



ISABEL RODRIGUES BRANDÃO

**CARACTERIZAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E
FISIOLÓGICAS DE PEDÚNCULOS E FRUTOS
DE CAFÉ COM DIFERENTES FORÇAS DE
DESPRENDIMENTO**

LAVRAS - MG

2015

ISABEL RODRIGUES BRANDÃO

**CARACTERIZAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E FISIOLÓGICAS DE
PEDÚNCULOS E FRUTOS DE CAFÉ COM DIFERENTES FORÇAS DE
DESPRENDIMENTO**

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

Orientador

Dr. Jose Donizeti Alves

Coorientador

Dr. Fábio Moreira da Silva

LAVRAS - MG

2015

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

Brandão, Isabel Rodrigues.

Caracterizações ultraestruturais e fisiológicas de pedúnculos e frutos de café com diferentes forças de desprendimento / Isabel Rodrigues Brandão. – Lavras: UFLA, 2015.

74 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador(a): Jose Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Zona de abscisão. 3. Poliaminas. 4. Enzimas de degradação. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ISABEL RODRIGUES BRANDÃO

**CARACTERIZAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E FISIOLÓGICAS DE
PEDÚNCULOS E FRUTOS DE CAFÉ COM DIFERENTES FORÇAS DE
DESPRENDIMENTO**

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

APROVADA em 19 de fevereiro de 2015.

Dra. Milene Alves de Figueiredo Carvalho	EMBRAPA Café
Dra. Vânia Aparecida da Silva	EPAMIG
Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dr. Fábio Moreira da Silva	UFLA

Dr. Jose Donizeti Alves
Orientador

LAVRAS - MG

2015

Aos meus pais e amado marido

Dedico

As minhas irmãs e sobrinhos

Ofereço

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por me dar força diariamente para continuar na longa caminhada e proporcionar mais uma conquista.

Ao meu marido Pedro que sempre esteve ao meu lado apoiando e me dando forças. Te amo! Essa conquista é nossa!!

Aos meus pais, Tomaz e Elcar, que são à base de tudo! Sempre me incentivaram e, mesmo de longe, apoiaram-me até nos momentos mais difíceis! Essa conquista também é de vocês!! Amo vocês.

As minhas irmãs, Tatiana e Luciana, pelo amor e amizade que sempre dedicaram a mim e por me darem sobrinhos tão maravilhosos! Amo vocês manas!!

Ao meu orientador, Professor Donizeti, pela confiança e pelos ensinamentos proporcionados.

Aos meus colegas e amigos de Laboratório que, ao longo dessa jornada, tornaram-se uma família! Dayane, Lissa, Kamila, Lorena, Meline, Helbert, Cinthia, Jéssica, Jacqueline e Amanda, obrigada pelos momentos de descontração nas coletas!!!

Um agradecimento especial para duas pessoas que foram fundamentais durante todo o processo, principalmente nessa etapa final, sem elas teria sido muito mais pesado, Dayane e Kamila, muito obrigada!!

Pituca Preta, tu sabes, mais que uma colega, és minha irmã!! Obrigada, por sempre estar ao meu lado!!

Aos professores e funcionários do Setor de Fisiologia, principalmente a Lena, pela amizade dedicada.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa, e ao PPG em Agronomia/Fisiologia Vegetal, pela oportunidade de realização do doutorado.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização
dessa etapa.

RESUMO

Objetivou-se investigar os eventos fisiológicos envolvidos no desprendimento dos frutos, durante os diferentes estádios de amadurecimento, relacionando-os com as diferentes forças de desprendimento, bem como a existência de uma zona de abscisão nos frutos de café. Pedúnculos e frutos de *Coffea arabica* cv. Icatu amarelo, foram coletados nos estádios de maturação verde, verde-cana e cereja nos intervalos de forças de 10 – 13N e 8 – 9,9N, 6 – 6,9N e 5 – 5,9N, 4 – 4,9 e 2 – 3,9N, respectivamente. Avaliações ultraestruturais e anatômicas foram realizadas na ligação entre pedúnculos e frutos, e as análises bioquímicas em pedúnculos e frutos separadamente. Não foi observada uma zona de abscisão entre os pedúnculos e frutos de cafeeiro, porém nota-se uma desestruturação das células, ao longo do período de maturação. Essa desestruturação está relacionada ao aumento da atividade das enzimas de degradação de parede celular, poligalacturonase e celulase nos estádios finais de maturação, bem como com uma maior peroxidação lipídica nesses estádios. Os níveis de poliaminas foram superiores no estágio inicial de maturação, indicando uma regulação antagônica com a síntese de etileno. Em geral, existe uma clara diferença fisiológica entre os estádios de maturação, o que explica as diferentes forças de desprendimento utilizadas em cada um. A partir desses resultados, pode-se concluir que *Coffea arabica* cultivar Icatu amarelo não apresenta uma zona de abscisão entre o pedúnculo e o fruto e que a diminuição da força de desprendimento está relacionada às alterações morfológicas e bioquímicas durante o processo de maturação.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Zona de abscisão. Poliaminas. Enzimas de degradação. Espécie reativa de oxigênio.

ABSTRACT

This study aimed to investigate the physiological events involved in coffee detachment during the various stages of ripening, linking them with the different forces of detachment used for its harvesting, as well as the existence of an abscission zone in coffee fruits. Peduncle and fruit of *Coffea arabica* cv Icatu Amarelo were collected in the stages of ripening “verde”, “verde-cana” and “cereja” in forces intervals of 10 - 13 N and 8 - 9,9 N, 6 - 6,9 N and 5 - 5,9 N, 4 - 4,9 and 2 - 3,9 N, respectively. Ultrastructural and anatomical evaluations were performed on the connection region between peduncle and fruits, and biochemical analyzes were performed in peduncle and fruits separately. It was not observed a clear abscission zone between the peduncle and fruit of coffee plants, but can be observed a disruption of the cells over the maturation period. This disruption can be related to the increase in activity of cell wall degrading enzymes, polygalacturonase and cellulose, in the final stage of maturation, as well as the increase of lipid peroxidation. Polyamine levels were higher in the initial stage of ripening, indicating an antagonistic regulation with ethylene synthesis. In general there is a clear physiological difference between the maturation stages which explain the different forces of detachment used in each. In this way, it can be concluded that *Coffea arabica* cv Icatu Amarelo does not have an clear abscission zone between peduncle and fruit. Moreover the decrease of fruit-detachment force is clearly related to morphological and biochemical changes during the maturation process.

Key-words: *Coffea arabica*. Abscission zone. Polyamines. Degrading enzymes. Reactive oxygen species.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Cultura do cafeeiro	12
2.2	Fisiologia da maturação do café	14
2.3	O processo de maturação e as espécies reativas de oxigênio	18
2.4	Colheita mecanizada seletiva e força de desprendimento de frutos de café	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Obtenção do material vegetal	24
3.2	Análises ultraestruturais e anatômicas	26
3.2.1	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	26
3.2.2	Anatomia dos pedúnculos	27
3.3	Análises Bioquímicas	28
3.3.1	Atividade da poligalacturonase (PG)	28
3.3.2	Atividade da celulase	28
3.3.3	Quantificação de amido	29
3.3.4	Quantificação de poliaminas livres (PA)	30
3.3.5	Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	30
3.3.6	Peroxidação lipídica	31
3.3.7	Enzimas antioxidantes	31
3.3.7.1	Dismutase do superóxido (SOD)	32
3.3.7.2	Catalase (CAT)	32
3.3.7.3	Peroxidase do ascorbato (APX)	33
3.4	Análise estatística	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	Análises ultraestruturais e anatômicas	34
4.2	Análises bioquímicas	40
5	CONCLUSÃO	59
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	60
	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

O cafeeiro é uma das culturas mais tradicionais e de grande impacto econômico na agricultura brasileira, tendo seu cultivo iniciado há mais de 200 anos. Seu fruto é conhecido como climatérico, apresentando um pico na produção de etileno no estágio verde-cana, que antecede o estágio cereja, que é o ponto de maturação ideal para a colheita.

O processo de maturação dos frutos é descrito como uma forma de senescência modificada, caracterizada por uma elevada produção de espécies reativas de oxigênio, declínio na atividade antioxidante e consequente dano às membranas celulares. Esses eventos, associados à ativação de enzimas de degradação de parede celular, acarretam nas alterações necessárias para o total amadurecimento dos frutos.

O cafeeiro apresenta uma diferença na maturação de seus frutos, em consequência de uma florada desuniforme, podendo prejudicar, tanto o processo de colheita como a qualidade do produto final. Isso porque os frutos devem ser colhidos somente quando atingirem a maturação, fase em que apresentam as características de aroma e paladar desejadas. No caso do café, a desuniformidade de maturação dos frutos, juntamente com o formato da planta, proporciona um maior grau de dificuldade de colheita quando comparada a outras culturas.

Os custos, na etapa de colheita, podem chegar a 70% do custo total da produção, e a escassez de mão de obra está levando a um aumento do uso de colhedoras. A colheita mecanizada é realizada por varetas situadas em cilindros oscilantes, os quais trabalham na vertical. Há variação da força exigida para o desprendimento dos frutos da planta nos diferentes estágios de maturação, ocorrendo um decréscimo da intensidade ao longo do amadurecimento. Assim, durante o processo de colheita, deve-se considerar o tempo de aplicação, bem como a intensidade da vibração da colhedora. Essa força de desprendimento dos

frutos pode estar diretamente relacionada com a formação de uma zona de abscisão, com células anatômicas e morfológicamente diferenciadas, que preparam o órgão vegetal para o seu desprendimento da planta.

Com o objetivo de aperfeiçoar a colheita mecanizada seletiva, investigaram-se os eventos fisiológicos envolvidos no desprendimento dos frutos durante os diferentes estádios de amadurecimento, relacionando-os com as diferentes forças de desprendimento, bem como a existência de uma zona de abscisão nos frutos de café.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do cafeeiro

O cafeeiro é uma espécie originária do continente africano, sendo, no Brasil, uma das culturas mais tradicionais e de grande expressão econômica na agricultura (DAVIS et al., 2011). Ela pertence ao gênero *Coffea* L. da família Rubiaceae, que apresenta em torno de 100 espécies, sendo *C. arabica* e *C. canephora* as de maior valor econômico (CASTRO; MARRACCINI, 2006).

Depois do petróleo, o café é a *commodity* mais comercializada no mundo, com vendas globais estimadas em 90 bilhões de dólares. No Brasil, a área cultivada com as espécies arábica e canephora totalizam cerca de 2.282.619 hectares, sendo a maior área (1.238.270 hectares) localizada no estado de Minas Gerais, com predomínio da espécie arábica (98,87%) (CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2015).

Dentre as cultivares de cafeeiro, podemos destacar a cultivar Icatu amarelo, desenvolvida, inicialmente, a partir da identificação do cruzamento natural de plantas da cultivar Icatu Vermelho com 'Bourbon Amarelo' ou 'Mundo Novo Amarelo', ocorrido em um experimento do Instituto Agrônomo. Essa cultivar apresenta excelente qualidade da bebida, podendo ser utilizada mais intensivamente para café "espresso". Apresenta maturação de média a tardia, e as cultivares do grupo Icatu Amarelo, podem ser uma opção em regiões de baixas altitudes, quentes e úmidas (GUERREIRO FILHO; FAZUOLI; EIRA AGUIA, 2015).

A região Sul do estado de Minas Gerais é marcada por grandes variações edafoclimáticas, o que faz com que a qualidade do café se expresse de maneira distinta, com uma grande diversidade de sabores e aromas (BARBOSA et al., 2012). Aliado a isso, está o fato de que o processo de floração do cafeeiro pode

ocorrer em diferentes períodos, resultando em uma maturação dos frutos de forma desigual (MAJEROWICZ; SONDAHL, 2005). A qualidade da bebida tem sido associada, entre outros fatores, com a fase de maturação dos frutos no período da colheita. Dessa maneira, a presença de frutos imaturos durante a colheita, resultantes da desuniformidade da florada, altera a acidez e o amargor da bebida, influenciando a qualidade do produto final (PEREIRA et al., 2005).

Os frutos imaturos são aqueles que não completaram o ciclo de maturação e, portanto, não apresentam composição química plena e equilibrada, apresentando sabor, textura e odor indesejáveis. Com isso, as propriedades organolépticas do café não se desenvolvem completamente durante a torra dos grãos, dando origem a bebidas ásperas, adstringentes e com amargor acentuado, com qualidade inferior àquela proporcionada por frutos maduros (CORTEZ, 2001).

Após o processo de fecundação, inicia-se a fase de formação dos frutos, fase essa denominada “chumbinho”, na qual ainda não apresentam crescimento visível. Posteriormente, no estágio verde, há a formação do endosperma e granação dos frutos, que se expandem rapidamente, atingindo seu crescimento máximo. A partir da fase “verde-cana”, que caracteriza o início da maturação, os frutos começam a mudar de cor, evoluindo até o estágio “cereja”, e já se pode diferenciar a cultivar de fruto amarelo ou vermelho. Após essa fase, os frutos começam a secar até atingir o estágio “seco” (MORAIS et al., 2008; PEZZOPANE et al., 2003).

A maturação dos frutos é marcada por vários processos metabólicos e modificações na composição química, até o ponto ideal de colheita, ou seja, o estágio cereja (MORAIS et al., 2008). Por isso, o estágio cereja, confirmado pela troca de coloração de verde a vermelho ou amarelo, dependendo da cultivar, é o momento em que o fruto expressa o seu potencial máximo de qualidade (ARRUDA; HOVELL; REZENDE, 2011).

O fruto do cafeeiro atinge o auge da maturação no estágio cereja, onde há o máximo desenvolvimento de todos os seus componentes, como casca, mucilagem, pergaminho e sementes. Durante o processo de torra, ocorrem todas as reações físico-químicas necessárias para a obtenção de características sensoriais desejáveis, satisfazendo às exigências para produção de cafés de alta qualidade (GIOMO, 2012). Essa qualidade do café está intimamente relacionada com o sabor e aroma que ele apresenta, e isso determina o preço do produto final, bem como a aceitação no mercado nacional e internacional dos cafés especiais (MALAVOLTA, 2000). Com o aumento da demanda por cafés especiais em relação aos cafés comuns, a qualidade da bebida vem se tornando um critério para atingir o mercado com maior valorização do produto final (LADERACH et al., 2011).

2.2 Fisiologia da maturação do café

O estudo da fisiologia do cafeeiro é de grande relevância para o conhecimento da cultura e dos tratamentos culturais a serem realizados para a obtenção de uma bebida de qualidade (FAGAN et al., 2011).

O cafeeiro apresenta frutos climatéricos e sua maturação é um processo em que os frutos alcançam as características de cor, textura, aroma, sabor, tornando-os aptos ao consumo (MARIN-LOPEZ et al., 2003; SÁGIO et al., 2013, 2014). Em *C. arabica*, a sacarose é um dos principais compostos presentes no grão e, embora seja degradada durante a torra, esta molécula ainda pode ser encontrada em baixas concentrações nos grãos torrados, contribuindo para a doçura da bebida. Além disso, sua degradação fornece açúcares redutores, os quais estão envolvidos nas reações de Maillard e/ou caramelização que ocorrem durante o processo de torra, sendo responsáveis pela formação da cor, sabor e aroma peculiares da bebida. O alto conteúdo de sacarose em grãos de *C.*

arabica, em relação ao encontrado em *C. robusta*, pode explicar, parcialmente, a melhor qualidade da bebida, a qual depende também de vários outros fatores (GEROMEL et al., 2008; KY et al., 2001).

Portanto, os processos de transformação física, química e fisiológica são determinantes na qualidade da bebida e se iniciam comumente, durante as etapas finais da maturação fisiológica do fruto. Esse processo final de maturação do café inicia-se com o aumento da atividade respiratória e com a síntese de etileno, acompanhado do metabolismo de açúcares e ácidos graxos, além do decréscimo da adstringência e síntese de compostos voláteis, como aldeídos, ésteres, cetonas e álcoois que caracterizam o aroma do fruto maduro (CARVALHO; CHALFOUN; CHAGAS, 1985; WANG; LI; ECKER, 2002). No cafeeiro, a produção do etileno é baixa em frutos verdes, atinge um pico no estágio verde-cana e novamente uma queda no estágio final de maturação, indicando uma fase climática da maturação (PEREIRA et al., 2005).

A biossíntese desse hormônio tem como precursor o adenosil-L-metionina (SAM), que é produzido, a partir do aminoácido metionina, pela ação da enzima sintetase da SAM (EC 2.5.1.6), numa reação que consome energia na forma de ATP (BLEECKER; KENDE, 2000; YANG; HOFFMAN, 1984). A etapa crucial na rota, no entanto, é a conversão de SAM ao ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), catalisada pela enzima sintase do ACC (EC 4.4.1.14). Juntamente com a produção do ACC, a ação da sintase do ACC sobre a SAM produz também 5'-metiltioadenosina (MTA). Essa molécula é, então, convertida à metionina por meio de uma via de síntese de metionina modificada (MIYAZAKI; YANG, 1987), conhecida como ciclo de Yang, onde a quantidade de metionina é mantida para a produção do etileno. Na etapa subsequente, o ACC é convertido a etileno, pela ação da oxidase do ACC (EC 1.4.3) (BLEECKER; KENDE, 2000; YANG; HOFFMAN, 1984).

O etileno é um hormônio gasoso, relacionado com vários processos fisiológicos nas plantas, tais como: respostas a estresses ambientais, processo de senescência de órgãos e tecidos, maturação de frutos e no processo de abscisão (KESY et al., 2011; WANG; LI; ECKER, 2002). O processo de abscisão é altamente regulado e envolve mudanças estruturais, bioquímicas e moleculares, que resultam na separação dos órgãos vegetais, como folhas, flores e frutos (LEWIS et al., 2006). Esse processo ocorre em uma camada de células anatomicamente distinta, conhecida como zona de abscisão (ZA) (PATTERSON, 2001). A funcionalidade e o posicionamento das células da ZA proporcionam às mesmas serem alvos hormonais em plantas superiores (OSBORNE; MCMANUS, 2005). Essa zona apresenta camadas, que são diferenciadas do ponto de vista bioquímico e morfológico, e o enfraquecimento das paredes celulares, nessa região, ocorre pela dissolução da lamela média e degradação da parede celular por essas enzimas.

Os polissacarídeos das paredes celulares dos frutos estão associados à firmeza de seus tecidos que, durante o amadurecimento, sofrem alterações, levando à degradação da parede celular e à diminuição da adesão intercelular (WALDRON et al., 1997). A decomposição das moléculas, como: protopectinas, celulosas e hemicelulosas amaciam as paredes celulares, pois diminuem a força coesiva que mantém as células unidas, assim como a degradação da molécula de amido (CHITARRA; CHITARRA, 1990). As mudanças aparentes nas dimensões dos polímeros da parede celular que acompanham o amadurecimento dos frutos implicam na ação de enzimas capazes de degradar componentes específicos da parede celular. Dessa maneira, a percepção do sinal do etileno pelas células, durante o processo de maturação, leva à ativação das isoformas de enzimas específicas de degradação de parede celular, como poligalacturonase (EC 3.2.1.15) e celulase (EC 3.1.2.4) (GONZALEZ-CARRANZA; LOZOYA-GLORIA; ROBERTS, 1998).

Nesse contexto, a enzima poligalacturonase desempenha o papel de catalisar a hidrólise das ligações α 1-4 entre os resíduos de ácido galacturônico da cadeia de pectina (FISCHER; BENNETT, 1991). Sua atividade tem sido identificada em vários frutos, durante o amadurecimento, e se correlaciona com aumento de pectinas solúveis e o amadurecimento dos frutos (RESENDE et al., 2004). Já, a enzima celulase é responsável pela desestruturação das microfibrilas de celulose e, portanto, capaz de romper as ligações glicosídicas, resultando na liberação de oligossacarídeos (GALLON; BROETTO; SILVA, 2009).

Em várias espécies, a interação do etileno com outros hormônios, como as poliaminas (PA), é crítica na regulação da progressão da abscisão dos órgãos (LEWIS; LESLIE; LILJEGREN, 2006; PATTERSON; BLEECKER, 2004). PA ou também conhecidas como aminas bioativas, desempenham importante papel no crescimento e proliferação celular e na síntese de proteínas e ácidos nucléicos. Estão envolvidas na reparação da matriz extracelular, adesão celular e em certos processos de sinalização (LEITE et al., 2012), estando presentes, com proporções variadas, na maioria dos vegetais (GLÓRIA, 2005). A concentração de poliaminas nos tecidos vegetais pode ser afetada por inúmeros fatores, dentre eles o grau de maturação, luz e temperatura. Estudos têm demonstrado uma correlação positiva da concentração de poliaminas totais, ou, até mesmo, de uma ou das três principais (putrescina, espermidina e espermina) no crescimento e desenvolvimento vegetal (MALIK; SINGH, 2004; ZIOSI et al., 2003). De forma geral, os frutos são ricos em putrescina e espermidina, contendo baixas concentrações de espermina. Maiores teores de espermina são, geralmente, encontrados em produtos cárneos (BARDÓCZ, 1995). Como o etileno e as PA compartilham de um precursor comum, SAM, a relação de biossíntese dessas moléculas é considerada como uma demanda competitiva (PANDEY et al., 2000; PANG et al., 2006; QUIN; LAN, 2004).

Em *Olea europaea* L., foi observado que o metabolismo das PA é alterado na ZA, durante a abscisão de frutos maduros (GOMEZ-JIMENEZ et al., 2010a). Trabalhos com essa espécie já demonstraram que, durante a abscisão dos frutos maduros, os níveis endógenos de poliaminas estão intrinsecamente controlados, provavelmente em benefício da síntese de etileno na zona de abscisão (GOMEZ-JIMENEZ et al., 2010b). No entanto, em frutos de café, ainda é desconhecida a existência dessa zona de abscisão, bem como a interação entre os hormônios. Dados esses que auxiliariam na compreensão do processo de desprendimento dos frutos de café.

2.3 O processo de maturação e as espécies reativas de oxigênio

O processo de amadurecimento do fruto pode ser considerado como uma forma modificada de senescência. O mecanismo de deterioração das membranas e desestruturação dos tecidos durante o amadurecimento podem ser, provavelmente, semelhantes aos caracterizados durante o processo de senescência, envolvendo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (MONDAL et al., 2004, 2009).

Dentre as EROs, estão o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e oxigênio singlete (1O_2), que são produtos inevitáveis do metabolismo vegetal e que são consideradas a principal causa de danos oxidativos celulares (JIMENEZ et al., 2002; SHARMA et al., 2012). Visando a minimizar os efeitos das EROs, as células apresentam em seu metabolismo o sistema antioxidante enzimático, constituído por enzimas, como: a dismutase do superóxido (SOD - EC 1.15.1.1), catalase (CAT - EC 1.11.1.6) e peroxidase do ascorbato (APX - EC 1.11.1.11), e o não-enzimático composto, por exemplo, pelo ascorbato e glutatona.

A enzima SOD é a primeira linha de defesa contra as EROs, realizando a dismutação dos íons superóxidos, com a formação de H_2O_2 . Os íons superóxidos são sintetizados em qualquer compartimento celular que apresente transporte de elétrons, estando presentes em todos os compartimentos celulares susceptíveis ao estresse oxidativo (ALSCHER; ERTURK; HEATH, 2002; BREUSEGEM et al., 2001; MITTLER, 2002). A CAT tem a função de neutralizar o H_2O_2 em água e oxigênio molecular e está presente nos peroxissomas e glioxissomas (MITTLER, 2002; SHARMA et al., 2012). Já, a APX utiliza o ascorbato como seu doador de elétrons para reduzir H_2O_2 à água, fazendo parte do ciclo ascorbato-glutationa (SHIGEOKA et al., 2002). A APX é considerada uma enzima de suma importância na eliminação de H_2O_2 no citosol e nos cloroplastos (INZÉ; VAM, 1995). O ciclo ascorbato-glutationa é uma via eficiente para plantas que tenham disponibilidade de H_2O_2 em compartimentos celulares onde não esteja presente a enzima CAT, como nos cloroplastos e citosol (MITTLER, 2002; POLLE, 2001).

A existência de um equilíbrio entre a formação de EROs e a ação de componentes celulares com capacidade antioxidante é muito importante, uma vez que as células são muito susceptíveis aos danos oxidativos (ANAND et al., 2009). Reações envolvendo EROs são constituintes intrínsecas de processos como senescência e maturação de frutos, principalmente porque é uma resposta ao declínio da atividade de determinadas enzimas antioxidantes (PROCHÁZKOVÁ; WIHELMOVÁ, 2007).

Acredita-se que as EROs desempenham um papel importante no afrouxamento da parede celular. Estudos têm demonstrado a participação do H_2O_2 na formação da zona de abscisão. A aplicação exógena de H_2O_2 em *Capsicum frutescens* levou a um aumento na expressão de genes que codificam a enzima celulase, levando ao processo de abscisão de folhas. Por outro lado, quando aplicados inibidores de EROs e, conseqüentemente, de H_2O_2 , ocorreu

uma inibição da expressão desses genes, impedindo o processo de abscisão (SAKAMOTO et al., 2008). Tem sido proposto que NADPH oxidases, na membrana plasmática, catalisam a formação de superóxido apoplástico, que dismuta em H_2O_2 e O_2 . Já, o radical hidroxila pode ser formado a partir de O_2 e H_2O_2 no apoplasto sob catálise por peroxidases. O radical hidroxila pode clivar diretamente os polissacarídeos, levando à desestruturação da parede celular (MÜLLER; TINTELNOT; LEUBNER-METZGER, 2006; SCHWEIKERT; LISZKAY; SCHOPFER, 2000, 2002).

Durante o processo de maturação dos frutos, o aumento do estresse oxidativo, provavelmente resultante da diminuição da atividade das enzimas antioxidantes, é necessário para facilitar muitas mudanças metabólicas associadas com o amadurecimento dos frutos (MONDAL et al., 2004; ROGIERS; KUMAR; KNOWLES, 1998). Além da correlação das EROs com as enzimas de degradação de parede celular, elas estão relacionadas com a morte celular programada. Esse evento desencadeia inúmeros papéis no desenvolvimento dos vegetais, estando diretamente relacionada à senescência (FUKUDA, 2000) e é um processo altamente relacionado com a sinalização em virtude do aumento das EROs (MOLLER; JENSEN; HANSSON, 2007). Ela pode, também, ser desencadeada pela sinalização do etileno, para ativação das enzimas de afrouxamento e degradação da parede celular (IRFAN et al., 2010). O aumento da produção de EROs desencadeiam uma alta atividade das enzimas que controlam a degradação da parede celular, culminando com sua degradação (GUNAWARDENA et al., 2001).

2.4 Colheita mecanizada seletiva e força de desprendimento de frutos de café

Em períodos em que o preço de mercado não cobre os custos de produção do café, como o caso atual, os produtores necessitam reduzir seu custo global e, nesse caso, para não comprometer os tratos culturais, a melhor solução é a redução dos custos operacionais. Nesse contexto, a mecanização das operações de cultivo e colheita assume um importante papel, principalmente em tempos de crise na cafeicultura (SILVA; SILVA; MIRANDA, 2014).

A produção do café pode ser realizada por um sistema manual, semimecanizado, mecanizado ou supermecanizado. O sistema manual pode ser considerado como convencional, onde as diversas operações são realizadas a partir de trabalho braçal. O sistema semimecanizado consiste na utilização associada de trabalho braçal e máquinas. O sistema mecanizado considera o uso das colhedoras e o supermecanizado consta de todas as operações da colheita feitas mecanicamente, com colheita seletiva e recolhimento mecânico do café caído no chão (SILVA; SILVA; MIRANDA, 2014).

A tendência que se verifica em regiões em que predominam pequenas e médias propriedades, é a expansão do sistema semimecanizado, havendo um equilíbrio entre o trabalho braçal e de máquinas, atendendo em especial à agricultura familiar. Em regiões com topografia mais plana e em propriedades maiores, o sistema mecanizado tem apresentado grande crescimento (SILVA; SILVA; MIRANDA, 2014).

Apesar de não ter uma relação direta com a qualidade da bebida, a colheita seletiva efetuada com o uso de colhedoras visa a melhorias nos padrões de classificação da bebida para atender ao mercado dos cafés especiais, no qual a bebida é altamente valorizada. O café deve ser colhido no ponto ótimo de maturação (cereja), pois, quando colhido verde ou mais seco, há

comprometimento da qualidade do produto final (CARVALHO; CHALFOUN; CHAGAS, 1994). Com isso, a colheita mecanizada e seletiva torna-se uma opção, visto que permite uma seleção mais adequada dos frutos durante a fase de colheita (SILVA, 2004).

A colheita do café apresenta maior grau de dificuldade quando comparada a outras culturas, em razão do formato da planta, da desuniformidade de maturação e do elevado teor de umidade dos frutos. Fatores como topografia, espaçamento de plantio e área cultivada devem ser observados para a escolha de um desses sistemas de colheita. No entanto, parâmetros relacionados com o desempenho médio operacional e custo do serviço braçal ou mecanizado são fundamentais para a tomada de decisão. Enquanto o custo da mão de obra varia conforme a região, o desempenho operacional e o custo da mecanização são mais complexos e específicos, pois variam muito com a topografia e tamanho das propriedades.

Dentro dos custos de produção de café, a mão de obra empregada na colheita representa de 25 a 35% do total, e os custos do processo de colheita podem atingir até 70% do custo de produção total (MONROE; WANG, 1968). Além disso, a falta de mão de obra leva ao aumento do uso da colheita mecanizada pelo uso de colhedoras, que podem realizar o trabalho de até 250 homens (FILGUEIRAS, 2001; SILVA, 2004). Por outro lado, os custos na etapa da colheita podem ter uma redução de 42%, pelo uso da colheita semimecanizada e entre 45-52%, pela colheita mecanizada, ambas comparadas à colheita manual. Já, a colheita supermecanizada pode levar a até 70% da redução dos custos (SILVA; SILVA; MIRANDA, 2014).

A colheita mecânica do café é realizada por meio de varetas situadas em cilindros oscilantes na colhedora, os quais trabalham na vertical, envolvendo os cafeeiros lateralmente, derriçando os frutos pelo efeito da vibração (SILVA et al., 2013). Dessa forma, o tempo e a intensidade de aplicação da vibração devem

ser considerados no processo de colheita, visando à colheita seletiva (SOUZA et al., 2005). Assim, a força exigida pelos frutos de café para seu desprendimento da planta é que determina a velocidade operacional e a vibração das varetas da colhedora, visto que esta varia entre os estádios de maturação dos frutos de café (SILVA et al., 2010, 2013). Dessa maneira, essa diferença na força entre os estádios de maturação pode ser um parâmetro para o gerenciamento da colheita mecanizada em cada lavoura (SILVA et al., 2010).

O desprendimento dos frutos ocorre quando as forças inerciais, decorrentes do movimento dos frutos, tornam-se maiores do que a força de tração necessária para causar o desprendimento (PARCHOMCHUK; COOKE, 1971). Para colher o maior número de frutos cerejas, é necessário ajustar a vibração das varetas da colhedora, deixando a maioria dos frutos verdes na planta (SILVA et al., 2010). A força de desprendimento dos frutos (FDF) pode ser considerada um indicativo do momento ideal da colheita, como também um parâmetro para o gerenciamento da colheita mecanizada do café, visto as diferenças encontradas em diferentes estádios de maturação e progênies de café (SILVA et al., 2013).

A FDF é um fator limitante no processo de colheita do café. Embora os intervalos de FDF já tenham sido estabelecidos para os diferentes estádios de maturação (SILVA et al., 2013), ainda são inexistentes trabalhos que relacionem a FDF com os eventos fisiológicos e morfológicos, ao longo do amadurecimento. Com isso, torna-se necessário compreender a relação entre a abscisão, a força de desprendimento e as alterações ultraestruturais e fisiológicas em cada estágio de desenvolvimento dos frutos de café. A caracterização fisiológica dos frutos ao longo do processo de maturação e sua relação com a força de desprendimento contribuirá para o aperfeiçoamento da colheita mecanizada seletiva, possibilitando maior conhecimento acerca dos ajustes necessários para a FDF a ser empregada no momento da colheita.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal foi obtido de área cafeeira localizada no Setor de Cafeicultura da Universidade Federal de Lavras. Frutos e pedúnculos de *Coffea arabica* cv. Icatu amarelo foram coletados, individualmente, em diferentes estádios de maturação e intervalos de força de desprendimento (Tabela 1). A FDF foi aferida pela utilização de um dinamômetro portátil modelo DD-200, marca Instrutemp (Figura 1) adaptado para a coleta dos frutos de café. Os intervalos de forças de desprendimento para cada estádio de maturação dos frutos foram determinados e fixados por um pré-teste realizado no local das coletas, baseando-se nos resultados descritos por Silva et al. (2013).

Tabela 1 Estádio de maturação, mês de coleta e intervalos de FDF

Estádio de maturação	Mês de coleta	Intervalo da FDF
Verde	Março – Abril	8 a 9,9 N e 10 a 13 N
Verde-cana	Maio – Junho	6 a 6,9 N e 7 a 7,9 N
Cereja	Junho – Julho	2 a 3,9 N e 4 a 5,9 N



Figura 1 Utilização do dinamômetro portátil

A coleta foi realizada no terço médio das plantas, com quatro repetições, sendo que os frutos foram coletados individualmente. Quando desprendidos dentro de um dos intervalos de força pré-determinados tiveram a região de ligação entre o pedúnculo e o fruto foram excisadas com o auxílio de um bisturi (Figura 2A), e fixadas em Karnovsky (amostra “a”), ou fixadas em formaldeído, álcool e ácido acético – FAA (amostra “b”) ou levadas ao ultrafreezer a -80 °C (amostra “c” e “d”), conforme descritos na figura 2A. Paralelamente, os pedúnculos foram manualmente separados dos frutos e fixados em Karnovsky (Figura 2B).

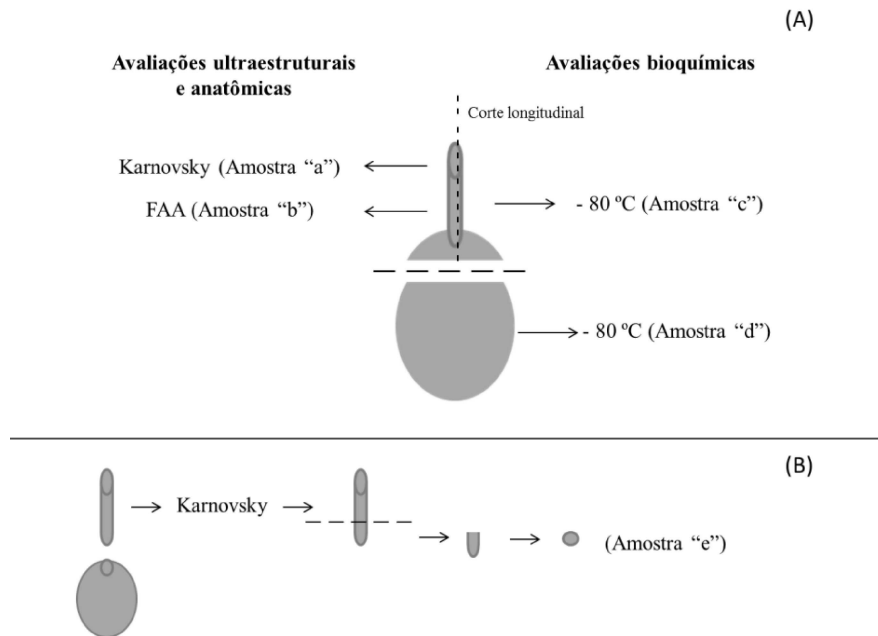


Figura 2 Ilustração da metodologia de coleta e armazenamento das amostras

3.2 Análises ultraestruturais e anatômicas

Para a realização dessas análises, foram utilizadas as amostras “a”, “b” e “e” (Figura 2A e B).

3.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para investigar a possível existência de uma zona de abscisão em frutos verde, verde-cana e cereja, amostras fixadas em Karnovsky (amostra “a”) foram colocadas em glicerol 30% por 30 minutos e, na sequência, imersas em nitrogênio líquido. Em seguida, foi realizado um corte longitudinal com o auxílio de um bisturi (Figura 2A).

Os pedúnculos armazenados em Karnovsky (Figura 2B) foram excisados na região proximal do fruto e a amostra “e” foi utilizada. As amostras (“a” e “e”) foram lavadas três vezes, durante 10 minutos em tampão de cacodilato 0,05 M e pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% durante duas horas. Posteriormente, foram desidratadas em gradiente de acetona (25, 50, 75 e 90%), durante 10 minutos cada e duas vezes em acetona 100%, durante 10 minutos e, em seguida, levadas ao aparelho de ponto crítico (Balzers CPD 030), utilizando CO₂ líquido para completar a secagem. As amostras foram montadas em suportes de alumínio (stubs) com fita dupla de carbono e banhadas com ouro, utilizando um evaporador Balzers SCD 050 e mantidas em sílica gel até observação. As amostras “a” foram dispostas com a região excisada para cima, enquanto que as amostras “e” foram montadas com a região que estava voltada para o fruto para cima. Análises de MEV foram realizadas utilizando um microscópio Leo EVO 40, com 5,5 a 9 mm de distância de trabalho e 20kv.

3.2.2 Anatomia dos pedúnculos

A região de ligação entre pedúnculo e fruto que estava fixada em FAA (amostras “b”) foi emblocada em Polietilenoglicol (PEG) de forma gradual (40 a 100%). Cada bloco foi seccionado com auxílio de um micrótomo semiautomático de 8 em 8 µm de espessura. As secções foram distendidas sobre lâminas contendo água e, quando secas, o material foi corado com azul de toluidina (O'BRIEN et al., 1964). As lâminas foram fotografadas em câmera Zeiss AxioCam Erc 5s acoplada ao microscópio modelo Zeiss Axio Lab.A1.

3.3 Análises Bioquímicas

Nessas análises, foram utilizadas as amostras armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (amostras “c” e “d”). As amostras “c”, denominadas na seção 4.2 de “P” (pedúnculo), continham além do pedúnculo intacto, uma pequena porção do fruto. Amostras “d”, denominadas de “F” (fruto), continham, apenas, o fruto sem o pedúnculo.

3.3.1 Atividade da poligalacturonase (PG)

A extração enzimática foi realizada pelo método de Buescher e Furmanski (1978) com modificações de Vilas-Boas (1995). O extrato foi obtido pela maceração de 1,5 g de matéria fresca em nitrogênio líquido e posterior adição de 5mL de NaCl 1M, após foi adicionado 1 mL de pectina cítrica 0,25%, deixando em banho-maria a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas. A reação foi paralisada por 5 minutos de fervura, seguida pela desproteíntização das amostras com hidróxido de bário 0,3 N, sulfato de zinco 5% e água. As amostras foram filtradas e utilizadas para a determinação da atividade enzimática, pelo método de Somoghi-Nelson (NELSON, 1994) que foi expressa em μmol de ácido galacturônico de matéria fresca min^{-1} .

3.3.2 Atividade da celulase

A atividade da enzima celulase foi determinada, conforme metodologia de Walker et al. (2006), com modificações. O extrato enzimático foi obtido pela maceração de 0,3 g de matéria fresca em nitrogênio líquido, adicionado a 1,5 mL de NaCl 1M, e centrifugado a 12000 g por 30 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o sobrenadante coletado para a atividade enzimática. 400 μL do extrato foram adicionados a 400

μL de carboximetil-celulose 1% (m/v) e incubados em banho-maria a 30 °C por 1 hora. Após esse período, foi realizada a desproteinização das amostras pela adição de hidróxido de bário 0,3 N, sulfato de zinco 5% e água e centrifugação a 8000 g, por 20 minutos, a 25 °C. A determinação da atividade enzimática foi pelo método DNS (MILLER, 1959), em que diferentes alíquotas das amostras foram acrescidas de 400 μL de DNS com posterior fervura, por 10 minutos e leitura da absorbância a 540 nm. Uma unidade de celulase foi definida como a quantidade de enzima requerida para quebrar 1 μmol de açúcares redutores por hora.

3.3.3 Quantificação de amido

Foram homogeneizados 0,3 g de massa fresca em 5 mL de tampão fosfato de potássio, 100 mM, pH 7,0, e incubado por 30 minutos a 40 °C. Após incubação, foram centrifugadas a 5.000 g por 10 minutos, a 25 °C, separando o sobrenadante do pellet. O processo foi repetido por duas vezes (ZANANDREA et al., 2010).

Para extração de amido, o pellet foi ressuscitado com 8 mL de tampão acetato de potássio 200 mM, pH 4,8. Em seguida, foram adicionadas 16 unidades da enzima amiloglicosidase, incubando-se em banho-maria a 40 °C por duas horas. Após a centrifugação a 5.000 g por 20 minutos, a 25 °C, o sobrenadante foi coletado e o volume completado com água para 15 mL. A quantificação do amido foi realizada pelo método da Antrona descrito por Dische (1962).

3.3.4 Quantificação de poliaminas livres (PA)

Foram macerados 200 mg de massa fresca com 1,6 mL de ácido perclórico 5% (v/v) e mantidos em gelo por 1h. Posteriormente, foram centrifugadas a 20.000 g por 20 min a 4 °C (TASSONI et al., 2000). Coletaram-se 400 uL do sobrenadante, contendo as PAs livres e adicionou-se 1 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio (Na_2CO_3) com pH ajustado para 10,5. Adicionou-se 1 mL do reagente derivatizante, cloreto de dansil (10 mg mL^{-1} de acetona) e colocados em banho-maria a 40 °C por 30 minutos ao abrigo da luz. Adicionaram-se 100 μL de prolina (100 mg mL^{-1}) deixando em repouso por 15 minutos ao abrigo da luz, para garantir o consumo do excesso do reagente derivatizante. Em seguida, foi adicionado 1,5 mL de tolueno, agitando em vórtex e refrigerado a -20 °C por 15 minutos para melhorar a separação das fases. Coletou-se o sobrenadante, e evaporou-se em nitrogênio gasoso a 40 °C. Posteriormente, o pellet foi ressuspensionado com 300 μL de acetonitrila e mantidos em -20 °C até o momento da injeção (JUDAS, 2000). Os compostos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e identificados por comparação dos seus tempos de retenção, dos espectros de UV e dos cromatogramas de fluorescência com padrões para putrescina, espermina e espermidina.

3.3.5 Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Foram macerados 100 mg de material fresco em nitrogênio líquido com polivinil polipirrolidona (PVPP), homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v) e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4 °C. O H_2O_2 foi determinado, medindo-se a absorbância a 390 nm em um meio de reação, contendo 500 μL tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0, 500 μL do

extrato e 1 mL de iodeto de potássio 1M para 1 reação (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

3.3.6 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada, por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Cem miligramas de material fresco foram macerados em nitrogênio líquido, acrescidos de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Alíquotas (250 μ L) do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação, contendo 0,5% (m/v) de ácido tiobarbitúrico (TBA) e 10% (m/v) de TCA, incubando-se, em seguida, a 95 °C, por 30 minutos. A reação foi paralisada por resfriamento rápido em gelo e as leituras foram determinadas em espectrofotômetro, a 535 nm e 600 nm. O TBA forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixo peso molecular, como o malondialdeído (MDA), produto secundário do processo de peroxidação. A concentração do complexo MDA/TBA foi calculada pela seguinte equação: $[MDA] = (A_{535} - A_{600}) / (\xi \cdot b)$, em que: ξ (coeficiente de extinção = $1,56 \times 10^{-5} \text{ cm}^{-1}$); b (comprimento ótico = 1).

3.3.7 Enzimas antioxidantes

O extrato enzimático foi obtido pela maceração em nitrogênio líquido de 50 mg de material fresco, às quais foram adicionados 1,5 mL do tampão de extração contendo tampão fosfato de potássio 400 mM (pH 7,8), EDTA 10 mM, ácido ascórbico 200 mM e água. O extrato foi centrifugado a 13.000 g por 10 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -20 °C durante o

período das análises. Os sobrenadantes coletados foram utilizados para as análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT) e peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

3.3.7.1 Dismutase do superóxido (SOD)

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 incubação composto por fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8, metionina 70 mM, EDTA 10 μ M, NBT 1 mM, riboflavina 0,2 mM e água. Os tubos com o meio de reação e 10 μ L de amostra foram iluminados, por 7 minutos, com uma lâmpada fluorescente de 20 W. Para o controle, o mesmo meio de reação contendo água no lugar da amostra foi iluminado. As leituras foram realizadas a 560 nm e o cálculo da enzima foi feito com a seguinte equação: % de inibição = $(A_{560} \text{ amostra com extrato enzimático} - A_{560} \text{ controle sem enzima}) / (A_{560} \text{ controle sem enzima})$. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

3.3.7.2 Catalase (CAT)

A atividade da CAT foi avaliada segundo o decréscimo na absorvância de H_2O_2 a 240 nm. O tampão de incubação continha 18 μ L de H_2O_2 , dissolvidos em tampão fosfato de potássio, 9 μ L do extrato enzimático e 162 μ L de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), contendo NaEDTA 0,1 mM (MENGUTAY et al., 2013). O coeficiente de extinção molar utilizado foi $36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.3.7.3 Peroxidase do ascorbato (APX)

A atividade da APX foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos. Uma alíquota de 9 μL do extrato enzimático foi adicionada a 180 μL de tampão de incubação composto por 90 μL de fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), 9 μL de ácido ascórbico 10 mM, 9 μL H_2O_2 30 mM e 63 μL de água para 1 reação (NAKANO; ASADA, 1981). O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

3.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa estatístico SISVAR 4.3 (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados) (FERREIRA, 2011) e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises ultraestruturais e anatômicas

A análise das imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura possibilitou comparar a morfologia das células da região que liga o pedúnculo ao fruto, entre os diferentes estádios de maturação, bem como entre as forças de desprendimento dos frutos (Figura 3 e 4). Observando os cortes longitudinais (amostra “a”), de maneira geral, não foi possível detectar diferenças nas estruturas das células quando comparados os frutos nos diferentes estádios, bem como entre as forças utilizadas. Não foram observadas, também, evidências de uma clara zona de abscisão (Figura 3).

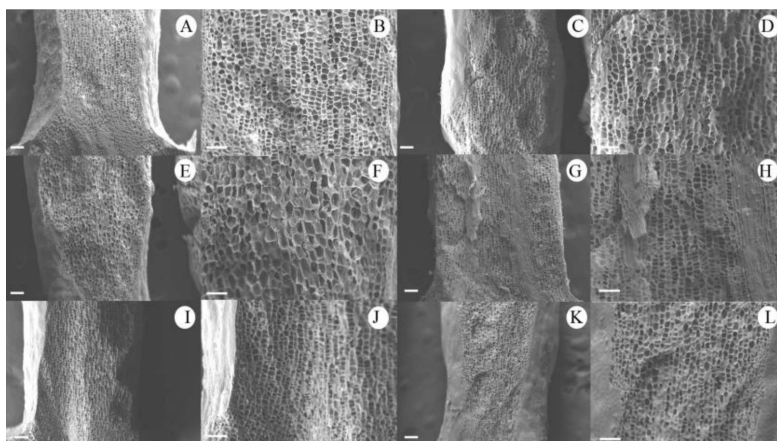


Figura 3 Eletromicrografias de varredura da região de ligação entre pedúnculos e frutos verde, com força de desprendimento de 10 – 13 N (A e B), verde com força de desprendimento de 8 – 9,9 N (C e D), verde-cana com força de desprendimento 7 – 7,9 N (E e F), verde-cana com força de desprendimento de 6 – 6,9 N (G e H), cereja com força de desprendimento de 4 – 5,9 N (I e J) e cereja com força de desprendimento de 2 – 3,9 N

Fonte: Barra de escalas: 200 μm em A-C-E-G-I-K e 100 μm em B-D-F-H-J-L (amostra “a”).

Analisando os pedúnculos que foram destacados manualmente dos frutos (amostra “e”) (Figura 4), podemos observar que os pedúnculos no estágio verde, independente da força de desprendimento utilizada, apresentam parede celular rompida e células desorganizadas, tanto na região central, como na periférica. Já, nos estádios verde-cana e cereja, observou-se um rompimento mais organizado, tanto na parte mais central, como na periférica, na região de ligação entre os frutos e pedúnculos.

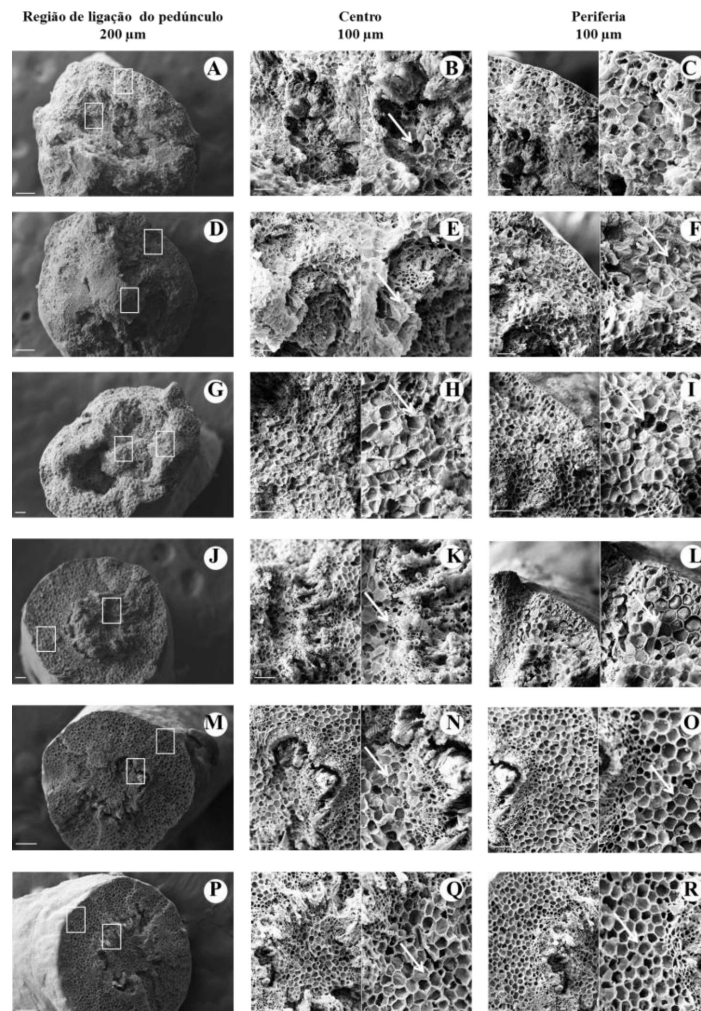


Figura 4 Eletromicrografias de varredura da ligação entre frutos e pedúnculos

Legenda: A - verde com força de desprendimento de 10 – 13 N, células do centro (B) e da periferia (C). D - verde com força de desprendimento de 8 – 9,9 N, células do centro (E) e da periferia (F). G - verde-cana com força de desprendimento 7 – 7,9 N, células do centro (H) e da periferia (I). J - verde-cana com força de desprendimento de 6 – 6,9 N, células do centro (K) e da periferia (L). M - cereja com força de desprendimento de 4 – 5,9 N, células do centro (N) e da periferia (O). P - cereja com força de desprendimento de 2 – 3,9 N, células do centro (Q) e periferia (R). Barra de escalas: 200 µm em A-D-G-J-M-P e 100 µm em B-C-E-F-H-I-K-L-N-O-Q-R. (amostra “e”). Quadrado significa as áreas observadas no centro e na periferia, setas indicam as células.

No estágio de maturação verde (Figura 4A a 4F), normalmente o pedúnculo está mais fortemente aderido ao fruto, necessitando, com isso, uma maior força para o seu desprendimento (10-13 N e 8-9,9 N). Portanto, o ato de desprendimento manual do pedúnculo induziu um maior rompimento celular e, com isso, as células se apresentaram mais desorganizadas. Em relação aos frutos verde-cana (Figura 4G a 4L), observa-se um rompimento com uma ligeira organização das células, sem uma quebra evidente da parede celular. Isso pode ser explicado pela diminuição da força de desprendimento do fruto (7-7,9 e 6-6,9 N) e/ ou pelo começo das alterações fisiológicas associadas ao processo de amadurecimento. Por outro lado, no estágio cereja (Figura 4M a 4R), os frutos já se encontram maduros e as células com maior grau de afrouxamento, o que explica a baixa força de desprendimento necessária para a colheita (4-5,9 N e 2-3,9 N). Nesse caso, as células já se encontram, naturalmente, desorganizadas, não apresentando nenhum grau de rompimento forçado.

Esses resultados demonstram que, embora tenha ocorrido uma redução da FDF ao longo da maturação, em decorrência do afrouxamento celular, não se observou claramente uma zona de abscisão, nessa região, embora algumas células tenham apresentado rompimentos sem um padrão linear.

Avaliando a morfologia da zona de abscisão de frutos de *Olea europaea* L. (azeitona), que apresentavam uma diminuição da FDF ao longo do processo de maturação, Gomez-Jimenez et al., 2010 observaram um padrão semelhante aos observados neste trabalho. Os frutos de azeitona no início do processo de maturação apresentaram células centrais mais rugosas e com rupturas após a remoção forçada. Já, as células dos frutos nos estágios finais de maturação apresentavam-se esféricas e alongadas, com separação espontânea. Em ambos os casos, os padrões de modificação da organização celular foram semelhantes aos encontrados nos frutos verdes e cerejas do cafeeiro. Possivelmente, os padrões de modificação das células dos frutos de azeitona e de cafeeiro sejam

semelhantes, em virtude de ambos apresentarem um decréscimo de 75% na FDF ao longo do processo de maturação (Tabela 1).

A semelhança do que ocorreu nas análises de MEV, de maneira geral, as análises anatômicas, não evidenciaram uma desestruturação das células em uma zona específica do pedúnculo, em nenhum dos estádios de maturação e forças de desprendimento (Figura 5). Ocorreu apenas uma separação de algumas células no estádio final de maturação (Figura 4 N e O), provavelmente pela atuação das enzimas de degradação de parede celular. Esses resultados sugerem que os frutos de cafeeiro não se desprendem da planta-mãe pela inexistência de uma camada de abscisão, e sim pelo afrouxamento de algumas células. Esse fato talvez explique a permanência dos frutos cereja à planta, caso existisse essa zona de abscisão os frutos cereja cairiam logo no início de sua formação.

Dessa maneira, o fruto amadurece no ramo, mudando sua coloração característica e passando pelas fases de cereja, passa e seco, permanecendo, ainda, no mesmo local de origem. Esse fato é, normalmente, observado nas lavouras de café, onde é comum a presença de frutos nos ramos em diferentes fases de maturação. Acredita-se que a queda dos frutos secos ocorra, fundamentalmente, em decorrência do rompimento mecânico dos tecidos dos pedúnculos, em função da desidratação. Dessa forma, a queda natural dos frutos secos, bem como a do cereja, pode ser decorrente de fatores externos, tais como vento e chuva (CHAVES FILHO, 2007).

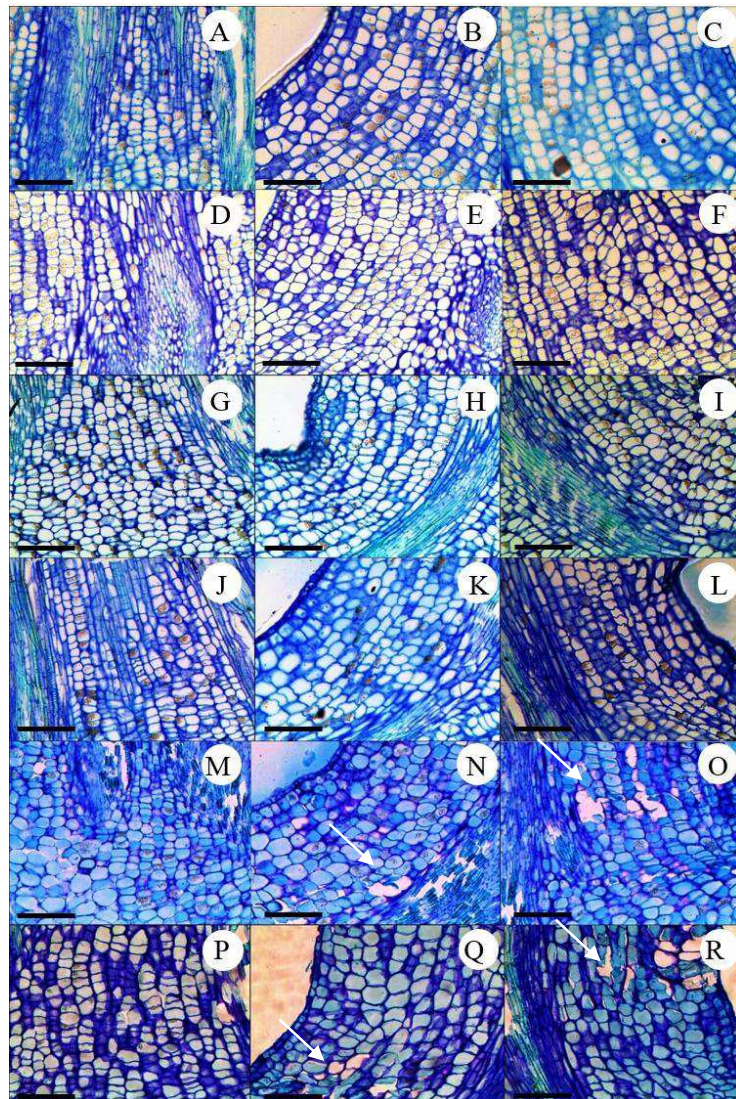


Figura 5 Fotomicrografias de cortes anatômicos da região proximal de ligação entre pedúnculos e frutos (amostra “b”)

Legenda: Verde, com força de desprendimento de 10 – 13 N (A - C), verde com força de desprendimento de 8 – 9,9 N (D - F), verde-cana com força de desprendimento 7 – 7,9 N (G - I), verde-cana com força de desprendimento de 6 – 6,9 N (J - L), cereja com força de desprendimento de 4 – 5,9 N (M - O) e cereja com força de desprendimento de 2 – 3,9 N (P – R). Barra de escalas 10 μ m. Setas indicam rompimento celular.

4.2 Análises bioquímicas

Uma vez que não foram observadas evidências de uma clara zona de abscisão nos frutos de cafeeiro, visando a elucidar os mecanismos envolvidos na redução da força de desprendimento dos frutos, avaliou-se a atividade das enzimas de afrouxamento e degradação da parede celular, poligalacturonase e celulase.

Foi observada diferença significativa na atividade da PG (Gráfico 1) quando comparados os estádios de maturação. Os maiores valores de atividade foram encontrados no estádio verde-cana, independentemente da FDF e do órgão, e, no estádio cereja, na menor força e somente no fruto. Comparando-se as FDF, as maiores atividades foram observadas em frutos verde-cana sob a maior força, e no estádio cereja em ambos os órgãos na menor força de desprendimento. Em relação aos órgãos analisados, ocorreu diferença estatística somente no estádio verde-cana, na menor força, sendo a maior atividade da PG no pedúnculo.

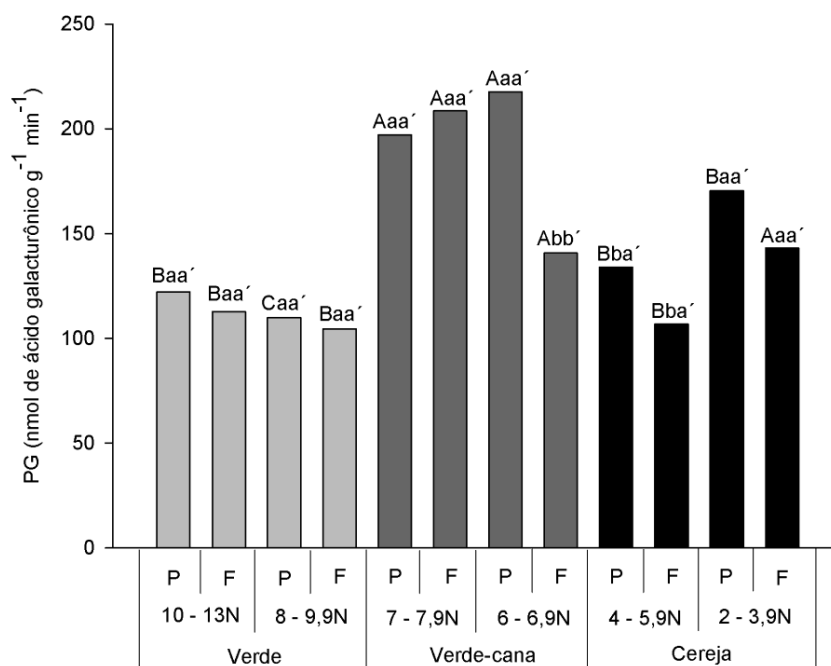


Gráfico 1 Atividade da poligalacturonase da região de ligação entre pedúnculos e frutos – P - (amostra “c”) e frutos – F - (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estágio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estágio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Para a atividade enzimática da celulase (Gráfico 2), também foi observada diferença significativa entre os estádios de maturação, sendo os maiores valores encontrados no estágio cereja, independente da força e do órgão. Em relação às forças de desprendimento, foi observada diferença estatística somente no estágio cereja, em ambos os órgãos, sendo a maior atividade

encontrada na menor força. Em relação ao órgão analisado, não ocorreu diferenças significativas entre os mesmos.

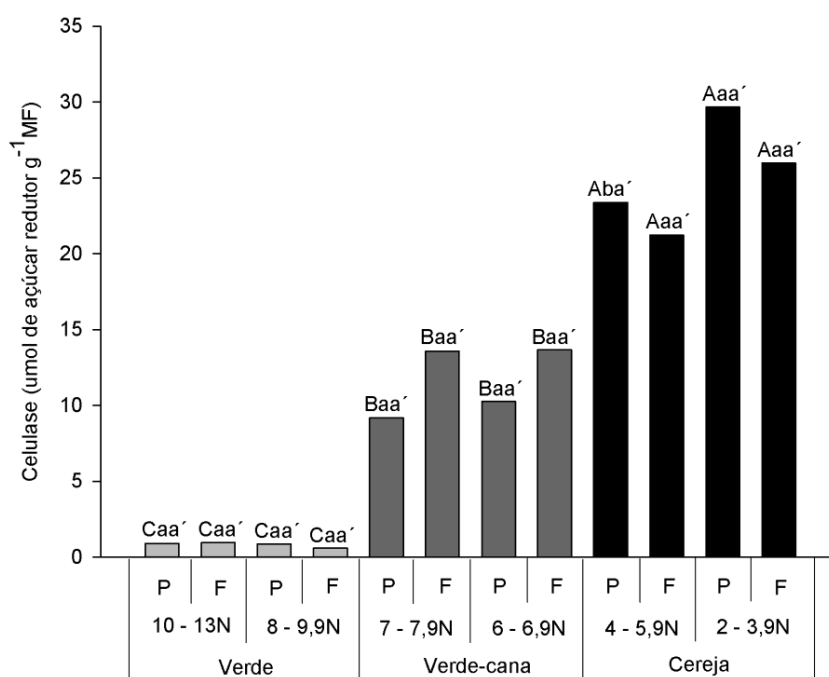


Gráfico 2 Atividade da enzima celulase da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra “c”) e frutos - F (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estágio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estágio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

A enzima PG está ligada ao afrouxamento da parede celular, enquanto a celulase promove a lise celular, em um processo coordenado ao longo da maturação dos frutos. Desse modo, a desestruturação da parede celular por ação

enzimática inicia-se com a digestão dos polissacarídeos pécticos, contendo ácido poligalacturônico. Primeiramente, ocorre atuação das pectinases, como a PG, que está diretamente relacionada com a permeabilidade da parede pela hidrólise das ligações α 1-4 entre os resíduos de ácido galacturônico. Na sequência, a celulase cliva as ligações glicolíticas β 1-4 de moléculas de celulose ou carboximetilcelulose, que estão presentes na zona amorfa da parede celular (HE et al., 1996; LYONS, 1973; RODIONOVA et al., 2001). A análise conjunta de ambas as enzimas revela que o processo de amadurecimento de frutos de cafeeiro apresenta uma ação coordenada caracterizada por atividade elevada da PG no estágio verde-cana e da celulase no estágio cereja. Desse modo, durante o amadurecimento dos frutos a PG ao promover o afrouxamento das células, permite maior acesso da celulase, que passa a degradar a parede celular mais eficiente.

Autores relatam o aumento da atividade de celulase ao longo dos estádios de maturação de *Vitis vinifera* e *Prunus persica*, estando esse aumento fortemente ligado à abscisão desses frutos (BONGHI et al., 1992; WU; DENG; LI, 2008). Estudos com *Citrus sinensis*, *Lycopersicon esculentum* e *Lupinus angustifolius* indicam a ação de enzimas hidrolíticas, incluindo poligalacturonase e celulase no processo de abscisão dos frutos, por meio da dissolução da lamela média e degradação da parede celular (CLEMENTS; ATKINS, 2001; HONG; SEXTON; TUCKER, 2000; KAZOKAS; BURNS, 1998).

Outro composto que parece ter relação com o afrouxamento da parede celular é o amido (MURAYAMA et al., 2006). No presente caso, maiores níveis desse carboidrato foram encontrados em frutos no estágio verde, independente das forças e nos pedúnculos no estágio cereja, também independente da força utilizada para o desprendimento (Gráfico 3). Quando comparadas às FDF, maiores valores foram encontrados nos pedúnculos das menores forças,

independente do estágio de maturação, e nos frutos coletados nas maiores forças. Em relação aos órgãos, os frutos apresentaram maiores níveis de amido, exceto na menor força do estágio cereja. Ao longo do amadurecimento dos frutos de café houve a degradação desse composto de reserva, cujos níveis foram menores nos últimos estádios de maturação. Em relação aos pedúnculos, ocorreu uma maior concentração desse composto, nos estádios finais de maturação, estimulando a degradação da parede celular.

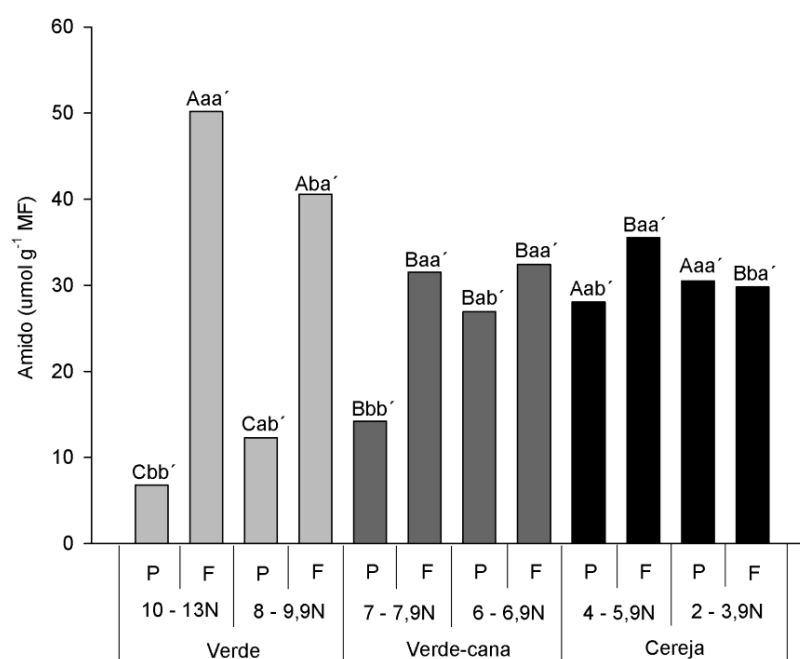


Gráfico 3 Conteúdo de amido da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra “c”) e frutos - F (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estágio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estágio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

O transporte de fotoassimilados para o fruto e o seu acúmulo e decomposição nos mesmos sofrem variações quantitativas, durante o processo de amadurecimento dos frutos (LAVIOLA et al., 2007). De maneira geral, com os frutos ainda verdes, é comum observar maior transporte de sacarose e menor degradação de amido. Com o avanço da maturação, os níveis de amido aumentam e o transporte de sacarose diminui. Nos frutos de cafeeiro (Gráfico 3), foi possível observar uma diminuição dos níveis de amido, conforme o amadurecimento. Paralelamente a esse decréscimo, ocorreu um aumento nos níveis desse carboidrato nos pedúnculos, provavelmente pela interrupção do transporte para os frutos. Assim, é possível que a interrupção do transporte de assimilados para o fruto seja decorrente de um aumento na síntese de amido que, posteriormente, será degradado, fornecendo energia para síntese ou ativação de enzimas ligadas ao afrouxamento e degradação da parede celular, características intrínsecas da maturação (MURAYAMA et al., 2006).

Outra classe de substâncias que vem sendo relacionada com a maturação de frutos é a das poliaminas; assim, foram investigados os níveis de putrescina, espermidina e espermina, dentro de cada estágio de maturação.

Os maiores níveis de putrescina (Gráfico 4) foram encontrados no estágio verde, independente da força e do órgão analisado. Sendo que, nesse estágio de maturação, os maiores valores encontrados foram na menor força, independente do órgão analisado. Não ocorreu diferença entre os órgãos analisados dentro de cada estágio de maturação e força de desprendimento.

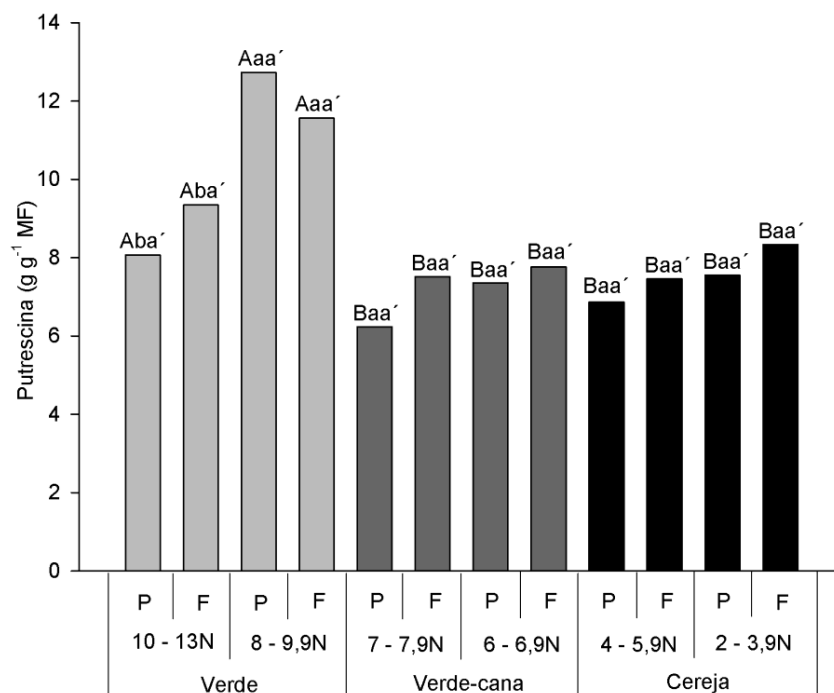


Gráfico 4 Conteúdo de putrescina da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra “c”) e frutos - F (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estádio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estádio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Em relação a espermidina (Gráfico 5), menores níveis foram encontrados no estádio cereja, no pedúnculo, na menor força. Não ocorreu diferença entre as forças de desprendimento, bem como entre os órgãos analisados.

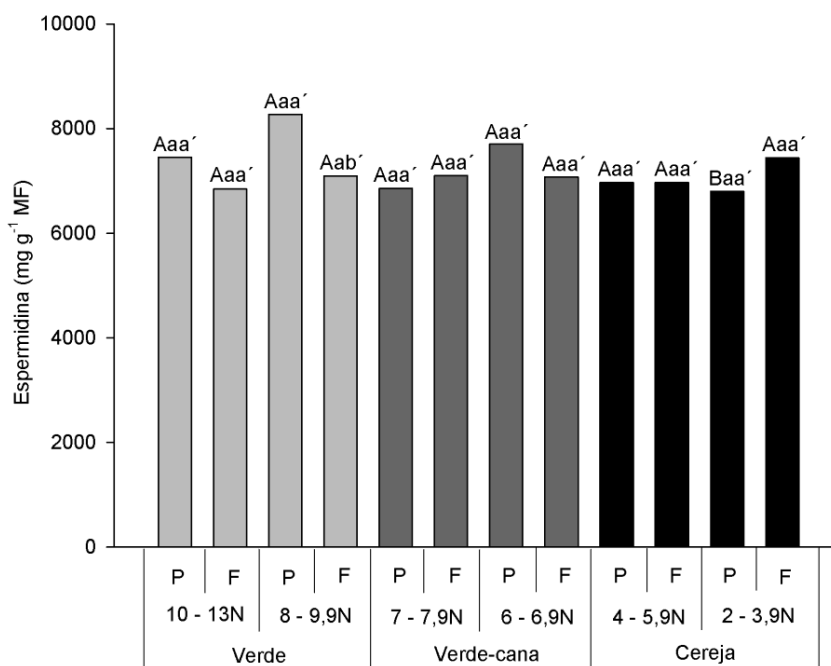


Gráfico 5 Conteúdo de espermidina da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra “c”) e frutos - F (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estádio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estádio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

A espermina, por sua vez, apresentou baixos níveis em frutos e pedúnculos de cafeeiro (Gráfico 6), sendo os maiores valores encontrados nos pedúnculos do estádio verde-cana, independente da força. Não ocorreu diferença entre as forças de desprendimentos utilizadas. Em relação aos órgãos, maiores níveis foram encontrados em pedúnculos, independente do estádio de maturação e força utilizada.

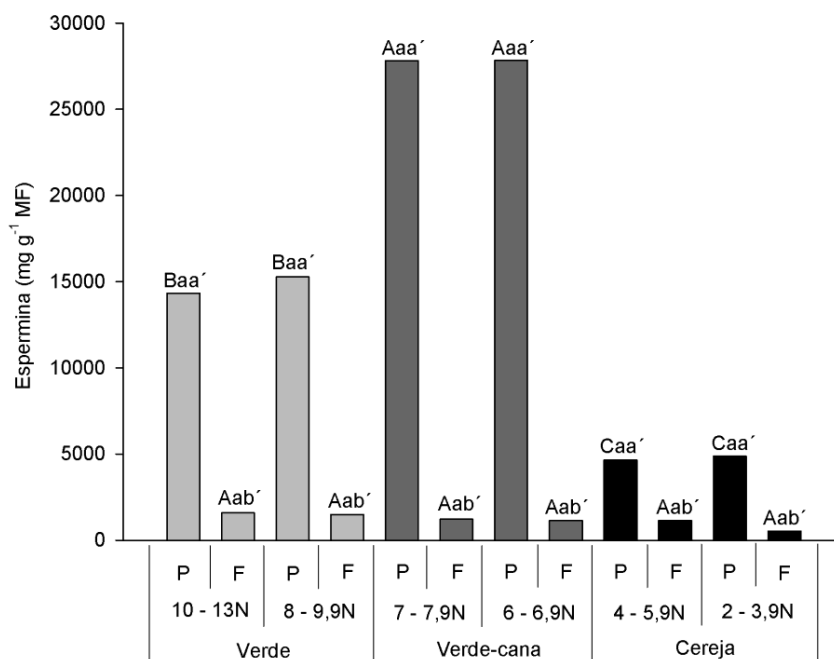


Gráfico 6 Conteúdo de espermina da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra “c”) e frutos - F (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estágio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estágio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Enquanto que os níveis de espermidina não variaram, os de putrescina foram maiores no estágio verde, tanto no fruto como no pedúnculo e os de espermina foram maiores no pedúnculo de frutos no estágio verde-cana. Esses resultados estão de acordo com os observados com Moret et al. (2005) que observaram maiores níveis de poliaminas nos primeiros estádios de desenvolvimento dos frutos, declinando em cerca de 30% até o completo

amadurecimento do vegetal. No presente caso, os níveis de putrescina decresceram 43% do início até os estádios finais de maturação.

A via biossintética das poliaminas deriva de S-adenosilmetionina (SAM), um intermediário comum da síntese de etileno, e acredita-se que este seja o ponto que regula os níveis internos tanto de poliaminas, como de etileno, onde a síntese do primeiro inibe a do segundo e vice-versa (PANDEY et al., 2000). Portanto, a inibição do etileno ocorre pela canalização do SAM para a biossíntese de poliaminas, evidenciando uma interação antagônica entre essas duas vias (PARRA-LOBATO; GOMEZ-JIMENEZ, 2011).

Em *C. arabica* foram observados menores teores de etileno em frutos no estágio verde e um pico da sua produção nos frutos verde-cana e cereja (PEREIRA et al., 2005). Dessa forma, os resultados do presente trabalho sugerem, indiretamente, que essas vias são antagônicas, uma vez que, nos estádios iniciais de maturação dos frutos, foram encontrados altos níveis de poliaminas, com decréscimo dos seus valores ao longo da maturação.

Uma segunda ação atribuída as poliaminas é a sua ligação nas membranas celulares, prevenindo a peroxidação lipídica, o que leva a uma supressão da ação das espécies reativas de oxigênio (EROs) (LUDFORD, 1995; MASIA et al., 1998).

Acredita-se que as EROs desempenham um importante papel no amadurecimento de frutos, ao ativar enzimas de degradação de parede celular, levando a sua desestruturação. Um bom exemplo seria o peróxido de hidrogênio que atua como sinalizador desses processos (MÜLLER; TINTELNOT; LEUBNER-METZGER, 2006; SCHWEIKERT; LISZKAY; SCHOPFER, 2000, 2002).

Os teores de peróxido de hidrogênio (Gráfico 7) foram superiores nos estádios de maturação verde e verde-cana, nos pedúnculos e frutos da menor força e no estágio cereja independente da força e órgão. Comparando-se as

forças de desprendimento, ocorreu diferença estatística em todos os estádios, independente do órgão analisado. Em relação aos pedúnculos e frutos, também ocorreu diferença em todos os estádios e forças, sendo as maiores médias observadas nos frutos.

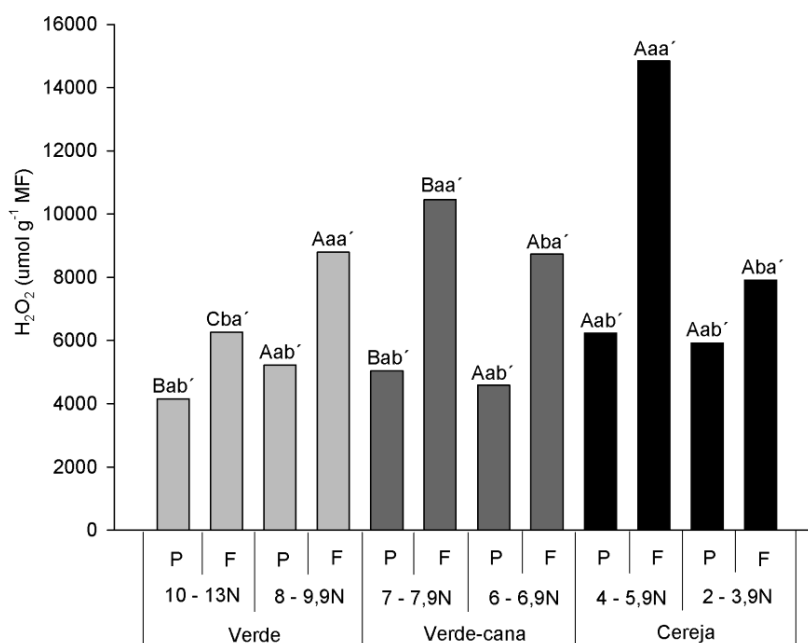


Gráfico 7 Conteúdo de peróxido de hidrogênio da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra “c”) e frutos - F (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estádio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estádio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Os níveis de peroxidação lipídica (Gráfico 8) foram superiores nos últimos estádios de maturação. As maiores médias foram obtidas nos pedúnculos e frutos na menor força, tanto no estádio verde quanto no verde-cana. Já, no

estádio cereja, maiores médias foram encontradas independentes da força e do órgão. Quando comparadas as forças de desprendimento, foram observadas diferenças no estágio cereja, com maiores médias na maior força independente do órgão. Analisando-se pedúnculos e frutos, observa-se diferença somente no estágio cereja, na maior força, com maior nível de peroxidação lipídica no fruto.

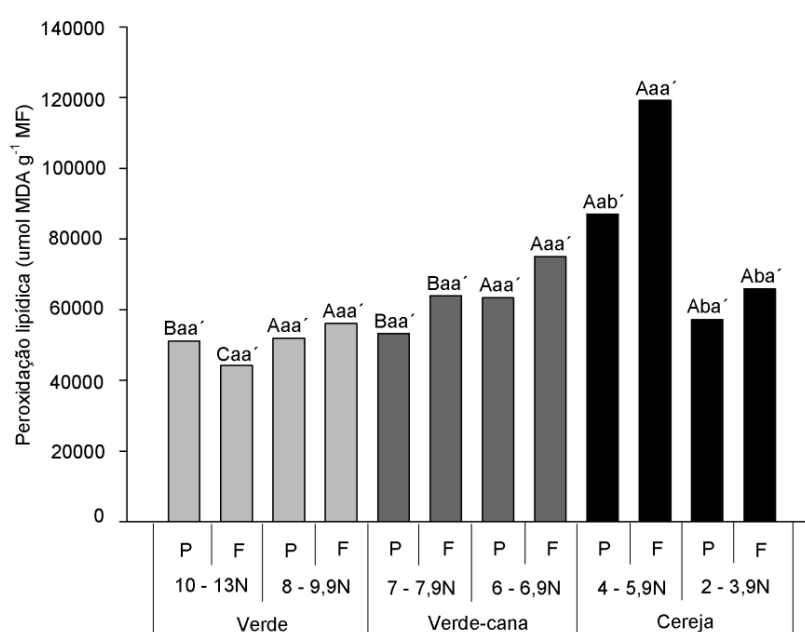


Gráfico 8 Níveis de peroxidação lipídica da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra “c”) e frutos - F (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estágio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estágio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

O peróxido de hidrogênio é uma molécula com uma meia vida relativamente longa (BHATTACHARJEE, 2005). É produzido em organelas

como cloroplasto, mitocôndrias e peroxissomos, através de reações como dismutação do O_2^- , beta oxidação e oxidação do glioxilato. Essa molécula pode atuar como um regulador chave em vários processos, dentre eles a maturação e senescência de frutos, flores e folhas (BRIGHT et al., 2006; MITTLER et al., 2004). Uma vez que durante o processo de desenvolvimento dos frutos ocorre degradação de componentes celulares, bem como alterações que desencadeiam a ruptura de membranas celulares, os eventos de maturação e senescência são, reconhecidamente, processos oxidativos (AWAD; AL-QURASHI; MOHAMED, 2011; BRENNAN; FRENKEL, 1977). O peróxido de hidrogênio está relacionado com a sinalização para a abscisão, pois, juntamente com o etileno, regula, positivamente, a expressão da celulase. Em *Capsicum* a abscisão final de folhas foi relacionada com a elevada produção de H_2O_2 , que pode desempenhar papel na degradação da parede celular pela clivagem dos polissacarídeos (SAKAMOTO et al., 2008).

Por outro lado, o aumento substancial da respiração nos estádios finais de maturação dos frutos climatéricos, provavelmente desencadeie maior produção de EROs. A intensidade do estresse oxidativo pode ser avaliada pela extensão da peroxidação lipídica catalisada por lipoxigenase, que desempenha um papel central na deterioração das membranas. Os ácidos graxos, bem como os lipídios de membranas são altamente susceptíveis à oxidação, e o acúmulo desses compostos indica maiores níveis de peroxidação lipídica (MONDAL et al., 2009).

A maior produção de H_2O_2 , observada em frutos cereja na maior força pode ter ligação com a sinalização do peróxido de hidrogênio, promovendo a atividade das enzimas de degradação de parede, PG e celulase. Maiores concentrações de H_2O_2 na maior força de desprendimento, provavelmente, seja um modo de sinalização para a ativação das enzimas de degradação de parede,

culminando o afrouxamento da parede celular e, conseqüentemente, com uma menor força de desprendimento do fruto.

A fim de correlacionar o papel das enzimas antioxidantes, avaliou-se a atividade das mesmas ao longo dos estádios de maturação. Para a atividade da enzima dismutase do superóxido (Gráfico 9), não ocorreu diferença entre os estádios de maturação ou entre as forças de desprendimento dos frutos. Em relação aos órgãos analisados, em todos os estádios, assim como as forças, a maior atividade foi observada em pedúnculos.

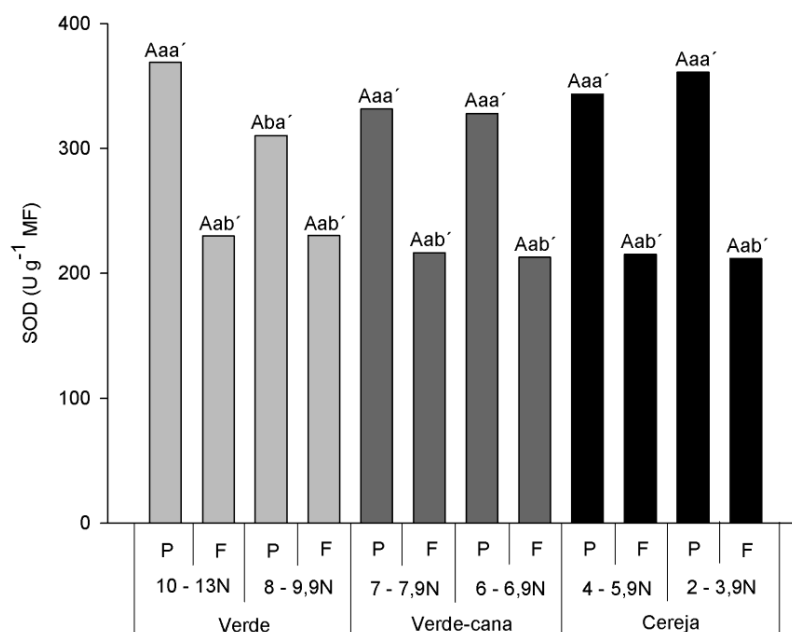


Gráfico 9 Atividade da enzima dismutase do superóxido da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra "c") e frutos - F (amostra "d") em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estágio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estágio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

De modo geral, a atividade da enzima catalase (Gráfico 10) foi maior no estágio cereja, independente da força. Os maiores valores da atividade da enzima catalase ocorreram nos estádios cereja, na menor força e em ambos os órgãos e na maior força somente no fruto, e no estágio verde-cana na maior força, no fruto, e no estágio verde, na maior força, no pedúnculo. Em relação às forças dentro de cada estágio de maturação, foram encontradas diferenças em todos os estádios de maturação e órgãos, exceto nos frutos do estágio verde. Para os órgãos analisados, ocorreu diferença estatística, sendo no estágio verde, os maiores valores encontrados nos pedúnculos de ambas as forças, no estágio verde-cana nos frutos, também de ambas as forças e no estágio cereja apenas nos frutos de menor força de desprendimento.

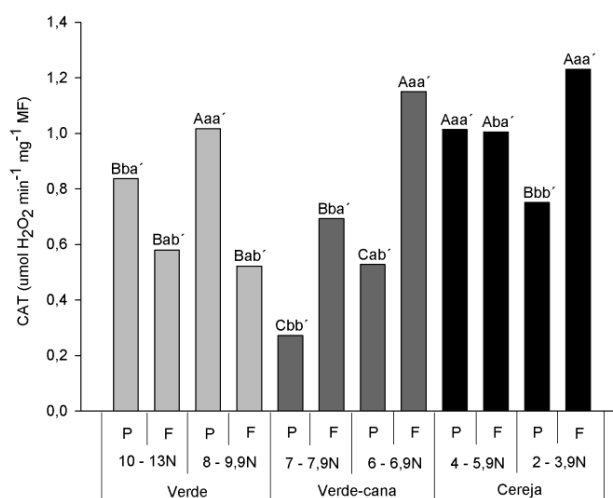


Gráfico 10 Atividade da enzima catalase da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra “c”) e frutos - F (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estágio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estágio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

Na quantificação da atividade da enzima peroxidase do ascorbato (Gráfico 11), maiores médias foram obtidas no estágio verde, na maior força, em ambos os órgãos e na menor força no fruto, no estágio verde-cana, na maior força, no pedúnculo e na menor força no fruto, já, para o estágio cereja foi na menor força e no pedúnculo. Quando comparadas as forças de desprendimento entre os estádios de maturação, notaram-se maiores atividades nos pedúnculos coletados na maior força do estágio verde e nos frutos da maior força do estágio verde-cana e cereja. Com exceção da maior força no estágio verde, os frutos apresentaram maiores atividades quando comparado com os pedúnculos.

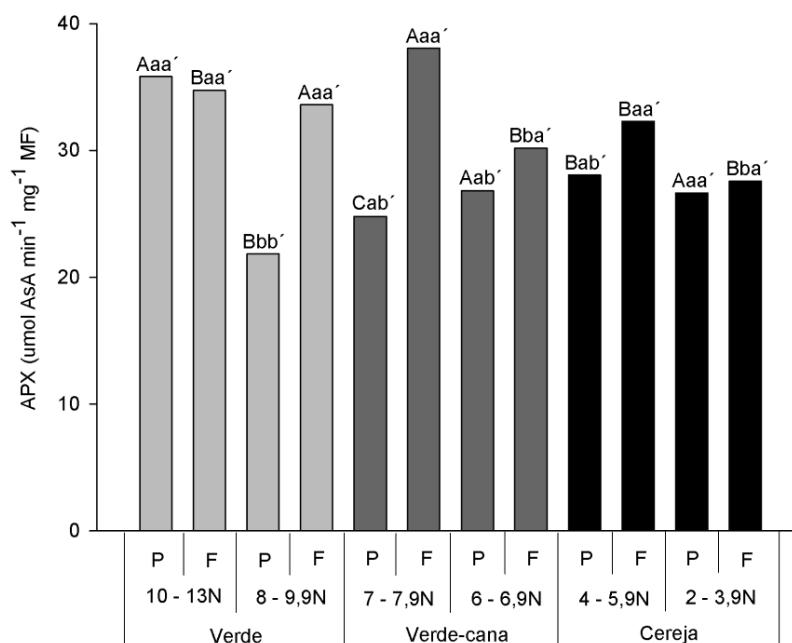


Gráfico 11 Atividade da enzima peroxidase do ascorbato da região de ligação entre pedúnculos e frutos - P (amostra “c”) e frutos - F (amostra “d”) em diferentes estádios de maturação e forças de desprendimento

Nota: Letras maiúsculas comparam os estádios de maturação dentro das forças maiores e menores de cada órgão, letras minúsculas as diferentes forças de desprendimento dentro de cada estágio e órgão e letras minúsculas seguidas por apóstrofe comparam pedúnculo e fruto, dentro de cada força e estágio de maturação. Diferentes letras indicam diferenças significativas com 0,05 de probabilidade pelo teste Scott-Knott.

A atividade da SOD durante o processo de maturação dos frutos varia entre as espécies. Em *Fragaria ananassa* (LÓPEZ; GOCHICOA; FRANCO, 2010) e *Psidium guajava* L. (MONDAL et al., 2009) essa enzima apresentou um pico nos estádios intermediários com uma queda nos estádios finais de maturação. No entanto, para o café parece ocorrer uma manutenção na atividade dessa enzima, ao longo dos estádios de maturação, fato que também foi

observado por Santos (2012), ao estudar a frutificação do cafeeiro em diferentes altitudes.

A CAT é a primeira enzima de defesa contra os danos oxidativos induzidos pela senescência (ZIMMERMANN et al., 2006). Ela apresenta maiores atividades, ao longo do processo de maturação, corroborando com os resultados encontrados com *Mangifera indica* e *Solanum lycopersicum* (ANDREWS; FAHY; FOYER, 2004; MASIA et al., 1998; MONDAL et al., 2004).

De maneira geral, durante o processo de maturação dos frutos de cafeeiro, ocorreu um aumento nos níveis de peróxido de hidrogênio, culminando com uma maior atividade da enzima catalase, em detrimento da atividade da APX no estágio cereja. Embora tenha ocorrido um aumento na atividade da catalase, esse não foi suficiente para neutralizar os danos causados pelas EROs, resultando em maior peroxidação lipídica em frutos cereja. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos com *Lycopersicon esculentum*, *Citrus sinensis*, *Arabidopsis thaliana* e *Acacia mangium* (HUANG et al., 2007; MONDAL et al., 2004; YE; RODRIGUEZ; TRAN, 2000; YU; ONG, 2000). Frutos de *Salicifolius cotoneaster*, *Citrus sinensis*, *Solanum lycopersicum* e *Pyrus communis*, apresentaram aumento nos níveis de EROs, durante o processo de maturação (HUANG et al., 2007; MONDAL et al., 2004; ROGIERS; KUMAR; KNOWLES, 1998). Em frutos de *Rubus sp.* ocorreu uma diminuição da atividade das enzimas SOD, CAT e APX, assim como um aumento da peroxidação lipídica, concomitantemente ao amadurecimento (WANG; JIAO, 2001). Também, em *Solanum lycopersicum*, as atividades da SOD e da CAT decresceram com o amadurecimento, assim como seus mRNAs (JIMÉNEZ et al., 2002).

Esses dados sugerem que, juntamente com alterações morfológicas e bioquímicas, a formação de EROs, resulta em um aumento progressivo no

estresse oxidativo, caracterizando o amadurecimento dos frutos de cafeeiro da cultivar Icatu amarelo.

5 CONCLUSÃO

As análises ultraestruturais, anatômicas e bioquímicas realizadas em frutos e pedúnculos sugerem que a espécie *Coffea arabica*, cultivar Icatu amarelo, não apresenta uma zona de abscisão entre o pedúnculo e o fruto. As células sofrem alterações ao longo da maturação, caracterizadas por afrouxamento seguido de degradação da parede celular, o que explica as menores FDF em frutos cereja. Constatou-se, também, que, durante o amadurecimento há uma relação entre enzimas de degradação de parede celular, poliaminas e produção de espécies reativas de oxigênio.

As diferenças observadas no conteúdo de peróxido de hidrogênio sugere a aplicação desse composto na lavoura, para a obtenção de um padrão de uma menor força de desprendimento na hora da colheita, visto que este é um sinalizador para as enzimas de degradação de parede celular. Isso contribui para o amolecimento da parede celular, reduzindo, assim, a força necessária para o desprendimento dos frutos cereja.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

Realização de análises para investigar a existência ou não da zona de abscisão em outras cultivares de *Coffea arabica*, para descrever se a ausência dessa zona é característica da espécie ou da cultivar Icatu Amarelo;

Aplicação de substâncias, como peróxido de hidrogênio, visto que esse composto é um sinalizador para a ativação de enzimas de degradação de parede celular;

Comparar os resultados obtidos com futuros trabalhos de cultivares conhecidamente mais ou menos “dura”.

REFERÊNCIAS

ALSCHER, R. G.; ERTURK, E.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, May 2002.

ANAND, T. et al. Defence responses of chilli fruits to *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata*. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 53, p. 553-559, Sept. 2009.

ANDREWS, P. K.; FAHY, D. A.; FOYER, C. H. Relationships between fruit exocarp antioxidants in the tomato (*Lycopersicon esculentum*) pigment-1 mutant during development. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 120, p. 519-528, Mar. 2004.

ARRUDA, N. P.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Discriminação entre estádios de maturação e tipos de processamento de pós-colheita de cafés arábica por microextração em fase sólida e análise de componentes principais. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 819-824, fev. 2011.

AWAD, M. A.; AL-QURASHI, A. D.; MOHAMED, S. A. Antioxidant capacity, antioxidant compounds and antioxidant enzyme activities in five date cultivars during development and ripening. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, p. 688-693, July 2011.

BARBOSA, J. et al. Coffee quality and its interactions with environmental factors in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, New York, v. 4, p. 181-190, May 2012.

BARDÓCZ, S. Polyamines in food and their consequences for food quality and human health. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 6, p. 341-346, Oct. 1995.

BHATTACHARJEE, S. Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress senescence and signal transduction in plant. **Current Science**, Bangalore, v. 89, p. 1113-1121, Oct. 2005.

BIEMELT, S.; KEETMAN, U.; ALBRECHT, G. Re-aeration 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.

BLEECKER, A. B.; KENDE, H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v. 16, p. 1-18, Nov. 2000.

BONGHI, C. et al. Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach. **Plant Molecular Biology**, Boston, v. 20, p. 839-848, Dec. 1992.

BRENNAN, T.; FRENKEL, C. Involvement of hydrogen peroxide in the regulation of senescence in pear. **Plant Physiology**, Rockville, v. 59, p. 411-416, Mar. 1977.

BREUSEGEM, F. van et al. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, Clare, v. 161, p. 405-414, Aug. 2001.

BRIGHT, J. et al. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. **The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 45, p. 113-122, Jan. 2006.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUESCHER, R. W.; FURMANSKI, R. J. Role of pectinesterase and polygalacturonase in the formation of woolliness in peaches. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 43, p. 264-266, Aug. 1978.

CARVALHO, V. D.; CHALFOUN, S. M.; CHAGAS, S. J. de R. Relação entre classificação do café pela bebida e composição físicoquímica, química e microflorado grão beneficiado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 15., 1985, Maringá. **Resumos...** Rio de Janeiro: MIC/IBC, 1985. p. 2526.

CASTRO, R. de; MARRACCINI, P. Cytology, biochemistry and molecular changes during coffee fruit development. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, p. 175-199, Jan./Mar. 2006.

CHAVES FILHO, J. T. **Novos paradigmas na fisiologia do cafeeiro**. Campinas: IAC, 2007. 74 p. (Documentos, 80).

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutos e hortaliças: fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1990. 783 p.

CLEMENTS, J. C.; ATKINS, C. A. Characterization of a non abscission mutant in *Lupinus angustifolius* L.: physiological aspects. **Annals of Botany**, Oxford, v. 88, p. 629-635, July 2001.

CONSELHO NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: café (safra 2013), primeiro levantamento, janeiro de 2015**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/15_01_14_11_57_33_boletim_cafe_janeiro_2015.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2015.

CORTEZ, J. G. **Efeito de espécies e cultivares e do processamento agrícola e industrial nas características da bebida do café**. 2001. 71 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2001.

DAVIS, A. P. et al. Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 167, p. 357-377, Dec. 2011.

DISCHE, Z. General color reactions. In: WHISTLER, R. L.; WOLFRAM, M. L. (Ed.). **Carbohydrate chemistry**. New York: Academic, 1962. p. 477-520.

FAGAN, E. B. et al. Efeito do tempo de formação do grão de café (*Coffea* sp) na qualidade da bebida. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 27, p. 729-738, set./out. 2011.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FILGUEIRAS, W. H. **Modelagem da planta de café por elementos finitos para estudos de colheita por vibração**. 2001. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

FISCHER, R. L.; BENNETT, A. B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 675-703, June 1991.

FUKUDA, H. Programmed cell death of tracheary elements as a paradigm in plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 44, p. 245-253, Oct. 2000.

GALLON, C. Z.; BROETTO, S. G.; SILVA, D. M. Atividade da celulase e β -galactosidase no estudo da firmeza da polpa de mamões “Golden” e “Gran Golden”. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, p. 1178-1183, dez. 2009.

GEROMEL, C. et al. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 46, p. 569-579, May/June 2008.

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.

GIOMO, G. S. Uma boa pós-colheita é segredo da qualidade. **A Lavoura**, Rio de Janeiro, v. 115, n. 688, p. 12-21, fev. 2012.

GLÓRIA, M. B. A. Bioactive amines. In: HUI, H.; SHERKAT, F. (Ed.). **Handbook of food science, technology and engineering**. London: CRC, 2005. chap. 1.

GOMEZ-JIMENEZ, M. C. et al. Mature fruit abscission is associated with up regulation of polyamine metabolism in the olive abscission zone. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 167, p. 1432-1441, Nov. 2010a.

GOMEZ-JIMENEZ, M. C. et al. Tissue-specific expression of olive S-adenosyl methionine decarboxylase and spermidine synthase genes and polyamine metabolism during flower opening and early fruit development. **Planta**, Berlin, v. 232, p. 629-647, Aug. 2010b.

GONZALEZ-CARRANZA, Z. H.; LOZOYA-GLORIA, E.; ROBERTS, J. Recent developments in abscission: shedding light on the shedding process. **Trends in Plant Sciences**, Ames, v. 3, p. 10-13, Jan. 1998.

GUERREIRO FILHO, O.; FAZUOLI, L. C.; EIRA AGUIAR, A. T. **Cultivares de Coffea arabica selecionadas pelo IAC**: características botânicas, tecnológicas, agronômicas e descritores mínimos. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/Cultivares_cafe/Index.htm>. Acesso em: 1 mar. 2015.

GUNAWARDENA, A. et al. Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). **Planta**, Berlin, v. 212, p. 205-214, Jan. 2001.

HE, C. J. et al. Ethylene biosynthesis during aerenchyma formation in roots of maize subjected to mechanical impedance and hypoxia. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 112, p. 1679-1685, Dec. 1996.

HONG, S. B.; SEXTON, R.; TUCKER, M. L. Analysis of gene promoters for two tomato polygalacturonases expressed in abscission zones and the stigma. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 123, p. 869-881, July 2000.

HUANG, R. et al. Antioxidant activity and oxygen scavenging system in orange pulp during fruit ripening and maturation. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 113, p. 166-172, June 2007.

INZÉ, D.; VAM, M. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 6, n. 2, p. 153-158, 1995.

IRFAN, M. et al. Physiological and biochemical changes in plants under waterlogging. **Protoplasma**, Karlsruhe, v. 241, p. 3-17, May 2010.

JIMÉNEZ, A. et al. Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening. **Planta**, Berlin, v. 214, n. 5, p. 751-758, Mar. 2002.

JUDAS, I. C. S. M. **Evolução do teor de aminas biogénicas ao longo do fabrico e armazenamento de 2 formulações de enchidos secos curados**. 2000. 148 p. Dissertação (Mestrado em Controle de Qualidade) - Universidade do Porto, Porto, 2000.

KAZOKAS, W. C.; BURNS, J. K. Cellulase activity and expression in citrus fruit abscission zones during and after ethylene treatment. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 123, p. 781-786, Sept. 1998.

KESY, J. et al. Independent effects of jasmonates and ethylene on inhibition of *Pharbitis nil* flowering. **Acta Physiology Plantarum**, Copenhagen, v. 33, p. 1211-1216, July 2011.

KY, C. L. et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica* L. and *C. canephora*. **Food Chemistry**, Berlin, v. 75, p. 223-230, Nov. 2001.

LADERACH, P. et al. Systematic agronomic farm management for improved coffee quality. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 120, n. 3, p. 321-329, Feb. 2011.

LAVIOLA, B. G. et al. Alocação de fotoassimilados em folhas e frutos de cafeeiro cultivado em duas altitudes. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1521-1530, nov. 2007.

LEITE, G. A. et al. A ação das poliaminas na maturação e senescência de frutos. **Revista Agropecuária Científica no Semiárido**, Campus de Patos, v. 8, n. 4, p. 8-21, out. 2012.

LEWIS, M. W.; LESLIE, M. E.; LILJEGREN, S. J. Plant separation: 50 ways to leave your mother. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, p. 59-65, Feb. 2006.

LÓPEZ, A. P.; GOCHICOA, A.; FRANCO, A. R. Activities of antioxidante enzymes during strawberry fruit development and ripenibg. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, p. 349-352, June 2010.

LUDFORD, P. M. Postharvest hormone changes in vegetables and fruit. In: DAVIES, P. J. (Ed.). **Plant hormones: physiology, biochemistry and molecular biology**. Dordrecht: Kluwer Academic, 1995. p. 725-750.

LYONS, J. M. Chilling injuries in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 24, p. 445-466, June 1973.

MAJEROWICZ, N.; SONDAHL, M. R. Induction and differentitaion of reproductive buds in *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, p. 247-254, Apr./June 2005.

MALAVOLTA, E. **História do café no Brasil: agronomia, agricultura e comercialização**. São Paulo: Ceres, 2000. 464 p.

MALIK, A. U.; SINGH, Z. Endogenous free polyamines of mangos in relation to development and ripening. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 129, p. 280-286, May 2004.

- MARIN-LOPEZ, S. M. et al. Cambios físicos y químicos durante la maduración del fruto de café (*Coffea arabica* L. var. Colombia). **Cenicafé**, Chinchina, v. 54, n. 3, p. 208-225, 2003.
- MASIA, A. et al. Effect of some plant growth regulator treatments on apple fruit ripening. **Plant Growth Regulation**, Wageningen, v. 25, p. 127-134, Feb. 1998.
- MENGUTAY, M. et al. Adequate magnesium nutrition mitigates adverse effects of heat stress on maize and wheat. **Plant and Soil**, The Hague, v. 368, p. 57-72, July 2013.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, New York, v. 31, p. 426-428, Mar. 1959.
- MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.
- MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 9, p. 490-498, Oct. 2004.
- MIYAZAKI, J. H.; YANG, S. F. The methionine salvage pathway in relation to ethylene and polyamine biosynthesis. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 69, p. 366-370, Feb. 1987.
- MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459-481, June 2007.
- MONDAL, K. et al. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 48, n. 1, p. 49-53, Mar. 2004.
- MONDAL, K. et al. Oxidative stress and antioxidant systems in Guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New York, v. 15, p. 327-334, Oct. 2009.

MONROE, G. E.; WANG, J. K. Systems for mechanically harvested coffes. **Transactions of the ASAE**, Saint Joseph, v. 11, p. 272-278, 1968.

MORAIS, H. et al. Escala Fenológica detalhada da Fase Reprodutiva de *Coffea arabica*. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 257-260, 2008.

MORET, S. et al. A survey on free biogenic amine content of fresh and preserved vegetables. **Food Chemistry**, Berlin, v. 89, p. 355-361, Feb. 2005.

MÜLLER, K.; TINTELNOT, S.; LEUBNER-METZGER, G. Endosperm-limited Brassicaceae seed germination: abscisic acid inhibits embryo-induced endosperm weakening of *Lepidium sativum* (cress) and endosperm rupture of cress and *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 47, p. 864-877, July 2006.

MURAYAMA, H. et al. Effect of girdling above the abscission zone of fruit on “Bartlett” pear ripening on the tree. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 14, p. 3679-3686, Sept. 2006.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 22, n. 5, p. 867-880, Aug. 1981.

NELSON, N. A. A photometric adaptation of Somogyi method for the determination of glucose. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 153, n. 1, p. 375-380, Feb. 1944.

O' BRIEN, T. P. et al. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **Protoplasma**, New York, v. 59, n. 2, p. 368-373, 1964.

OSBORNE, D. J.; MCMANUS, M. T. **Hormones, signals and target cells in plant development**. Cambridge: Cambridge University, 2005. 268 p.

PANDEY, S. et al. Role of polyamines and ethylene as modulators of plant senescence. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 25, p. 291-299, Sept. 2000.

PANG, X. M. et al. Interrelationship between polyamine and ethylene in 1-methylcyclopropene treated apple fruits after harvest. **Physiologia Plantarum**, Hoboken, v. 128, p. 351-359, Sept. 2006.

PARCHOMCHUK, P.; COOKE, J. R. Vibratory fruit harvesting: an experimental analysis of fruit-stem dynamics. **Transactions of the ASAE**, Saint Joseph, v. 15, n. 4, p. 598-603, 1971.

PARRA-LOBATO, M. C.; GOMEZ-JIMENEZ, M. C. Polyamine-induced modulation of genes involved in ethylene biosynthesis and signalling pathways and nitric oxide production during olive mature fruit abscission. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, p. 4447-4465, June 2011.

PATTERSON, S. E. Cutting loose, abscission and dehiscence in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, p. 494-500, June 2001.

PATTERSON, S. E.; BLEECKER, A. B. Ethylene-dependent and-independent process associated with floral organ abscission in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 134, p. 194-203, Jan. 2004.

PEREIRA, L. F. P. et al. Ethylene production and acc oxidase gene expression during fruit ripening of *Coffea arabica* L. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 17, p. 283-289, July/Sept. 2005.

PEZZOPANE, J. R. M. et al. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro arábica. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 1, p. 499-505, 2003.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione-pathway on chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, Rockville, v. 126, n. 1, p. 445-462, May 2001.

PROCHÁZKOVÁ, D.; WILHELMOVÁ, N. Leaf senescence and activities of the antioxidant enzymes. **Biologia Plantarum**, Prague, v. 51, p. 401-406, Sept. 2007.

QUIN, W. M.; LAN, W. Z. Fungal elicitor-induced cell death in *Taxus chinensis* suspension cells is mediated by ethylene and polyamines. **Plant Science**, Prague, v. 166, p. 989-995, Apr. 2004.

RESENDE, J. M. et al. Atividade de enzimas pectinametilesterase e poligalacturonase durante o amadurecimento de tomates do grupo multilocular. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 206-201, Apr./June 2004.

RODIONOVA, N. A. et al. Formation of extracellular enzyme systems during *Geotrichum candidum* 3C growing on the cell walls isolated from the testa of cereal grains. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 37, n. 5, p. 562-565, 2001.

ROGIERS, S. Y.; KUMAR, M. G. N.; KNOWLES, N. R. Maturation and ripening of fruit of *Amelanchier alnifolia* Nutt. are accompanied by increasing oxidative stress. **Annals of Botany**, Oxford, v. 81, p. 203-211, Feb. 1998.

SÁGIO, S. A. et al. Identification and expression analysis of ethylene biosynthesis and signaling genes provides insights into the early and late coffee cultivars ripening pathway. **Planta**, Berlin, v. 239, p. 951-963, May 2014.

SÁGIO, S. A. et al. Physiological and molecular analyses of early and late *Coffea arabica* cultivars at different stages of fruit ripening. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 35, p. 3091-3098, Nov. 2013.

SAKAMOTO, M. et al. Involvement of hydrogen peroxide in leaf abscission signaling, revealed by analysis with an in vitro abscission system in *Capsicum* plants. **The Plant Journal**, Oxford, v. 58, p. 13-27, Oct. 2008.

SANTOS, M. O. **Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de frutos de cafeeiros cultivados em um gradiente de altitude na Serra da Mantiqueira.**

2012. 77 p. Tese (Doutorado em Fisiologia Vegetal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

SCHWEIKERT, C.; LISZKAY, A.; SCHOPFER, P. Polysaccharide degradation by Fenton reaction- or peroxidase-generated hydroxyl radicals in isolated plant cell walls. **Phytochemistry**, Oxford, v. 61, p. 31-35, Sept. 2002.

SCHWEIKERT, C.; LISZKAY, A.; SCHOPFER, P. Scission of polysaccharides by peroxidase-generated hydroxyl radicals. **Phytochemistry**, Oxford, v. 53, p. 565-570, Mar. 2000.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, v. 2012, p. 1-26, 2012.

SHIGEOKA, S. et al. Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1305-1319, May 2002.

SILVA, C. F. et al. Comportamento da força de desprendimento dos frutos de cafeeiros ao longo do período de colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, p. 468-474, mar./abr. 2010.

SILVA, C. S. et al. Desempenho operacional da colheita mecanizada e seletiva do café em função da força de desprendimento dos frutos. **Coffee Science**, Lavras, v. 8, n. 1, p. 53-60, jan./mar. 2013.

SILVA, F. M. Colheita mecanizada e seletiva do café. In: _____. **Cafeicultura empresarial: produtividade e qualidade**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. p. 1-75.

SILVA, F. M.; SILVA, F. O. E.; MIRANDA, N. B. Mecanização da colheita viabiliza cafeicultor. **Granja**, Porto Alegre, v. 784, p. 60-62, abr. 2014.

SOUZA, C. M. A. et al. Desenvolvimento de uma máquina vibradora para estudo do desprendimento de frutos do cafeeiro. **Engenharia Agrícola**, Viçosa, MG, v. 13, p. 7-18, jan./mar. 2005.

TASSONI, A. et al. Polyamine content and metabolism in *Arabidopsis thaliana* and effect of spermidine on plant development. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 38, p. 383-393, May 2000.

VELIKOVA, V.; YORDANOV, I.; EDREVA, A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, Clare, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.

VILAS-BOAS, E. V. B. **Modificações pós-colheita de bananas 'Prata' (*Musa acuminata* X *Musa balbisiana* Grupo AAB) irradiada**. 1995. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1995.

WALDRON, K. W. et al. New approaches to understanding and controlling cell separation in relation to fruit and vegetable texture. **Trends in Food Science and Technology**, Cambridge, v. 8, p. 213-221, July 1997.

WALKER, D. et al. High endo β -1,4-D-glucanase activity in a broad pH range from the alkali-tolerant *Nocardopsis* sp. SES28. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 22, p. 761-764, July 2006.

WANG, K. L.; LI, H.; ECKER, J. R. Ethylene biosynthesis and signaling networks. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 131-151, May 2002.

WANG, S. Y.; JIAO, H. Changes in oxygen-scavenging systems and membrane lipid peroxidation during maturation and ripening in blackberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 49, p. 1612-1619, Mar. 2001.

WU, Y.; DENG, Y.; LI, Y. Changes in enzyme activities in abscission zone and berry drop of "Kyoho" grapes under high O₂ or CO₂ atmospheric storage. **LWT - Food Science and Technology**, Trivandrum, v. 41, p. 175-179, Jan. 2008.

YANG, S. F.; HOFFMAN, N. E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, Palo Alto, v. 35, p. 155-189, June 1984.

YE, Z. Z.; RODRIGUEZ, R.; TRAN, A. The development transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induce enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, Clare, v. 158, p. 115-127, Sept. 2000.

YU, H. B.; ONG, B. Photosynthesis and antioxidante enzymes of phyllodes of *Acacia mangium*. **Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology**, Clare, v. 159, p. 107-115, Oct. 2000.

ZANANDREA, I. et al. Tolerance of *Sesbania virgata* plants to flooding. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 57, p. 661-669, Feb. 2010.

ZIMMERMANN, P. et al. Senescence-specific regulation of catalases in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 1049-1060, June 2006.

ZIOSI, V. et al. Peach (*Prunus persica* L.) fruit growth and ripening: transcript levels and activity of polyamine biosynthetic enzymes in the mesocarp. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 160, p. 1109-1115, Sept. 2003.