



ANA CRISTINA DE SOUZA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS, BIOFÍSICOS E
ULTRAESTRUTURAIS ASSOCIADOS À
CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES DE *Coffea arabica* L.**

**LAVRAS-MG
2019**

ANA CRISTINA DE SOUZA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS, BIOFÍSICOS E
ULTRAESTRUTURAISS ASSOCIADOS À CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES
DE *Coffea arabica* L.**

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

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Prof. Dr. Luciano Coutinho Silva
Coorientador

**LAVRAS–MG
2019**

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

Souza, Ana Cristina de.

Aspectos fisiológicos, bioquímicos, biofísicos e ultraestruturais
associados à criopreservação em sementes de *Coffea arabica* L. /

Ana Cristina de Souza. - 2019.

102 p. : il.

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

Coorientador(a): Luciano Coutinho Silva.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2019.

Bibliografia.

1. Armazenamento em longo prazo. 2. Análise térmica. 3.
Tolerância a dessecação. I. Rosa, Stella Dellyzete Veiga Franco da.
II. Silva, Luciano Coutinho. III. Título.

ANA CRISTINA DE SOUZA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS, BIOFÍSICOS E
ULTRAESTRUTURAIS ASSOCIADOS À CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES
DE *Coffea arabica* L.**

**PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL, BIOPHYSICAL AND ULTRASTRUCTURAL
ASPECTS ASSOCIATED WITH CRYOPRESERVATION IN SEEDS OF *Coffea
arabica* L.**

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

APROVADA em 26 de abril de 2019.

| | |
|--------------------------------------|------|
| Dr. Luciano Coutinho Silva | UFPB |
| Dr. Juliano Elvis Oliveira | UFLA |
| Dra. Heloisa Oliveira Santos | UFLA |
| Dra. Maria Laene Moreira de Carvalho | UFLA |

Pesq. Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

**LAVRAS-MG
2019**

*Aos amigos do Setor de Sementes e do Laboratório de Anatomia e Fisiologia do Cafeeiro
Ofereço*

*À minha família.
Aos amigos de perto e de longe.
E a todos que torceram pela minha vitória.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos ‘Santos, pela força para que esse sonho fosse realizado hoje.

Aos meus pais, Joaquim e Sílvia, pelo amor incondicional durante todos esses anos que, juntamente com toda a minha família, fizeram de mim uma pessoa humilde e batalhadora. Ao meu noivo Henrique Leotério, pelo amor e companheirismo.

À minha orientadora Sttela, pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, pela paciência e confiança de desenvolver este trabalho, pela orientação, pelo incentivo e apoio.

À Milene Carvalho, pela amizade, por ter me dado forças e esperanças quando nem eu mesma acreditava mais em mim.

Aos membros da banca pela colaboração.

Aos colegas do Setor de Sementes, pela convivência nesses anos, e aos queridos amigos do Laboratório de Anatomia e Fisiologia do Cafeeiro, pelo respeito e amizade.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-graduação em Agronomia/Fitotecnia, pela realização do curso.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos. Agradeço também à FAPEMIG e ao CNPq.

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

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Tolerância à dessecação é a capacidade de recuperar as atividades metabólicas depois da remoção parcial da água celular em sementes, possibilitando sua sobrevivência. A conservação a longo prazo, temperatura em nitrogênio líquido, se mostra economicamente viável em comparação com a conservação de plantas a campo. Pesquisas sobre tolerância à dessecação e métodos de criopreservação contribuem para o entendimento do comportamento destas sementes em relação a sensibilidade, à dessecação e ao resfriamento. Neste contexto, estudos foram realizados objetivando-se investigar os aspectos fisiológicos, bioquímicos, biofísicos e ultraestruturais em sementes de *Coffea arabica* L. No primeiro estudo, o objetivo foi investigar metodologias de armazenamento em longo prazo, de sementes de café, realizando estudos fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais relacionados com os efeitos da desidratação, pré-resfriamento e reaquecimento após exposição ao nitrogênio líquido. No segundo estudo, foram investigadas as propriedades calorimétricas dos vidros citoplasmáticos associados a criopreservação. A qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* L. é reduzida à medida que perdem água durante a secagem. 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 e o perfil eletroforético das enzimas catalase e superóxido dismutase. As enzimas polifenol oxidase e peroxidase 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. Identificou-se que danos nas membranas celulares são menos drásticos nas sementes que são crioarmazenadas após a secagem. Sementes de *Coffea arabica* L. secadas em sílica gel até 20 ou 17% (bu), pré-resfriadas em biocongelador ou diretamente imersas em nitrogênio líquido, apresentam alta sobrevivência. Em sementes de *Coffea arabica* L. com teores de água, de (43 e 35% bu) a entalpia de fusão e a porcentagem de água congelável são maiores do que em sementes com teores de água de 20, 17 ou 12% bu. O ponto de fusão da água congelada em sementes hidratadas ocorre em temperaturas inferiores à temperatura de fusão da água pura de 0 °C. A formação de vidros intracelulares em sementes hidratadas foi detectada em temperaturas de -18 e -22 °C, sementes com 17 e 20% (bu) entre -20 e -23 °C e em sementes crioarmazenadas em -18 °C.

Palavras-chave: Armazenamento em longo prazo. Análise térmica. Tolerância a dessecação.

ABSTRACT

Desiccation tolerance is the ability to recover metabolic activities after the partial removal of cellular water in seeds, allowing their survival. The long-term conservation, temperature in liquid nitrogen, is economically viable compared to the conservation of plants in the field. Research on desiccation tolerance and cryopreservation methods contribute to the understanding of the behavior of these seeds in relation to sensitivity, desiccation and cooling. In this context, studies were carried out with the objective of investigating the physiological, biochemical, biophysical and ultrastructural aspects of *Coffea arabica* L. seeds. In the first study, the objective was to investigate long-term storage methods of coffee seeds, performing physiological studies, biochemical and ultrastructural studies related to the effects of dehydration, precooling and reheating after exposure to liquid nitrogen. In the second study, the calorimetric properties of the crystalline cytoplasmic agents associated with cryopreservation were investigated. The physiological quality of *Coffea arabica* L. seeds is reduced as they lose water during drying. Reheating at a temperature of 25 ° C or a 40 ° C water bath of *Coffea arabica* L. seeds after pre-cooling at a rate of 1 ° C min⁻¹ to -40 ° C does not alter the physiological quality and the electrophoretic profile of the catalase and superoxide dismutase enzymes. The enzymes polyphenol oxidase and peroxidase present lower expression in electrophoresis gel 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. Damage to cell membranes has been found to be less drastic in seeds that are cryo-stored after drying. Seeds of *Coffea arabica* L. dried in silica gel up to 20 or 17% (bu), pre-cooled in a biofreezer or directly immersed in liquid nitrogen, present high survival. In *Coffea arabica* L. seeds with water contents, (43 and 35% bu) the melting enthalpy and the percentage of freezing water are higher than in seeds with water contents of 20, 17 or 12% bu. The melting point of frozen water in hydrated seeds occurs at temperatures below the melting temperature of pure water of 0 ° C. The formation of intracellular glasses in hydrated seeds was detected at temperatures of -18 and -22 ° C, seeds with 17 and 20% (bu) between -20 and -23 ° C and in cryo-stored seeds at -18 ° C.

Keywords: Long-term storage. Thermal analysis. Desiccation tolerance.

SUMÁRIO

| | |
|--|--|
| CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL | |
| 1 | INTRODUÇÃO 10 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO 12 |
| 2.1 | A espécie <i>Coffea arabica</i> L. cv. Catuaí Amarelo..... 12 |
| 2.2 | Tolerância a dessecação 13 |
| 2.3 | Criopreservação..... 15 |
| 2.4 | Armazenamento, reaquecimento e recuperação do crescimento..... 17 |
| 2.5 | Sistema de defesa antioxidativa 17 |
| 2.6 | Vidros citoplasmáticos 20 |
| 2.7 | Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)..... 22 |
| | REFERÊNCIAS 24 |
| CAPÍTULO 2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS EM SEMENTES DE <i>COFFEA ARABICA</i> L. SUBMETIDAS À SECAGEM, RESFRIAMENTO E ARMAZENAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO..... 32 | |
| 1 | INTRODUÇÃO 34 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... 37 |
| 2.1 | Obtenção das sementes 37 |
| 2.2 | Etapa de secagem visando a criopreservação 37 |
| 2.3 | Etapa de pré-resfriamento..... 38 |
| 2.4 | Etapa de criopreservação e reaquecimento 39 |
| 2.5 | Determinação do teor de água..... 39 |
| 2.6 | Avaliação fisiológica 40 |
| 2.6.1 | Teste de germinação e massa seca de plântulas..... 40 |
| 2.6.2 | Teste de condutividade elétrica 40 |
| 2.7 | Avaliação bioquímica 41 |
| 2.7.1 | Expressão de isoenzimas em géis de eletroforese 41 |
| 2.7.2 | Quantificação da atividade das enzimas antioxidantes..... 41 |
| 2.8 | Análise ultraestrutural..... 42 |
| 2.9 | Delineamento experimental 43 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO 44 |
| 3.1 | Etapa de secagem visando à criopreservação 44 |

| | | |
|-------|--|-----------|
| 3.2 | Etapa de pré-resfriamento..... | 46 |
| 3.3 | Etapa de criopreservação | 49 |
| 3.4 | Análises bioquímicas | 51 |
| 3.4.1 | Expressão de isoenzimas em géis de eletroforese e quantificação da atividade das enzimas antioxidantes | 51 |
| 3.4.2 | Avaliações ultraestruturais..... | 60 |
| 3.5 | Análise ultraestrutural das sementes após pré-resfriamento..... | 62 |
| 3.6 | Análise ultraestrutural das sementes após criarmazenamento..... | 63 |
| 4 | CONCLUSÕES | 65 |
| | REFERÊNCIAS | 66 |
| | CAPÍTULO 3 PROPRIEDADES CALORIMÉTRICAS DA ÁGUA E VIDROS CITOPLASMÁTICOS ASSOCIADOS À CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES DE <i>COFFEA ARABICA</i> L. | 70 |
| 1 | INTRODUÇÃO | 72 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 75 |
| 2.1 | Local e material vegetal | 75 |
| 2.2 | Secagem das sementes | 75 |
| 2.3 | Pré-resfriamento e criarmazenamento das sementes..... | 76 |
| 2.4 | Avaliação fisiológica das sementes..... | 77 |
| 2.5 | Análise térmica nas sementes | 78 |
| 2.6 | Delineamento experimental..... | 79 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 79 |
| 3.1 | Análises térmicas das sementes após secagem..... | 80 |
| 3.2 | Análises térmicas das sementes pré-resfriadas..... | 84 |
| 3.3 | Análises térmicas das sementes criarmazenadas..... | 90 |
| 4 | CONCLUSÕES | 99 |
| | REFERÊNCIAS | 100 |

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro pertence à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* L. A espécie *Coffea arabica* L. tem grande valor comercial no mercado devido ao fato de que seus grãos têm um sabor mais pronunciado e refinado (DANKOWSKA; DOMAGAŁA; KOWALEWSKI, 2017).

O café é largamente cultivado em países tropicais, tanto para consumo próprio como para exportação para países de clima temperado. O Brasil é o maior produtor e exportador mundial de café, seguido pelo Vietnã e a Colômbia (NOGUEIRA; NEVES, 2015).

Com relação ao caráter econômico, o café está entre as *commodities* de maior valor no mercado, sendo a espécie *Coffea arabica* L. responsável por 60% do café comercializado em todo o mundo (CAMPOS et al., 2019), além disso, é uma das bebidas mais apreciadas no mundo (NOGUEIRA; NEVES, 2015).

Para a safra brasileira 2019, a produção estimada é de 54,48 milhões de sacas beneficiadas. Sendo para o café arábica produção entre 36,12 milhões e 38,16 milhões de sacas, representando redução em comparação ao produzido na safra passada entre 23,9% e 19,6% (CONAB, 2019).

Devido a sua grande importância econômica, a conservação da diversidade genética 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). Dentro do gênero são encontrados diferentes graus de tolerância à dessecação, sendo a espécie *C. liberica* a menos tolerante e a *C. racemosa* a mais tolerante (BERJAK et al., 2008).

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). Estudos de técnicas de criopreservação do café têm sido desenvolvidos com embriões somáticos, embriões zigóticos, ápices e sementes. Porém, apenas a atenção dada à criopreservação de sementes tem sido suficiente para permitir seu uso

rotineiro em bancos de germoplasma de café, mas devido à grande variedade de cultivares existentes ainda há muito a ser estudado (FREITAS et al., 2016, FIGUEIREDO et al., 2017).

Avaliações bioquímicas e ultraestruturais são de grande importância para esclarecer os efeitos dos danos celulares causados por estresses, como a manutenção das sementes a baixas temperaturas. Trabalhos com sementes de café, envolvem estudos bioquímicos (ABREU et al., 2014) e ultraestruturais (SAATH et al., 2010) dos efeitos da secagem, sendo poucos os estudos do efeito da criopreservação. Estudos ultraestruturais de sementes têm contribuído para a compreensão de diferentes respostas à desidratação e ao resfriamento, que podem levar à perda de viabilidade, por causar danos às membranas das organelas celulares (BERJAK; PAMMANTER, 2000).

A técnica de DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura) na análise calorimétrica da água contida em sementes é uma importante ferramenta em estudos sobre a tolerância à dessecação (ROSA et al., 2008) e crioarmazenamento, podendo trazer informações adicionais relevantes que contribuam para a elucidação das causas da baixa longevidade de sementes de café, quando submetidas a diferentes velocidades de desidratação, e expostas a criopreservação em nitrogênio líquido. Portanto, investigar vidros citoplasmáticos e correlacioná-los a estudos fisiológicos, pode auxiliar no entendimento da perda da qualidade de sementes de café criopreservadas e, assim, promover a manutenção da qualidade destas após a criopreservação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 A espécie *Coffea arabica* L. cv. Catuaí Amarelo

O cafeeiro (*Coffea* sp.) é um arbusto pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* L. Atualmente, 103 espécies do gênero já foram identificadas, porém, destas, apenas duas são cultivadas com o propósito comercial, as espécies *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre. As demais espécies do gênero são utilizadas em programas de melhoramento genético devido à presença de características agrônômicas importantes como resistência a pragas e doenças (EIRA et al., 2006; GUNNING et al., 2018; COUTO et al., 2019).

A espécie *Coffea arabica* L. é originária do sudoeste da Etiópia e foi trazida para a América no século XVIII, contribuindo para o crescimento econômico e cultural dos países onde passou a ser cultivado. Hoje a espécie é cultivada em diversos países, devido ao interesse agrônômico (KUMAR; NAIDU; RAVISHANKAR, 2006; OLIVEIRA, 2012).

Coffea arabica L. é um alotetraplóide com $2n = 4x = 44$ cromossomos e autofértil com cerca de 10% de polinização cruzada (CARVALHO et al., 1964). Vários estudos de natureza genética (CHARRIER; BERTHAUD, 1985) e citológica (PINTO-MAGLIO; CRUZ, 1987), serológicos (CHARRIER; BERTHAUD, 1985) ou, mesmo análises relacionadas à origem geográfica e compatibilidade em cruzamentos controlados (CARVALHO; MÔNACO, 1968), indicam que a espécie teve origem mais provável na hibridação de gametas não reduzidos de espécies diplóides do gênero. Estudos conduzidos por Lashermes et al. (1999) corroboraram a teoria de que *C. eugenoides* e *C. canephora* ou uma forma ancestral desta espécie seriam os parentais da espécie.

Originalmente, os cafezais no Brasil foram formados a partir da cultivar Arábica (*Coffea arabica* L. var. *typica*), primeira a ser introduzida no país. Aos poucos os cafezais foram se diversificando por meio da introdução de novas cultivares.

A cultivar Catuaí Amarelo é oriunda do cruzamento artificial entre ‘Mundo Novo’ e ‘Caturra Amarelo’. Esta última é caracterizada por seu porte baixo e frutos com exocarpo (casca) amarelo, enquanto a cultivar Mundo Novo é caracterizada por sua grande produtividade. A hibridação entre as duas cultivares resultou em uma cultivar com elevada capacidade produtiva e porte reduzido, características de grande interesse econômico que facilitam tratos da lavoura e a colheita do produto (MARTINS et al., 1992).

A cultivar foi liberada pelo Instituto Agronômico de Campinas, para fins comerciais, em 1972. Durante mais de 20 anos considerou-se que existia somente uma cultivar 'Catuaí Amarelo' e várias linhagens dentro desta cultivar, como por exemplo, IAC 86, IAC 74 e IAC 62. Todavia, em 1999, devido às exigências da Lei de Proteção de Cultivares, cada uma das antigas linhagens foi registrada no Registro Nacional de Cultivares (RNC) como uma nova cultivar. Assim, atualmente usa-se o termo Catuaí Amarelo, em referência a um grupo de cultivares e, por exemplo, Catuaí Amarelo IAC 62 e Catuaí Amarelo IAC 74, como cultivares e não mais como linhagens. São cultivares suscetíveis à ferrugem e aos nematóides (FAZUOLI et. al, 2008).

2.2 Tolerância a dessecação

A habilidade de recuperar as atividades metabólicas após a remoção de toda, ou quase toda a água celular sem que ocorram danos irreversíveis, conservando sua germinabilidade e vigor é definida como tolerância à dessecação, e confere algumas vantagens biológicas como superar períodos de estresse ambiental, estabilizar a unidade biológica por longos períodos pela suspensão da atividade metabólica e tolerar as condições extremas do ambiente (LEPRINCE; BUITINK, 2010; BRANDÃO et al., 2018). Segundo Colville e Kranner (2010), as formas de vida tolerantes à dessecação são capazes de perder mais de 90% de seu conteúdo de água e reassumir o metabolismo quando a água estiver disponível.

As sementes tolerantes à dessecação são denominadas ortodoxas e secam até um baixo conteúdo de água durante a maturação na planta mãe, cerca de 5% a 15% (WANG et al., 2012), e após a dispersão, podem permanecer viáveis por longos períodos, podendo ser armazenadas em um estado relativamente hidratado (CHEN et al., 2011).

De modo contrário, as sementes recalcitrantes são sensíveis à dessecação, não suportando secagem durante a maturação, e permanecem metabolicamente ativas durante o desenvolvimento e após a dispersão da planta mãe (COLVILLE; KRANNER, 2010).

A separação clássica entre sementes ortodoxas e recalcitrantes é questionada, sendo que alguns autores preferem classificar as espécies em três categorias que, além das ortodoxas e recalcitrantes, incluiriam uma terceira, considerada intermediária (ELLIS et al., 1990; MARTINS et al., 1999; SCHMIDT, 2000). Essas espécies são assim chamadas por apresentarem comportamento que se situa fisiologicamente entre as duas classes citadas anteriormente.

De acordo com Black et al. (2002), sementes intermediárias são aquelas que toleram secagem considerável, mas não completa. No gênero *Coffea*, as sementes apresentam comportamento intermediário entre ortodoxo e recalcitrante. No entanto, o grau de tolerância à dessecação varia muito entre as espécies (EIRA et al., 1999).

A criopreservação só é bem-sucedida quando a formação de gelo intracelular é impedida. A única forma de evitar a formação de cristais de gelo, sem que haja uma redução extrema da água celular, é através da vitrificação, que é um processo físico de transição no qual uma solução aquosa passa para um estado vítreo ou amorfo (não-cristalino) (SAKAI, 2000).

Para que a célula atinja o estado vítreo são necessárias duas condições, rápidas taxas de resfriamento e uma solução celular concentrada. O resfriamento rápido acontece ao mergulhar o material no nitrogênio líquido. Já a concentração da solução celular pode acontecer de várias maneiras, secagem ao ar, desidratação induzida pelo resfriamento extracelular e aplicação de crioprotetores (PANIS; LAMBARDI, 2006).

Para secagem ao ar, normalmente são utilizadas câmaras de fluxo laminar ou sílica gel (ENGELMANN, 2004). Porém, a utilização da câmara de fluxo laminar não permite o controle da temperatura e teor de água, sendo que ambos influenciam as taxas de evaporação, assim, o mais recomendável é a utilização de recipientes herméticos contendo quantidades fixas de sílica-gel (PANIS; LAMBARDI, 2006).

A sílica gel é o dessecante mais utilizado para secagem de pequenas amostras de sementes mantidas em recipientes selados (PROBERT; HAY, 2000). Através da adsorção física da água, a sílica gel que tem capacidade de adsorção de no máximo 30% de seu próprio peso, retira a umidade da amostra, e as moléculas de água ficam retidas à superfície dos poros do dessecante (JOSÉ et al., 2009; JOSÉ et al., 2011). Com redução da umidade relativa para menos de 20% em um curto espaço de tempo, ela proporciona a secagem rápida por meio da criação de um gradiente de água entre a amostra e o meio circundante (WALTERS et al., 2008)

Para estudar o comportamento de *Coffea* sp. durante o armazenamento, Coelho et al. (2015) utilizaram a sílica gel como alternativa para a secagem rápida e observaram que sementes de café toleram dessecação a menores teores de água utilizando-se o dessecante. Figueiredo et al (2017) investigaram o teor de água mais adequado para criopreservar sementes de *Coffea arabica* L. e concluiu que sementes secas em sílica gel com teor de água de 20% bu (base úmida) permitiu a maior sobrevivência das sementes.

Para a secagem de sementes a menores velocidades, soluções salinas saturadas têm sido utilizadas. Segundo Hay et al. (2008), essas soluções mantêm a umidade relativa constante na atmosfera ao seu redor. Assim, quando usadas em recipientes fechados, as soluções salinas saturadas proporcionam uma pressão de vapor constante nos recipientes, a uma determinada temperatura. Portanto, as soluções salinas têm sido largamente utilizadas em pesquisas com a análise da relação entre umidade relativa do ar, temperatura e grau de umidade de equilíbrio das sementes (BAZIN et al., 2011; CHOUDHURY et al., 2011; COELHO et al, 2015).

Dussert e Engelmann (2006) trabalharam com 10 soluções salinas saturadas no estudo para determinar tolerância das sementes de *Coffea arabica* L. expostas ao nitrogênio líquido. Coelho et al. (2015) ajustaram diferentes teores de água em equilíbrio, antes de submeter sementes de *Coffea arabica* L. ao armazenamento em tanques criogênicos, mantendo as amostras de sementes sobre soluções salinas saturadas preparadas com três sais. As sementes permaneceram por até 42 dias a 25 °C sobre as soluções para que atingissem o teor de água próximo a 5%, sendo que os teores de água estudados variaram de 5 a 40%.

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, seguido de imersão direta em nitrogênio líquido, de modo que ocorra uma desidratação induzida por resfriamento (SANTOS, 2001). À medida que a temperatura decresce e aproxima-se de 0 °C, a célula e seu meio externo inicialmente atingem um estado de super-resfriamento e, posteriormente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular, mas a membrana celular funciona como uma barreira que evita a nucleação de gelo no seu interior (WITHERS; WILLIAMS, 1998; SANTOS, 2000).

2.3 Criopreservação

A criopreservação pode ser definida como o armazenamento do material vegetal em baixas temperaturas, e é a única técnica atualmente disponível para a conservação a longo prazo, considerada segura e economicamente viável para uma série de espécies que apresentam dificuldades de armazenamento pelos métodos tradicionais. Em temperaturas ultra-baixas (-196 °C) a divisão celular e os processos metabólicos são interrompidos, permitindo o armazenamento por um período ilimitado sem que haja alterações ou

modificações, ou seja, no método de criopreservação ocorre uma paralisia do metabolismo, impedindo assim, a deterioração do material biológico. Outras vantagens da técnica são a necessidade de pouco espaço para o armazenamento de grande quantidade de material, a ausência de possíveis contaminantes e a necessidade de simples manutenção (ENGELMANN, 2004; RAMÍREZ; SALCEDO, 2013).

Para a criopreservação, várias partes da planta já foram utilizadas com sucesso, como sementes (COELHO et al., 2017, FIGUEIREDO et al., 2017), embriões zigóticos (STEINMACHER et al., 2007; WEN et al., 2010), embriões somáticos (FERNANDES et al., 2008; POPOVA et al., 2010), ápices caulinares (VOLK et al., 2006; UCHENDO et al., 2010), meristemas (PANIS et al., 2002) e suspensões celulares (MENGES et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2006).

O estado da água e o equilíbrio osmótico relacionado com os movimentos da água dentro e fora das células, são parâmetros de grande importância para a criopreservação. A desidratação desempenha papel central na prevenção de lesões que podem ocorrer durante o resfriamento e, conseqüentemente, na viabilidade pós-reaquecimento (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008).

Durante o resfriamento, o grande desafio é prevenir a formação de gelo no interior das células, o que poderia causar ruptura do sistema de membranas resultando na perda da semi-permeabilidade e da compartimentalização celular, levando ao colapso e morte das células. Isto acontece principalmente devido à característica da água de se expandir quando congelada e à conformação dos cristais de gelo. Porém, evitar a formação desses cristais não é tão simples, já que as sementes ou explantes utilizados na criopreservação apresentam altos teores de água em suas células. Portanto, uma etapa importante no processo da criopreservação é a desidratação do material vegetal, até que seja atingido um teor de água baixo o suficiente para evitar a formação de gelo intracelular, mas não tão reduzido que cause injúrias ao tecido devido à desidratação (SANTOS, 2001; PINTO, 2016).

Um bom nível de sobrevivência, geralmente é obtido quando as amostras são resfriadas com teor de água entre 10 e 20% bu. As técnicas empregadas e os mecanismos físicos nos quais a desidratação é baseada são diferentes na criopreservação clássica e nas técnicas contemporâneas de criopreservação. Na técnica clássica, também chamada de resfriamento lento, a desidratação é induzida durante o resfriamento extracelular, já nas técnicas contemporâneas, chamadas de resfriamento rápido, a desidratação é baseada na vitrificação (ENGELMANN, 2004; WOWK, 2010).

As sementes do café apresentam limitações com relação a sua conservação, uma vez que são classificadas como intermediárias, sendo sensíveis à dessecação e a baixas temperaturas, inviabilizando o armazenamento convencional via banco de sementes (ARAUJO et al., 2008; SIMOES-COSTA et al., 2009). Em consequência da dificuldade de armazenamento de sementes de café, alternativas biotecnológicas tal como a criopreservação têm sido investigadas para a conservação de germoplasma (SANTANA-BUZZY et al., 2007). Pesquisas para o desenvolvimento de técnicas de criopreservação do café têm sido desenvolvidas com sementes, e têm sido suficientes para permitir seu uso rotineiro em bancos de germoplasma (ETIENNE et al., 2002).

2.4 Armazenamento, reaquecimento e recuperação do crescimento

O armazenamento no processo de criopreservação é feito geralmente em botijões ou tanques criogênicos contendo nitrogênio líquido, mantendo as amostras a $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ na fase líquida, ou $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ na fase de vapor. O reaquecimento rápido evita a devitrificação e a imersão em água a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ tem garantido melhores resultados em muitas espécies (DUSSERT; ENGELMANN, 2006).

O reaquecimento em temperatura ambiente não é o procedimento clássico de criopreservação, porém, tem sido realizado com sucesso (SILVA, et al., 2014). Stanwood e Bass (1981) sugerem que o reaquecimento lento evita danos nos tecidos e células da semente. Portanto, o método de reaquecimento a temperatura ambiente se torna questionável, uma vez que existe a possibilidade da devitrificação durante este período (MOLINA et al., 2006).

Na fase de recuperação, o restabelecimento do crescimento indica o sucesso do processo de criopreservação. Sendo assim, as culturas devem ser estimuladas para reinício dos processos metabólicos com procedimentos específicos a cada tipo de cultura (SANTOS, 2004).

2.5 Sistema de defesa antioxidativa

A criopreservação de sementes é feita basicamente por desidratação e resfriamento (PANIS; LAMBARDI, 2005; KAVIANI, 2011). O estresse causado às células por meio da dessecação e resfriamento podem ocasionar danos às células das sementes comprometendo a integridade e provocando alterações na viabilidade do germoplasma (WALTERS et al., 2008; SHARMA et al; 2012; CAMPOS et al, 2019).

Em sementes recalcitrantes submetidas à dessecação artificial, a perda da viabilidade e intolerância à dessecação podem ser consequência da falha dos mecanismos de proteção contra espécies reativas de oxigênio (EROs) (VARGHESE et al., 2011). Segundo Chen et al. (2011) a dessecação causa acúmulo de EROs que não são eficientemente eliminadas pelo aumento nos níveis de enzimas antioxidantes.

Nas sementes ortodoxas, a reativação do metabolismo, através da entrada de água, pode levar à formação das espécies reativas de oxigênio que causam danos estrutural e funcional às células e, apesar de poderem ser armazenadas por um longo período de tempo, é comum a indução de deterioração durante o armazenamento, levando à perda da viabilidade (KIBINZA et al., 2011).

As EROs incluem radicais livres, como ânion superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH), assim como moléculas não radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2). Nas plantas, as EROS são formadas pelo vazamento de elétrons para o O_2 das atividades de transporte de elétrons dos cloroplastos, mitocôndrias e membranas plasmáticas ou como um subproduto de várias vias metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (HEYNO et al., 2011; SHARMA et al., 2012).

Quando o nível de EROS excede os mecanismos de defesa, diz-se que uma célula está em um estado de 'estresse oxidativo'. A produção aumentada de ROS durante estresse pode representar uma ameaça às células, causando peroxidação de lipídios, oxidação de proteínas, danos aos ácidos nucleicos, inibição enzimática, ativação da morte celular programada e, finalmente, levando à morte das células (SHARMA et al., 2012).

O sequestro, ou desintoxicação do excesso de EROs em sementes, é controlado por um sistema antioxidante enzimático eficiente (PUKACKA et al., 2011). Os antioxidantes enzimáticos incluem superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PO), estas enzimas atuam na remoção de radicais livres presentes nas células, neutralizando o oxigênio singlete e outros radicais livres, formados em condições de estresse (BERJAK, 2006; DUSSERT; ENGELMANN, 2006; DUMAN; YILMAZ, 2018), como as que ocorrem durante a criopreservação.

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

A superóxido dismutase (SOD) desempenha um papel central na defesa contra o estresse oxidativo, pertence ao grupo das metaloenzimas e catalisa a dismutação do radical superóxido (O_2^-) em oxigênio O_2 e peróxido de hidrogênio H_2O_2 . Está presente na maioria dos compartimentos sub celulares que geram oxigênio ativado (GILL et al., 2015). Esta reação apresenta grande importância para as células, pois o radical (O_2^-) é mais tóxico do que o H_2O_2 . A superprodução de SOD resulta em maior tolerância ao estresse oxidativo em plantas (ARORA; SAIRAM; SRIVASTAVA, 2002; SHARMA et al., 2012).

Entre as enzimas antioxidantes, a catalase (CAT) foi a primeira enzima a ser descoberta e caracterizada. É uma enzima tetramérica contendo heme, que catalisa a dismutação de duas moléculas de H_2O_2 em água e oxigênio. Tem alta especificidade para H_2O_2 , mas fraca atividade contra peróxidos orgânicos. As plantas contêm vários tipos de enzimas de degradação de H_2O_2 , no entanto, as CATs são únicas, pois não exigem equivalentes redutores celulares. A ausência desta enzima pode resultar na inativação da enzima superóxido dismutase, que é outra enzima removedora de radicais livres (SHARMA et al., 2012; ANJUM et al., 2016).

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

As polifenoloxidasas (PPO) fazem parte de um grande grupo de enzimas conhecidas como oxidorreduções, que oxidam fenóis a o-quinonas na presença de oxigênio molecular (MATHEIS, 1983; CLEMENTE, 1998). A PPO está relativamente presente em todos os estágios de desenvolvimento da planta, porém, sua atividade é mais elevada nos frutos mais jovens e após uma injúria mecânica ou ataque microbiano (YORUK; MARSHALL, 2003).

A secagem pode causar injúrias no sistema de membrana, desencadeando mecanismos enzimáticos, com alterações nos constituintes celulares. O comprometimento da estrutura celular facilita o contato da enzima polifenoloxidase, exclusiva de plastídeos, com compostos fenólicos, armazenados preferencialmente 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).

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.

2.6 Vidros citoplasmáticos

A água é um elemento essencial, de valor inestimável à vida, e é vital para a manutenção dos ciclos biológicos, sendo responsável pela organização da estrutura celular e cadeia de processos bioquímicos, organização e integridade das membranas, representa 70% do protoplasma de células ativas (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977). Mudanças discretas na atividade metabólica das sementes de acordo com o teor de água, provavelmente estão associadas a mudanças discretas nas propriedades físicas da água (VERTUCCI; FARRANT, 1995).

Considerando o modelo dos sítios de sorção de água nas macromoléculas, Vertucci (1993) e Vertucci e Farrant (1995) descrevem cinco formas de água nas sementes e correspondentes potenciais de intervalo e teor de água de acordo com a mobilidade da molécula e propriedades de fase (VILELA, 1998).

A água do tipo 1 está fortemente ligada à superfície das macromoléculas, considerada água estrutural, sem mobilidade, não apresenta propriedades de solvente, não congelável, tem força de ligação da ordem de -150 Mpa e corresponde a teores de água menores do que 0,08 g g⁻¹. A água do tipo 2 forma película delgada na superfície da matriz, trata-se de água de multicamada, tem papel de solvente, tem energia de ligação entre -11 e -150 MPa ou teor de água entre 0,25 e 0,08 g g⁻¹. Pode apresentar características vítreas e fortes interações com superfícies polares das macromoléculas. Assim como a do tipo 1, essa água não é congelável, em razão da formação dos estados vítreos, em temperaturas abaixo do ponto de resfriamento da água pura e é por isso que sementes secas abaixo de um determinado teor de água, de acordo com cada espécie, podem ser conservadas a baixas temperaturas (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; VILELA, 1998; VILLELA; MARCOS FILHO, 1998; MARCOS FILHO, 2005).

A do tipo 3, presente após a hidratação adicional dos tecidos em potencial hídrico entre -4 e -11 MPa ou teor de água entre 0,45 e 0,25 g g⁻¹, forma pontes associadas aos sítios hidrofóbicos das macromoléculas e sua presença assinala alterações nos lipídios das membranas. Há indicação de água congelável quando atinge níveis mais próximos do limite superior de hidratação (LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993; VILELA, 1998; MARCOS FILHO, 2005).

Água tipo 4 tem características de solução concentrada e não interage diretamente com a superfície das macromoléculas, ocupando poros capilares com potenciais hídricos de -4 a -1,5 MPa e tecidos com 33% a 41% de água. Esse tipo de água inclui a ativação dos processos

de síntese e início da germinação. Água tipo 5 é representada por uma solução diluída, que não se liga às macromoléculas. Sua ocorrência é observada sob teor de água superior a 41% e com potencial hídrico superior a -1,5 MPa. A germinação se completa quando esta água está presente (VILLELA; MARCOS FILHO, 1998; MARCOS FILHO, 2005). Águas dos tipos 3, 2 e 1 condizem a ‘água presa’ (adsorvida), isto é, água associada com matriz celular. Já a do tipo 5 e 4 têm propriedades termodinâmicas semelhantes às da ‘água livre’ considerada absorvida (MARCOS FILHO, 2005).

Os estudos das interações entre a água e os constituintes da semente conceitua o desenvolvimento de vidros aquosos dentro do citoplasma das células, isto é, uma solução líquida de alta viscosidade. Nesta condição, reações do metabolismo celular são retardadas e/ou inibidas garantindo a estabilidade celular (BURKE, 1986; LEPRINCE; HENDRY; MCKERSIE, 1993).

As interações da água com os constituintes da semente para a detecção dos vidros aquosos podem ser analisadas utilizando-se a calorimetria diferencial de varredura.

Vidros aquosos estabilizam macromoléculas, garantindo quiescência metabólica, prevenindo reações entre os metabólitos e, além disso, suprimindo ou prevenindo a cristalização de solutos no citoplasma (ROSA et al., 2008). As propriedades calorimétricas da água e os parâmetros da formação de vidros aquosos no citoplasma (vidroscitoplasmático) de sementes de café foram investigados por Rosa et al. (2008), que buscaram obter informações adicionais sobre as causas da sensibilidade à dessecação e do baixo potencial de armazenamento dessas sementes. Os autores concluíram que as propriedades térmicas da água nas sementes, tais como os parâmetros da formação dos vidros aquosos e a proporção entre a água congelável/não congelável, não estão relacionadas a baixa sensibilidade das sementes à dessecação. Os resultados indicaram que sementes de café podem não ser beneficiadas pela proteção conferida pelos vidros aquosos durante a secagem e o armazenamento, uma vez que a sua formação foi observada apenas em temperaturas abaixo de -15 °C.

Eira (1999), estudando aspectos biofísicos da tolerância à desidratação e baixa temperatura em sementes e embriões de várias espécies de *Coffea*, concluiu que o conteúdo de água não congelável foi semelhante entre as espécies, e que sementes de espécies mais tolerantes sobrevivem à remoção de maior parte dessa água. A vitrificação do citoplasma das sementes foi semelhante entre as espécies estudadas, levando à inferência de que a vitrificação, por si só, não é suficiente para conferir às sementes, tolerância à desidratação.

Por outro lado, Eira (1999) observou características diferenciadas de capacidade calorífica da água nas sementes entre as espécies, tendo, para a mais tolerante (*C. racemosa*)

sido obtidas duas curvas, delimitando uma região onde ocorreria a vitrificação e a menos tolerante não apresentou esta região (*C. liberica*).

2.7 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Análise Térmica é um termo que abrange um grupo de técnicas nas quais uma propriedade física ou química de uma substância, ou de seus produtos de reação, é monitorada em função do tempo ou temperatura, enquanto a temperatura da amostra, sob uma atmosfera específica, é submetida a uma programação controlada (DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

Na técnica Calorimetria diferencial de varredura, as variações de entalpia são monitoradas em relação a um material de referência termicamente inerte. A amostra e o material de referência são mantidos à mesma temperatura durante o programa térmico, sendo controlada a diferença de energia necessária para manter as amostras na mesma temperatura. Os eventos térmicos que ocorrem na amostra aparecem, então, como desvios da linha de referência na forma de picos negativos ou positivos, dependendo se a energia está sendo fornecida (endotérmico) ou retirada (exotérmico) (DENARI; CAVALHEIRO, 2012; BHUSNURE, 2016).

Existem dois tipos de equipamentos que realizam a calorimetria diferencial de varredura, o DSC de compensação de energia e o DSC de fluxo de calor. No DSC por compensação de energia, a amostra e a referência são colocadas em compartimentos diferentes com fontes de aquecimento individuais, onde a temperatura e a energia são monitoradas. A potência dissipada pelos aquecedores é relacionada com a energia envolvida no processo endotérmico ou exotérmico. Um gráfico da energia fornecida pelos aquecedores é formado, possibilitando quantificar as transformações uma vez que a compensação de calor é proporcional à energia envolvida na reação (DENARI; CAVALHEIRO, 2012).

No DSC por fluxo de calor, no compartimento (forno) os cadinhos são dispostos sobre uma base de um metal altamente condutora. A amostra e a referência são aquecidas pelo mesmo sistema de fornecimento de energia. Cada vez que a amostra reage, um fluxo de energia se estabelece entre os cadinhos, através da base de metal. Os dados na forma de potencial elétrico correspondente ao aumento da temperatura de ambos os cadinhos no interior do forno devem aumentar linearmente e simetricamente. Assim, uma curva de potencial *versus* tempo pode ser computada. O fluxo é então mensurado através dos sensores de temperatura posicionados sob cada cadinho, obtendo-se assim, um sinal proporcional à diferença de capacidade térmica entre a amostra e a referência (GILL et al., 2010).

A técnica de DSC é aplicada em catálises, condutividade térmica, controle de qualidade, determinação de pureza, diagramas de fase, entalpia das transições, estabilidade térmica e oxidativa, grau de cristalinidade, intervalo de fusão, nucleação, transição vítrea, transições mesofase, taxas de cristalização e reações (BHUSNURE, 2016).

Diante do exposto, observa-se que a técnica de DSC na análise calorimétrica da água contida em sementes é uma importante ferramenta em estudos sobre a tolerância à dessecação e criopreservação, podendo trazer informações adicionais relevantes, que contribuam para a elucidação das causas da baixa longevidade de sementes de café, quando submetidas a diferentes velocidades de desidratação e expostas a criopreservação.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399-406, Oct./Dec. 2014.
- 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.
- ANJUM, N. A et al. Catalase and ascorbate peroxidase-representative H₂O₂-detoxifying heme enzymes in plants. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 19. p. 19002–19029, Oct. 2016.
- ARAUJO, R. F. et al. Conservação de sementes de café (*Coffea arabica* L.) despulpado e não despulpado. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 3, p. 71-78, maio 2008.
- ARORA, A.; SAIRAM, R. K.; SRIVASTAVA, G. C. Oxidative stress and antioxidant system in plants. **Current Science**, Bangalore, v. 82, n. 10, p. 1227-1238, May 2002.
- BAZIN, J.; BATLLA, D.; DUSSERT, S.; MAAROUF-BOUTEAU, H.; BAILLY, C. Role of relative humidity, temperature, and water status in dormancy alleviation of sunflower seeds during dry after-ripening. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 627-640, 2011.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 16, n. 1, p. 1-15, Mar. 2006.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds? **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 12, p. 22-55, 2000 (Edição Especial).
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective. **Annals of Botany**, v.101, p.213–228, 2008.
- BHUSNURE, O. G. Solid sample differential scanning calorimetry in biopharmaceutical discovery and development. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 5, Issue 1, 2016.
- BRANDÃO, E. D. et al. Períodos de secagem na qualidade fisiológica de sementes de *Licania rigida* Benth **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 28, n. 4, p. 1798-1806, out./dez., 2018.
- BURKE, M. J. The glassy state and survival of anhydrous biological systems. In: LEOPOLD, A. C. (Ed.) **Membrane, metabolism and dry organisms**. Ithaca, Cornell: University Press, 1986. p 358–363.
- CAMPOS, C. N. et al. Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young *Coffea arabica* L. plants, **Agricultural Water Management**, v. 211, p. 37-47, jan. 2019.
- CARVALHO, A.; MÔNACO, L. C.; CAMPANA, M. P. Melhoramento do cafeeiro XXVII Experimentos de seleções regionais de Jaú. **Bragantia**, Campinas, v. 23, p.129-142, 1964.

CARVALHO, A.; MONACO, L.C. Relaciones geneticas de especies seleccionadas de Coffea. **Cafe**, Lima, v. 9, n. 4, p.1-19, 1968.

CHARRIER, A.; BERTHAUD, J. Botanical Classification of Coffee. In: CLIFFORF, M.N.; WILLSON, K.C. (Eds.). **Coffee: Botany, Biochemistry, and Production of Beans and Beverage**, Croom Herm, Westport, London,1985. p.13-47.

CHEN, Q.; YANG, L.; AHMAD, P.; WAN, X.; HU, X. Proteomic profiling and redox status alteration of recalcitrant tea (*Camellia sinensis*) seed in response to desiccation. **Planta**, v. 233, n. 3, p. 583-592, 2011.

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.

CHOUDHURY, D.; SAHU, J. K.; SHARMA, G. D. Moisture sorption isotherms, heat of sorption and properties of sorbed water of raw bamboo (*Dendrocalamus longispatus*) shoots. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 211-216, 2011.

CLEMENTE, E. Purification and thermo stability of isoperoxidase from oranges. **Phytochemistry**, v. 49, n. 1, p. 29-36, 1998.

COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491 June 2015.

COELHO, S. V. B. et al. Tolerance of Coffea arabica L. seeds to sub-zero temperatures. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 41, n. 3, p. 312-321, jun. 2017.

COLVILLE, L.; KRANNER, I. Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. **Plant Growth Regulation**, v. 62, n.3, p. 241-255, 2010.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de café**. Safra 2018. Quarto levantamento, Brasília. v. 5. n. 4. p. 1-84, dez. 2018.

COUTO, C. C. et al. *Coffea arabica* and *C. canephora* discrimination in roasted and ground coffee from reference material candidates by real-time PCR. **Food Research International**, v. 115, p. 227-233, 2019.

DANKOWSKA, A.; DOMAGAŁA, A.; KOWALEWSKI, W. Quantification of Coffea arabica and Coffea canephora var. robusta concentration in blends by means of synchronous fluorescence and UV-Vis spectroscopies. **Talanta**, v. 172, p. 215-220, jan. 2017.

DENARI, G. B.; CAVALHEIRO, E. T. **Princípios e Aplicações de análise térmica**. São Carlos: IQSC, jul/ago. 2012. 40 p.

DUMAN, Y.; YILMAZ, M. Investigation of in vitro salt stress on peroxidase enzyme of Amsonia orientalis and purification of peroxidase from non-stressed and salt-stressed plants. **Bulgarian Chemical Communications**, v. 5, p. 53 – 59 2018 (Special Issue I).

DUSSERT, S.; CHABRILLANGE, N.; ENGELMANN, F.; ANTHONY, F.; HAMON, S. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds: importance of the precooling temperature. **CryoLetters**, Cambridge, v.18, p. 269-276, 1997.

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge, v. 27, n. 3, p. 169-178, May/June. 2006.

EIRA, M. T. S. et al. Coffee seed physiology. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Minireview, v. 18, n. 1, p. 149-163, 2006.

EIRA, M. T. S. et al. Tolerance of coffee spp. seeds to desiccation and low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 97-105, ago. 1999.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour? I. Coffee. **Journal Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174, 1990.

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

ETIENNE, H.; ANTHONY, F.; DUSSERT, S.; FERNANDEZ, D.; LASHERMES, P.; BERTRAND, B. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, Columbia, v. 38, p. 129-138, 2002.

FAZUOLI, L. C. et al. Cultivares de café arábica de porte alto. In: CARVALHO, C. H. S., (ed) **Cultivares de café: Origem, características e recomendações**. Brasília, DF: Embrapa Café, 2008. p. 225-252.

FERNANDES, P. et al. Cryopreservation of *Quercus suber* somatic embryos by encapsulation-dehydration and evaluation of genetic stability. **Tree Physiology**, Oxford, v. 28, n. 12, p. 1841-1850, Aug. 2008.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 2, p. 150-158, 2017.

FREITAS, R. T. et al. Cryopreservation of *Coffea arabica* L. Zygotic Embryos by Vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v .44, n. 2, p. 445-451, 2016.

GILL, S. S. et al. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. REVIEW. **Journal of Biomolecular Techniques**, v. 21, p. 167–193, 2010.

GILL, S. S. et al. Superoxide dismutase - mentor of abiotic stress tolerance in crop plants. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 22, n. 14, p. 10375-10394, July 2015.

- GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, p. 1-13, jan. 2008.
- GUNNING, Y.; DEFERNEZ, M.; WATSON, A.D.; BEADMAN, N.; COLQUHOUN, I.J.; LE GALL, G.; KEMSLEY, E.K.; 16-O-methylcafestol is present in ground roast Arabica coffees: Implications for authenticity testing. **Food Chemistry**, v. 248. p. 52-60. 2018.
- 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.
- HEYNO E.; MARY, V.; SCHOPFER P.; KRIEGER-LISZKAY, A. Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. **Planta**, v. 234, n. 1, p. 35–45, 2011.
- INZÉ, D.; MONTAGU, M.V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1995.
- ISHIKAWA, M.; SUZUKI, M.; NAKAMURA, T.; KISHIMOTO, T.; ROBERTSON, A. J.; GUSTA, L.V. Effect of growth phase on survival of Bromegrass suspension cells following cryopreservation and abiotic stresses. **Annals of botany**, v. 97, p. 453-459, 2006.
- JOSÉ, A. C.; DA SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C.; MELO, A. J. S.; TOOROP, P. E. Effects of drying rate and storage time on *Magnolia ovata* Spreng. seed viability. **Seed Science and Technology**, v. 39, p. 425-434, 2011.
- JOSÉ, S.C. B. R.; SALOMÃO, A. N.; MUNDIM, R. C.; PÁDUA, J. G. Umidificação de sementes de girassol após ultrassecagem em sílica gel e câmara de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p.16-26, 2009.
- KAVIANI, B. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. **Aust J Crop Sci** v. 5, p. 778-800, jun. 2011.
- KIBINZA, S.; BAZIN, J.; BAILLY, C.; FARRANT, J. M.; CORBINEAU, F.; EL-MAAROUF-BOU-TEAU, H. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v. 181, n. 3, p. 309-315, 2011.
- KUMAR, V.; NAIDU, M. M.; RAVISHANKAR, G. A. Developments in coffee biotechnology: In vitro plant propagation and crop improvement. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 87, p. 49-65, Oct. 2006.
- LASHERMES, P.; COMBES, M. C.; ROBERT, J.; TROUSLOT, P.; D'HONT A.; ANTHONY, F.; CHARRIER, A. Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. **Mol. Gen. Genet.**, v. 261, p. 259-266, 1999.
- LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Desiccation tolerance: from genomics to the field. **Plant Science**, v.179, p. 554-564, 2010.

- LEPRINCE, O.; HENDRY, G. A. F.; MCKERSIE, B. D. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 3, p. 231-246, 1993.
- MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495 p.
- MARTINS, A. L. M. et al. Avaliação de progênies dos cafês Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho na região de Pindorama (SP). **Bragantia**, Campinas, v. 51, n. 1, p. 31-38, 1992.
- MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A. Tolerância à dessecação de sementes de palmito-vermelho (*Euterpe espirosantensis* Fernandes). **Revista Brasileira de Botânica**. São Paulo, v. 22, n. 3, p. 391-396, 1999.
- MATHEIS, G. Enzymatic browning of foods. **Z. Lebensm Unters. Forsch.**, v. 176, Issue 6, p. 176- 454, nov. 1983.
- MENGES, M.; MURRAY, J. A. H. Cryopreservation of transformed and wild-type Arabidopsis and tobacco cell suspension cultures. **The plant Journal**, v. 37, p. 635-644, 2004.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, Cambridge, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.
- MOLINA, T. F. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 72-81, 2006.
- NOGUEIRA, J. G. A.; NEVES, M. F. **Estratégia para a cafeicultura no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2015.
- OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T. Cultura do Café: histórico, classificação e fases de crescimento. **Revista Faculdade Montes Belos**, v. 5, n. 4, p. 17-32, 2012.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plant (crops and forest trees). In: RUANE J.; SONNINO, A. (Eds.). **The role of biotechnology in exploring and protecting agricultural genetic resource**. Rome: FAO, 2005.
- PANIS, B.; LAMBARDI, M. Status of cryopreservation technologies in plants (crops and forest trees). **The Role of Biotechnology**, v. 5, n. 7, p.43-54, 2006.
- PANIS, B.; STROSSE, H.; VAN DEN HENDE, S.; SWENNEN, R. Sucrose preculture to simplify cryopreservation of banana meristem cultures. **CryoLetters**, v. 23, n. 6, p. 375-384, 2002.
- PINTO, M. S. et al. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 40, n. 4, p. 380-389, ago. 2016.
- PINTO-MAGLIO, C. A. F.; CRUZ, N. D. Pachytene chromosome morphology in Coffea L. I. Nucleolar chromosomes. **Caryologia**, v. 40, p. 7-23, 1987.

POPOVA, E.; KIM, H. H.; PAEK, K. Y. Cryopreservation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) somatic embryos using sucrose preculture and air desiccation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 124, n. 4, p. 522-528, May. 2010.

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.

PUKACKA, S.; MALEC, M.; RATAJCZAK, E. ROS production and antioxidative system activity in embryonic axes of *Quercus robur* seeds under different desiccation rate conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, n. 6, p. 2219-2227, 2011.

RAMÍREZ, M. E.; SALCEDO, J. Los recursos fitogenéticos y la importância estratégica de su conservación em las Américas. In: GONZALEZ-ARNÃO, M. T.; ENGELMANN, F. (Eds.). **Crioconservación de plantas en América Latina y el Caribe**. San José, Costa Rica: IICA. 2013. P .37-51.

ROSA, S. D. V. F et al. Propriedades calorimétricas da água e vidros citoplasmáticos associados à tolerância a dessecação em sementes de *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO DE PESQUISAS CAFEIRAS. 2008. 34,. **Anais...** Caxambu, MG, 2008.

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

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

SAKAI, A.; Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F.; TAKAGI, H. (Ed.). **Cryopreservation of tropical plant germplasm: current research progress and application**. Cambridge: Cambridge University, 2000. p. 1-7.

SANTANA-BUZZY, N. et al. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant**, v. 43. p. 507–520, 2007.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação de eixos embrionários de espécies de Citrus usando encapsulamento e desidratação. **Boletim Técnico**. Brasília: EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2004. p. 23.

_____. Criopreservação de germoplasma vegetal: A alternativa para conservação a longo prazo. **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**, n. 20, p. 60-65, maio/jun. 2001.

_____. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.70- 84, 2000.

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

SCHMIDT, L. **Guide to handling of tropical and subtropical forest seed**. Humlebaek – Denmark: Danida Forest Seed Centre, 2000.

- SEIDEL, G. E. J. Cryopreservation of equine embryos. *Veterinary Clinics of North America: Equine Pract*, v. 12, n. 1, p. 85-99, April/1996.
- SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI M. "Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions," *Journal of Botany*, v. 2012, Article ID 217037, 26 p, 2012.
- 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.
- SIMOES-COSTA, M. C.; CARAPUCA, E.; MOURA, I. R. Somatic embryogenesis induction in different genotypes of *Coffea* spp. *Acta horticulturae*, v. 812, p. 295-300, 2009.
- SOUSA, V. A. de. Criopreservação de pólen de *Eucalyptus* spp. *Boletim de Pesquisa Florestal*, Colombo, n. 21, p.15-19, dez. 1990.
- STANWOOD, P; BASS, L. Seed Germplasm Preservation Using Liquid Nitrogen. *Seed Science and Technology*, v. 9, p. 423-437, 1981.
- STEINMACHER, D. A. et al. Cryopreservation of peach palm zygotic embryos. *Cryo Letters*, Cambridge, v. 28, n. 1, p. 13-22, jan./feb. 2007.
- TOLEDO, F. F.; MARCOS-FILHO, J. **Manual de sementes: tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977. 224 p.
- UCHENDU, E. E. et al. Vitamins C and E improve regrowth and reduce lipid peroxidation of blackberry shoot tips following cryopreservation. *Plant Cell Reports*, Berlin, v. 29, n. 1, p. 25-35, Jan. 2010.
- VARGHESE, B.; SERSHEN, BERJAK, P.; VARGHESE, D.; PAMMENTER, N. W. Differential drying rates of recalcitrant *Trichilia dregeana* embryonic axes: a study of survival and oxidative stress metabolism. *Physiologia Plantarum*, v. 142, n. 4, p. 326-338, 2011.
- VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIEGEL, J.; GALILI, G. (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. p. 237-271.
- VILLELA, F. A. Water relations in seed biology. *Sci. agric.*, Piracicaba, v. 55, p. 98-101, 1998. (Número Especial).
- VILLELA, F. A.; MARCOS-FILHO, J. Estados energéticos e tipos de água na semente. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 20, n. 2, p.79-83, 1998.
- VOLK, G. M.; WALTERS, C. Plant vitrification solution 2 lowers water content and alters freezing behavior in shoot tips during cryoprotection. *Cryobiology*, v. 52, p. 48-61, 2006.
- WALTERS, C. et al. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 465-484.

WANG, W.-Q.; MOLLER, I. M.; SONG, S.-Q. Proteomic analysis of embryonic axis of *Pisum sativum* seeds during germination and identification of proteins associated with loss of desiccation tolerance. **Journal of Proteomics**, v. 77, n. 21, p. 68–86, Dec. 2012.

WEN, B.; WANG, R. Pretreatment incubation for culture and cryopreservation of Sabal embryos. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 102, n. 2, p. 237-243, Aug. 2010.

WITHERS, L. A.; WILLIAMS, J. T. Conservação in vitro de recursos genéticos de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília. 1998. v.1, p. 297-330.

WOWK, B. Thermodynamic aspects of vitrification. **Cryobiology**, v. 60, n. 1, p. 11-22, 2010.

YORUK, R.; MARSHALL, M. R. Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. **J. Food Biochem**, v. 27, p. 361-422, 2003.

CAPÍTULO 2 ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS EM SEMENTES DE *COFFEA ARABICA* L. SUBMETIDAS À SECAGEM, RESFRIAMENTO E ARMAZENAMENTO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO.

RESUMO

A conservação de germoplasma vegetal em temperatura ultra-baixa, em nitrogênio líquido (-196 °C), é uma alternativa para o armazenamento a longo prazo de sementes classificadas como de comportamento intermediário, como as de café. Entretanto, para que essa técnica apresente sucesso, é de fundamental importância realizar pesquisas que garantam a manutenção da integridade celular antes e após a imersão em nitrogênio líquido. O objetivo neste estudo foi avaliar metodologias de criopreservação de sementes de café, realizando estudos fisiológicos, bioquímicos e ultraestruturais relacionados com os efeitos da desidratação, resfriamento e reaquecimento após exposição ao nitrogênio líquido. As sementes foram secadas por meio de sílica gel e/ou solução salina saturada até os teores de água 35, 20, 17, 12% (bu), submetidas a tratamentos de resfriamento lento nas velocidades -1° C min⁻¹ até as temperaturas finais de -40 °C e -50 °C por meio de um biocongelador, e foram reaquecidas em temperatura ambiente ou banho-maria por dois minutos a 40 °C. Outra parte das sementes foi diretamente imersa em nitrogênio líquido e após 36 horas de armazenamento foram reaquecidas em banho-maria por dois minutos a 40 °C. A qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* L. é reduzida à medida em que perde água durante a secagem. 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 e o perfil eletroforético das enzimas catalase e superóxido dismutase. As enzimas polifenol oxidase e peroxidase apresentam menor expressão 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. Identificou-se que danos nas membranas celulares são menos drásticos nas sementes que são crioarmazenadas após a secagem.

Palavras-chave: Secagem. Resfriamento. Crioconservação. Armazenamento a longo prazo. Qualidade fisiológica. Germinação. Enzimas. Microscopia eletrônica de varredura.

ABSTRACT

The conservation of plant germplasm at ultra-low temperature, in liquid nitrogen (-196°C), is an alternative for the long-term storage of seeds classified as intermediate behavior, such as coffee beans. However, for this technique to be successful, it is of fundamental importance to carry out researches that guarantee the maintenance of cellular integrity before and after immersion in liquid nitrogen. The objective of this study was to evaluate coffee seed cryopreservation methodologies, performing physiological, biochemical and ultrastructural studies related to the effects of dehydration, cooling and reheating after exposure to liquid nitrogen. The seeds were dried by silica gel and / or saturated saline until the water contents 35, 20, 17, 12% (bu) were submitted to slow cooling treatments at $-1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to final temperatures of -40°C and -50°C by means of a bio-freezer, and were reheated at room temperature or water bath for two minutes at 40°C . Another part of the seeds was directly immersed in liquid nitrogen and after 36 hours of storage they were reheated in a water bath for two minutes at 40°C . The physiological quality of *Coffea arabica* L. seeds is reduced as water loses during drying. The reheating at a temperature of 25°C or a water bath at 40°C of *Coffea arabica* L. seeds after precooling, at a rate of $1^{\circ}\text{C.min}^{-1}$ to -40°C , does not alter the physiological quality and the electrophoretic profile of the catalase and superoxide dismutase enzymes. The enzymes polyphenol oxidase and peroxidase present lower expression in *Coffea arabica* L. seeds reheated at a temperature of 25°C than in a water bath at 40°C , after precooling, at a rate of $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ to -40°C . Damage to cell membranes has been found to be less drastic in seeds that are cryo-stored after drying.

Keywords: Drying. Cooling. Cryopreservation. Long term storage. Physiological quality. Germination. Enzymes. Scanning electron microscopy.

1 INTRODUÇÃO

O café tem grande importância se destacando como a segunda *commodity* mais comercializada no mundo. Pertence ao gênero *Coffea* e possui duas grandes espécies de importância mundial, *Coffea arabica* e *Coffea canefora*, conhecidas como café arábica e conilon, respectivamente (CAMPOS et al., 2019). A cafeicultura possui grande importância econômico-social no Brasil, que há mais de 150 anos tem sido o maior produtor e exportador mundial de café (BALIZA et al., 2013). Devido à grande importância econômica, a conservação da diversidade genética torna-se fundamental. Visando garantir o armazenamento seguro de recursos genéticos do cafeeiro, os pesquisadores têm buscado o aprimoramento de técnicas de armazenamento de sementes intermediárias em baixas temperaturas, como a criopreservação (TRIGIANO; GRAY, 2011; BERJAK; PAMMENTER, 2014).

A criopreservação é um método importante para o armazenamento a longo prazo de recursos genéticos (REED, 2008; REED et al., 2011). Para ser bem-sucedida deve-se evitar a formação de cristais de gelo dentro das células. Assim, as técnicas de desidratação, resfriamento e reaquecimento, e recuperação, são os principais fatores que influenciam o sucesso da criopreservação (SANTOS, 2000; ENGELMANN, 2011; PINTO et al., 2016).

As sementes precisam passar primeiramente por um processo de secagem antes de entrarem em contato com o nitrogênio líquido, o que evita a formação de cristais de gelo que podem levar à morte celular (PAMMENTER; BERJAK, 2014). A desidratação das sementes pode ser obtida pela secagem rápida através do uso de sílica gel, e a utilização de soluções salinas é indicada para uma desidratação lenta, no caso de sementes intermediárias (HAY et al., 2008). A desidratação induzida pelo resfriamento ocorre em protocolos de criopreservação baseados no resfriamento lento. Nesse processo, o resfriamento ocorre em uma velocidade controlada (1 a 10 °C por minuto) até uma temperatura previamente definida (-40 °C). À medida que a temperatura decresce e abaixo de 0 °C, a célula e seu meio externo inicialmente atingem um estado de super-resfriamento e, posteriormente, ocorre a formação de gelo no meio extracelular (SANTOS, 2000; ENGELMANN, 2011; PAMMENTER; BERJAK, 2014).

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

O sistema de membranas é afetado negativamente pela formação de cristais de gelo, o que compromete a sua semi-permeabilidade (ENGELMANN, 2011). Além disso, os processos de resfriamento e reaquecimento podem levar à desnaturação de enzimas e geração de espécies reativas a oxigênio ou EROs (BENSON; BREMNER, 2004; BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011; ROACH et al., 2008; WHITAKER et al., 2010). Essas EROs incluem o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e ânion superóxido (O^{2-}) (ASADA, 2006).

Pesquisas sobre a secagem, resfriamento e reaquecimento, relacionados à conservação do gênero *Coffea*, são encontrados na literatura com resultados divergentes em relação a esses parâmetros, seja pelo teor de água final, temperatura, ou pela velocidade de realização de cada etapa (DUSSERT; ENGELMANN, 2006; VIEIRA et al., 2007; ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015). Sendo assim, os efeitos dessas etapas em conjunto podem influenciar a qualidade final das sementes submetidas à criopreservação e, no geral, a criopreservação tem sido relatada como uma forma viável de conservação de *Coffea* spp. (SANTANA-BUZZY et al. 2007; FREITAS et al., 2016).

O sistema antioxidante é caracterizado por componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam na neutralização das EROs, prevenindo danos aos componentes celulares e mantendo a homeostase. A ativação do sistema antioxidante pode ser um mecanismo de tolerância das plantas aos estresses bióticos e abióticos (SILVEIRA et al., 2015). A reparação dos danos de membrana, causados pela peroxidação oxidativa depende da atuação de um sistema enzimático eficiente, composto, principalmente, pelas enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (PO). Estas atuam na remoção de radicais livres presentes nas células, neutralizando o oxigênio singlete e outros radicais livres, formados em condições de estresse (BERJAK, 2006; DUSSERT; ENGELMANN, 2006), como as que ocorrem durante a secagem.

Em condições inadequadas do processo de secagem do café podem ocorrer uma desorganização das membranas celulares que são particularmente suscetíveis a danos estruturais durante o processo (SAATH et al., 2010).

Alterações na membrana celular após a secagem, podem ser identificadas em análises ultra-estruturais do endosperma da semente de café. A retirada da água induz à contração da membrana plasmática e, conseqüentemente, à redução do volume celular, provocando uma aglomeração dos componentes citoplasmáticos (HOEKSTRA et al., 2001; SAATH et al. 2010).

O objetivo com o presente trabalho foi investigar diferentes protocolos de criopreservação de sementes de *Coffea arabica* L. descritos na literatura, avaliando efeitos antes e depois do resfriamento e após a imersão em nitrogênio líquido, sobre as características fisiológicas, bioquímicas e ultra-estruturais das sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção das sementes

Frutos em estágio de maturidade fisiológica (cereja), da espécie *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí amarelo IAC 62, foram colhidos em lavouras da Fazenda Experimental da Fundação Procafé, em Varginha (MG) e foram mecanicamente despulpados, sendo as sementes desmuciladas por fermentação em água, por período de 24 horas em temperatura ambiente, no Setor da Inova Café na UFLA. Posteriormente, as sementes foram secadas superficialmente à sombra, em camada única sobre telado na Unidade de Beneficiamento de Sementes da UFLA.

Após o processamento, as sementes foram submetidas à determinação do teor de água e avaliação da qualidade fisiológica inicial por meio do teste de germinação e de condutividade elétrica, no Laboratório Central de Sementes da UFLA.

Os protocolos investigados nesta pesquisa combinaram diferentes teores de água (43, 35, 20, 17 e 12% bu), diferentes métodos de secagem; rápida (sílica gel) e secagem lenta (solução salina saturada), etapa de resfriamento em biocongelador, armazenamento em nitrogênio líquido-196 °C (imersão em criotânques) e reaquecimento das sementes em temperatura ambiente 25 °C e em banho-maria 40 °C. Os efeitos de cada etapa da técnica de criopreservação, foram analisadas separadamente.

2.2 Etapa de secagem visando a criopreservação

Além da secagem das sementes à sombra, até o teor de 43% (bu), foram avaliados outros métodos de secagem em umidades mais baixas, visando a criopreservação.

Para a secagem em sílica, as sementes foram colocadas em recipientes herméticos contendo 60 gramas de sílica gel ativada e mantidos em câmaras B.O.D (*Biochemical Oxygen Demand*), reguladas a 25 °C, na ausência de luz. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,0001, até as amostras atingirem os teores de água de 35, 20, 17 e 12% (base úmida - bu).

Para a secagem em soluções salinas saturadas de sulfato de amônio e cloreto de sódio, foram utilizados os mesmos tipos de recipientes herméticos, em mesma temperatura. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança de precisão de 0,0001 até as amostras atingirem os teores de água de 17% (base úmida).

A secagem nestas soluções salinas saturadas propicia velocidades de secagens mais lentas que em sílica gel, tendo em vista que a umidade relativa na solução de sulfato de amônio é de 81% e no cloreto de sódio de 75%. A sílica gel tem capacidade de adsorção de água de no máximo, 30% do seu próprio peso (JOSÉ et al., 2011; COELHO et al., 2015).

As sementes secadas em sílica gel até teores de 35, 20, 17 e 12% (bu), bem como em solução salina de sulfato de amônio ou cloreto de sódio até 17% (bu) foram submetidas a avaliação fisiológica, por meio do teste de germinação e teste de condutividades elétrica de massa além da expressão de enzimas em gel de eletroforese. Na Tabela 1 estão descritos os procedimentos de secagem estudados nesta pesquisa.

Tabela 1 - Métodos de secagem e teor final de água nas sementes após secagem (TF) em sementes de *Coffea arabica* L.

| Método de secagem | TF (%bu) |
|---|-----------------|
| Sombra | 43 |
| Sílica gel | 35 |
| Sílica gel | 20 |
| Sílica gel | 17 |
| Solução saturada (NH ₄) ₂ SO ₄ (81% UR) | 17 |
| Solução saturada NaCl (75% UR) | 17 |
| Sílica gel | 12 |

Fonte: Da autora (2019).

2.3 Etapa de pré-resfriamento

As sementes secadas a 20 e 17% (bu) foram submetidas ou não ao pré-resfriamento que é uma etapa preparatória que pode ser utilizada antes da imersão no nitrogênio líquido.

Neste experimento, sementes secadas em sílica gel foram acondicionadas em embalagens trifoliadas 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 e antes da imersão em nitrogênio líquido, estas sementes foram submetidas a avaliações fisiológicas e bioquímicas utilizando-se os testes descritos abaixo. Para avaliação, as sementes foram reaquecidas em banho-maria a 40 °C por 2 minutos ou em bancada de laboratório a temperatura de 25 °C. conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - 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 |

Fonte: Da autora (2019).

2.4 Etapa de criopreservação e reaquecimento

Sementes foram secadas em sílica gel e embaladas em envelopes de papel alumínio ou criotubo, aquelas sementes secadas em solução salina saturada, pré resfriadas ou não, e imersas no nitrogênio líquido conforme descrito na Tabela 3 e, após 36 horas de criopreservação, foram retiradas rapidamente e reaquecidas em contato direto com a água, em equipamento de banho-maria a 40 °C ± 1 °C com o tempo de imersão de 2 minutos. Após este procedimento, as sementes foram submetidas às avaliações fisiológicas, bioquímicas e ultraestruturais.

Tabela 3 - Descrição das etapas dos protocolos de criopreservação investigados para sementes de *Coffea arabica* L.

| Secagem | Pré-Resfriamento |
|---|----------------------------------|
| Sílica gel até 20% bu | 1°C min. ⁻¹ até -40°C |
| Sílica gel até 17% bu | 1°C min. ⁻¹ até -40°C |
| Solução saturada (NH ₄) ₂ SO ₄ até 17% bu | 1°C min. ⁻¹ até -50°C |
| Sílica gel até 17% bu | Sem pré-resfriamento |
| Sílica gel até 20% bu | Sem pré-resfriamento |
| Solução saturada NaCl até 17% bu | Sem pré-resfriamento |

Fonte: Da autora (2019).

2.5 Determinação do teor de água

O teor de água nas sementes foi determinado pelo método de estufa a 105 °C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 10 sementes para cada parcela experimental. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso úmido das sementes.

Foram investigados neste trabalho, protocolos de criopreservação encontrados na literatura para sementes desta espécie, os quais, embora diverjam quanto aos protocolos de criopreservação, apresentaram resultados satisfatórios (DUSSERT et al., 1997, 1998, 2000; DUSSERT; ENGELMANN, 2006; EIRA et al., 2005; FIGUEIREDO, 2017).

2.6 Avaliação fisiológica

2.6.1 Teste de germinação e massa seca de plântulas

Realizado com oito repetições de 25 sementes para a avaliação dos efeitos do pré-resfriamento e quatro repetições de 50 sementes para os efeitos de secagem e criopreservação. As sementes foram semeadas em rolos de papel de germinação umedecidos com água destilada na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Placas de acrílico foram utilizadas para a semeadura e as sementes foram acondicionadas em germinador, regulado a 30 °C, na presença de luz, conforme metodologia (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, por 4 a 5 dias ou até massa constante. A massa seca foi determinada em balança de precisão e expressa em mg/plântula.

2.6.2 Teste de condutividade elétrica

Realizado no sistema de massa com quatro repetições de 12 sementes após secagem e pré-resfriadas, e quatro repetições de 25 sementes para os protocolos de criopreservação segundo metodologia de Krzyzanowsky, França Neto e Henning (1991), modificada. As sementes foram pesadas com precisão de duas casas decimais e, em seguida, colocadas em copos plásticos descartáveis contendo 18,7 mL de água destilada e deionizada para as sementes do protocolo de pré-resfriamento e 37,5 mL de água destilada e deionizada para as

sementes do protocolo de criopreservação. Após 24 horas de embebição à temperatura de 25 °C, a condutividade elétrica foi determinada em condutivímetro MS TECNOPON[®], modelo mCA 150, sendo os resultados expressos em $\mu\text{Scm}^{-1}\text{g}^{-1}$ de sementes.

2.7 Avaliação bioquímica

2.7.1 Expressão de isoenzimas em géis de eletroforese

Cinquenta sementes de cada tratamento foram armazenadas em temperatura de -80 °C até a realização das análises de isoenzimas por meio da técnica de eletroforese. As sementes, sem pergaminho, foram trituradas em moinho refrigerado a 4 °C, a 22.500 RPM, na presença de PVP (polivinilpirrolidona) e armazenadas em temperatura de -80 °C. Para a extração das enzimas foi utilizado o tampão Tris HCL 0,2M pH 8,0 + (0,1% de mercaptoetanol), na proporção de 320 μL por 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 40 μL do sobrenadante das amostras no gel e a corrida eletroforética efetuada a 150 V por 5 horas. Terminada a corrida, os géis foram revelados para as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (PO), polifenoloxidase (PPO) (MITTLER; ZILINSKAS, 1993; LEE; LEE, 2000; ALFENAS et al., 2006).

Os resultados da expressão de isoenzimas em gel de eletroforese foram analisados e interpretados visualmente.

2.7.2 Quantificação da atividade das enzimas antioxidantes

Amostras de todas as sementes a serem avaliadas foram retiradas após cada etapa e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C onde permaneceram até a quantificação. Para a quantificação da atividade das enzimas antioxidantes as amostras de sementes foram maceradas sem pergaminho com PVP (polivinilpirrolidona) em nitrogênio líquido. O extrato enzimático foi obtido pela pesagem de 100 mg de material macerado com uso do seguinte tampão de extração: fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), EDTA 0,1 mM, ácido ascórbico 10 mM e água (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998). O homogeneizado foi centrifugado a 13.000 g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado e utilizado nas

análises de quantificação das enzimas dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e polifenoxidase (PPO).

A atividade da SOD foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT) (GIANNOPOLITIS; RIES, 1977), em um meio de reação contendo fosfato de potássio 100 mM (pH 7,8), metionina 70 mM, EDTA 10 μ M, NBT 1 mM e riboflavina 0,2 μ M e extrato enzimático. As placas com o meio de reação e amostra, ou somente o meio de incubação com água (branco), foram iluminados, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W. As leituras foram realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições de ensaio.

A CAT foi avaliada segundo Azevedo et al. (1998), com modificações. A atividade dessa enzima foi estimada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm durante 3 minutos monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio em um meio de reação contendo fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0) e H₂O₂ 250 mM.

A atividade da PPO foi determinada conforme metodologia descrita por Kar e Mishra (1976). Adicionou-se 20 μ L do extrato enzimático, ajustado para 200 μ L de solução contendo fosfato de potássio 70 mM pH 7,0 e catecol 20 mM. Após incubação a 30 °C, por 10 minutos, a absorvância 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 reaquescimentos) com quatro repetições. Os resultados da etapa de secagem e criopreservação foram em delineamento inteiramente casualizado (DIC), composto de 6 tratamentos 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).

2.8 Análise ultraestrutural

As sementes foram imersas em solução fixativa *Karnovsky's* modificado (Glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2 e CaCl₂ 0,001M e armazenadas em geladeira por 24 hs. As amostras (frações de sementes) foram lavadas em tampão cacodilato 0,05M (três vezes de 10 min.) e, subsequentemente, foram desidratados em uma série ascendente de concentração de acetona (25, 50, 75, 90 e 100% por três vezes). A desidratação final foi realizada em um aparelho de ponto crítico

(BAL-TEC CPD 030). Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, com fita de carbono de dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio, cobertos com ouro em um aparelho de Sputter (BAL-TEC SCD 050) e observados no microscópio eletrônico de varredura Carl Zeiss LEO EVO® 40 VP. Imagens foram geradas e registradas digitalmente, com aumento de 1000X, nas condições de trabalho de 20Kv e distância de trabalho entre 7 e 8 mm.

2.9 Delineamento experimental

As avaliações foram conduzidas em delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial para os protocolos de pré-resfriamento (3 tipos de secagem x 2 reaquecimentos) com quatro repetições de 25 sementes. Os resultados da etapa de secagem e criopreservação foram compostos de 7 e 6 tratamentos com quatro repetições de 50 sementes respectivamente. Os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de *Scott-Knott*, a 5% de probabilidade (FERREIRA, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Etapa de secagem visando à criopreservação

Após os diferentes métodos de secagem, as sementes utilizadas neste experimento atingiram os teores de água descritos na Tabela 5. A sílica gel proporcionou secagem mais rápida das sementes, principalmente em relação à secagem na qual se utilizou solução saturada de sulfato de amônio.

Tabela 4 - Teor de água inicial (TI), taxa de secagem (TS), teor de água final após a secagem (TF), de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem.

| Método de secagem | TI (% bu) | TS (% h ⁻¹) | TF (% bu) |
|---|-----------|-------------------------|-----------|
| Sombra | 43,5 | - | - |
| Sílica gel 35% | 43,5 | 0,42 | 34,5 |
| Sílica gel 20% | 43,5 | 0,33 | 19,5 |
| Sílica gel 17% | 43,5 | 0,44* | 17,5 |
| Solução saturada de (NH ₄) ₂ SO ₄ 17% | 43,5 | 0,03*** | 16,5 |
| Solução saturada de NaCl 17% | 43,5 | 0,05**** | 17,3 |
| Sílica gel 12% | 43,5 | 0,28** | 12,5 |

*Sílica gel trocada após 48h de secagem; **Sílica gel trocada após 93h de secagem; ***Mudança para solução salina de NaCl após 524 hs; ****Mudança para sal de NaCl após 218 hs. O teor de água variou de 0,3 a 0,5.

Fonte: Da autora (2019).

As sementes com diferentes teores de água (TABELA 5) foram avaliadas no teste de germinação e de condutividade elétrica. De acordo com os resultados da análise de variância e dos resultados dos dados fisiológicos, não houve diferenças significativas para porcentagem de protrusão radicular ($p < 0,05$). Para as demais variáveis houve efeito da secagem das sementes. Pôde-se constatar a alta qualidade fisiológica das sementes secadas à sombra, com 91% de plântulas normais.

De modo geral, observou-se menor desempenho fisiológico quando a secagem foi realizada em sílica gel até os teores de água de 12% e 17% bu e em solução saturada (NH₄)₂SO₄ até os teores de água de 17% bu. Observou-se redução do vigor das sementes após os tratamentos de secagem, por meio das variáveis plântulas normais fortes, massa seca de raiz e condutividade elétrica.

Tabela 5 - Resultados médios de porcentagem de protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas normais fortes (PNF), plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), massa seca da raiz (MSR) (mg), de massa seca da parte aérea (MSPA)(mg) e condutividade elétrica (CE) ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$) de sementes de café secadas até diferentes teores de água.

| Teor de água | Secagem | PR | PN | PNF | FC | MSPA | MSR | CE |
|--------------|---|------|------|-------|------|------|------|-------|
| 43% | Sombra | 93 A | 91 A | 44 A | 86 A | 51 A | 09 A | 20 A |
| 35% | Sílica | 96 A | 91 A | 44 A | 90 A | 54 A | 08 A | 24 A |
| 20% | Sílica | 97 A | 91 A | 26 B | 87 A | 50 A | 08 A | 32 C |
| 17% | Sílica | 94 A | 82 B | 14 B | 71 B | 41 B | 05 C | 32 C |
| 17% | Sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 85% UR | 95 A | 88 A | 21 B | 75 B | 41 B | 07 B | 32 C |
| 17% | Sal (NaCl) 75% UR | 96 A | 94 A | 35 A | 90 A | 52 A | 08 A | 28 B |
| 12% | Sílica | 93 A | 80 B | 18 B | 62 B | 38 B | 05 C | 39 D |
| | CV | 3.30 | 5.11 | 29.16 | 9.39 | 8.23 | 8.51 | 10.20 |

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

Fonte: Da autora (2019).

Neste estudo, foi possível observar que, quando as sementes foram secadas até 12% e 17% (bu) houve uma redução de aproximadamente 10% do vigor quando comparados com as sementes secadas a sombra com 43% bu. Quando as sementes foram expostas a solução salina de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ também houve redução do vigor de 3%, supostamente causada pelo maior tempo de secagem das sementes em relação as demais, possivelmente causando danos às sementes.

No teste de condutividade elétrica, maior lixiviação de exsudados foram observados nas sementes que foram secas a 12% (bu) seguidas por aquelas que foram secas a 17% tanto na secagem rápida quanto na lenta, não diferindo daquelas com 20% (bu). Observa-se que à medida que as sementes são secadas, ocorre aumento da condutividade elétrica.

Coelho et al. (2015), relatam que sementes sensíveis à dessecação podem sobreviver a menores teores de água se submetidas a uma secagem mais rápida, assim, não há tempo suficiente para que os danos se acumulem. O processo de secagem causa estresse hídrico e oxidativo gerando espécies reativas de oxigênio (DUSSERT; ENGELMANN, 2006), o que pode afetar a viabilidade e vigor das sementes de café. De forma geral, observou-se maior qualidade fisiológica em sementes que foram submetidas à secagem rápida em sílica gel com teores de água 35 e 20% bu e solução salina saturada de NaCl.

Alguns autores têm associado a secagem rápida de sementes de café, como melhor método para se alcançar níveis mais baixos de teor de água das sementes sem a perda da viabilidade (DUSSERT; ENGELMANN, 2006; COELHO et al., 2015). Por outro lado, a secagem rápida apresenta maior potencial de dano ao endosperma do que aos embriões (COELHO et al., 2015), não sendo recomendada quando as sementes forem secadas a níveis intermediários e/ou armazenadas por longos períodos (VIEIRA et al., 2007).

3.2 Etapa de pré-resfriamento

Diferenças significativas foram observadas nos diferentes métodos de secagem com seus teores de água sobre os efeitos do reaquecimento. No geral, sementes com 17% (bu) secas em solução salina obtiveram menores médias nas duas temperaturas de reaquecimento testadas, exceto para as variáveis protrusão radicular e condutividade elétrica. 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. Apenas para a condutividade elétrica pôde-se observar diferenças significativas entre as temperaturas de reaquecimento para sementes com secagem rápida a 20% (bu), sendo observado que sementes reaquecidas em temperatura ambiente a 25 °C tiveram maior lixiviação de exsudados (TABELA 6).

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, com uma média geral de 94,5% de protrusão, 86,5% de plântulas normais, 18,75% de plântulas normais forte, 83% de folhas cotiledonares, 40% de massa seca de parte aérea e 7,7% de massa seca de raiz.

O reaquecimento pode ser feito de modo lento à temperatura ambiente ou rapidamente utilizando-se um 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 à 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). Segundo Mazur (1969), o reaquecimento lento é menos deletério para células vegetais, do que o rápido. O reaquecimento rápido reduz a possibilidade de recristalização do gelo intracelular, conduzindo assim, a maior recuperação e sobrevivência do material resfriado em nitrogênio líquido (PANIS; PIETTE; SWENNEN,

2005). Não só o processo de criopreservação, como também o método de reaquecimento, deve ser levado em consideração, pois quanto mais rápido ocorrer o reaquecimento das sementes, melhor a preservação de suas características fisiológicas (MOLINA et al., 2006).

Tabela 6 - 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)) e condutividade elétrica (CE ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$)) avaliadas após re-aquecimento em banho-maria (40 °C) ou temperatura ambiente (25 °C).

| | PR | | PN | | PNF | | FC | | MSPA | | MSR | | CE | |
|------------|-----------|-------|-----------|-------|------------|-------|-----------|-------|-------------|-------|------------|------|-----------|-------|
| | 25°C | 40°C | 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 | 63 Aa | 63 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 | 58 Aa | 60 Aa |
| 20% Sílica | 95Aa | 94Aa | 87Aa | 86Aa | 20Aa | 17Aa | 83Aa | 82Aa | 40Aa | 39Aa | 8Aa | 7Ba | 64Ab | 59Aa |
| CV | 7.33 | | 15.54 | | 60.79 | | 18.35 | | 21.11 | | 20.69 | | 8.97 | |

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

Fonte: Da autora (2019).

3.3 Etapa de criopreservação

As sementes criopreservadas por meio dos seis diferentes protocolos foram avaliadas após pré-aquecimento em banho-maria a 40 °C por 2 minutos. Para as sementes criopreservadas por meio dos protocolos, diferenças significativas foram observadas para todas variáveis testadas sendo que sementes com a secagem lenta, em solução salina saturadas, apresentaram menores médias (TABELA 7).

Tabela 7 - Efeito do armazenamento em criotânques (-196 °C) de sementes com diferentes teor de água (17 e 20% bu), resfriadas em biocongelador ou imersas diretamente em nitrogênio líquido sobre as porcentagens de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e condutividade elétrica.

| Teor de água/Secagem | Pré-Resfriamento | PR | PN | PNF | FC | MSPA | MSR | CE |
|---|-------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-------------|------------|-----------|
| 20% Sílica | -1°C min a -40°C | 91 A | 81 A | 12 A | 74 A | 33 A | 06 A | 28 A |
| 17% Sílica | -1°C min a -40°C | 93 A | 80 A | 10 A | 73 A | 33 A | 06 A | 29 A |
| 17% Sal (NH ₄) ₂ SO ₄ | -1°C min a -50°C | 21 B | 04 B | 01 C | 3 B | 1 B | 0 B | 28 A |
| 17% Sílica | Imersão direta | 93 A | 76 A | 08 B | 70 A | 32 A | 06 A | 29 A |
| 20% Sílica | Imersão direta | 91 A | 75 A | 22 A | 72 A | 35 A | 06 A | 26 A |
| 17% Sal (NaCl) | Imersão direta | 0 C | 0 B | 0 C | 0 B | 0 B | 0 B | 30 A |
| CV (%) | | 5.82 | 11.65 | 40.87 | 15.07 | 13.99 | 13.14 | 7.62 |

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

Fonte: Da autora (2019).

Uma possibilidade pode ser proposta para explicar a baixa sobrevivência após a exposição ao nitrogênio líquido observada nas sementes que foram secadas em solução salina saturada (TABELA 7) e não tiveram danos causados pela dessecação (TABELA 5) uma vez que as sementes após a secagem foram avaliadas com mais de 90% de germinação. Assim, danos podem ter ocorrido nas etapas de pré-resfriamento e reaquecimento após a criopreservação.

Pesquisas relacionadas a secagem, resfriamento e reaquecimento do gênero *Coffea*, apresentam resultados discordantes em relação a esses parâmetros (DUSSERT; ENGELMANN, 2006; VIEIRA et al., 2007; ABREU et al., 2014; COELHO et al., 2015, FIGUEIREDO, 2017). Nessas pesquisas, a criopreservação de sementes de *Coffea arabica* após secagem em soluções salinas saturadas, proporciona sementes com alta qualidade fisiológica. Contrariamente também, a alta qualidade obtida após criopreservação das sementes com umidade de 20% bu observada no presente trabalho, contraria os resultados de Coelho et al. (2017) e Figueiredo (2017). Assim, os efeitos dessas etapas em conjunto podem influenciar a qualidade final das sementes submetidas à criopreservação.

3.4 Análises bioquímicas

3.4.1 Expressão de isoenzimas em géis de eletroforese e quantificação da atividade das enzimas antioxidantes

As alterações bioquímicas foram avaliadas por meio da análise de padrões eletroforéticos de isoenzimas, e da quantificação da atividade das enzimas Catalase, Superóxido dismutase e Polifenoloxidase.

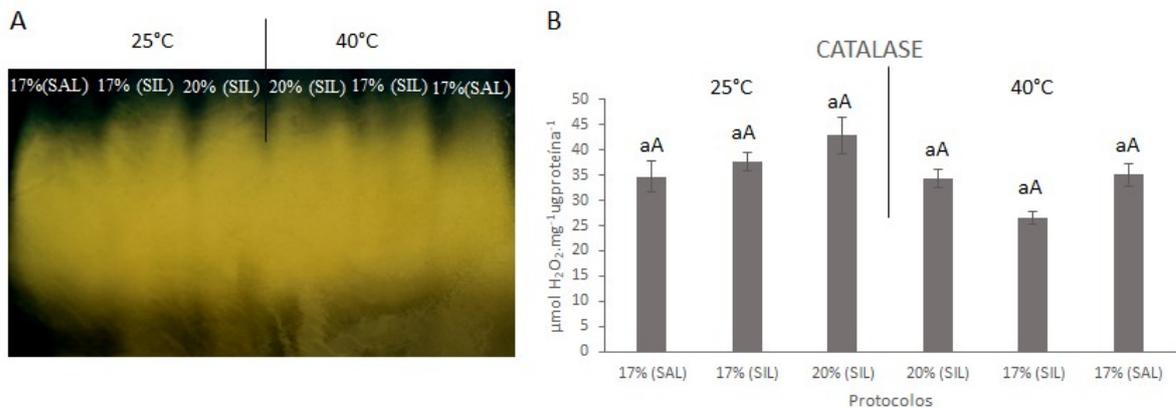
As catalases são enzimas indispensáveis para desintoxicação das células das plantas em condições de stress, pois elas são responsáveis pela dismutação direta de H_2O_2 em H_2O e O_2 , (GILL; TUTEJA, 2010). Não foram observadas diferenças na atividade entre as amostras que foram pré-resfriadas e reaquecidas em diferentes temperaturas (FIGURA 1A). Na Figura 2A observa-se que a enzima catalase apresentou menor atividade quando as sementes foram submetidas à secagem rápida com teor de água de 35% bu. Dentre as amostras que foram resfriadas e criopreservadas (FIGURA 3A) pode-se observar maior atividade da enzima nas sementes que foram secadas a 17% (bu) de teor de água, tanto na secagem rápida quanto na secagem lenta, sendo uma menor atividade observada nas sementes com secagem rápida a

20% teor de água. Nas amostras que foram imersas diretamente em criotânques, maior atividade foi observada nas sementes submetidas à secagem rápida.

De maneira geral, as sementes secadas à sombra com 43% (bu) teor de água e aquelas que tiveram a secagem rápida até 35% (bu) e criopreservadas com 20% bu, foram as que apresentaram uma menor atividade da enzima. Não foram observadas diferenças para a quantificação da atividade da catalase para as amostras das etapas de secagem, pré-resfriamento e criopreservação (FIGURA 1B, 2B e 3B).

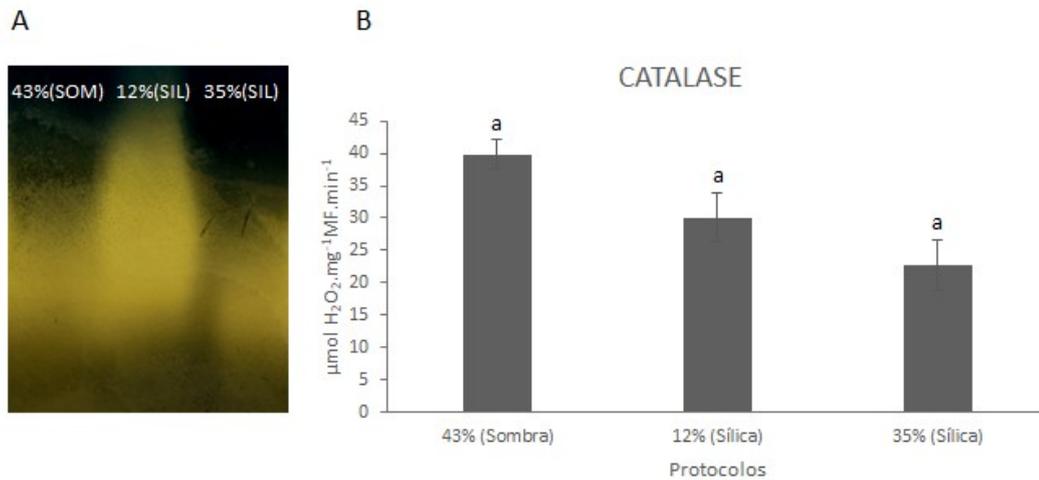
A enzima Catalase é oxirredutora e atua na remoção de radicais livres, durante estresses oxidativos (BERJAK, 2006), assim, a maior atividade pode estar relacionada com a maior intensidade de danos ocorridos durante a secagem das sementes. Estes resultados mostram que as sementes submetidas à secagem, possivelmente sofreram danos, como pode ser constatado pelos resultados do perfil, e quando as sementes sofreram uma pequena secagem.

Figura 1 - A) Padrão eletroforético e atividade da enzima Catalase 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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.



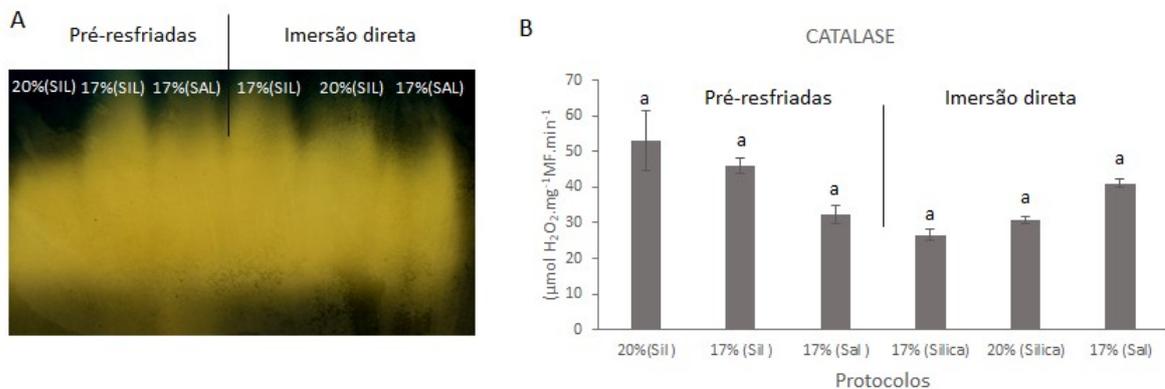
Fonte: Da autora (2019).

Figura 2 - A) Padrão eletroforético e atividade da enzima Catalase em sementes de *Coffea arabica* L. com diferentes teores de umidade. B) Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes. 1S) Sementes secadas a sombra com 43% (bu) de teor de água; 2S) Secagem em sílica gel até 12% (bu); 3S) Secagem em sílica gel até 35% (bu).



Fonte: Da autora (2019).

Figura 3 - A) Padrão eletroforético e atividade da enzima Catalase em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas aos protocolos de criopreservação. B) Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes. Secagem em sílica gel até 20% bu resfriada em biocongelador, imersão em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em sílica gel até 17% bu resfriada em biocongelador, imersão em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17% bu, resfriada em biocongelador, imersão em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em sílica gel até 17% bu, imersão direta em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em sílica gel até 20% bu imersão direta em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em solução saturada de NaCl até 17% bu, imersão direta em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C.

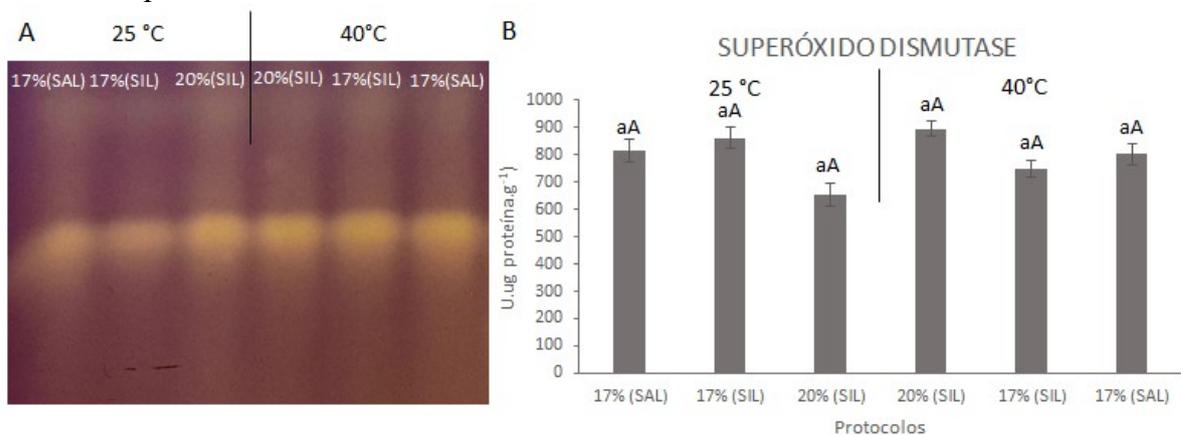


Fonte: Da autora (2019).

A superóxido dismutase (SOD) é uma das enzimas antioxidantes intracelulares mais eficazes, fornece a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos dos níveis elevados das espécies reativas de oxigênio realizando a dismutação do radical superóxido (O_2^\bullet), resultando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SINHA; SAXENA, 2006; GILL; TUTEJA, 2010).

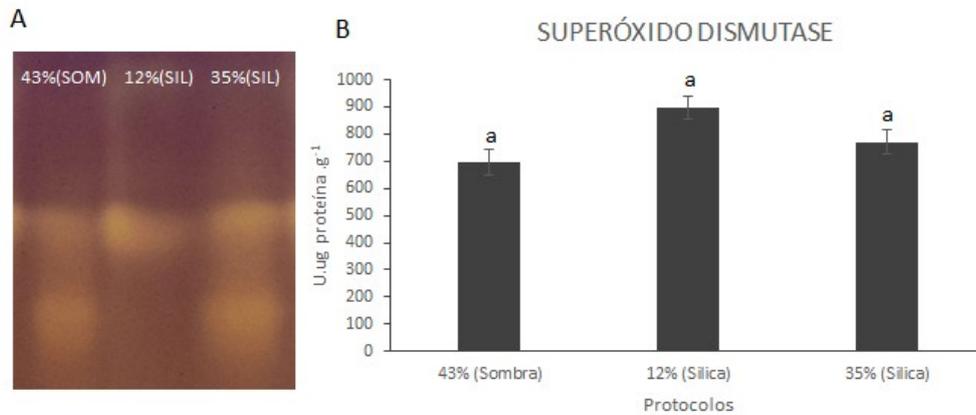
Pequenas diferenças foram observadas no perfil de expressão da isoenzima SOD. Para as sementes que foram pré-resfriadas, aquelas com secagem em sílica gel a 17% bu reaquecidas a 25 °C (protocolo 2R) teve uma menor atividade da enzima SOD (FIGURA 4A), podendo indicar uma possível redução de radicais livres devido a diminuição dos danos na secagem, e com o reaquecimento em temperatura ambiente. Não foram observadas diferenças na quantificação da atividade da SOD entre as amostras que foram secadas, secadas e pré-resfriadas em biocongelador e reaquecidas em diferentes temperaturas, e entre as amostras criopreservadas (FIGURA 4B, 5B e 6B).

Figura 4 - A) Padrão eletroforético e atividade da enzima Superóxido dismutase 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 $(NH_4)_2SO_4$ 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 $(NH_4)_2SO_4$ 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.



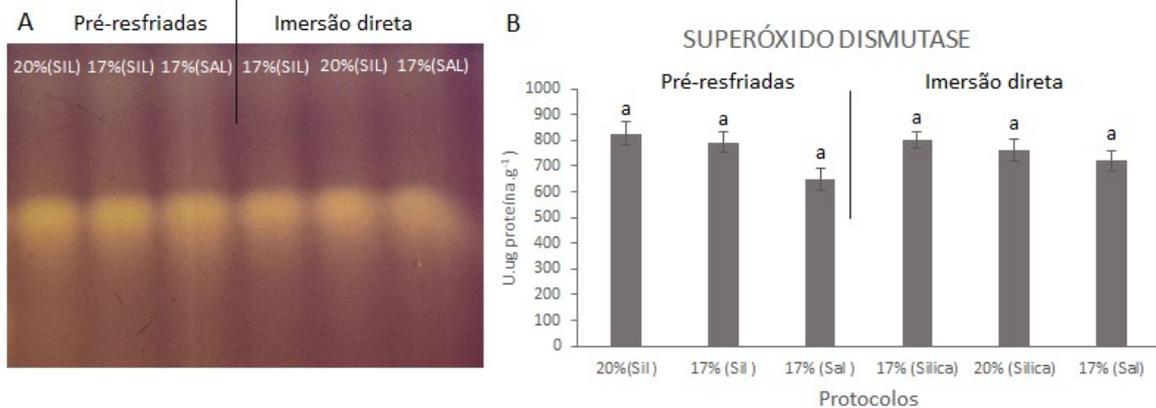
Fonte: Da autora (2019).

Figura 5 - A) Padrão eletroforético e atividade da enzima Superóxido dismutase em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes teores de água. B) Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes. Sementes secadas a sombra com 43% (bu) teor de água; Secagem em sílica gel até 12% (bu); Secagem em sílica gel até 35% (bu);



Fonte: Da autora (2019).

Figura 6 - A) Padrão eletroforético e atividade da enzima Superóxido dismutase em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas aos protocolos de criopreservação. B) Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes. Secagem em sílica gel até 20% (bu) resfriada em biocongelador, imersão em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em sílica gel até 17% (bu) resfriada em biocongelador, imersão em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17% (bu), resfriada em biocongelador, imersão em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em sílica gel até 17% (bu), imersão direta em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em sílica gel até 20% (bu); imersão direta em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em solução saturada de NaCl até 17% (bu), imersão direta em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C.



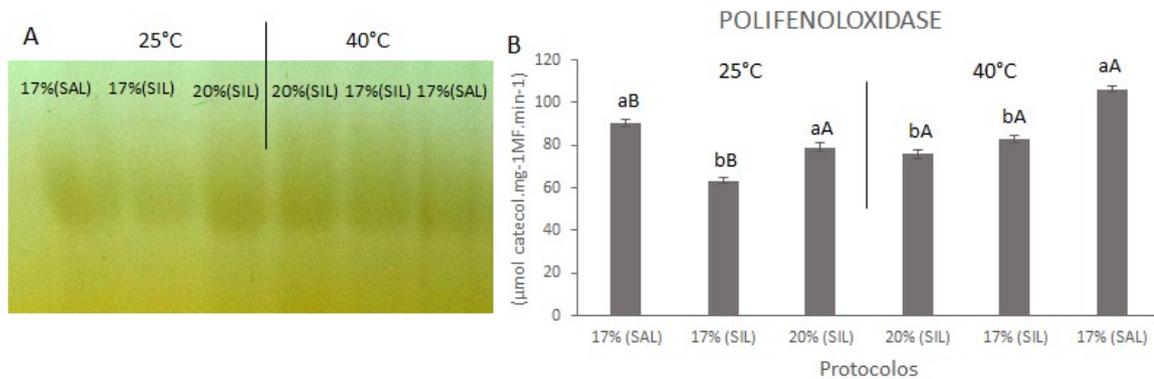
Fonte: Da autora (2019).

As polifenoloxidasas (PPO) fazem parte de um grande grupo de enzimas conhecidas como oxidoredutases, que oxidam fenóis a o-quinonas na presença de oxigênio molecular. É apontada como uma das enzimas importantes contra danos nos tecidos causados por injúrias mecânicas (LORENZETTI et al., 2018).

Uma menor atividade da PPO foi observada para as sementes que foram secas a 17% pré-resfriadas reaquecidas em temperatura ambiente (FIGURA 7A). Entre aquelas que foram criopreservadas (FIGURA 9A), as com 17% bu e pré-resfriadas aparentemente apresentaram uma menor atividade. A atividade da enzima polifenoloxidase entre as sementes que foram reaquecidas em temperatura ambiente foi maior naquelas que foram secadas em solução salina satura de nitrato de amônio a 17% bu e aquelas que foram secadas em sílica gel a 20% bu, diferindo estatisticamente das sementes que foram secadas em sílica gel a 17% bu. Para as sementes que foram reaquecidas em banho maria a 40 °C diferenças significativas foram observadas para aquelas que foram secadas em solução salina saturada (FIGURA 7B). Para as sementes que foram secadas a sombra 43%, em sílica gel a 35% e 12% bu, pode-se observar uma maior atividade das enzimas naquelas sementes com teor de umidade de 12% bu, no entanto, para a quantificação, não foram observadas diferenças significativas (FIGURA 8A e 8B).

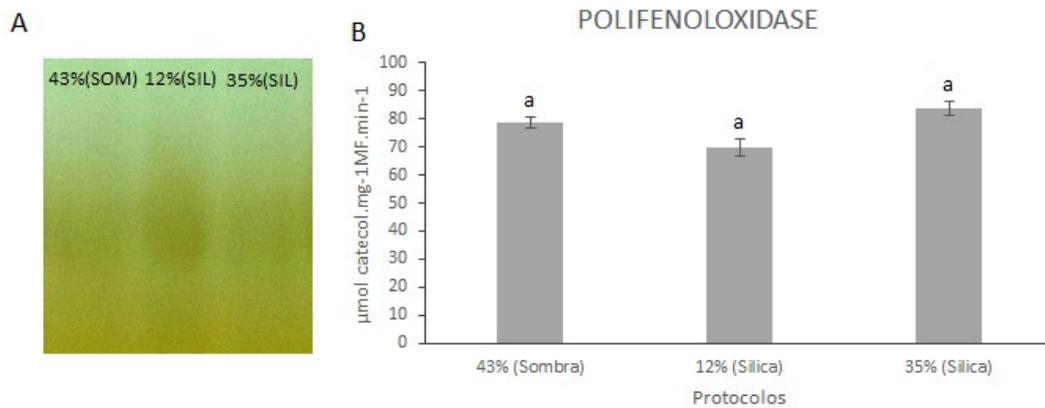
Entre as amostras que foram criarmazenadas não foram encontradas diferenças significativas para a atividade da polifenoloxidase (FIGURA 9A e 9B).

Figura 7 - 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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.



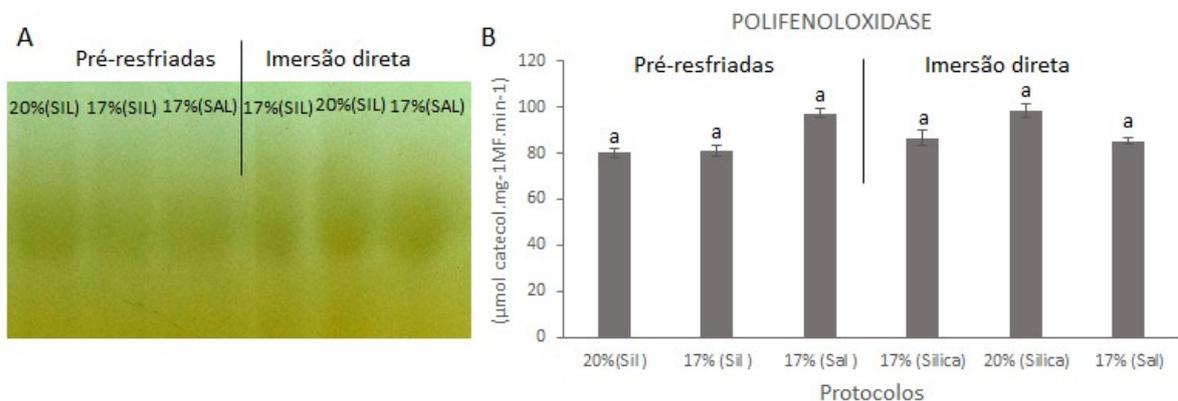
Fonte: Da autora (2019).

Figura 8 - A) Padrão eletroforético e atividade da enzima Polifenoloxidase em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferente teor de umidade. B) Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes. Sementes secadas a sombra com 43% (bu) de teor de água; Secagem em sílica gel até 12% (bu); Secagem em sílica gel até 35% bu.



Fonte: Da autora (2019).

Figura 9 - A) Padrão eletroforético e atividade da enzima Polifenoloxidase em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas aos protocolos de criopreservação. B) Quantificação da atividade de enzimas antioxidantes. Secagem em sílica gel até 20% (bu) resfriada em biocongelador, imersão em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em sílica gel até 17% (bu) resfriada em biocongelador, imersão em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17% (bu), resfriada em biocongelador, imersão em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40°C; Secagem em sílica gel até 17% (bu), imersão direta em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em sílica gel até 20% (bu) imersão direta em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C; Secagem em solução saturada de NaCl até 17% (bu), imersão direta em criotânque e reaquecida em banho-maria a 40 °C.



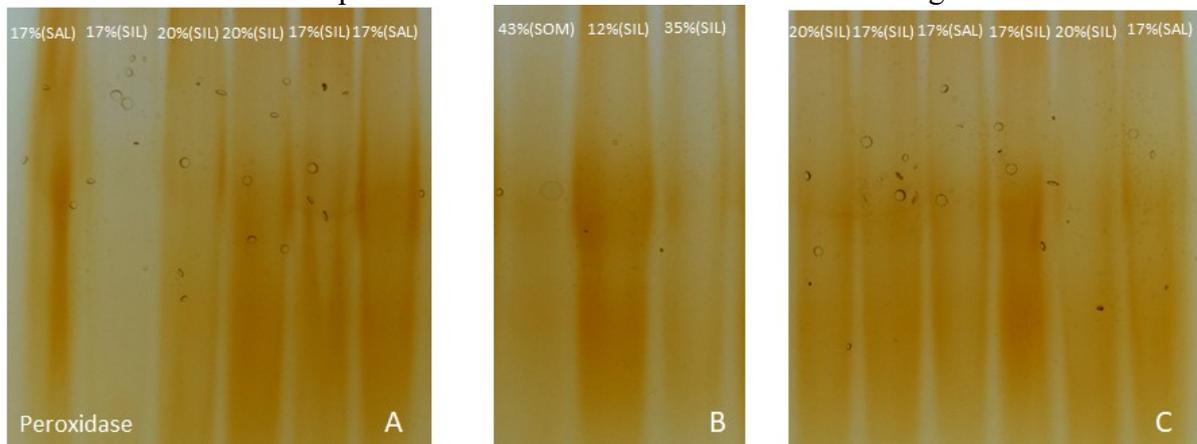
Fonte: Da autora (2019).

As peroxidases também desempenham um importante papel no mecanismo de limpeza de EROs e no afrouxamento da parede celular e reorganização. É uma classe de enzimas que cataliza a oxidoredução entre H_2O_2 e vários redutores participando de uma ampla variedade de processos fisiológicos nas plantas (NASCIMENTO; BARRIGOSI, 2014).

Neste trabalho, foi observado alterações dos perfis de peroxidase, menor atividade da PO foi observada para as sementes que foram secas a 17% resfriadas reaquecidas em temperatura ambiente (FIGURA 10 A). Sementes secadas a 12% bu apresentaram maior atividade entre aquelas que foram secadas a sombra 43% bu e secadas em sílica gel a 35% bu (FIGURA 10 B). A imersão direta de sementes com 17% bu secadas em sílica gel apresentou maior expressão da enzima peroxidase (FIGURA 10C). Nos resultados da avaliação fisiológica observa-se que houve uma redução (76%) de plântulas normais.

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).

Figura 10 - Padrão eletroforético da enzima Peroxidase em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem, pré-resfriamento e reaquecimento (A); com diferentes teores de água (B); e submetidas aos protocolos de criopreservação(C). A) Secagem em solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 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 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ até 17% (bu), resfriada em biocongelador e reaquecida em banho-maria a 40 °C; B) Perfil das sementes com 43% (bu) de teor de água; Secagem em Menor expressão das enzimas polifenoloxidase e peroxidase foram observadas em sementes reaquecidas em temperatura ambiente após pré-resfriamento para sementes com 17% bu secadas em sílica gel.



Fonte: Da autora (2019).

A atividade enzimática das enzimas catalase e superóxido dismutase não é alterada independentemente do método de reaquecimento utilizado após pré-resfriamento.

Atividade da polifenoloxidase foi 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 que foram reaquecidas em banho-maria a 40 °C apresentaram uma maior atividade da polifenoloxidase.

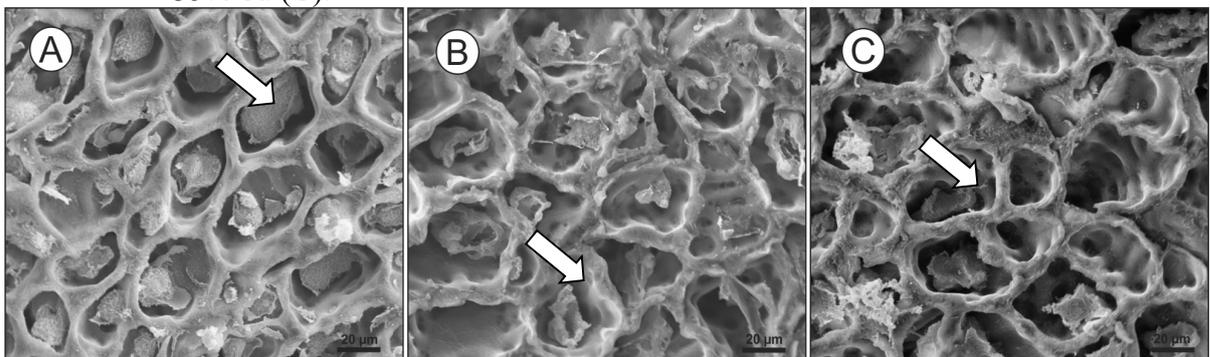
3.4.2 Avaliações ultraestruturais

As estruturas celulares nos endospermas de sementes de café submetidas aos procedimentos de pré-resfriamento, reaquecimento e criopreservação, foram avaliadas em microscopia eletrônica de varredura. As alterações devido aos efeitos da secagem nas

estruturas da membrana celular do endosperma do café e observadas nas eletromicrografias estão apresentadas na sequência.

Nas sementes com teor de água mais elevado (FIGURA 11A), notou-se que as células se apresentaram mais túrgidas e seu volume celular expandido. Por outro lado, sob o teor de água de 12% bu (FIGURA 11B), observou-se que houve contração do citoplasma, reduzindo seu volume celular, e com espaço entre a membrana plasmática e a parede celular. Essa redução pode comprometer a integridade da membrana citoplasmática, resultando no extravasamento do citoplasma (SAATH et al., 2010). Nas sementes com 35% bu (FIGURA 11C) pode-se observar que o citoplasma se contraiu, conseqüentemente, reduzindo seu volume celular, o conteúdo interno das células apresenta-se preenchido com o material celular e espaço entre a membrana plasmática e a parede celular. Pode-se observar que o citoplasma se contraiu de forma gradual até o teor de água 12% bu.

Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura em endosperma de sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a secagem. Sementes secadas a sombra com 43% bu teor de água (A); Secagem em sílica gel até 12% bu, (B); Secagem em sílica gel até 35% bu (C).



Fonte: Da autora (2019).

A retirada da água induz a membrana celular à contração e, conseqüentemente, à redução do volume celular, provocando uma aglomeração dos componentes citoplasmáticos, tornando o conteúdo da célula viscoso (HOEKSTRA et al., 2001; SAATH et al., 2010).

Saath et al. (2010) também observaram em eletromicrografias de endospermas de café secadas até 40% bu células preenchidas em alguns pontos e, em outros, contração do volume celular. À medida que o teor de água foi reduzido a 30% e 20% bu, houve comprometimento da estrutura celular das células do endosperma, e quando o café apresenta teor de água de 11% bu, o volume celular estava contraído.

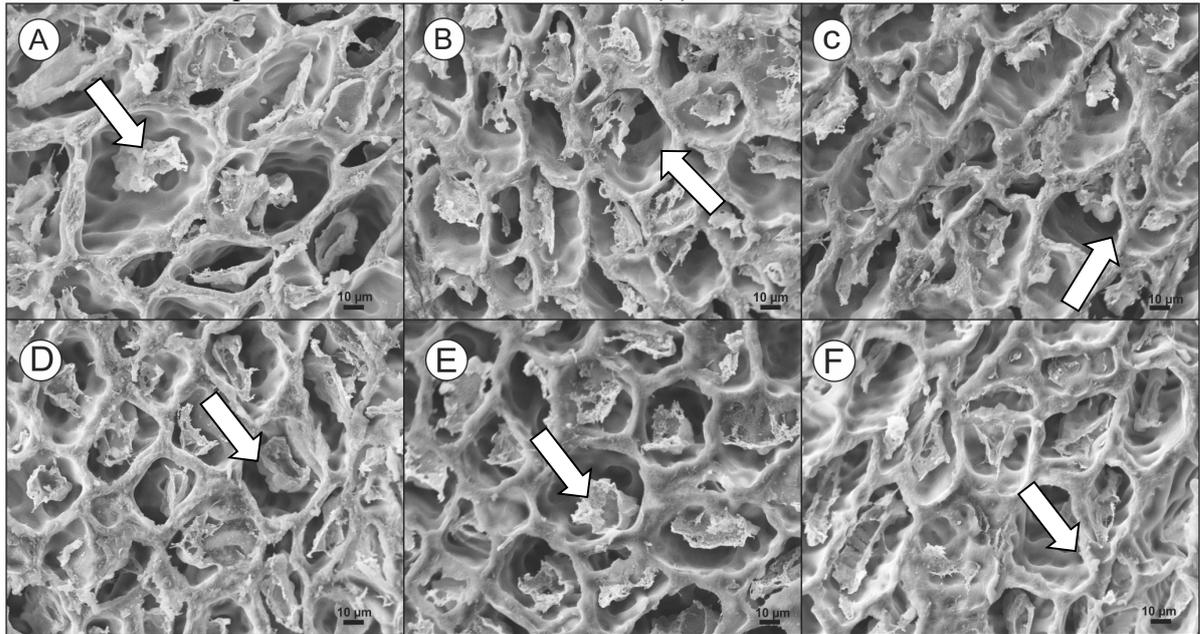
3.5 Análise ultraestrutural das sementes após pré-resfriamento

A Figura 12 apresenta as imagens de microscopia eletrônica de varredura das sementes de *Coffea arabica* que foram submetidas a diferentes métodos de secagem, pré-resfriadas e reaquecidas.

Nota-se que, tanto as sementes que foram reaquecidas em temperatura ambiente, quanto em banho-maria, apresentaram descolamento da membrana plasmática e contração do volume celular. A membrana plasmática sofre danos significativos com o processo de secagem, podendo provocar rupturas nas membranas celulares, e consequente extravasamento de parte do protoplasma no interior das células e nos espaços intercelulares (SAATH et al., 2010).

Comparando as sementes que foram reaquecidas em diferentes métodos, observa-se que sementes secadas em solução salina saturada de sulfato de amônio aquelas que foram reaquecidas a 40 °C apresentaram extravasamento do conteúdo celular significativo (FIGURA 12A e F). Sementes secadas em sílica gel a 17% bu apresentaram comportamento contrário onde, sementes que foram reaquecidas em temperatura ambiente apresentaram maior contração do volume celular (FIGURA 12B e E) e em sementes secadas em sílica gel até 20% bu (FIGURA 12C e D), observa-se que aquelas que foram reaquecidas em banho-maria a 40 °C apresentaram menor contração do volume celular.

Figura 12 - Microscopia eletrônica de varredura em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem, pré-resfriamento e reaquecimento. Secagem em solução salina saturada de sulfato de amônio até 17% bu reaquecida em temperatura ambiente a 25 °C (A); Secagem em sílica gel até 17% bu, reaquecida em temperatura ambiente a 25 °C (B); Secagem em sílica gel até 20% bu, reaquecida em temperatura ambiente a 25 °C (C); Secagem em sílica gel até 20% bu, reaquecida em banho-maria a 40 °C (D); Secagem em sílica gel até 17% bu, reaquecida em banho-maria a 40°C (E); Secagem em solução salina saturada de nitrato de amônio até 17% bu reaquecida em banho-maria a 40° C (F).

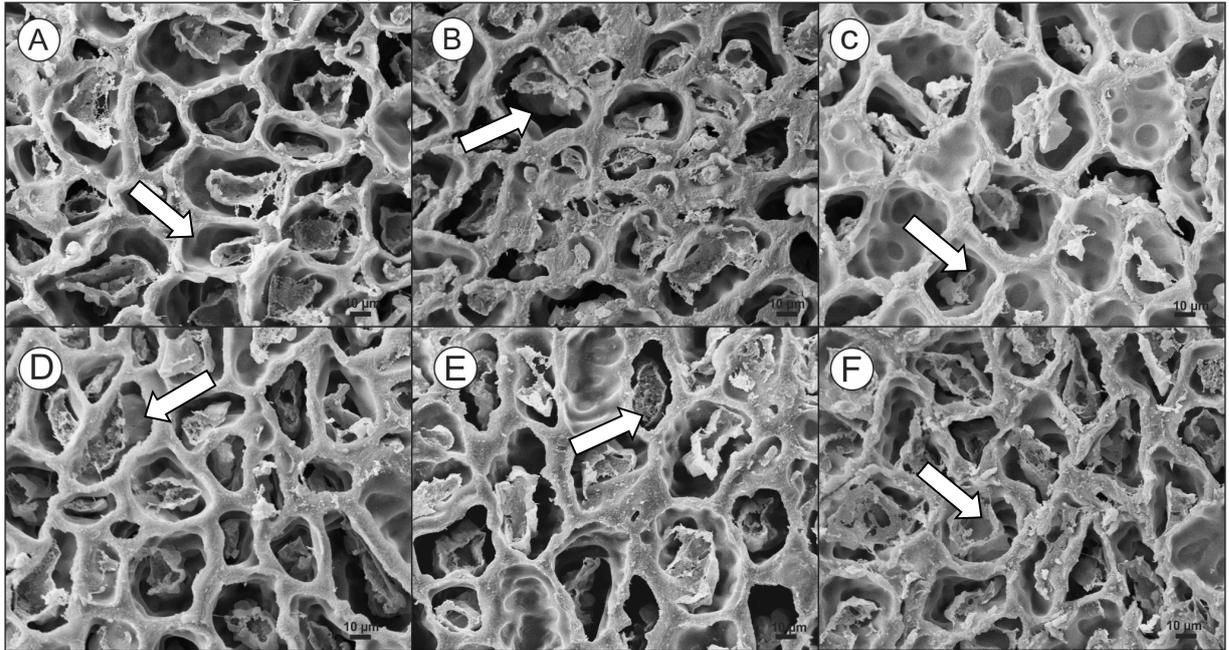


Fonte: Da autora (2019).

3.6 Análise ultraestrutural das sementes após criopreservação

O resultado das análises ultraestruturais em células do endosperma de sementes de café submetidas a diferentes protocolos de criopreservação pode ser observado nas Figura 13. Os protocolos de criopreservação analisados em microscopia eletrônica de varredura, cujas sementes foram secadas em solução salina saturada e apresentaram resultados fisiológicos contrastantes dos demais, podem ser observados na Figura 13C e F, nota-se que a parede celular retraiu e pode ser constatado conteúdo celular reduzido. Nas sementes com teor umidade de 20% bu pré-resfriadas ou com imersão direta (FIGURA 13A e E), nota-se que a parede celular retraiu e uma diminuição no conteúdo celular é constatada, entretanto, apresentam-se íntegras.

Figura 13 - Microscopia eletrônica de varredura em sementes de *Coffea arabica* L. submetidas a diferentes métodos de secagem, pré-resfriamento e reaquecimento. Secagem em sílica gel até 20% bu, pré-resfriada (A); Secagem em sílica gel até 17% bu, pré-resfriada (B); Secagem em solução salina saturada de nitrato de amônio até 17% bu, pré-resfriada (C); Secagem em sílica gel até 17% bu, imersas diretamente em criotânque (D); Secagem em sílica gel até 20% bu, imersa em diretamente em criotânque (E); Secagem em solução salina saturada de cloreto de sódio até 17% bu imersa diretamente em criotânque (F).



Fonte: Da autora (2019).

Assim como foi observado na qualidade fisiológica das sementes, foi possível detectar uma diferença discrepante na estrutura celular do endosperma entre os protocolos de secagem em solução salinas saturadas (FIGURA 13C e 13F), apesar de terem sido submetidos a diferentes tipos de sal na secagem e de pré-resfriamento.

No geral, as estruturas das células do endosperma, dos diferentes protocolos analisados, se mantiveram similares (FIGURA 13). Em todas as eletromicrografias é possível observar células contraídas, células túrgidas e íntegras e também extravasamento de conteúdo celular. Analisando as sementes que sofreram secagem rápida pode-se observar que aquelas que foram pré-resfriadas (FIGURAS A e B), aparentemente apresentaram conteúdo celular mais retraído. Este resultado pode ser indicativo de que os danos da criopreservação foram menos drásticos nas sementes que são imersas diretamente em criotânque. No entanto, a análise fisiológica mostrou maior porcentagem de plântulas normais quando as sementes foram pré-resfriadas.

4 CONCLUSÕES

A qualidade fisiológica de sementes de *Coffea arabica* L. é reduzida à medida que perde água durante a secagem. Sementes com teor de água de 17% e 12% bu apresentaram menor qualidade fisiológica.

A secagem lenta em solução salina saturada afeta negativamente a qualidade fisiológica das sementes de café independentemente do método de reaquecimento após o pré-resfriamento e das sementes criopreservadas.

A redução do teor de água das sementes de café a 17 e 20% bu seguidas de pré-resfriamento ou imersão direta em nitrogênio líquido não afetam a qualidade inicial das sementes.

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 e o perfil eletroforético das enzimas catalase e superóxido dismutase.

As enzimas polifenoloxidase e peroxidase apresentaram 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.

Identificou-se que danos nas membranas celulares foram menos drásticos em sementes criopreservadas após a secagem.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399-406, oct./dec. 2014.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. 627 p.
- ASADA, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions. **Plant Physiology**, Rockville, v. 141, n. 2, p. 391-396, june, 2006.
- 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.
- BALIZA, D. P. et al. Antecipação da produção e desenvolvimento da lavoura cafeeira implantada com diferentes tipos de mudas. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 61-68, jan./mar. 2013.
- BENSON, E. E.; BREMNER, D. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. Cap. 6. p. 205-241.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 16, n. 1, p. 1-15, mar. 2006.
- BERJAK, P.; PAMMENTER, N. W. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant-seeded species: Approaches and problems. **International Journal Plant Science**, Chicago, v. 175, n. 1, p. 29-39, jan. 2014.
- BERJAK, P.; SERSHEN, B. V.; PAMMENTER, N. W. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 21, n. 3, p. 187-203, Sept. 2011.
- BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Reaeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, p. 651-658, Feb. 1998.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- CAMPOS, C. N. et al., Melatonin reduces oxidative stress and promotes drought tolerance in young *Coffea arabica* L. plants, **Agricultural Water Management**, v. 211, 2019, p. 37-47. jan. 2019.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, June. 2015.

COELHO, S. V. B. et al. Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to sub-zero temperatures. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 41, n. 3, p. 312-321, june. 2017.

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

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, 1997a.

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

DUSSERT, S.; ENGELMANN, F. New determinants for tolerance of coffee (*Coffea arabica* L.) seeds to liquid nitrogen exposure. **CryoLetters**, Cambridge v. 27, n. 3, p. 169-178, may/june 2006.

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

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

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

FIGUEIREDO, M. A. et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 2, p.150-158, 2017.

FREITAS, R. T. et al. Cryopreservation of *Coffea arabica* L. Zygotic Embryos by Vitrification. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, [S.l.], v. 44, n. 2, p. 445-451, dec. 2016.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases: I., occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, n. 2, p. 309-314, feb. 1977.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 48, n. 12, p. 909-930, dec. 2010.

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.

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

- KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase and Polyphenol Oxidase Activities during Rice Leaf Senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315-319, 1976.
- KRZYŻANOWSKY, F. C.; FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. Relatos dos testes de vigor disponíveis para as grandes culturas. **Informativo ABRATES**, Brasília, v. 1, n. 2, p. 15-50, mar. 1991.
- LEE, D.H.; LEE, C.B. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber in gel enzyme activity assays. **Plant Science**, Shannon, v. 159, n. 1, p. 75-85, Oct. 2000.
- 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.
- MAZUR, P. Freezing injury in plants. **Annual Review of plant Physiology**, v. 20, p. 419, 1969.
- MITTLER, R.; ZILINSKAS, B. A. Detection of ascorbate peroxidase activity in native gels by inhibition of the ascorbate-dependent reduction of nitroblue tetrazolium. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 212, n. 2, p. 540-546, aug. 1993.
- MOLINA, T. F. Crioconservação em sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 72-81, 2006.
- NASCIMENTO, J. B.; BARRIGOSI, J. A. F. O papel das enzimas antioxidantes na defesa das plantas contra insetos herbívoros e fitopatógenos. **Agrarian Academy**, v.1, p. 234-250, 2014.
- PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Physiology of desiccationsensitive (recalcitrant) seeds and the implications for cryopreservation. **International Journal Plant Science**, v. 175, n. 1, p. 21-28, 2014.
- PANIS, B.; PIETTE, B.; SWENNEN, R. Droplet vitrification of apical meristems: a 104 cryopreservation protocol applicable to all Musaceae. **Plant Sci.**, p. 168:45-55, 2005.
- PINTO, M. S. et al. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v. 40, n. 4, p. 380-389, aug. 2016.
- REED, B. M. **Plant Cryopreservation: A Practical Guide**. New York: Springer New York, 2008.
- REED, B. M.; SARASAN, V.; KANE, M.; BRUNN, E.; PENCE, V. C. Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools. **In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant.**, v. 47, p. 1-4, 2011.
- ROACH, T. et al. An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. **Physiologia Plantarum**, Malden, v. 133, n. 2, p. 131-139, june. 2008.

ROCHA, M. S. Crioconservação de sementes de algodão. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n. 3, p. 312–318, 2009.

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

SANTANA-BUZZY, N. et al. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cellular & Developmental Biology -Plant** **43**, p. 507–520, 2007.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: Potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.70- 84, 2000.

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.

SINHA, S.; SAXENA, R. Effect of iron on lipid peroxidation, and enzymatic and nonenzymatic antioxidants and bacoside-A content in medicinal plant *Bacopa monnieri* L. **Chemosphere**, v. 62, p. 1340-1350, 2006.

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.

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

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.

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

WALTERS, C.; WESLEY-SMITH, J.; CRANE, J; HILL, L.M.; CHMIELARZ, P.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P. Cryopreservation of recalcitrant (i.e. desiccation-sensitive) seeds. In: REED, B. M. (Ed.). **Plant Cryopreservation: a practical guide**. New York: Springer, 2008. p. 465-484.

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

CAPÍTULO 3 PROPRIEDADES CALORIMÉTRICAS DA ÁGUA E VIDROS CITOPLASMÁTICOS ASSOCIADOS À CRIOPRESERVAÇÃO EM SEMENTES DE *COFFEA ARABICA* L.

RESUMO

A criopreservação tem sido apontada como uma técnica de armazenamento segura e de longo prazo, viável para sementes de *Coffea* spp. No entanto, além dos resultados nem sempre serem coerentes, sementes de diferentes espécies apresentam variações quanto à perda de viabilidade, pois diferem quanto à tolerância a desidratação, resfriamento e reaquecimento, após a imersão no nitrogênio líquido. As interações da água com os constituintes da semente, medidas e analisadas por meio de análises térmicas das propriedades calorimétricas, podem contribuir para o entendimento da tolerância das sementes ao processo de criopreservação. Assim, esta pesquisa foi realizada com o objetivo de investigar a relevância das propriedades calorimétricas da água e parâmetros da formação de vidros intracelulares no comportamento de sementes de *Coffea arabica* L. criopreservadas. As sementes foram submetidas a diferentes métodos de secagem, resfriamento e criopreservação, e analisadas por meio de análise térmica utilizando-se a calorimetria diferencial de varredura (DSC). As transições atribuídas ao reaquecimento ou à fusão da água contida nas sementes foram detectadas nos termogramas e foram determinadas a porcentagem de água congelável, água não congelável, temperatura e entalpia de fusão da água, bem como as temperaturas de transição vítrea. Sementes de *Coffea arabica* L. secadas em sílica gel até 20 ou 17% bu, pré-resfriadas em biocongelador ou diretamente imersas em nitrogênio líquido, apresentam alta sobrevivência. Em sementes de *Coffea arabica* L. com altos teores de água, de (43 e 35% bu) a entalpia de fusão e a porcentagem de água congelável são maiores do que em sementes com teores de água de 20, 17 ou 12% bu. A fusão da água congelada em sementes hidratadas ocorre em temperaturas inferiores à temperatura de fusão da água pura de 0 °C. A formação de vidros intracelulares em sementes hidratadas foi detectada em temperaturas de -18 e -22 °C, em sementes com 17 e 20% (bu) entre -20 e -23 °C e em sementes crioarmazenadas, em -18 °C.

Palavras-chave: Análises térmicas. Análise biofísicas. Nitrogênio líquido. Vidros aquosos.

ABSTRACT

Cryopreservation has been pointed out as a safe and long-term, viable storage technique for *Coffea* spp. However, besides the results are not always coherent, seeds of different species present variations as to the loss of viability, since they differ in the tolerance to dehydration, cooling and reheating, after immersion in liquid nitrogen. The interactions of the water with the seed constituents, measured and analyzed by means of thermal analyzes of the calorimetric properties, can contribute to the understanding of the tolerance of the seeds to the process of cryopreservation. Thus, this research was carried out with the objective of investigating the relevance of water calorimetric properties and parameters of intracellular glass formation in the behavior of Cryopreserved *Coffea arabica* L. seeds. The seeds were submitted to different methods of drying, cooling and cryopreservation, and analyzed by means of thermal analysis using differential scanning calorimetry (DSC). The transitions attributed to the reheating or melting of the water contained in the seeds were detected in the thermograms and the percentage of freezing water, non-freezing water, melting temperature and enthalpy of the water, as well as the glass transition temperatures were determined. Seeds of *Coffea arabica* L. dried in silica gel up to 20 or 17% bu, pre-cooled in a biofreezer or directly immersed in liquid nitrogen, present high survival. In *Coffea arabica* L. seeds with high water contents, (43 and 35% bu) the melting enthalpy and the percentage of freezing water are higher than in seeds with water contents of 20, 17 or 12% bu. The melting of frozen water in hydrated seeds occurs at temperatures below the melting temperature of pure water at 0 ° C. The formation of intracellular glasses in hydrated seeds was detected at temperatures of -18 and -22 ° C, in seeds with 17 and 20% (bu) between -20 and -23 ° C and in cryo-stored seeds at -18 ° C.

Keywords: Thermal analysis. Biophysical analysis. Liquid nitrogen. Water glasses

1 INTRODUÇÃO

O café é um produto de extrema importância no Brasil, contribuindo positivamente na exportação e geração de renda do país, gerando empregos e concebendo mão de obra no meio rural devido a sua grande produtividade (SANTOS et al., 2009). A estimativa de produção para *Coffea canephora* Pierre é de 16 milhões de sacas e de *Coffea arabica* L. de 38 milhões de sacas (CONAB, 2019).

Considerando a sua grande importância, uma preocupação que se tem é a baixa tolerância das sementes de café à dessecação e a baixa capacidade de armazenamento, sendo classificadas como intermediárias (ELLIS et al., 1990). Por esse motivo, preservar sementes de café se tornou um grande desafio e, na busca por soluções para este, pesquisas são realizadas com a finalidade de entender os processos fisiológicos de sementes de café no armazenamento (FIGUEIREDO et al, 2017; COELHO et al, 2017).

Criopreservação pode ser definida como o armazenamento de material biológico vivo em temperaturas ultrabaixas, é uma técnica para a conservação em longo prazo e é considerada viável para espécies que apresentam dificuldades de armazenamento pelos métodos tradicionais. Em temperaturas como a do nitrogênio líquido (-196 °C), os processos metabólicos são interrompidos, permitindo o armazenamento por um período a longo prazo sem que haja alterações no material armazenado. Uma vantagem da técnica é o pequeno espaço para o armazenamento de uma grande quantidade de material (ENGELMANN, 2004; 2011).

Tem sido descrita como uma forma viável de conservação de *Coffea* spp. (SANTANA-BUZZY et al., 2007), porém, sabe-se que as sementes de diferentes espécies apresentam variações quanto à perda de viabilidade, pois diferem quanto a tolerância a desidratação, resfriamento e reaquecimento (DUSSERT et al., 1998). O sucesso da criopreservação depende da não formação de cristais de gelo no interior dos tecidos, durante as diferentes etapas da criopreservação (PANIS et al., 2005; ENGELMANN, 2004, 2011).

A desidratação é importante para a prevenção da formação desses cristais de gelo intracelular, que podem ocorrer durante o resfriamento e reaquecimento causando lesões nas células (GONZALEZ-ARNAO et al., 2008). A desidratação do material vegetal deve ser a um teor de água baixo, para evitar a formação de cristais, mas que não cause a desidratação severa das células. Um bom nível de sobrevivência geralmente é obtido quando as sementes são resfriadas com teor de água entre 10 e 20% bu (SANTOS, 2001; ENGELMANN, 2004).

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

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

Vertucci (1993) e Vertucci e Farrant (1995) descreveram cinco tipos de água na semente, sendo elas: 1) água estrutural ou de constituição, água remanescente em tecidos muito secos e que não apresenta propriedades de solvente, correspondente a teor de água inferior a 7,5% bu; 2) água com papel de solvente, não congelável, que permite reações catabólicas (deterioração), no entanto, quando a umidade é inferior a 10%, apresenta características vítreas sendo essas reações reprimidas em sementes com teor de água entre 7,5% a 20% bu; 3) água com propriedades de água congelável, este tipo de água promove umedecimento da superfície de macromoléculas se associando aos seus sítios hidrofóbicos formando pontes de união. A atividade fisiológica da semente é alterada facilmente neste nível de hidratação e a respiração é intensificada, corresponde a sementes com 20% a 30% de teor de água; 4) água com características de solução concentrada, ocupando espaços intercapilares entre as macromoléculas, sem interações com suas superfícies correspondendo a teores de água entre 33% a 41% nas sementes e; 5) água livre, com características de solução diluída e não se liga às macromoléculas; a germinação da semente se completa quando esse tipo de água está presente sendo teor de água superior a 41%. Os tipos de água 4 e 5 correspondem à água considerada absorvida.

Estudos sobre as propriedades físicas e calorimétricas da água contida nas sementes, por meio de análises térmicas realizadas para a determinação da temperatura de transição de vidros aquosos, e outros parâmetros como temperatura e entalpia de fusão e porcentagem de água congelável e não congelável, podem contribuir para o entendimento da sensibilidade das sementes e grãos de café à dessecação e a deterioração. Tais parâmetros podem ser experimentalmente identificados por meio de várias técnicas de análise térmica, sendo o DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) o mais largamente utilizado.

A calorimetria diferencial de varredura é um método que mede diretamente a diferença na captação de energia térmica que ocorre em uma amostra relativa a uma referência durante uma mudança de temperatura regulada (DUROWOJU et al., 2017; GILL et al., 2010). Por meio desta, é determinada a alteração na capacidade de calor (C_p) de uma amostra que se quer avaliar e o material de referência, em função da temperatura, ou seja, uma amostra de massa conhecida é aquecida e/ou resfriada, e as mudanças na sua capacidade de calor, são rastreados como mudanças no fluxo de calor (GILL et al., 2010).

O DSC permite a detecção de transições como temperatura de cristalização (T_c), temperatura de fusão cristalina (T_m), entalpia de fusão (J/g), temperatura de transição vítrea (T_g), dentre outros. Por DSC também é possível determinar o tempo de indução oxidativa no modo isotérmico (MOLINA et al., 2011).

Utilizando-se do aparelho de DSC, as propriedades termodinâmicas da água e, em particular, a presença de vidros aquosos nos citoplasmas das células em sementes, podem ser determinadas, visando um melhor entendimento das causas da sensibilidade ou tolerância à desidratação. As interações da água com os constituintes da semente podem ser analisadas, detectando-se os vidros aquosos que estabilizam macromoléculas garantindo quiescência metabólica, prevenindo reações entre os metabólitos e, além disto, suprimindo ou prevenindo a cristalização de solutos no citoplasma (ROSA et al., 2008).

Assim, este trabalho foi realizado com o objetivo de investigar as propriedades calorimétricas da água e o fenômeno da transição vítrea em sementes *Coffea arabica* L. pelo método de calorimetria diferencial de varredura, avaliando a sua associação com a criopreservação das sementes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local e material vegetal

Este estudo foi realizado no Laboratório de Análise de Sementes (LAS) do Departamento de Agricultura e Laboratório Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ), do Departamento de Química ambos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brasil, em conjunto com a Embrapa instrumentação Agropecuária em São Carlos, SP, Brasil. Foram utilizadas sementes de *Coffea arabica* L., cultivar Catuaí Amarelo IAC 62. Frutos de café foram colhidos na Fazenda Experimental Procafé em Varginha, MG, altitude de 980 m, com clima tropical nas terras altas (Cwb), segundo a classificação de Köppen.

Os frutos no estágio de maturação da cereja foram colhidos seletivamente dos ramos médios das plantas e na parte média dos ramos. Após a colheita, os frutos foram selecionados quanto à uniformidade do estágio de maturação e mecanicamente despulpados. As sementes foram então desmuciladas por fermentação em água por 24 horas, seguida de lavagem em água corrente mantidas à sombra para pré-secagem para remoção da água de superfície.

Estas sementes foram submetidas à secagem, pré-resfriamento e criopreservação sendo investigadas a formação de vidros aquosos e a determinação das propriedades calorimétricas por meio de análises térmicas em cada etapa do processo.

2.2 Secagem das sementes

As sementes foram secadas até diferentes teores de água em ambientes com temperatura e umidade relativa controladas. A secagem foi realizada em um ambiente hermético em caixas de acrílico tipo gerbox, dotadas de telas e seladas com filme plástico para evitar mudanças na umidade relativa no seu interior. Dois métodos de secagem foram realizados. Para o método de secagem rápida as sementes foram colocadas em camada única sobre as telas do gerbox, contendo sílica gel ativada abaixo das telas permitindo a secagem por equilíbrio higroscópico. Durante a secagem, a sílica foi trocada antes que uma mudança de cor, indicativa de aumento na umidade relativa ocorresse.

Para a secagem lenta foi utilizado o mesmo sistema em uma única camada sobre as telas nas caixas de acrílico, porém, contendo soluções salinas saturadas capazes de manter

umidade relativa interna estável. Cada solução salina saturada foi preparada adicionando-se o sal específico em água, sendo utilizado o sal sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (81% UR) e cloreto de sódio (NaCl) (75% UR) os quais proporcionaram equilíbrio higroscópico das sementes de café em teor de água de 17% bu.

Os recipientes com as sementes foram mantidos em B.O.D. em temperatura constante de 25 °C. A perda de água durante a secagem foi monitorada por pesagens contínuas em balança com precisão de 0,001 g até que as sementes atingissem os teores de água de 35, 20, 17, 12% bu. Assim os tratamentos de secagem e obtenção dos diferentes teores de água nas sementes utilizados foram sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1 - Métodos de secagem e teor de água nas sementes após secagem (TF) em sementes de *Coffea arabica* L.

| Método de secagem | Teor de água (%bu) |
|--|--------------------|
| Sombra | 43 |
| Sílica gel | 35 |
| Sílica gel | 20 |
| Sílica gel | 17 |
| Solução saturada $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (81% UR) | 17 |
| Solução saturada NaCl (75% UR) | 17 |
| Sílica gel | 12 |

Fonte: Da autora (2019).

2.3 Pré-resfriamento e criarmazenamento das sementes

Sementes com teores de água de 20 e 17% bu secadas em sílica gel e 17% secadas em solução salina saturada de sulfato de amônio foram resfriadas em um biocongelador Icecube, modelo 14S-B, software SY-LAB - Minitub do Brasil, com programação de curvas de resfriamento na velocidades de $-1 \text{ } ^\circ\text{C min}^{-1}$ e temperatura final de $-40 \text{ } ^\circ\text{C}$ ou $-50 \text{ } ^\circ\text{C}$ seguindo protocolo de Figueiredo et al. (2017). Após o resfriamento, as sementes foram submetidas à avaliação fisiológica e térmica, sendo reaquecidas em bancada do laboratório sob temperatura de $25 \text{ } ^\circ\text{C}$ ou banho-maria por 2 minutos a $40 \text{ } ^\circ\text{C}$ (TABELA 2).

Tabela 2 - 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 |

Fonte: Da autora (2019).

Sementes com 20,17% secadas em sílica gel ou secadas em solução salina saturada de (NH₄)₂SO₄ após resfriamento foram imersas no criotânque contendo nitrogênio líquido (NL) a -196 °C. Outra parte das sementes, após secagem em sílica gel ou em solução saturada de NaCl, foi imersa diretamente no nitrogênio líquido. Após 5 dias de armazenamento as sementes foram descongeladas rapidamente em banho-maria por 2 minutos a 40 °C, de acordo com a metodologia de Dussert et al. (1998), secadas superficialmente em papel toalha e tiveram os pergaminhos manualmente retirados para posterior avaliação (TABELA 3).

Tabela 3 - Descrição das etapas dos protocolos de criopreservação investigados para sementes de *Coffea arabica* L.

| Secagem | Pré-Resfriamento |
|---|----------------------------------|
| Sílica gel até 20% bu | 1°C min. ⁻¹ até -40°C |
| Sílica gel até 17% bu | 1°C min. ⁻¹ até -40°C |
| Solução saturada (NH ₄) ₂ SO ₄ até 17% bu | 1°C min. ⁻¹ até -50°C |
| Sílica gel até 17% bu | Sem pré-resfriamento |
| Sílica gel até 20% bu | Sem pré-resfriamento |
| Solução saturada NaCl até 17% bu | Sem pré-resfriamento |

Fonte: Da autora (2019).

2.4 Avaliação fisiológica das sementes

Realizada com oito repetições de 25 sementes para a avaliação dos efeitos do pré-resfriamento e quatro repetições de 50 sementes para os efeitos de secagem e criopreservação. As sementes foram semeadas em rolos de papel de germinação umedecidos com água destilada, na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Placas de acrílico foram utilizadas para a semeadura e as sementes foram acondicionadas em germinador, regulado a 30 °C, na presença de luz, conforme metodologia 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 sementeira, 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 sementeira. 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 por 4 a 5 dias ou até massa constante. A massa seca foi determinada em balança de precisão e expressa em mg/plântula.

2.5 Análise térmica nas sementes

Amostras de sementes correspondentes ao tratamento de secagem, pré-resfriamento e criopreservação foram submetidas à análise térmica por calorimetria diferencial de varredura.

As sementes foram armazenadas em temperatura de -80 °C até a realização das análises em equipamento DSC Q100 V9.9 uild 303 (Standard Cell FC). Amostras com aproximadamente 5 mg foram pesadas e hermeticamente seladas em cadinhos de alumínio próprios para DSC onde, cadinhos vazios foram utilizados como referência no interior do DSC. As amostras foram equilibradas a -50 °C e aquecidas numa taxa de 10 °C/min⁻¹, até a temperatura de 80 °C. Os termogramas gerados pelo *software* específico do DSC foram analisados para todas as transições térmicas ocorridas.

As curvas DSC foram obtidas em um módulo calorimétrico exploratório diferencial DSC Q100 V9.9 build 303 e os termogramas foram então analisadas em um software de analisador térmico TA - *Instruments Universal Analysis 2000* versão 4.1D. build 4.1.0.16. A formação vítrea é detectada pela mudança no fluxo de calor e é indicada por uma inflexão na curva (*baseline*). A partir das mudanças no fluxo de calor é possível definir os três parâmetros da formação dos vidros: a temperatura em que a transição se inicia (*onset*), o ponto médio (*midpoint*) e onde ela termina (*endset*). Os valores das transições térmicas são dados automaticamente pelo *software* a partir de marcações na curva por observações visuais de mudanças na linha base da curva. Das transições vítreas foram utilizados os dados dos pontos médios das amostras de sementes analisadas.

As transições térmicas atribuídas ao reaquecimento ou à fusão da água contida nas sementes (*melting*) foram detectadas nos termogramas, representadas por picos na curva,

gerados ao redor de 0 °C, em consequência de transição endotérmica no fluxo de calor, em que energia é requerida para o derretimento dos cristais de gelo, quando água congelável está presente nas amostras. As temperaturas de fusão foram obtidas e a energia envolvida (capacidade calorífica ou entalpia da transição) foi estimada pela integração da área do pico abaixo da curva.

A porcentagem de água congelável das amostras de sementes correspondente à água descongelada, quando a temperatura se aproxima de zero graus e foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$\text{Água congelável (\%)} = \frac{Q}{\lambda \times (U)} \times 100 \quad (1)$$

U= teor de água das amostras de sementes em base úmida

Q = Entalpia do pico endotérmico da fusão da água (J/g);

λ = calor latente específico de fusão da água (334 J/g).

Utilizando-se o teor de água das sementes em base úmida e a porcentagem de água congelável, calculada por meio da equação acima, foi obtida por diferença, a porcentagem de água não congelável.

Os parâmetros da formação de vidros aquosos foram estimados nos termogramas, nas regiões onde ocorreram desvios na curva (variações na linha base), em consequência de mudanças no fluxo de calor, onde são definidas as temperaturas nos pontos inicial (*onset*), médio (*mid point*) e final (*endset*) da transição vítrea. Diferentemente da transição a 0 °C, atribuída ao reaquecimento da água, a transição de vidro não envolve evento endotérmico ou exotérmico e se diferencia daquela porque não produz um pico na curva, mas sim, um desvio ou inflexão na linha base do termograma.

2.6 Delineamento experimental

Os dados obtidos nas análises térmicas nas sementes de café foram submetidos à Anova, separadamente em cada etapa do processo de criopreservação, em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. As análises, assim como a comparação de médias pelo teste de Scott Knott, foram realizadas por meio do programa estatístico SISVAR (FERREIRA, 2014).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Curvas de DSC foram utilizadas para investigar a relevância das propriedades calorimétricas da água e dos parâmetros da formação de vidros intracelulares na sensibilidade das sementes de café em cada etapa do processo de criopreservação, ou seja, após dessecação, pré-resfriamento e imersão no nitrogênio líquido. Os resultados das análises térmicas em DSC foram comparados aos resultados da avaliação fisiológica das sementes, após cada etapa do processo.

3.1 Análises térmicas das sementes após secagem

Os resultados das avaliações fisiológicas das sementes após secagem encontram-se na Tabela 4. As sementes secadas a sombra apresentavam teor de água inicial de 43% bu e alta qualidade fisiológica, com porcentagem de 91% de plântulas normais.

Sementes de *Coffea arabica* L são classificadas como intermediárias quanto à sensibilidade à dessecação e comportamento durante o armazenamento, pois apresentam germinação após secagem até teores de água relativamente baixos, mas perdem vigor. De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4, a porcentagem de germinação e vigor variou em função do teor de água e métodos de secagem.

Tabela 4 - Efeito da secagem na porcentagem de protrusão radicular (PR), plântulas normais (PN), plântulas normais fortes (PNF), plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), massa seca da raiz (MSR) (mg), de massa seca da parte aérea (MSPA)(mg) e condutividade elétrica (CE) ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$) de sementes de café secadas até diferentes teores de água.

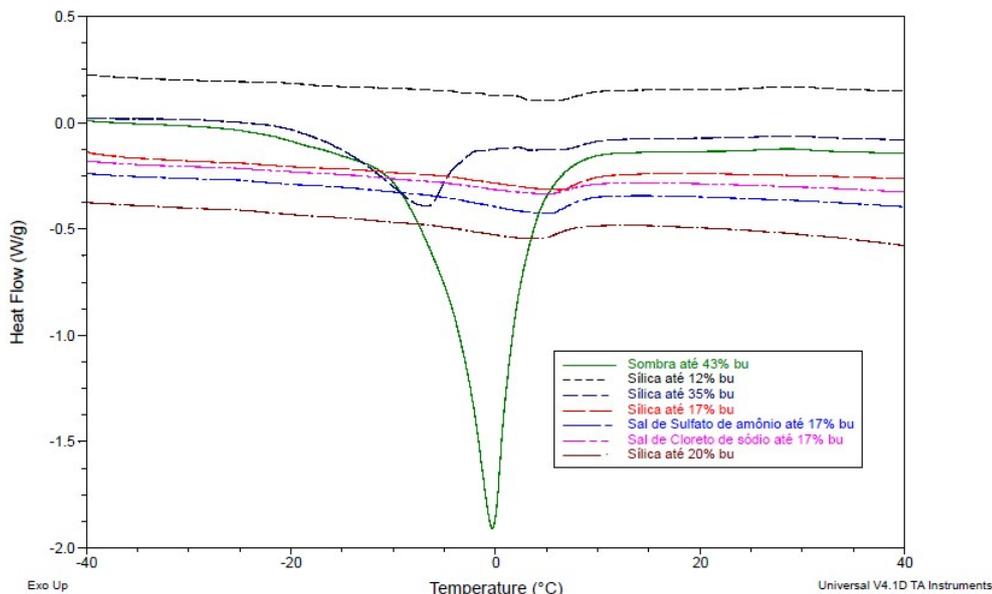
| Teor de água | Secagem | PR | PN | PNF | FC | CE |
|--------------|----------------------------------|------|------|-------|------|-------|
| 43% | Sombra | 93 A | 91 A | 44 A | 86 A | 20 A |
| 35% | Sílica | 96 A | 91 A | 44 A | 90 A | 24 A |
| 20% | Sílica | 97 A | 91 A | 26 B | 87 A | 32 C |
| 17% | Sílica | 94 A | 82 B | 14 B | 71 B | 32 C |
| 17% | Sal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 95 A | 88 A | 21 B | 75 B | 32 C |
| 17% | Sal (NaCl) | 96 A | 94 A | 35 A | 90 A | 28 B |
| 12% | Sílica | 93 A | 80 B | 18 B | 62 B | 39 D |
| CV | | 3.30 | 5.11 | 29.16 | 9.39 | 10.20 |

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

Fonte: Da autora (2019).

Na Figura 1 estão representados os termogramas das sementes úmidas e sementes secadas até diferentes teores de água. Observa-se que as sementes com mais altos teores de água, próximos de 43%, apresentam as maiores transições térmicas ocorrendo ao redor de 0 °C. Estas transições são atribuídas ao reaquecimento da água contida nas sementes. Já nas sementes com teores de água ao redor de 12% as transições apresentaram picos menores do que nas sementes úmidas. Essas diferenças se devem às diferentes quantidades de água livre, ou congelável, presentes nas sementes com diferentes teores de água, submetidas ou não à secagem (FIGURA 1).

Figura 1 - Termogramas de DSC de sementes de *Coffea arabica* L. secadas à sombra até 43% (bu); em sílica gel até 35% (bu), ou até 20% (bu), ou até 17% (bu), ou até 12% (bu); em solução salina saturada de sulfato de amônio até 17% (bu); e em solução salina saturada de cloreto de sódio até 17% (bu).



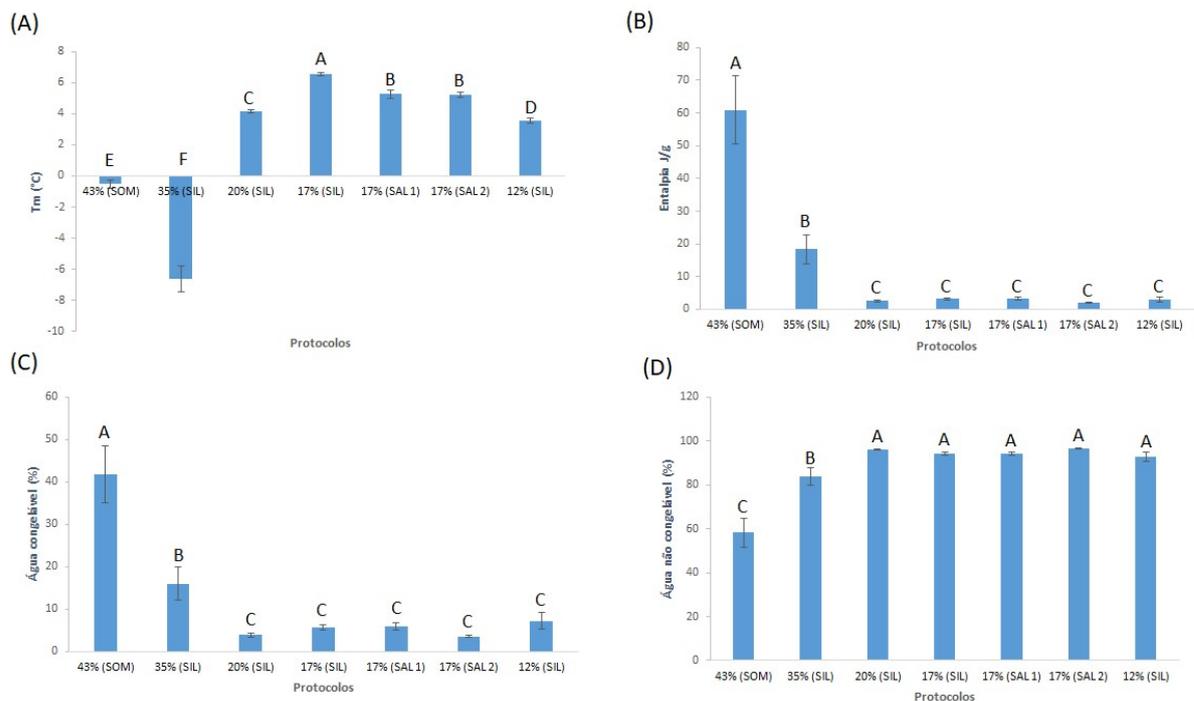
Fonte: Da autora (2019).

Observa-se no termograma, que as maiores transições nas sementes com 35% de teor de água, ocorreram em temperaturas inferiores à temperatura de fusão da água pura 0 °C. Isto pode ocorrer devido a possíveis efeitos dos solutos devido à sua capacidade de deprimir o ponto de fusão da água congelada (SISUNANDAR et al., 2010).

Resultados similares foram encontrados por Rosa et al. (2008), onde os termogramas de sementes de cafeeiro armazenadas com 30% de teor de água mostraram que as maiores transições ao redor de 0 °C fortemente atribuídas ao reaquecimento da água contida nas sementes, ocorreram em temperaturas inferiores a 0 °C, sendo mais baixas do que nos demais tratamentos (40, 20 e 12% teores de água).

Na Figura 2, observa-se a representação das temperaturas (3A) ou entalpia (3B) de fusão, da porcentagem de água congelável (3C) e de água não congelável (3D) das sementes de *Coffea arabica* L. após secagem até os diferentes teores de água, por meio de diferentes métodos. É possível verificar que nas sementes submetidas à secagem a sombra, as transições nos termogramas ocorreram em temperaturas abaixo de zero, provavelmente devido às maiores quantidades de água congelável presentes nas sementes úmidas. Observa-se também a depressão de T_m (aproximadamente $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$) ocorrida em sementes com 35% bu.

Figura 2 - Temperatura (A) e entalpia (B) de fusão, porcentagem de água congelável (C) e de água não congelável (D), determinadas por DSC, em sementes de *Coffea arabica* L. secadas à sombra até 43% (bu); em sílica gel até 35% (bu), ou até 20% (bu), ou até 17% (bu), ou até 12% (bu); em solução salina saturada de sulfato de amônio até 17% (bu); e em solução salina saturada de cloreto de sódio até 17% (bu). Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% probabilidade.



Fonte: Da autora (2019).

Os resultados de entalpia de fusão (Ent), os quais representam a energia envolvida nas transições atribuídas ao aquecimento da água nas sementes, podem ser observados na Figura 2B. Nas sementes secadas a sombra, com maior teor de água 43% bu, maior quantidade de energia foi requerida para a fusão, em temperatura próxima de zero, ou entalpia de 60,86 J/g). Sementes com teor de água de 35% bu com entalpia de 18 J/g, enquanto aquela com menor teor de água estudado 12% bu apresentou aproximadamente 3 J/g. Observa-se que as maiores

quantidades de energia requeridas nessas transições endotérmicas foram detectadas nas sementes com o teor de água de 43 e 35% bu.

Os valores da entalpia de fusão são utilizados nos cálculos da porcentagem de água congelável e não congelável, os quais estão representados na Figura 2C e D. O conceito de água congelável está diretamente relacionado à sensibilidade das sementes a temperaturas abaixo de zero, ou seja, se água congelável está presente em organismos, estes não poderão sobreviver a temperaturas sub zero, devido à formação de gelo intracelular (VERTUCCI, 1989). Por outro lado, a água que é aprisionada nos vidros intracelulares é a água não congelável e a perda do estado vítreo em sementes ou outros organismos tolerantes à dessecação, pode resultar na liberação desta água, a qual pode tornar-se água congelável (LEOPOLD; SUN; BERNAL-LUGO, 1994).

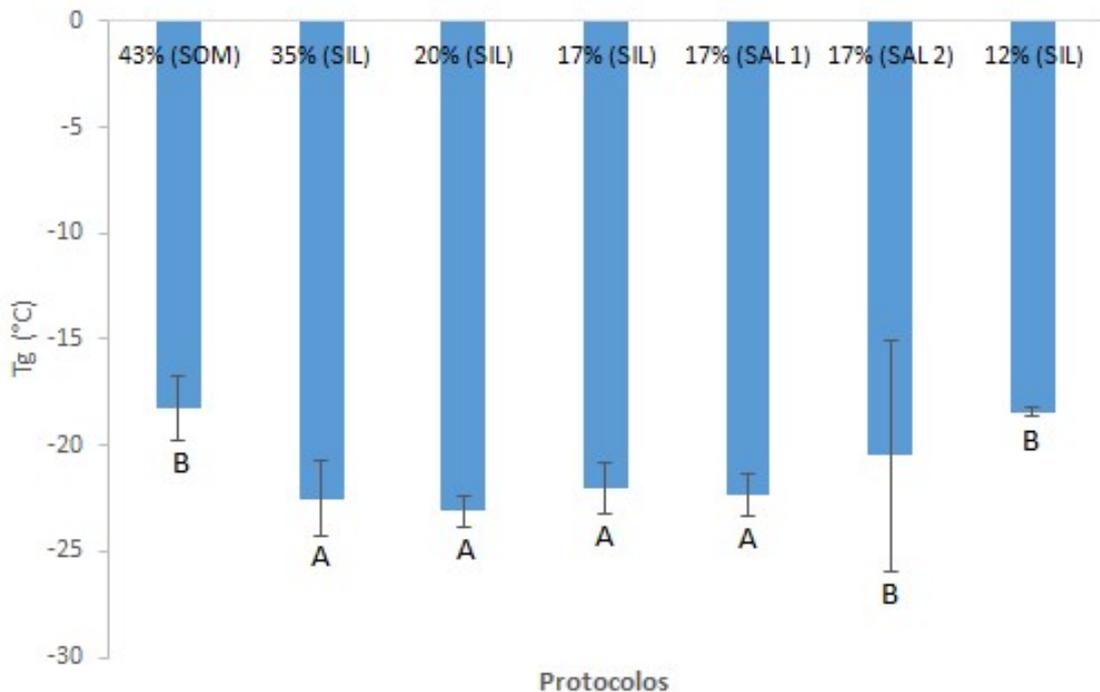
Observa-se que, nas sementes úmidas, há maior porcentagem de água congelável (FIGURA 2C). Muito embora haja indícios do envolvimento desses parâmetros no processo de deterioração das sementes, não se pode tirar conclusões a respeito das relações entre as diferenças em sensibilidade à dessecação e à deterioração das sementes de café e os resultados de porcentagem de água congelável e não-congelável (VEIGA, 2010).

O mais importante parâmetro da análise térmica nas sementes corresponde a temperatura de transição vítrea (T_g), na qual os vidros aquosos são formados ou desfeitos, quando ocorrem o resfriamento ou o aquecimento, respectivamente. Na Figura 3, verifica-se os valores de T_g para cada protocolo de secagem. Observa-se que, nas sementes úmidas, a formação de vidros intracelulares ocorrera no intervalo de temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ enquanto que as sementes com 35% de teor de água obtiveram um intervalo de temperatura inferior, chegando a $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$. O maior pico de temperatura ($-23\text{ }^{\circ}\text{C}$) entre todos os tratamentos foi observado para sementes com 20% bu. Foram observados que sementes com 43%, secadas em solução salina de NaCl a 17% e 12% secadas em sílica gel, obtiveram as menores médias diferindo estatisticamente das demais.

Veiga (2010) não detectou qualquer formação de vidros intracelulares no intervalo de temperatura ($-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$) em que as análises em sementes úmidas de café foram realizadas. Sisunandar et al. (2010) observaram que o valor de temperatura de transição vítrea de embriões de *Cocos nucifera* L. desidratados, foram dependentes do teor de água, ou seja, o valor de T_g aumentou à medida que o teor de água dos embriões diminuiu.

Vidros aquosos podem ser formados por decréscimos na temperatura ou no teor de água de sementes, e a temperatura em que ocorre esta transição, depende, fundamentalmente, da constituição química (LEOPOLD; SUN; BERNAL-LUGO, 1994).

Figura 3 - Temperatura de formação de vidro intracelular (T_g) em sementes de *Coffea arabica* L. secadas à sombra até 43% bu; em sílica gel até 35% bu, ou até 20% bu, ou até 17% bu, ou até 12% bu; em solução salina saturada de sulfato de amônio até 17%; e solução salina saturada de cloreto de sódio até 17% bu. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente, entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% probabilidade.



Fonte: Da autora (2019).

3.2 Análises térmicas das sementes pré-resfriadas

Após secagem, sementes foram submetidas ao pré-resfriamento em biocongelador e, antes de serem avaliadas pelos testes de germinação, de condutividade elétrica e análises térmicas, foram reaquecidas em temperatura ambiente a 25 °C ou banho-maria a 40 °C por dois minutos. A Tabela 5 sumariza os resultados da avaliação fisiológica destas sementes.

Tabela 5 - Resultados da avaliação fisiológica das sementes de *Coffea arabica* L. secadas por diferentes metodologias. PR: porcentagem de protrusão radicular. PN: porcentagem de plântulas normais. PNF: de plântulas normais fortes. FC: de plântulas com folhas cotiledonares expandidas. CE: condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$). Sementes avaliadas após reaquecimento por dois minutos em banho-maria (40 °C) ou em temperatura de 25 °C.

| | PR | | PN | | PNF | | FC | | CE | |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 25°C | 40°C |
| 17% Sílica | 90 Aa | 93 Aa | 89 Aa | 85 Aa | 19 Aa | 14 Aa | 83 Aa | 86 Aa | 63 Aa | 63 Aa |
| 17% Sal | 87 Aa | 87 Aa | 44 Ba | 52 Ba | 11 Ba | 11 Aa | 40 Ba | 47 Ba | 58 Aa | 60 Aa |
| 20% Sílica | 95 Aa | 94 Aa | 87 Aa | 86 Aa | 20 Aa | 17 Aa | 83 Aa | 82 Aa | 64 Ab | 59 Aa |
| CV | 7.33 | | 15.54 | | 60.79 | | 18.35 | | 8.97 | |

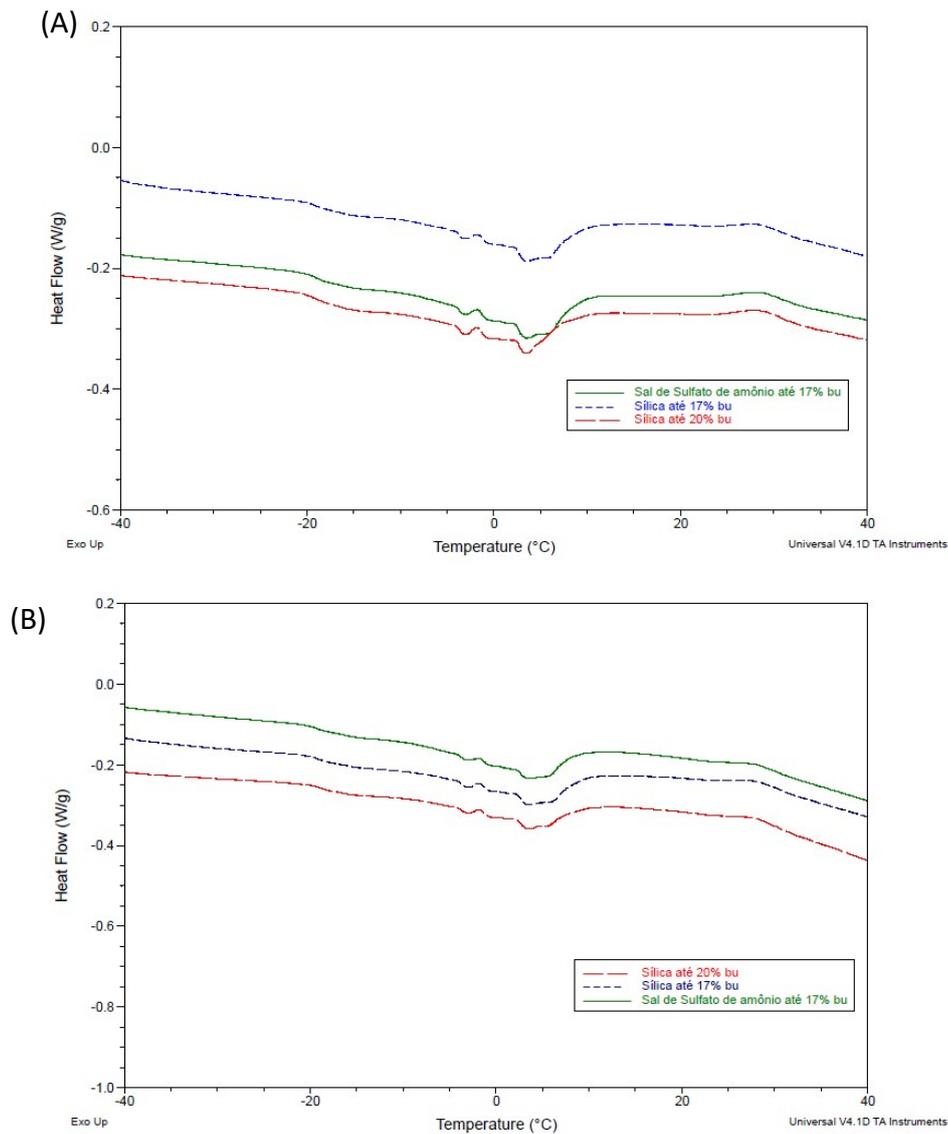
Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% probabilidade.

Fonte: Da autora (2019).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5, não houve diferenças significativas na qualidade fisiológica as sementes, em função do método de reaquecimento antes das avaliações. Nos teores de água de 17 e 20% bu, sementes secadas em sílica gel têm mesma qualidade, porém, as sementes secadas em solução salina saturada de sulfato de amônio apresentaram baixa qualidade fisiológica, provavelmente indicando danos durante o procedimento de reaquecimento, de -50 °C para a temperatura ambiente, de aproximadamente 25 °C.

Na Figura 4 estão representados os termogramas das sementes secadas até 20 e 17% bu em sílica gel e até 17% em solução salina, pré-resfriadas em biocongelador e reaquecidas a 25 °C ou 40 °C em banho-maria por dois minutos. Observa-se que os termogramas das sementes após tratamentos de pré-resfriamento, apresentaram padrões semelhantes, cujas temperaturas de fusão foram superiores à temperatura de fusão da água pura (0 °C).

Figura 4 - Termogramas de DSC de sementes de *Coffea arabica* L. pré-resfriadas em biocongelador. (A) secagem em solução salina saturada de sulfato de amônio até 17% (bu), ou em sílica gel até 17% (bu), ou em sílica gel até 20% (bu) reaquecidas em temperatura de 25°C; (B) sementes secadas em sílica gel até 20% (bu), ou em sílica gel até 17% (bu), ou em solução salina saturada de sulfato de amônio até 17% bu, reaquecidas em banho-maria a 40°C por dois minutos.

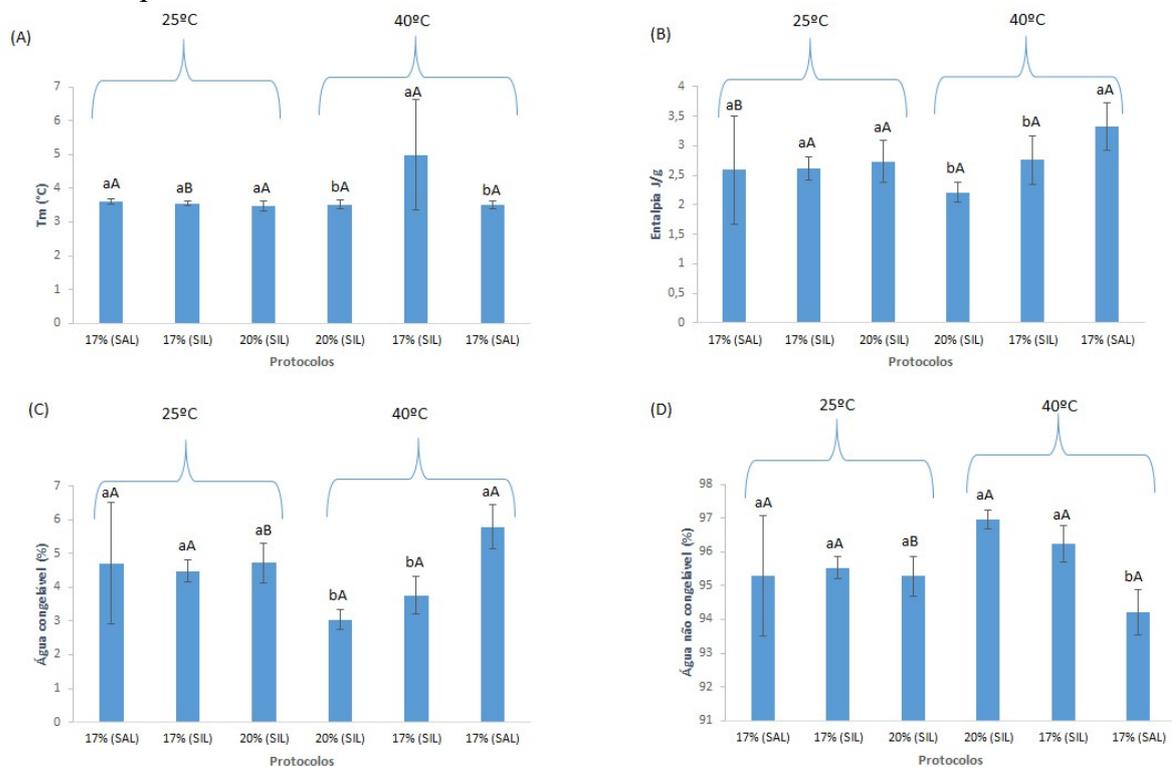


Fonte: Da autora (2019).

As temperaturas de fusão das sementes após reaquecimento estão representadas na Figura 5A, onde se verifica que as transições ocorreram em temperaturas superiores a 0 °C, sementes secadas até 17% de teor de água apresentaram maiores temperaturas de fusão, sendo que as sementes que tiveram o reaquecimento em 25 °C apresentaram temperaturas

equivalentes. As sementes dos outros protocolos de pré-resfriamento apresentaram comportamentos semelhantes.

Figura 5 - Propriedades termodinâmicas da água em sementes de *Coffea arabica* L. pré-resfriadas em biocongelador após secagem em solução salina de sulfato de amônio até 17% (bu), ou em sílica gel até 17% (bu), ou em sílica gel até 20% (bu), reaquecidas em temperatura de 25 °C; sementes secadas em sílica gel até 20% (bu), ou em sílica gel até 17% (bu), ou em solução salina saturada de sulfato de amônio até 17% (bu), reaquecidas em banho-maria a 40 °C por dois minutos. (A) Temperatura de fusão (T_m). (B) Entalpia de fusão (Ent). (C) Porcentagem de água congelável. (D) Porcentagem de água não congelável. Médias seguidas pela mesma letra minúsculas dentro e maiúscula entre as temperaturas de aquecimento não diferem estatisticamente, entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% probabilidade.



Fonte: Da autora (2019).

Os resultados de entalpia de fusão podem ser observados na Figura 5B, maiores energias foram observadas nas sementes secadas em solução saturada de sulfato de amônio, reaquecidas em banho-maria a 40 °C com aproximadamente 3,3 J/g. Sementes submetidas à secagem em sílica até 20% bu apresentaram menores energias envolvidas nas transições atribuídas ao reaquecimento da água, de cerca 2,2 J/g.

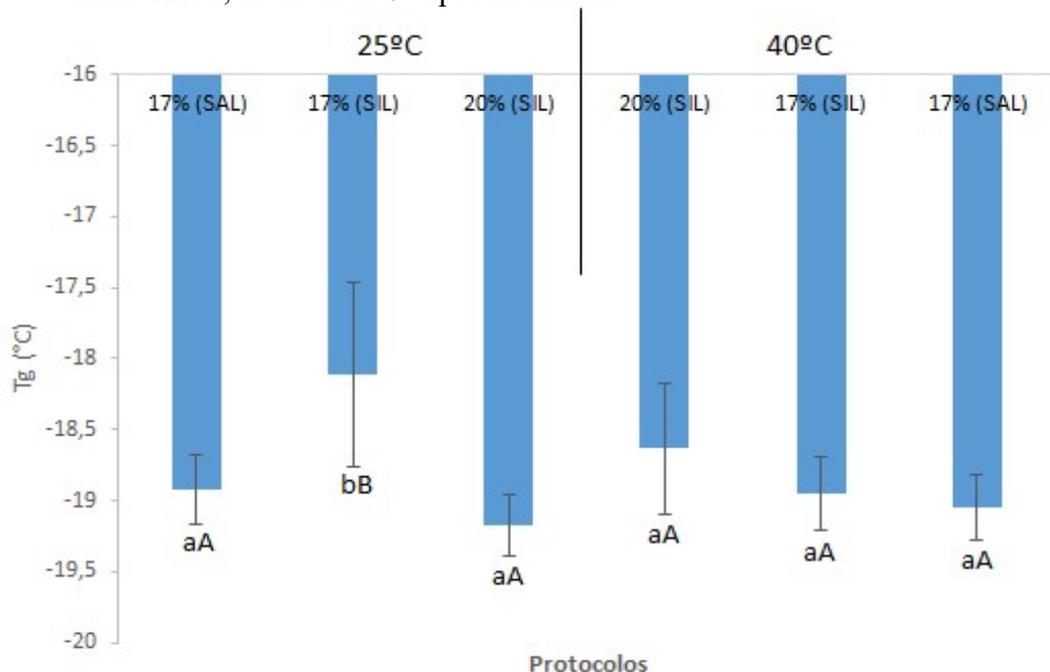
A porcentagem de água congelável e de água não congelável estão representados nas Figuras 5C e 5D. Observa-se que a água congelável nas sementes com 20% do teor de água

reaquecidas em banho-maria a 40 °C apresentaram menores porcentagens. Fato encontrado que, embora estas sementes continham um teor de água maior que as demais, apresentaram uma menor porcentagem de água congelável e porcentagem de água não congelável superior as com 17% bu.

A transformação sólido-líquido de um material amorfo é denominada de transição vítrea. A transição vítrea é uma transformação reversível e ocorre em uma faixa de temperatura específica (PERRONE et al., 2016).

A temperatura de transição vítrea nas sementes de café ocorreu em temperatura entre -18 e -19 °C para as amostras analisadas, sendo que sementes secadas em sílica gel até 20% bu e reaquecidas em temperatura ambiente apresentaram maior temperatura de transição vítrea -19,1°C e sementes secas em sílica gel a 17% (bu) também reaquecidas no ambiente menor temperatura de transição vítrea a-18,1 °C (FIGURA 6).

Figura 6 - Temperatura de formação de vidro intracelular em sementes de *Coffea arabica* L. pré-resfriadas em biocongelador, após secagem em solução salina saturada de sulfato de amônio até 17% (bu), ou em sílica gel até 17% (bu), ou em sílica gel até 20%, reaquecidas em temperatura de 25 °C; sementes secadas em sílica gel até 20% (bu), ou em sílica gel até 17% (bu), ou em solução salina de saturada sulfato de amônio até 17% (bu), reaquecidas em banho-maria a 40 °C por dois minutos. Médias seguidas pela mesma letra minúsculas dentre e maiúscula entre as temperaturas de aquecimento não diferem estatisticamente, entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% probabilidade.



Fonte: Da autora (2019).

3.3 Análises térmicas das sementes criarmazenadas

Nas avaliações anteriores, foram realizadas as análises térmicas separadamente em cada etapa preparatória das sementes para a imersão no nitrogênio líquido, ou seja, após secagem e após pré-resfriamento em biocongelador. Após a imersão, as sementes foram submetidas à avaliação fisiológica e os resultados foram confrontados com as propriedades calorimétricas e parâmetros da formação vítrea apresentados pelas sementes submetidas à criopreservação. De acordo com os resultados da avaliação fisiológica das sementes dos seis protocolos investigados (TABELA 7), observa-se alta porcentagem de plântulas normais, em todos os protocolos, exceto naqueles em que as sementes foram secadas em soluções salinas saturadas, as quais praticamente não apresentaram qualquer sobrevivência. Em estudos recentes, sementes criopreservadas por meio destes protocolos apresentaram alta qualidade fisiológica (DUSSERT et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2017; COELHO et al., 2017). Este fato indica uma provável ocorrência de problemas nos procedimentos de reaquecimento, seja após o pré-resfriamento ou após o criarmazenamento.

Tabela 6 - Efeito do armazenamento em criotânques (-196 °C) de sementes com diferentes teores de água (17 e 20% bu), resfriadas em biocongelador ou imersas diretamente em nitrogênio líquido sobre as porcentagem de protrusão radicular (PR), de plântulas normais (PN), de plântulas normais fortes (PNF), de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC), de massa seca da raiz (MSR), de massa seca da parte aérea (MSPA) e condutividade elétrica.

| Teor de água/Secagem | Pré-Resfriamento | PR | PN | PNF | FC | CE |
|---|--------------------------------|------|-------|-------|-------|------|
| 20% Sílica | -1°C min ⁻¹ a -40°C | 91 A | 81 A | 12 A | 74 A | 28 A |
| 17% Sílica | -1°C min ⁻¹ a -40°C | 93 A | 80 A | 10 A | 73 A | 29 A |
| 17% Sal (NH ₄) ₂ SO ₄ | -1°C min ⁻¹ a -50°C | 21 B | 04 B | 01 C | 3 B | 28 A |
| 17% Sílica | Imersão direta | 93 A | 76 A | 08 B | 70 A | 29 A |
| 20% Sílica | Imersão direta | 91 A | 75 A | 22 A | 72 A | 26 A |
| 17% Sal (NaCl) | Imersão direta | 0 C | 0 B | 0 C | 0 B | 30 A |
| CV | | 5.82 | 11.65 | 40.87 | 15.07 | 7.62 |

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

Fonte: Da autora (2019).

Para o sucesso da criopreservação, as sementes devem ser adequadamente preparadas durante as etapas de secagem e de pré-resfriamento, para suportarem os rigores da imersão no nitrogênio líquido e, posteriormente, serem reaquecidas.

Na Tabela 7 observa-se os resultados das análises fisiológicas e térmicas, antes e após a criopreservação.

Tabela 7 - Resultados das análises fisiológicas e das análises térmicas nas sementes de *Coffea arabica* L. antes e após criopreservação, avaliadas após secagem por diferentes metodologias até 17 e 20% bu. PN: porcentagem de plântulas normais. Temperatura (Tm) e entalpia (Ent) de fusão, porcentagem de água congelável (H₂O C) e de água não congelável (H₂O NC), e temperatura de formação de vidro intracelular (Tg).

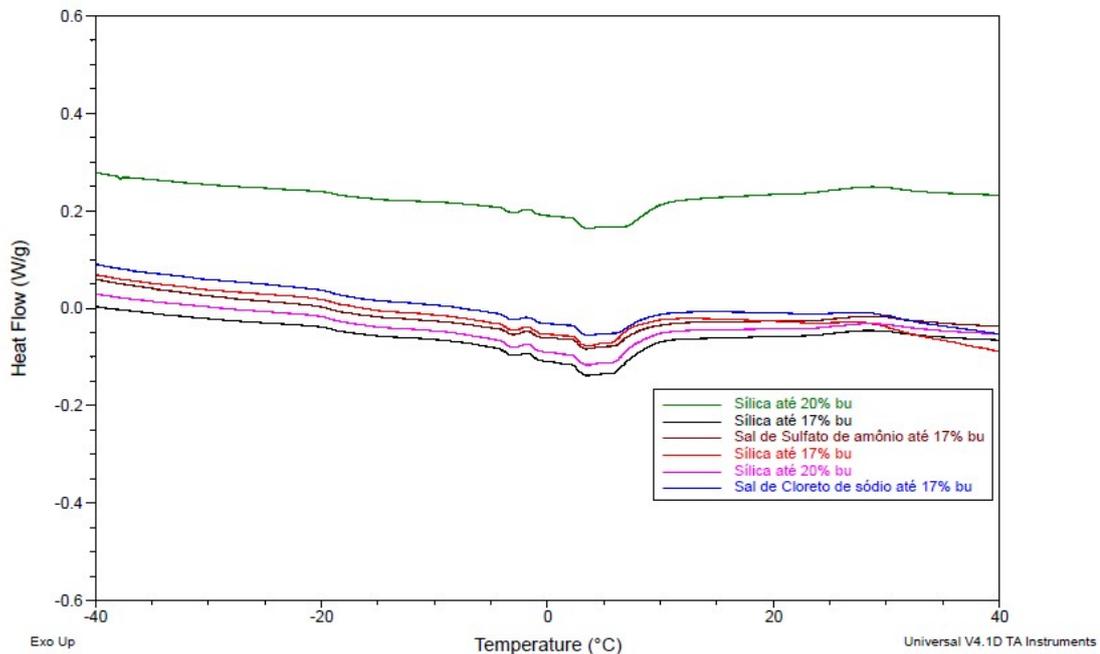
| Secagem | Resfriamento | Antes da criopreservação | | | | | | | Após criopreservação | | | | | | |
|------------|--------------|--------------------------|--------|---------|-----------|------------------------|-------------------------|---------|----------------------|--------|---------|-----------|------------------------|-------------------------|---------|
| | | U% | PN (%) | Tm (°C) | Ent (J/g) | H ₂ O C (%) | H ₂ O NC (%) | Tg (°C) | U% | PN (%) | Tm (°C) | Ent (J/g) | H ₂ O C (%) | H ₂ O NC (%) | Tg (°C) |
| Sílica 20% | Pré-resfr. | 19,8 | 86 | 3,52 | 2,21 | 3,04 | 96,96 | -18,63 | 22,5 | 81 | 4,37 | 2,83 | 4,07 | 95,93 | -18,372 |
| Sílica 17% | Pré-resfr. | 17,5 | 85 | 4,98 | 2,76 | 3,76 | 96,24 | -18,96 | 23,0 | 80 | 3,69 | 2,97 | 4,29 | 95,71 | -18,377 |
| *Sal 1 17% | Pré-resfr. | 17,2 | 52 | 3,50 | 3,32 | 5,79 | 94,21 | -19,05 | 17,6 | 4 | 3,70 | 2,68 | 4,55 | 95,45 | -18,59 |
| Sílica 17% | Direto NL | 17,5 | 96 | 6,53 | 3,18 | 5,56 | 94,44 | -21,99 | 22,4 | 76 | 3,54 | 2,13 | 2,86 | 97,14 | -18,13 |
| Sílica 20% | Direto NL | 19,8 | 94 | 4,16 | 2,60 | 3,80 | 96,20 | -23,12 | 22,3 | 75 | 3,79 | 2,81 | 4,06 | 95,94 | -18,63 |
| *Sal 2 17% | Direto NL | 17,3 | 86 | 5,21 | 2,06 | 3,52 | 96,48 | -20,48 | 22,8 | 0 | 3,65 | 2,47 | 3,86 | 96,14 | -18,55 |

*Sal 1 (Solução salina de sulfato de amônio); Sal 2 (Solução salina de Cloreto de sódio); NL (Nitrogênio líquido).

Fonte: Da autora (2019).

Na Figura 7 estão representados os termogramas das sementes submetidas aos diferentes protocolos de criopreservação. Observa-se que as sementes com teores de água de 20 ou 17% bu apresentaram padrões semelhantes, com temperaturas de fusão (T_m) acima de zero graus centígrados.

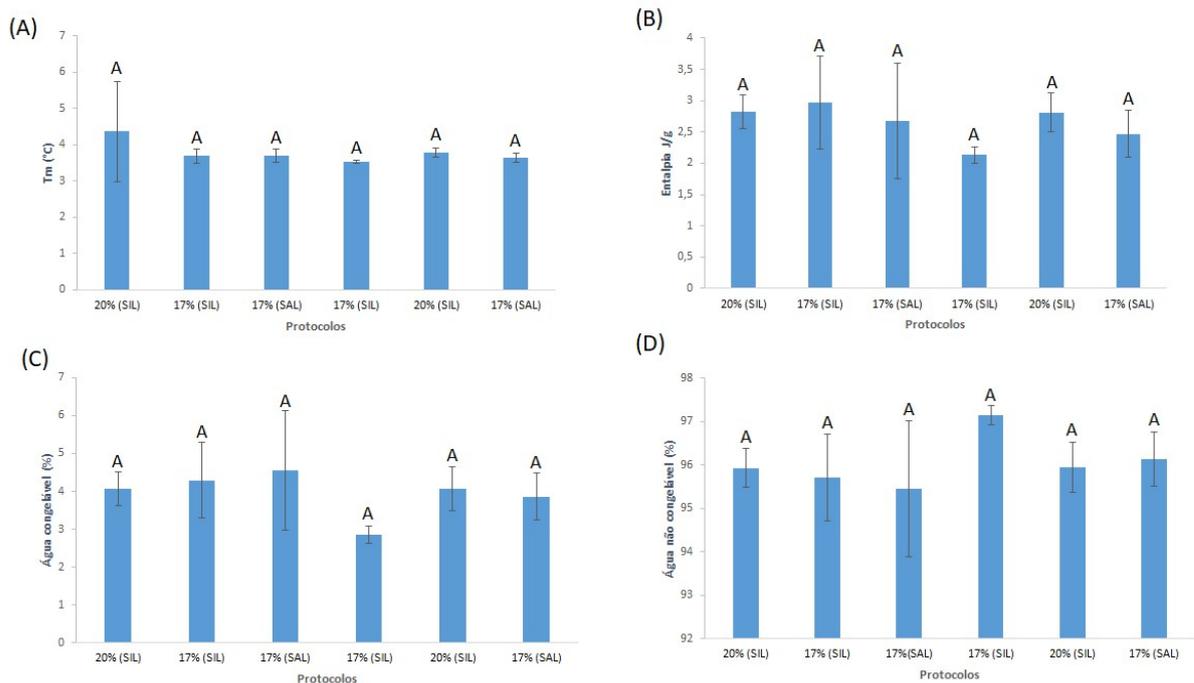
Figura 7 - Termograma de DSC de sementes de *Coffea arabica* L. criopreservadas e reaquecidas em banho-maria a 40°C após secagem em sílica gel a 20% (bu) pré-resfriadas; em sílica gel até 17% (bu) pré-resfriadas; em solução salina saturada de sulfato de amônio a 17% (bu) pré resfriadas; em sílica gel a 17% bu; em sílica gel a 20% bu; em solução salina saturada de cloreto de sódio a 17% bu.



A temperatura de fusão (T_m) das sementes após o criarmazenamento estão representadas na Figura 8A, onde pode ser observado que sementes secadas em sílica gel a 20% teor de umidade e pré-resfriadas apresentaram maiores médias para a temperatura de fusão 4,7 °C não diferindo estatisticamente das demais amostras que apresentaram T_m 's entre 3,5 e 3,7 °C.

Os resultados de entalpia de fusão estão apresentados na Figura 8B, onde nota-se que a maior entalpia ou energia requerida para a fusão da água, foi observada em sementes que foram secadas até 17% (bu) e pré-resfriadas em biocongelador, ou seja de 2,9 J/g. No entanto, não houve diferenças significativas entre os diferentes protocolos.

Figura 8 - Propriedades termodinâmicas da água em sementes de *Coffea arabica* L. criarmazenadas após secagem em sílica gel até 20% (bu), pré resfriadas em biocongelador, em sílica gel até 17% pré-resfriadas em biocongelador; em solução salina de sulfato de amônio até 17% bu pré resfriada, ou em sílica gel até 17%, em sílica gel até 20%, ou em solução salina saturada de cloreto de sódio, todos avaliadas após reaquecimento em banho-maria a 40 °C por dois minutos. (A) Temperatura de fusão (Tm). (B) Entalpia de fusão (Ent). (C) Porcentagem de água congelável. (D) Porcentagem de água não congelável. Médias seguidas pela mesma letra minúsculas dentre e maiúscula entre as temperaturas de aquecimento não diferem estatisticamente, entre si pelo teste de Skott-Knott, ao nível de 5% probabilidade.

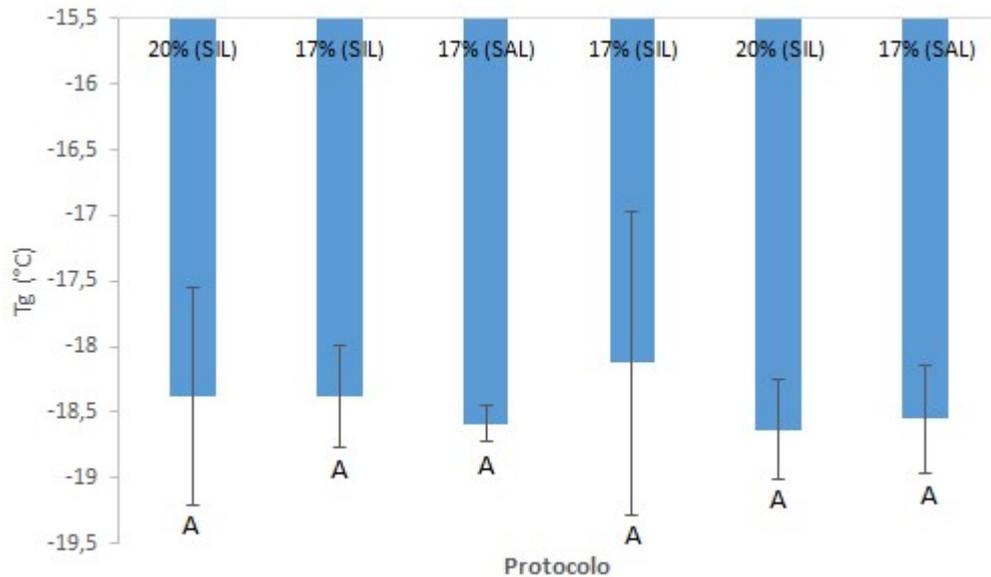


Fonte: Da autora (2019).

Para a porcentagem de água congelável e não congelável (FIGURA 8C e 8D), verifica-se que também não houve diferenças significativas entre os protocolos e sementes com 17% de teor de água secadas em solução salina de sulfato de amônio apresentaram maior média de porcentagem de água congelável de 4,5%. No entanto, aquelas sementes que foram secadas em sílica gel até 17% bu apresentaram menores médias, de 2,8%, consequentemente com maior porcentagem de água não congelável 97,2%.

Na Figura 9 observa-se que para todos os protocolos de criarmazenamento a formação de vidros intracelulares foi detectada em temperaturas próximas de -18 °C.

Figura 9 - Temperatura de formação de vidro intracelular (T_g) em sementes de *Coffea arabica* L. criopreservadas e reaquecidas em banho-maria a 40 °C após secagem em sílica gel até 20% bu pré-resfriadas; em sílica gel até 17% bu pré-resfriadas; em solução salina saturada de nitrato de amônio pré resfriadas; em sílica gel até 17% bu ; em sílica gel até 20% bu; em solução salina saturada de cloreto de sódio a 17% bu.



Fonte: Da autora (2019).

Nos trabalhos realizados por Rosa et al. (2008), os vidros intracelulares em sementes de café foram detectados em temperaturas abaixo de -15 °C e nos estudos de Dussert et al. (2001) com sementes de *Coffea* spp. em temperatura de -20 °C. Na presente pesquisa, a transição vítrea foi detectada em temperaturas próximas de -18 °C, estando, portanto, na mesma faixa de -15 °C a -20 °C, detectada por esses autores.

Em sementes, à medida que o teor de água diminui e a concentração de soluto aumenta, a temperatura de transição vítrea também aumenta e, eventualmente, a matriz celular vitrifica a temperaturas acima do ponto de resfriamento da água (WALTERS et al., 2010).

Relacionando as taxas de sobrevivência após o resfriamento com os parâmetros da formação de vidro e variações de entalpia, pode-se observar que no tratamento com secagem em solução salina de NaCl e imersão direta em criotânque, onde não houve sobrevivência (TABELA 5), o pico exotérmico mostrou uma entalpia de fusão de 2,47 J/g em temperatura de fusão de 3 °C, e temperatura de transição vítrea em -18 °C (FIGURAS 8 e 9).

Este resultado é similar ao das sementes secadas em solução salina de sulfato de amônio, pré-resfriadas e imersas em criotânque com 21% de sobrevivência (germinação) pico exotérmico aos 3 °C e entalpia de 2,67 J/g, com temperatura de transição vítrea -18 °C.

Embora estas sementes tenham apresentado quase zero de sobrevivência, os resultados das análises térmicas foram similares aos demais protocolos de criopreservação.

Estudos de criopreservação de sementes envolvendo a determinação do teor de água não congelável da análise de DSC são escassos. No entanto, a partir desses poucos estudos pode-se observar que alguns materiais de sementes (cotilédones, embriões) podem suportar a presença de água congelável durante a exposição a temperatura abaixo de zero, enquanto outros não (VERTUCCI, 1989; MARTINÍZ, et al., 2000; DUSSERT, 2001; SISUNANDAR et al., 2010). Em sementes de ervilha, a formação de cristais de gelo intracelular nem sempre limitava a sobrevivência (VERTUCCI, 1989). Este mesmo autor sugeriu que, abaixo de um limite de teor de água, os cristais de gelo que se formam em cotilédones de ervilha e embriões durante o resfriamento são muito pequenos para causar danos significativos e não se aglutinam durante o reaquecimento. Em contraste, as sementes de soja inteiras não resistiram à formação de gelo intracelular durante a exposição ao nitrogênio líquido.

Os resultados das análises térmicas, temperatura e entalpia de fusão da água, porcentagem de água congelável e não-congelável e parâmetros da transição vítrea nas sementes estudadas neste trabalho, estão sumarizados na Tabela 8.

Tabela 8 - Valores da porcentagem de água congelável (H₂O Cong.), água não congelável (H₂O N. Cong.), entalpia (Ent), temperatura de pico da fusão de água (T_m) e transição vítrea (T_g) e porcentagem de plântulas normais (PN) de sementes de *Coffea arabica* L submetidas a diferentes teores de água, métodos de secagem, pré-resfriamento, reaquecimento e criopreservação.

| Etapa de Secagem | H₂O Cong. | H₂O N. Cong. | Ent (J/g) | T_m (°C) | T_g (°C) | PN |
|---|-----------------------------|--------------------------------|------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| 43% Sombra | 41,77 | 58,22 | 60,86 | -0,52 | -18,25 | 91 |
| 35% Sílica | 15,97 | 84,02 | 18,39 | -6,59 | -22,49 | 91 |
| 20% Sílica | 3,79 | 96,20 | 2,60 | 4,15 | -23,11 | 94 |
| 17% Sílica | 5,56 | 94,43 | 3,17 | 6,53 | -21,99 | 96 |
| 17% Sal 1 | 5,88 | 94,11 | 3,42 | 5,25 | -22,33 | 84 |
| 17% Sal 2 | 3,52 | 96,47 | 2,05 | 5,21 | -20,48 | 86 |
| 12% Sílica | 7,14 | 92,85 | 2,99 | 3,55 | -18,41 | 80 |
| Etapa de Pré- resfriamento/Reaq. | | | | | | |
| 17% (Sal1)/ Ambiente 25°C | 4,70 | 95,29 | 2,58 | 3,61 | -18,92 | 44 |
| 17% (Sil)/ Ambiente 25°C | 4,47 | 95,52 | 2,61 | 3,54 | -18,10 | 89 |
| 20% (Sil)/ Ambiente 25°C | 4,71 | 95,28 | 2,73 | 3,48 | -19,17 | 87 |
| 20% (Si)/Banho-maria 40°C | 3,04 | 96,95 | 2,21 | 3,51 | -18,63 | 86 |
| 17% (Sil)/ Banho-maria 40°C | 3,76 | 96,23 | 2,75 | 4,98 | -18,95 | 85 |
| 17% (Sal1)/ Banho-maria 40°C | 5,78 | 94,21 | 3,32 | 3,50 | -19,05 | 52 |
| Etapa de Criopreservação | | | | | | |
| 20% (Sil) pré-resfr. | 4,07 | 95,92 | 2,82 | 4,37 | -18,37 | 81 |
| 17% (Sil) pré-resfr. | 4,29 | 95,70 | 2,97 | 3,68 | -18,37 | 80 |
| 17%(Sal 1) pré-resfr. | 4,55 | 95,44 | 2,67 | 3,70 | -18,59 | 04 |
| 17% (Sil) Direto NL | 2,85 | 97,14 | 2,13 | 3,535 | -18,12 | 76 |
| 20% (Sil) Direto NL | 4,05 | 95,94 | 2,81 | 3,79 | -18,63 | 75 |
| 17%(Sal 2) Direto NL | 3,86 | 96,13 | 2,47 | 3,64 | -18,55 | 0 |

*Sal 1 (Solução salina de sulfato de amônio); Sal 2 (Solução salina de Cloreto de sódio); NL (Nitrogênio líquido).

Fonte: Da autora (2019).

Apesar do paradigma de que a formação de gelo intracelular é letal, estudos usando diversos sistemas mostraram a incidência de gelo intracelular sem mortalidade (WESLEY-SMITH et al., 2014, 2015) mostrando que as células podem sobreviver ao gelo intracelular se os cristais forem pequenos e estiverem localizados no citoplasma.

Estudos utilizando calorimetria exploratória diferencial, sugerem que existem grandes frações congeladas e algumas não congeladas, como observado em experimentos de resfriamento extracelular. Talvez as frações não congeladas estejam localizadas dentro do maquinário celular crítico e sejam protegidas por mecanismos de resfriamento-dessecação ou vitrificação. Os estudos do DSC também sugerem que a estrutura do gelo não é letal, dependendo do tipo de célula, cristais suficientemente pequenos não são letais (WESLEY-SMITH et al., 2014).

Avaliação fisiológica de sementes que foram secadas em solução salina saturada obtiveram menores ou nenhuma sobrevivência após a criopreservação, pelos dados de DSC para estas amostras pôde-se observar que a porcentagem de água congelável estava similar aos demais tratamentos que foram expostos ao nitrogênio sugerindo que a causa do baixo índice de sobrevivência seria por algum outro dano nas sementes, não detectado nesta pesquisa.

A porcentagem de água congelável nas sementes após secagem foi superior àquelas que passaram pelo pré-resfriamento antes da imersão no nitrogênio líquido. O resfriamento lento das amostras até uma temperatura sub-zero pré-definida, favorece a desidratação e evita os danos por formação de gelo intracelular, pois ao diminuir a temperatura a um ritmo relativamente lento ($0,5-2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$), a água intracelular se movimenta para o meio extracelular por meio de um gradiente de potencial, permitindo que o conteúdo celular se torne mais concentrado. Essa concentração diminui o ponto de resfriamento intracelular e, conseqüentemente, pode permitir formação de cristais de gelo apenas fora da célula (ENGELMANN, 2011).

Neste trabalho, foi evidenciado que em sementes de café, a transição vítrea ocorre em temperaturas próximas de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, um valor médio entre as ocorrências detectadas em outras pesquisas (DUSSERT et al., 2001; ROSA et al., 2008). Uma vez que já foi confirmado que sementes de *Coffea arabica* L. com teores de água próximos a 20% bu não sobrevivem ao armazenamento em temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (EIRA et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2017), ressalta-se que, provavelmente, as sementes desta espécie não se beneficiam da proteção por

vidros intracelulares, contra os danos causados pelo armazenamento em temperaturas sub-zero.

Em semente ortodoxas, vidro aquosos ocorrem em sementes com baixos teores de água e em temperatura ambiente e está bem documentado que estas sementes se beneficiam das transições vítreas, uma vez que nestas condições, elas entram em quiescência metabólica por períodos variáveis com a espécie. Assim, quando as condições de umidade, luz e temperatura são favoráveis à germinação, estas sementes produzem plântulas normais.

É necessário entender melhor as interações entre o conteúdo de água, a taxa de resfriamento, a estrutura celular e a estrutura do gelo, para otimizar os tratamentos de criopreservação.

4 CONCLUSÕES

Sementes de *Coffea arabica* L. secadas em sílica gel até 20 ou 17% bu, pré-resfriadas em biocongelador, ou diretamente imersas em nitrogênio líquido, apresentam alta sobrevivência.

Em sementes de *Coffea arabica* L. com altos teores de água, de (43 e 35% bu) a entalpia de fusão e a porcentagem de água congelável são maiores do que em sementes com teores de água de 20, 17 ou 12% bu.

A fusão da água congelada em sementes com 35% bu ocorre em temperaturas inferiores à temperatura de fusão da água pura de 0 °C.

A formação de vidros intracelulares em sementes hidratadas foi detectada em temperaturas de -18 e -22 °C; em sementes com 17 e 20% (bu) entre -20 e -23 °C e em sementes crioarmazenadas, em -18 °C.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399-406, oct./dec. 2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- CADDAH, M. K.; ANDRADE, B. O.; MEDEIROS, A. C. S. Efeitos da desidratação e do armazenamento em sementes de *Magnolia ovata* St. Hil. Magnoliaceae. **Informativo ABRATES**, Londrina, v. 15, n. 1-3, p. 285, 2005.
- COELHO, S. V. B. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de café secas em sílica gel e soluções salinas saturadas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 50, n. 6, p. 483-491, june. 2015.
- COELHO, S. V. B. et al. Tolerance of *Coffea arabica* L. seeds to subzero temperatures. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 3, p. 312-321, may/jun. 2017.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de café. **Primeiro levantamento Safra 2019**, Brasília, v. 5, n. 1, p. 1-62, jan. 2019.
- DUROWOJU, I. B.; BHANDAL, K. S.; HU, J.; CARPICK, B.; KIRKITADZE, M. Differential Scanning Calorimetry — A Method for Assessing the Thermal Stability and Conformation of Protein Antigen. **J Vis Exp.**, v. 121, mar. 2017.
- DUSSERT, S. et al. Cryopreservation of seed of four coffee species (*Coffea arabica*, *C. costatifructa*, *C. racemosa* and *C. sessiliflora*): importance of water content and cooling rate. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 8, n. 1, p. 9-15, feb. 1998.
- DUSSERT, S. et al. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. **Physiologia Plantarum**, v. 112, p. 495–504, 2001.
- EIRA, M. T. S. et al. Tolerance of coffee spp. seeds to desiccation and low temperature. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 2, p. 97-105, ago. 1999.
- ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behaviour?: I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n.9, p. 1167-1174, sept. 1990.
- ENGELMANN, F. Plant cryopreservation: progress and prospects. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 40, n. 5, p. 427-433, sept./oct. 2004.
- ENGELMANN, F. Use of biotechnologies for the conservation of plant biodiversity. **In vitro & Developmental Biology**, Columbia v. 47, p. 5-16, nov. 2011.
- 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.

FIGUEIREDO, M. A. et al. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. **Journal of Seed Science**, v. 39, n. 2, p. 150-158, 2017.

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

GILL, P.; MOGHADAM, T. T.; RANJBAR, B. Differential Scanning Calorimetry Techniques: Applications in Biology and Nanoscience. **J. Biomol. Tech.** v. 21 n. 4 p. 167-193, 2010.

GONZALEZ-ARNAO, M. T. et al. Development and large scale application of cryopreservation techniques for shoot and somatic embryo cultures of tropical crops. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 92, p. 1-13, jan. 2008.

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

LEOPOLD, A. C.; SUN, W. Q.; BERNAL-LUGO, I. The glassy state in seeds: analysis and function. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 4, n. 3, p. 267- 274, sept. 1994.

MARTÍNEZ, D. et al, Differential scanning calorimetry applied to the storage at ultra-low temperatures of olive and hop in vitro grown shoot-tips. **Thermochimica Acta**, v. 349, Issues 1-2, 1, p.147-151, april. 2000.

MOLINA, F. H.; VOLPONI, J. E.; ANGELINI, J. M. G.; DADAM, A. P.; MEYER, L. H. **Degradation Studies of Polymeric Insulators – Products Performance Requirements**. CIRED 2011 – 21st International Conference on Electricity Distribution, Frankfurt, 2011.

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

PERRONI, I. T et al. Soro em pó: estado vítreo e condições de operação do spray dryer. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 71, n. 2, p. 106-118, abr./jun. 2016.

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

ROSA, S. D. V. F. et al. The effect of storage conditions on coffee seed and seedling quality. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 39, n. 1, p. 151-164, apr. 2011.

ROSA, S. D. V. F et al. Propriedades calorimétricas da água e vidros citoplasmáticos associados à tolerância a dessecação em sementes de *Coffea arabica* L. In: CONGRESSO DE PESQUISAS CAFEEIRAS. 2008. 34., **Anais...** Caxambu-MG, 2008.

SANTANA-BUZZY, N. et al. Advances in coffee tissue culture and its practical applications. **In Vitro Cell Developmental Biology Plant**, New York, v. 43, p. 507- 520, 2007.

- SANTOS, F. S. et al. Biometria e qualidade fisiológica de sementes de diferentes matrizes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex A. DC.) Standl. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 82, p. 163-173, jun. 2009.
- SANTOS, I. R. I. Criopreservação de germoplasma vegetal: a alternativa para conservação a longo prazo. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, n. 20, v. 4, p. 60-65, maio/jun. 2001.
- SANTOS, V. E. et al. Análise do setor de produção e processamento de café em Minas Gerais: uma abordagem matriz insumo-produto. **Revista Economia Sociologia Rural**, v. 47, n. 2, p. 363-388, 2009.
- SISUNANDAR, S. et al. Dehydration improves cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.). **Cryobiology**, v. 61, n. 3, p. 289-296, 2010.
- VERTUCCI, C. W. Relationship between thermal transitions and freezing injury in pea and soybean seeds. **Plant Physiol**, v. 90, p. 1121–1128, 1989a.
- VERTUCCI, C. W. The effects of low water contents on physiological activities of seeds. **Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 77, n. 1, p. 172-176, apr. 1989b.
- VERTUCCI, C. W. Predicting the optimum storage conditions for seeds using thermodynamic principles. **Journal Seed Technology**, Lansing, v.17, n. 2, p. 41-53, 1993.
- VERTUCCI, C.W.; FARRANT, J.M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G (Ed.). **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. p. 237-271.
- VILLELA, F. A.; MARCOS-FILHO, J. Estados energéticos e tipos de água na semente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 20, n. 2, p.79-83, 1998.
- WALTERS C, et al. Structural mechanics of seed deterioration: standing the test of time. **Plant Science**, v. 179, p. 565–573, 2010.
- WESLEY-SMITH et al. Intracellular ice and cell survival in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*: an ultrastructural study of factors affecting cell and ice structures. **Annals of botany**, v. 113, n. 4, 695-709, 2014.
- WESLEY-SMITH, J. et al. Why is intracellular ice lethal? A microscopical study showing evidence of programmed cell death in cryo-exposed embryonic axes of recalcitrant seeds of *Acer saccharinum*., **Annals of Botany**, v. 115, Issue 6, p. 991–1000, may. 2015.