratamentos de 2,5% de cloro ativo com período de imersão de 3 horas de imersão por 35 °C e 3,5% de cloro ativo com período de imersão de 2 horas por 30 °C foram também são eficientes na estimação da viabilidade pelo teste.

Zonta et al. (2008) utilizaram o teste LERCAFÉ para estimar a germinação e caracterizar danos em sementes de café. Segundo os autores o teste foi eficiente na detecção de danos causados por secagem à alta temperatura e pelo ataque de broca. O teste também foi utilizado para avaliação e caracterização de danos mecânicos em sementes de café, mostrando-se eficiente (Zonta et. al, 2011). A avaliação da presença ou ausência do embrião em sementes de café, também pode ser realizada pelo teste, uma vez que o mesmo torna o endosperma das sementes de café translúcido, o que possibilita a visualização das estruturas internas e conseqüentemente, a verificação e a quantificação do número de sementes dotadas de embrião (REIS et al., 2010).

A eficiência do teste LERCAFÉ já foi diagnóstica em trabalhos realizados por Reis et al. (2010) e Zonta et al. (2010), mas pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de atuação envolvidos entre o endosperma das sementes de café e o cloro ativo presente na solução de hipoclorito de sódio.

Como o teste LERCAFÉ se trata de um teste que associa a reação do cloro ativo com possíveis regiões mortas/lesionadas do endosperma das sementes, a descoberta de possíveis processos enzimáticos envolvidos no teste podem auxiliar no conhecimento das reações que ocorrem entre o endosperma da semente e o cloro ativo.

Camargo et al. (2003) cita que a análise de grupos de isoenzimas pode ser uma forma alternativa para o estudo do processo deteriorativo em sementes, já que esta análise permite identificar os pontos iniciais de ocorrência dos danos, além de fornecer informações seguras

sobre as reais causas e consequências de eventos deteriorativos. A grande variedade de proteínas e enzimas estruturais é responsável pela integridade e pelo metabolismo celular e, desta forma a atividade de certas enzimas, associadas com a quebra de reservas ou biossíntese de tecidos novos, pode determinar o estágio de deterioração de sementes (CARVALHO et al., 2000).

As superóxido dismutase (SOD) são um grupo de enzimas que catalisam a reação de dismutação de radicais livres (O_2^-) produzidos em diferentes locais na célula, para oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), estas isoenzimas estão localizadas no citoplasma celular e matriz mitocondrial (SCANDÁLIOS, 1993). Halliwell & Gutteridge (1989) descreveram que a SOD exerce um importante papel em proteger a célula contra os efeitos deletérios de radicais superóxidos livres, sendo considerada chave na regulação de concentrações intracelulares de radicais superóxidos e peróxidos. Nos glioxissomos e peroxissomos (WILLEKENS et al., 1995) esta localizada a catalase (CAT), enzima responsável pela eliminação do peróxido de hidrogênio e produção de H_2O e O_2 .

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

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

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

Chauhan et al. (1985) descreveu que a variação nos perfis de proteínas e enzimas específicas, mais especificamente as relacionadas à respiração, peroxidação de lipídeos e remoção de radicais livres, são métodos eficientes no monitoramento de alterações bioquímicas resultantes dos processos de deterioração.

Dessa forma, objetivou-se com essa pesquisa padronizar a metodologia do teste LERCAFÉ para avaliação da qualidade de sementes de café (*Coffea arabica* L.) e estudar o comportamento de sistemas isoenzimáticos das sementes após a aplicação do teste LERCAFÉ.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As pesquisas foram realizadas no Laboratório de Sementes da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina – MG e no Laboratório Central de Análises de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA), com sementes de café oriundas da Fazenda Experimental de Três Pontas, fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em dois experimentos, conforme descrito a seguir.

2.1 EXPERIMENTO 1 – ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO TESTE LERCAFÉ

Foi utilizado um lote de sementes de café (*Coffea arabica* L.) das cultivares Catuaí Amarelo IAC 44, Mundo Novo IAC 376-4, Travessia MGS e Rubi MG 1192, da safra 2009/2010, oriundas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

Para a caracterização do perfil das sementes de café, foram realizados as determinações e testes descritos a seguir:

O grau de umidade foi determinado pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 30 gramas de sementes, cujo pergaminho foi removido manualmente.

O teste de germinação foi realizado utilizando-se sementes sem pergaminho (remoção manual). Estas foram colocadas para germinar em substrato papel, umedecido com água em quantidade equivalente a 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos de papel foram transferidos para câmara de germinação regulada à temperatura de 30 °C, com luz constante. Os resultados foram expressos em porcentagem de plântulas normais computados aos 15 dias (primeira contagem) e aos 30 dias (contagem final) (BRASIL, 2009).

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo a fórmula proposta por Maguire (1962).

O teste LERCAFÉ foi realizado em sementes de café sem o pergaminho (removidos manualmente) para todas as cultivares. As sementes foram submetidas aos tratamentos de

imersão em solução aquosa de hipoclorito de sódio nas concentrações de 2,5%; 3,5%; 5,0% e 6,0% de cloro ativo, durante os períodos de 2, 3 e 6 horas a 30 °C. As concentrações de cloro ativo foram obtidas a partir da diluição do hipoclorito de sódio comercial, com teor de 10% de cloro ativo, em água destilada. Estes teores de cloro ativo, bem como períodos de imersão testados, foram escolhidos a partir de uma triagem realizada em trabalhos anteriores realizados por Reis et al. (2010) e Zonta et al. (2010), afim de se verificar qual é a melhor metodologia para se empregar o teste LERCAFÉ.

As sementes foram acondicionadas em caixas acrílicas tipo *gerbox*, onde ficaram emergidas em 100 ml de solução de hipoclorito de sódio pelas concentrações avaliadas. Após serem tampadas, as caixas tipo *gerbox* foram acondicionadas em câmara de germinação a 30 °C, onde permaneceram pelos períodos avaliados. Posteriormente, as sementes foram lavadas por 90 segundos em água corrente e emergidas em 100 ml de água destilada por 40 minutos, a fim de se retirar o excesso de solução (REIS et al., 2010).

Após esta etapa, as sementes foram dispostas na bancada devidamente esterilizada para avaliação visual e registro fotográfico. Estas foram classificadas, de acordo com Reis et al. (2010), em sementes não-viáveis, aquelas que apresentaram coloração verde escura no endosperma sob/ao redor da região do embrião ou que não apresentavam embrião, e viáveis quando não houve coloração no endosperma, coloração fraca (tonalidade não característica do teste) no endosperma (independente da região) ou esta foi visualizada distante da região embrionária (Figura 1). A estimativa da viabilidade das sementes de café foi expressa em porcentagem.



Figura 1 - Categorias de sementes de café encontradas no teste LERCAFÉ

Nota: Categorias de sementes viáveis - sementes com coloração verde escura no endosperma em uma região distante do embrião (A, B, C). Categorias de sementes Não viáveis - sementes com coloração verde escura sobre o embrião ou sementes totalmente coloridas (D, E, F). A seta pontilhada indica a região do endosperma e a seta contínua indica a posição do embrião.

Após a avaliação visual, as mesmas sementes utilizadas no teste LERCAFÉ foram submetidas ao teste de germinação, com o objetivo de avaliar o efeito do teste LERCAFÉ na qualidade fisiológica das sementes.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições de 50 sementes em esquema fatorial 4x4 (4 cultivares e 4 tratamentos do teste LERCAFÉ). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR® (FERREIRA, 2000).

2.2 EXPERIMENTO 2 – ADEQUAÇÃO DA METODOLOGIA DO TESTE LERCAFÉ COM O TEOR DE CLORO ATIVO QUANTIFICADO

Foi utilizado um lote das sementes de café (*Coffea arabica* L.) da cultivar Catuaí Vermelho IAC 99, da safra 2010/2011, oriundas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG).

Para a caracterização do perfil das sementes de café, foram realizados as determinações e testes descritos a seguir:

O grau de umidade, o teste de germinação, a primeira contagem e índice de velocidade de germinação (IVG) foram realizados conforme descrito para o experimento 1.

Para a adequação da metodologia do teste LERCAFÉ, testou-se soluções de hipoclorito de sódio com teores de 1%, 2%, 3%, 4% e 5% de cloro ativo pelos períodos de 1, 2, 3, 4, e 5 horas de imersão em câmara de germinação a 30 °C, sendo os teores, de cloro ativo, obtidos a partir da diluição do hipoclorito de sódio (PA) comercial em água destilada e quantificado segundo Brasil (2005). As sementes de café foram classificadas como germináveis e não germináveis seguindo a classificação apresentada no experimento 1 (Figura 1).

Para a identificação dos tratamentos eficientes na estimação da viabilidade pelo teste LERCAFÉ, aplicou-se o teste Dunnett unilateral à esquerda, com 5% de probabilidade, encontrando, assim, os resultados significativos em relação ao tratamento testemunha (teste de germinação). Para isso os dados foram instalados em um delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes e submetidos à análise de variância.

Para avaliação da atividade enzimática, avaliou-se o comportamento das sementes submetidas aos tratamentos eficientes na determinação da viabilidade das sementes de café, para isso utilizaram-se quatro repetições de 50 sementes representando cada tratamento.

Também foi inserido na avaliação enzimática o tratamento testemunha (T), no qual as sementes não foram submetidas ao teste LERCAFÉ e sim umedecidas por 3 horas em substrato papel (umedecido o equivalente a 2,5 vezes o peso do substrato). As sementes destes tratamentos foram trituradas em moinho Rebnal modelo TE613/1, refrigerado a 4 °C, na presença do antioxidante PVP (Polivinilpirrolidona) e nitrogênio líquido em almofariz. Após a moagem o material obtido foi armazenado a temperatura de – 86 °C, para as análises isoenzimáticas.

A extração das proteínas foi realizada adicionando-se 100 mg do pó das sementes a 280 µl do tampão de extração (0,2 tris), homogeneizados em vortex e, posteriormente, mantidos por uma hora em geladeira. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm, a 4 °C por 1 hora.

A eletroforese em géis de poliacrilamida foi realizada em sistema descontínuo (7,5% gel de separação e 4,5% gel de concentração). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Para proceder a corrida eletroforética, foram aplicados nas canaletas do gel 60 µl do sobrenadante do material extraído e a corrida foi realizada a 4 °C, a 150 V, por 6 horas. Ao término da corrida, os géis foram revelados para os seguintes sistemas enzimáticos: esterase (EST), malato desidrogenase (MDH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), álcool desidrogenase (ADH), conforme a metodologia descrita por Alfenas et al (2006).

Com o intuito de se comparar o potencial germinativo das sementes de café submetidas ao teste LERCAFÉ e tratamento testemunha (T), empregou-se o teste Tukey a 5% de probabilidade. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste tukey. O experimento foi instalado em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições de 50 sementes. As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa estatístico SISVAR® (FEREIRRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 EXPERIMENTO 1

O grau de umidade das sementes de café por ocasião da realização dos testes foi de 16% para as cultivares Catuaí Amarelo e Mundo Novo, 15% para Rubi e 17% para Travessia. Vale destacar que, quanto menor for o teor de água inicial das sementes, maior é a absorção de hipoclorito de sódio pelas mesmas (SOFIATTI, 2006).

Pelo perfil dos lotes das cultivares (Tabela 1) observa-se que a velocidade de germinação não variou entre as cultivares, no entanto houve superioridade na germinação da cultivar Rubi em relação à Catuaí Amarela e Travessia.

Tabela 1- Resultados em porcentagem de plântulas normais obtidas na primeira contagem (PC), teste de germinação (G) e índice de velocidade de germinação (IVG) para as cultivares de café

Cultivares	Testes		
	PC (%)	G (%)	IVG
Catuaí Amarelo IAC 44	40a	72c	4,45a
Mundo Novo IAC 376-4	42a	80ab	4,61a
Travessia MGS	36a	77bc	4,73a
Rubi MG 1192	47a	86a	4,91a
CV(%)	14,27	4,07	7,37

Médias seguidas da mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na Tabela 2, observam-se as estimativas da viabilidade obtidas pelo teste LERCAFÉ (avaliação visual). Os tratamentos de 2,5% de cloro ativo por 3 horas e 3,5% de cloro ativo por 2 e 3 horas permitiram a distinção das cultivares em dois níveis de qualidade, sendo a Rubi, Travessia e Mundo Novo de qualidade superior em relação a cultivar Catuaí Amarelo de qualidade inferior.

Tabela 2- Estimativas de viabilidade (%) das cultivares de café pelo teste LERCAFÉ

Tratamento Concentração/Período	Estimativa da viabilidade (%) das cultivares			
	Catuaí Amarelo IAC 44	Mundo Novo IAC 376-4	Travessia MGS	Rubi MG 1192
2,5% /3 h	76 Ba	88 Aa	83 Aa	86 Aa
2,5% /6 h	61 ABb	53 CDb	69 Ab	46 Bb
3,5% /2 h	75 Ba	86 Aa	81 Aa	85 Aa
3,5% /3 h	79 Ba	89 Aa	80 Aa	88 Aa
CV(%)	9,38			

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Ausência de cloração. ** Excesso de cloração.

As sementes de café imersas por 2 horas em solução de hipoclorito de sódio contendo 2,5% de cloro ativo, não apresentaram coloração esverdeada no endosperma, impossibilitando a avaliação (Tabela 2). Zonta et al. (2010) testando a eficiência do teste LERCAFÉ, não obtiveram resultados satisfatórios para os tratamentos onde as sementes de café foram imersas em solução de hipoclorito de sódio com teor de 2,5% de cloro ativo pelos períodos de 1 e 2 horas, pois houve ausência de coloração para estes tratamentos. Para os tratamentos de 3,5% de cloro ativo por 6 horas, 5,% e 6,% de cloro ativo por 2, 3 e 6 horas foram observadas coloração verde escura intensa e ocupando grande parte do endosperma das sementes, dificultando a avaliação destas pelo teste LERCAFÉ, sendo os dados não computados.

Pelos dados observados no teste de germinação após o teste LERCAFÉ, distinguiu-se apenas a cultivar Catuaí Amarelo como a de qualidade inferior às demais (Tabela 3).

Tabela 3- Porcentagem da germinação obtida pelo teste de germinação, das cultivares de sementes de café após serem submetidas ao teste LERCAFÉ

Tratamento Concentração/Período	Cultivares			
	Catuaí Amarelo IAC 44	Mundo Novo IAC 376-4	Travessia MGS	Rubi MG 1192
2,5% /3 h	72 Ba	83 Aa	80 Aa	83 Aa
2,5% /6 h	23 Bb	38 Ab	45 Ab	18 Ab
3,5% /2 h	70 Ba	80 Aa	79 Aa	80 Aa
3,5% /3 h	68 Ba	81 Aa	80 Aa	83 Aa
CV(%)	11,09			

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. * Ausência de cloração. ** Coloração em excesso.

No tratamento de 2,5% por 6 horas houve dificuldade na distinção da qualidade das sementes, havendo coloração do endosperma em excesso, inviabilizando a avaliação da viabilidade das sementes pelo teste LERCAFÉ, para este tratamento observou-se baixa porcentagem de germinação pelo teste de germinação (tabela 3), evidenciando que o período de 6 horas de imersão afetou negativamente a qualidade fisiológica das sementes.

Segundo Reis et al. (2010), o emprego do teste LERCAFÉ pode contribuir de maneira significativa para o setor de tecnologia de sementes de café, auxiliando na tomada de decisões no que diz respeito ao diagnóstico sobre a qualidade do lote, já que este, possibilita a visualização das estruturas essenciais para a germinação e ainda torna possível identificação das partes da semente que se encontram danificadas mecânica ou fisiologicamente, o que pode impedir o perfeito desenvolvimento das plântulas.

Observa-se, de maneira geral, que o teste LERCAFÉ superestima os resultados de viabilidade de sementes. Os resultados do teste LERCAFÉ e germinação coincidem, porém, esses resultados, podem apresentar discrepâncias consideráveis, devido a possíveis infestações com patógenos no lote. Dessa forma, nem todas as anormalidades encontradas em plântulas podem ser observadas no embrião e, como consequência, o teste LERCAFÉ pode apresentar resultados superiores.

A escolha da metodologia adequada para o emprego do teste LERCAFÉ deve basear-se na facilidade para diferenciação de tecidos viáveis e inviáveis e na capacidade de diferenciar lotes de qualidades fisiológicas distintas. Outro fator que deve ser levado em consideração na avaliação de viabilidade de sementes é o tempo de execução do teste, pois, a rapidez na avaliação proporciona vantagens, como a possibilidade de descarte de lotes com qualidade inadequada, havendo necessidade também de ajuste nas concentrações da solução de cloro ativo.

Para este experimento utilizou-se soluções comerciais de hipoclorito de sódio, contendo 10% de cloro ativo. Segundo Brasil (2005) o hipoclorito de sódio em soluções concentradas se degrada sob efeito de luz e calor, desta forma a quantificação desta solução é primordial para padronização do teste.

Para padronização do teste LERCAFÉ é essencial que se padronize a solução de hipoclorito de sódio, a fim de encontrar um tratamento que possibilite a distinção de lotes em níveis de qualidade fisiológicos distintos, tornando o teste reproduzível.

Desta forma realizou-se um segundo experimento, no qual se quantificou o teor de cloro ativo presente na solução de hipoclorito de sódio. Para isso avaliou-se a eficiência do

teste LERCAFÉ com as sementes imersas em solução de hipoclorito de sódio com teores de 1%, 2%, 3%, 4% e 5% de cloro ativo pelos períodos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas a 30 °C.

3.2 EXPERIMENTO 2

O grau de umidade das sementes de café da cultivar Catuaí Vermelho IAC 99 foi de 16%, a porcentagem de germinação de 82% e índice de velocidade de germinação igual a 4,31.

Os tratamentos onde as sementes foram imersas em solução contendo 2% e 3% de cloro ativo pelos períodos de 5 e 3 horas, respectivamente, mostraram-se eficientes na estimativa da viabilidade pelo teste LERCAFÉ, pois estes apresentaram médias estatisticamente iguais à testemunha (Tabela 4).

Tabela 4- Resultados da estimativa da viabilidade de sementes de café pelo teste LERCAFÉ, realizado com diferentes concentrações de cloro ativo e períodos de imersão

		Períodos de Imersão (horas)				
		1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Teor de Cloro Ativo (%)	1%	-	-	-	-	-
	2%	96 ^{ns}	93 ^{ns}	91 ^{ns}	91 ^{ns}	87*
	3%	96 ^{ns}	93 ^{ns}	87*	91 ^{ns}	45 ^{ns}
	4%	94 ^{ns}	92 ^{ns}	73 ^{ns}	+	+
	5%	94 ^{ns}	94 ^{ns}	61 ^{ns}	+	+

* Médias iguais ao tratamento testemunha (82% de germinação) pelo teste Dunnett a 5% de probabilidade. ns – não significativo. Ausência (-) e excesso (+) de coloração do endosperma.

Para os outros períodos de imersão não se observou tratamentos eficiente na estimativa da viabilidade pelo teste LERCAFÉ, os tratamentos onde as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio com teores de 4% e 5% pelos períodos de 4 e 5 horas não possibilitaram a avaliação pelo teste LERCAFÉ, devido ao excesso de coloração do endosperma (Tabela 4). Já para todos os períodos de imersão em solução de hipoclorito de sódio com teor de 1% de cloro ativo, não foi possível realizar a avaliação das sementes pelo teste LERCAFÉ, pois estes tratamentos não foram suficientes para colorir o endosperma das sementes de café, impossibilitando assim a avaliação destas.

Os resultados evidenciaram que o aumento do período de imersão, aliado ao aumento da concentração de cloro ativo, provocam o excesso de coloração do endosperma inviabilizando a avaliação visual pelo teste LERCAFÉ. Zonta et al. (2010) também não

obtiveram resultados satisfatórios para o teste LERCAFÉ quando utilizaram solução de hipoclorito de sódio com elevados teores de cloro ativo aliados a prolongados períodos de imersão, os mesmos reportaram que o teste subestimou os resultados de germinação das sementes de café nessas condições.

Com o intuito de associar a atividade enzimática com o observado pelo teste LERCAFÉ, avaliou-se o comportamento enzimático dos tratamentos eficientes na estimação da viabilidade pelo teste LERCAFÉ no experimento 2 (Tabela 4). Para melhor interpretação dos resultados, foram adicionados tratamentos com períodos de imersão acima e abaixo dos encontrados para os tratamentos eficientes, portanto avaliou-se o comportamento enzimático dos seguintes tratamentos: tratamento testemunha (sementes não submetidas ao teste LERCAFÉ), tratamentos onde as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio com teores de 2% e 3% de cloro ativo pelos períodos de 1, 3 e 5 horas.

Comparando a porcentagem de germinação do tratamento testemunha (T) com os resultados de germinação encontrados para os tratamentos onde as sementes foram submetidas ao teste LERCAFÉ, observou-se que apenas o tratamento onde as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio, com teor de 3% de cloro ativo pelo período de 5 horas apresentou germinação estatisticamente inferior aos demais tratamentos (Tabela 5).

Tabela 5- Porcentagem de germinação de sementes de café, cultivar Catuaí Vermelho IAC 99, tratamento testemunha (T) e tratamentos de sementes submetidas ao teste LERCAFÉ

Tratamento	Germinação
Testemunha	82% a
2% de Cloro Ativo / 1 h de imersão	78% a
2% de Cloro Ativo / 3 h de imersão	79% a
2% de Cloro Ativo / 5 h de imersão	81% a
3% de Cloro Ativo / 1 h de imersão	82% a
3% de Cloro Ativo / 3 h de imersão	79% a
3% de Cloro Ativo / 5 h de imersão	53% b

Médias seguidas da mesma letra não se diferem entre si, pelo teste Tukey a 5%.

Na figura 2 está representado o zimograma para a enzima esterase (EST). Santos et al. (2004) esta enzima participa das reações de hidrólise de ésteres, sendo diretamente ligada ao metabolismo dos lipídeos e ao processo degenerativo de membranas. Para os tratamentos com 5 horas de imersão nas concentrações de 2% e 3% não houve atividade da EST, esta ausência pode ser consequência do efeito do período prolongado de imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio. As sementes submetidas ao tratamento de 3% por 5 horas

apresentaram baixa germinação, evidenciando que os processos de degradação possivelmente foram ativados (BAKER, 1962 e GIVELBERG et al., 1984). No entanto, as sementes oriundas do tratamento 2% por 5 horas não apresentaram baixa porcentagem de germinação, evidenciando o efeito da exposição das sementes a tratamentos com teores elevados de cloro ativo, bem como períodos prolongados de imersão na atividade da EST (Tabela 1).

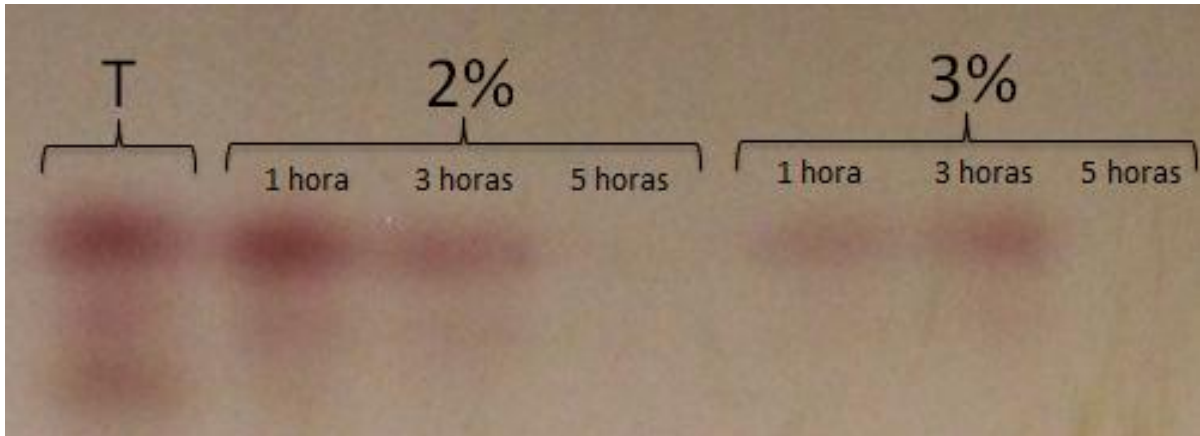


Figura 2- Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho

Nota: Tratamento testemunha (T) e os tratamentos onde as sementes foram submetidas ao teste LERCAFÉ (imersas em solução de hipoclorito de sódio com teores de 2% e 3% de cloro ativo pelos períodos de 1, 3 e 5 horas de acondicionamento), reveladas para a esterase (EST).

A redução da atividade das isoenzimas esterase, pode estar relacionada com a auto-oxidação de ácidos graxos (FLOOD & SINCLAIR, 1981), perda da integridade do sistema de membranas (GIVELBERG ET AL., 1984; MACHADO, 2000) e liberação de lipídeos ou desnaturação da enzima (BAKER, 1962).

A enzima malato desidrogenase (MDH) catalisa a última reação do ciclo de Krebs, oxidando o malato a oxaloacetato e produzindo NADPH (SIEDOW & DAY, 2000). Este sistema enzimático utiliza o NAD como doador ou receptor de elétrons nessas reações.

Por se tratar de uma enzima importante durante o processo respiratório celular, o aumento da sua atividade pode ser devido ao aumento da expressão desta em diferentes compartimentos celulares e/ou pela indução da atividade da enzima expressa pela maior intensidade das bandas, isto pode ter ocorrido devido ao aumento da respiração nas sementes que se encontravam em processo deteriorativo, uma vez que as enzimas envolvidas na respiração podem ser ativadas em sementes de reduzida qualidade, conforme Shatters et al. (1994). Notou-se que os tratamentos com maior germinação tiveram sua atividade enzimática

estável ou diminuída. Já o tratamento de 3%5 h teve maior influência do cloro ativo (Figura 3).

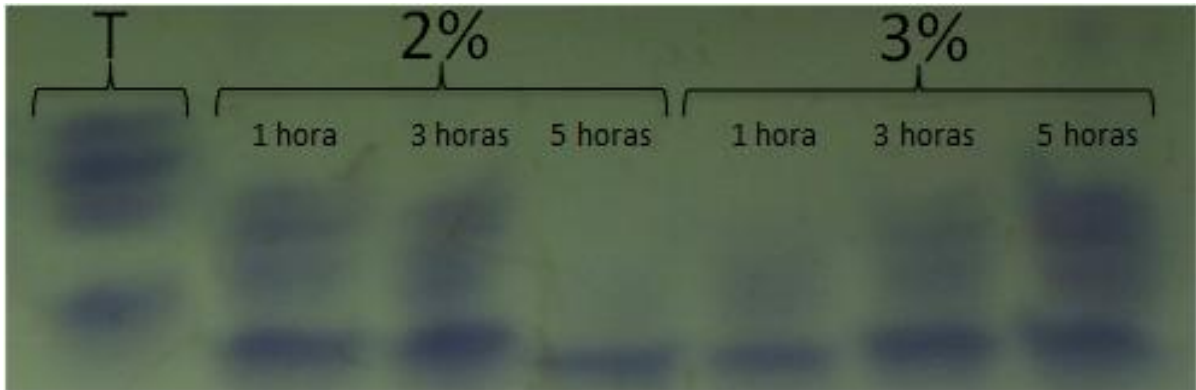


Figura 3- Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho

Nota: Tratamento testemunha (T) e tratamentos onde as sementes foram submetidas ao teste LERCAFÉ (imersas em solução de hipoclorito de sódio com teores de 2% e 3% de cloro ativo pelos períodos de 1, 3 e 5 horas de acondicionamento), reveladas para a malato desidrogenase (MDH).

As enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) são mecanismos eficientes no processo de desintoxicação celular, participando dos processos de remoção desses radicais livres (MCDONALD, 1999).

Entre as enzimas responsáveis pelo sistema de defesa, a superóxido dismutase (SOD), esta entre as mais importantes (ALSCHER et al., 2002), este grupo de metaloenzimas catalisa a formação de peróxido de hidrogênio a partir de radicais superóxidos, protegendo a célula de processos oxidativos (MCDONALD, 1999). Entretanto, o acúmulo de peróxido também pode ser tóxico para a célula, podendo levá-la a morte, principalmente na presença de ferro (EANTON, 1991).

Analisando a Figura 4, nota-se que houve intensa atividade da SOD para todos os tratamentos, sendo a atividade desta enzima baixa para o tratamento testemunha (T), evidenciando o efeito do tratamento do teste LERCAFÉ sobre a atividade da SOD, que possivelmente ativou o sistema antioxidante, como consequência ao estresse gerado pela imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio. O tratamento 3% por 5 horas foi o que apresentou banda mais intensa para esta enzima, sendo as sementes submetidas a este tratamento, as que apresentaram maior queda no potencial germinativo (Tabela 1).

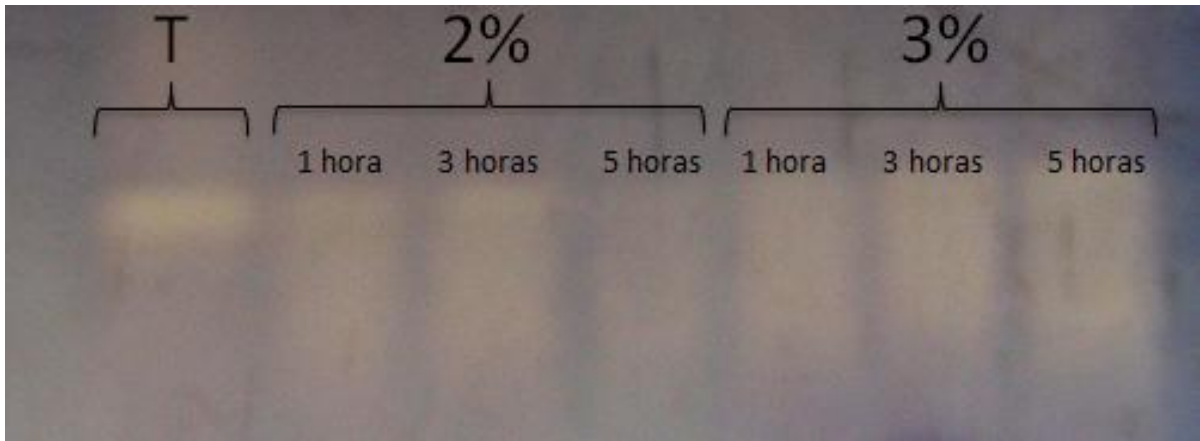


Figura 4- Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho

Nota: Tratamento testemunha (T) e tratamentos onde as sementes foram submetidas ao teste LERCAFÉ (imersas em solução de hipoclorito de sódio com teores de 2% e 3% de cloro ativo pelos períodos de 1, 3 e 5 horas de acondicionamento), reveladas para a superóxido dismutase (SOD).

A alta atividade da enzima da SOD em todos os tratamentos onde as sementes foram imersas em solução de hipoclorito de sódio, demonstra a eficiência do sistema antioxidante das sementes de café, já que este padrão de atividade não foi observado para o tratamento onde as sementes não foram submetidas ao teste LERCAFÉ, tratamento testemunha (T).

Por meio do ciclo de óxido-redução, a CAT atua como enzima chave no processo de remoção do peróxido de hidrogênio, participando do controle desses peróxidos endógenos (FRIDOVICH, 1986), com isso a redução da atividade da CAT, reduz a capacidade de prevenção contra danos oxidativo.

Como a CAT é uma enzima capaz de realizar a desintoxicação de O_2^- e H_2O_2 (MCDONALD, 1999; BAILLY et al., 1996), era de se esperar um comportamento desta enzima semelhante ao encontrado para a SOD para os tratamentos avaliados, porém ao observar a Figura 5, nota-se que não houve alteração do perfil enzimático para esta enzima, sendo apenas visível, a atividade da CAT para o tratamento testemunha (T). Provavelmente o estresse causado pela imersão das sementes em solução de hipoclorito de sódio causou a inibição deste sistema antioxidante (Figura 5).



Figura 5- Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho

Nota: Tratamento testemunha (T) e tratamentos onde as sementes foram submetidas ao teste LERCAFÉ (imersas em solução de hipoclorito de sódio com teores de 2% e 3% de cloro ativo pelos períodos de 1, 3 e 5 horas de acondicionamento), reveladas para a catalase (CAT).

Na Figura 6, observou-se o aumento progressivo na atividade da enzima álcool desidrogenase (ADH), a medida que se aumentou o teor de cloro ativo da solução de hipoclorito de sódio, bem como o período de imersão. A referida enzima atua no metabolismo anaeróbico, reduzindo acetaldeído a etanol e oxidando NADH a NAD^+ ADH (BUCHANAN et al., 2005). Zhang et al. (1994) descrevem que o acetaldeído é responsável pela aceleração do processo deteriorativo em sementes, o que coincide com o observado no tratamento de 3% 5 horas.

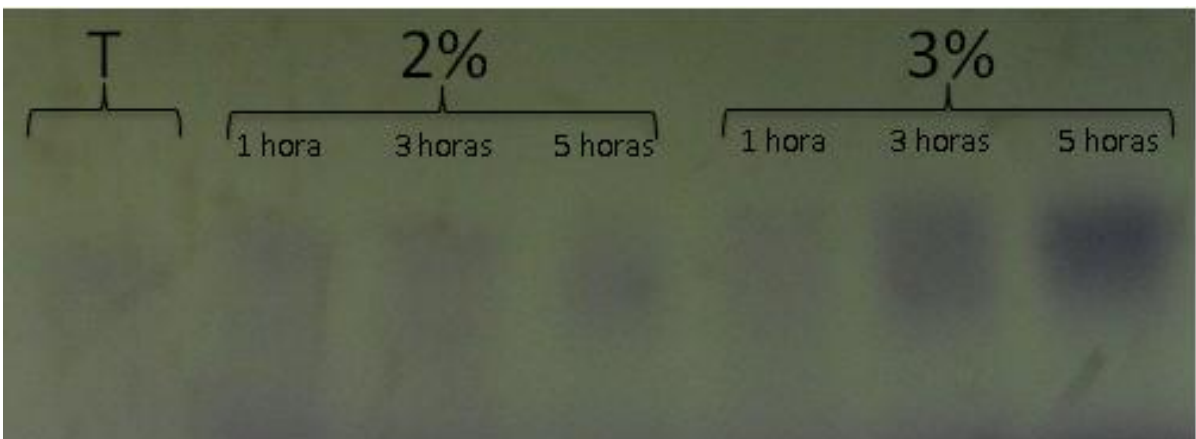


Figura 6- Padrões enzimáticos de sementes de café, Catuaí Vermelho

Nota: Tratamento testemunha (T) e tratamentos onde as sementes foram submetidas ao teste LERCAFÉ (imersas em solução de hipoclorito de sódio com teores de 2% e 3% de cloro ativo pelos períodos de 1, 3 e 5 horas de acondicionamento), reveladas para álcool desidrogenase (ADH).

4 CONCLUSÃO

O teste LERCAFÉ permite a determinação do potencial fisiológico das sementes de café, quando se utiliza solução de hipoclorito de sódio quantificada, pelos tratamentos onde as sementes são imersas em solução com teor de 2% de cloro ativo pelo período de 5 horas e 3% de cloro ativo pelo período de 3 horas, a 30 °C.

As sementes de café submetidas ao teste LERCAFÉ apresentam alterações na atividade das enzimas EST, MDH, SOD, CAT e ADH, sendo que a ativação ou desativação destes sistemas enzimáticos são variáveis com a concentração e tempo de imersão na solução de cloro ativo.

REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A.C (Ed). **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microrganismos**. 2. Ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 626 p.
- ALSCHER, RG; ERTURK, N; HEALTH, LS. **Role of superoxide dismutase (SODs) in controlling oxidative stress in plants**. Journal of experimental Botany, Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants Special Issue, v.53, n.372, p.1331-1341, 2002.
- BAILLY, C.; BENAMAR, A.; COBINEAU, F. CÔME, D. **Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflowers seeds related to deterioration during accelerated aging**. Physiologia Plantarum, Copenhagen, v. 97, n. 1, p. 104-110, May 1996.
- BAKER, K. F. **Principles of heat treatment of soil and planting material**. Journal of the Australian Institute of Agriculture Science 28: 118-126, 1962.
- BASU, R.N. Seed viability. In: BASRA, A.S. **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: The Haworth Press, p.1-42. 1995.
- BRASIL. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Hipoclorito de sódio - Determinação de cloro ativo - Método volumétrico. NBR 9425:2005**. Rio de Janeiro, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes. Secretaria de defesa agropecuária**. Brasília: MAPA, 2009. 399p.
- BUCHANAN, B. B.; GRUISSSEN, W.; JONES, R. L. **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2005. 1367 p.
- CAMARGO, R. **Armazenamento de sementes de milho doce**. 2003. 81p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- CARVALHO, H. P. de, SOUZA, P. E., ABREU, M. de S., GUIMARÃES, R. M., CARVALHO, M. L. M., REIS, R. de G. E. **Efeito de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, agente etiológico da mancha manteigosa, na germinação e viabilidade de sementes de cafeeiro**. Revista Brasileira de Sementes, Paraná, v. 34, n. 2, p. 264-271, 2012.

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

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

CLEMENTE, A. da C. S.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. **Suitability of the tetrazolium test methodology for recently harvested and stored coffee seeds.** Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 36, n. 4, p. 415-423, 2012.

COSTA, P. de S. C.; CARVALHO, M. L. M. **Teste de condutividade elétrica individual na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de café (*Coffea arabica* L.).** Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v. 30, n. 1, p. 92 – 96, 2006.

DIAS, M. C. L. de L.; SILVA, W. R. **Teste tetrazólio em sementes de café.** Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 1998, 16p.

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

FAVARATO, L. F.; ROCHA, V. S.; ESPINDULA, M. C.; SOUZA, M. A.; PAULA, G. S. **Teste de lixiviação de potássio para avaliação da qualidade em sementes de trigo.** Revista Brasileira de Ciências Agrárias, Recife, v. 6, n. 4, p. 670-674, 2011.

FERREIRA, D.F. SISVAR - **Sistema de análise de variância para dados balanceados.** Lavras: UFLA, 2000.

FLOOD, R.G. e SINCLAIR, A. **Fatty acid analysis of aged permeable and impermeable seeds of *trifolium subterranean* (subterranean clover).** Seed Science and Technology 9:475-477, 1981.

FRIDOVICH, I. **Biological effects of the superoxide radical.** Archives Biochemistry and Biophysics, San Diego, v. 147, n. 1, p. 1-11, May 1986.

GIVELBERG, A., HOROWITZ, M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. **Solute leakage from *Solanum nigrum* L. seeds exposed to high temperatures during imbibition.** Journal of Experimental Botany 35:1754-1763, 1984.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon, 1989. 543 p.

HENNING, F. A.; MERTZ, L. M.; ZIMMER, P. D.; TEPLIZKY, M. D. F. Qualidade fisiológica, sanitária e análise de isoenzimas de sementes de aveia-preta tratadas com diferentes fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, v.31, n.3, 2009.

HILST, P. C., DIAS, D. C. F. dos S., ALVARENGA, E. M., SOUZA, B. L. **Test of exudates color hues for evaluating the physiological potential of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds**. Revista Brasileira de Sementes, Paraná, v. 34, n. 2, p. 212 – 217, 2012.

LIMA, J. da S.; ARAUJO, E. F., ARAUJO, R. F., DIAS, L. A. dos S.; DIAS, D. C. F. dos S., RENA, F. C. **Uso da reidratação e do hipoclorito de sódio para acelerar a emergência de plântulas de cafeeiro**. Revista Brasileira de Sementes, v. 34, n. 2, p. 327-333, 2012.

MACHADO, J.C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras MG. Editora UFLA, 2000.

MAGUIRE, J.D. **Speednof germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor**. Crop Science, Madison, v.2, n.1, p.176-177, 1962.

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

REIS, L. S.; ARAÚJO, E. F.; DIAS, D. C. F. dos S.; SEDIYAMA, C. S.; MEIRELES, R. C. **Lercafê: Novo teste para estimar o potencial germinativo de semente de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. Revista Brasileira de Sementes, v. 32, n. 1, p. 09 – 16, 2010.

ROSA, S. D. V. F., ABREU, L. A. de S., FERREIRA, I. A., VILELA, F. L., PINHO, E. R. V. **Perfil isoenzimático em sementes de café produzidas sob manejo orgânico**. VII Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil. 22 a 25 de Agosto de 2011, Araxá, MG.

ROSA, S. D. V. F.; MAZZAFERA, P.; GUIMARÃES, R. M.; VEIGA, A. D.; VEIGA, A. D. **Pré-Embebição: Efeitos na germinação; crescimento de plântulas e teor de cafeína em sementes de cafeeiro**. Coffee Science, Lavras, v. 2, n. 1, p. 69 – 78, 2007.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N.L.; VILELA, F. V. **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente**. Revista Brasileira de Sementes, v. 26, n.1, p.110-119, 2004.

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

SCANDALIOS, J.G. Isozymes in development and differentiation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.25, n.1, p.225-258, 1974.

SERA, G. H.; MIGLIORANZA, E. **Avaliação visual do potencial germinativo de sementes de café por exsudados**. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 1., 2000, Poços de Caldas-MG. Brasília 2000. v. 1. p. 123-125.

SERA, G. H.; MIGLIORANZA, E. **Avaliação visual do potencial germinativo de sementes de café pelo formato e coloração do embrião**. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 24, n. 2, p. 307 – 310, 2003.

SIEDOW, J.N. & DAY, D.A. **Respiration and photorespiration**. In: Buchanan, B.B., Gruissem, W. & Jones, R.L. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Rockville MD. American Society of Plant Physiologist. 2000. pp 676-728.

SHATTERS JR, R. G.; ABDELGHANY, A.; ELBAGOURY, O.; WEST, S. H. **Soybean deterioration and response to priming: change in extracts from dry and germination seeds**. *Seed Science Research*, v.4 n.1, p.33-41, 1994.

SOFIATTI, V. **Aperfeiçoamento do uso de hipoclorito de sódio para acelerar a germinação de sementes e a emergência de plântulas de cafeeiro (*Coffea arabica* L.)**. 2006. 82f. Tese (Pós-graduação em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 2006.

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

VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. **Lixiviação de potássio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de amendoim**. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 25, n. 2, p. 7 – 12, 2003.

VEIGA, A.D.; VON PINHO, É. R.; VEIGA A.D.; PEREIRA, P.H.A.; CARVALHO, K. O. ; VON PINHO, R.G. Influência do potássio e da calagem na composição química, qualidade fisiológica e na atividade enzimática de sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, p.953-960, 2010.

WILLEKENS, H.; INZÉ, D.; VAN MONTAGU, M.; VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**. 1, 207-2888.1995.

ZHANG, M; MARDA, Y.; FUTIHATA, Y.; NORAMURA, Y. I.; ESASHI, Y. **A mechanism of seed deterioration in relation to volatile compounds evoked by dry seeds themselves.** Seed Science Research, Wallingford, v.4, n.1, p. 49-56, 1994.

ZONTA, J. B.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F.; REIS, M. S. **Uso do teste Lercafé para a caracterização de danos em sementes de cafeeiro.** Revista Agropecuária Brasileira. v. 43, n. 11, p. 1601 – 1607, 2008.

ZONTA, J. B.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F.; REIS, M. S.; ZONTA, F. M. G. **Teste lercafé para sementes de cafeeiro com diferentes teores de água.** Revista Brasileira de Sementes. v. 32, n. 1, p. 17 – 23, 2010.

ZONTA, J. B.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F.; ZONTA, F. M. G.; REIS, M. S. **Characterization of mechanical damage in coffee seeds by the LERCAFÉ test.** IDESIA, Chile, v. 29, n. 3, p. 33 – 38, 2011.