



MARCELA ANDREOTTI RICARDONI

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DA ÁGUA CATÓDICA:
ESTUDOS PRELIMINARES EM SEMENTES DE
CAFÉ**

LAVRAS- MG

2016

MARCELA ANDREOTTI RICALDONI

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DA ÁGUA CATÓDICA: ESTUDOS
PRELIMINARES EM SEMENTES DE CAFÉ**

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

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa
Orientadora

Dr. Renato Mendes Guimarães
Coorientador

LAVRAS- MG
2016

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

Ricaldoni, Marcela Andreotti.

Ação antioxidante da água catódica : estudos preliminares em sementes de café / Marcela Andreotti Ricaldoni. – Lavras : UFLA, 2016.

47 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

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

Bibliografia.

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Deterioração de sementes. 3. Qualidade fisiológica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

MARCELA ANDREOTTI RICALDONI

**AÇÃO ANTIOXIDANTE DA ÁGUA CATÓDICA: ESTUDOS
PRELIMINARES EM SEMENTES DE CAFÉ**

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

APROVADA em 20 de abril de 2016.

Dr. André Delly Veiga

IFSULDEMINAS

Dr. Antônio Rodrigues Vieira

EPAMIG

Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa

Orientadora

LAVRAS- MG

2016

Aos meus pais Domingos e Izabela, meus exemplos de vida.

Ao meu irmão Donato por todo carinho e amizade.

Ao meu amor Arthur pelo companheirismo e compreensão.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras (UFLA), em especial ao Departamento de Agricultura, pela oportunidade concedida para a realização do curso de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

À minha orientadora Dra. Sttela Dellyzete Veiga Franco da Rosa, por acreditar que venceria o desafio de me orientar, por todos os conselhos e ensinamentos dados com tanto carinho, paciência e disponibilidade e por me fazer compreender o verdadeiro sentido da palavra dedicação.

Aos professores e pesquisadores do Setor de Sementes pelos esclarecimentos e conhecimentos transmitidos durante o curso, em especial ao Prof. Dr. Renato Mendes Guimarães pela coorientação e apoio.

À professora substituta do departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, Aline da Consolação Sampaio Clemente pela amizade, incentivo e por não medir esforços em me ajudar.

A toda equipe de orientados da pesquisadora Sttela pela parceria, amizade, apoio e colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Sementes pela excelente convivência, respeito e ajuda no desenvolvimento do projeto.

Aos alunos do núcleo de estudos em sementes (NESEM) pelo convívio, amizade e valiosas contribuições.

Às minhas grandes amigas e companheiras desta jornada Madeleine, Cristiane e Marislaine, pela agradável convivência, pela amizade e momentos maravilhosos que passamos juntas, por não medirem esforços em me ajudar e por terem feito por mim, mais que eu mesma.

À bolsista de iniciação científica Amanda pelo auxílio, amizade e dedicação.

Aos amigos Maria Alice, Vitor, Aline (Kiki), Júlia, Nayara, Luís Filipe (Sid) e Joana por terem tornado essa etapa ainda mais especial, cheia de boas lembranças, carinho e descontração.

À Vovó Laura por ter me recebido em Lavras com tanto amor e por todas as orações.

Aos meus primos, tios e amigos que transformaram as dificuldades deste período em momentos descontraídos e prazerosos.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras, pela disposição e paciência em me auxiliar.

À Marli, secretária da pós-graduação do Departamento de Agricultura, pela atenção e ajuda.

E principalmente a Deus por me dar forças para superar os obstáculos e transformar mais um sonho em realidade.

Muito obrigada!

RESUMO

As sementes de café apresentam limitações com relação à conservação, devido a sua sensibilidade à dessecação e ao comportamento durante o armazenamento. Uma dificuldade no estabelecimento de metodologia ao armazenamento dessas sementes é devido à deterioração. A deterioração pode potencializar a produção de espécies reativas de oxigênio e causar danos oxidativos letais aos tecidos vegetais. Os danos causados por níveis nocivos de radicais livres podem ser amenizados pela ação de antioxidantes endógenos ou exógenos. Pesquisas recentes estão apresentando novas tecnologias de proteção antioxidativas, sendo a proteção catódica uma técnica promissora e com resultados relevantes em outras espécies recalcitrantes e até mesmo em outros organismos vivos. Assim, objetivou-se neste trabalho verificar o efeito antioxidante da água catódica em sementes da espécie *Coffea arabica* L. com a finalidade de investigar nova técnica para melhorar a qualidade fisiológica das sementes. O trabalho foi realizado no Laboratório Central de Sementes, do Departamento de Agricultura, da Universidade Federal de Lavras. Foram utilizadas sementes de *Coffea arabica* L. O trabalho foi desenvolvido em duas etapas, na primeira foi realizada uma análise preliminar da utilização da água catódica em lotes com diferentes níveis de qualidade. Na segunda etapa avaliou-se o efeito da luz e do período de embebição das sementes em água catódica. As sementes foram imersas em água catódica e água destilada por oito períodos distintos de tempo de embebição, com ausência e presença de luz e em seguida foram avaliadas por meio de testes fisiológicos. Conclui-se que água catódica pode influenciar positivamente o desempenho fisiológico das sementes de café com baixa qualidade, principalmente quando embebidas nos períodos entre 4,5 a 7,5 horas, na ausência de luz.

Palavras-chave: *Coffea arabica* L. Espécies reativas de oxigênio. Deterioração de sementes. Qualidade fisiológica.

ABSTRACT

Coffee seeds have limitations regarding to its conservation because of their sensitivity to desiccation and storage behavior. The establishment of a methodology for seed storage is difficult due to its deterioration. Deterioration can enhance the production of reactive oxygen species and cause lethal oxidative damage to plant tissues. The damage caused by harmful levels of free radicals can be softened by the action of endogenous or exogenous antioxidants. Recent research shows new antioxidative protection technologies, being cathodic protection a promising technique with relevant results in other recalcitrant species and even in other living organisms. Thus, the aim of this work was to verify the antioxidant effect of cathodic water in *Coffea arabica* L. seeds with the purpose of investigating a new technology to improve seed quality. The study was conducted at the Central Seed Laboratory, Department of Agriculture, at the Federal University of Lavras. *Coffea arabica* L. seeds were used. The study was conducted in two stages, in the first a preliminary analysis of the use of cathodic water was carried out in batches with different levels of quality. In the second it was evaluated the effect of light and of the imbibition period of the seeds in cathodic water. The seeds were immersed in distilled water and in cathodic water for eight distinct soaking periods, in absence and presence of light and then evaluated by physiological tests. It can be concluded that cathodic water can positively influence the physiological performance of the coffee seeds with poor quality, especially when embedded during periods between 4.5 to 7.5 hours in the absence of light.

Keywords: *Coffea arabica* L. Reactive oxygen species. Deterioration of seeds. Physiological quality.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação, de sementes de diferentes lotes, submetidas à embebição em água catódica ou em água destilada.....29
- Figura 2 - Porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de diferentes lotes de sementes de café submetidas à embebição em água catódica ou em água destilada30
- Figura 3 - Grau de umidade das sementes de café em função dos tempos (horas) de embebição em água destilada e em água catódica, na presença ou ausência de luz31
- Figura 4 - Porcentagem de protrusão radicular e embriões viáveis de sementes de café submetidas a diferentes períodos de embebição em água catódica ou destilada, na presença e ausência de luz.38
- Figura 5 - Porcentagem de plântulas normais e plântulas normais fortes de sementes de café submetidas a diferentes períodos de embebição em água catódica ou destilada, na presença e ausência de luz.40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Porcentagem média de embriões viáveis, protrusão radicular, germinação, plântulas normais fortes e plântulas com folhas cotiledonares expandidas, de sementes de café submetidas à embebição em água catódica e em água destilada por diferentes períodos de tempos, na presença ou ausência de luz.....	31
---	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1	Cafeicultura e sêmen	12
2.2	te de café	12
2.3	Características da semente de café	13
2.4	Deterioração de sementes: espécies reativas de oxigênio e antioxidantes	14
2.5	Proteção catódica contra o ataque de radicais livres	18
2.6	Proteção catódica - conceitos e princípios	19
2.7	Proteção catódica - efeitos contra danos de espécies reativas de oxigênio em sementes	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1	Espécie utilizada	23
3.2	Estudo da proteção catódica em lotes de sementes de café de diferentes níveis de qualidade fisiológica	23
3.3	Estudo dos efeitos da luz e de períodos de embebição na ação da água catódica.....	23
3.4	Avaliações fisiológicas	24
3.5	Produção da água catódica	26
3.6	Análise estatística dos resultados	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1	Estudo da proteção catódica em lotes de sementes de café de diferentes níveis de qualidade fisiológica	27
4.2	Estudo dos efeitos da luz e de períodos de embebição na ação da água catódica.....	29
5	CONCLUSÕES	39
	REFERÊNCIAS	40
	ANEXO	46

1 INTRODUÇÃO

O café é um dos produtos agrícolas com destaque no quadro de exportações do Brasil, sendo que o país apresenta liderança absoluta na produção mundial. Assim, a cultura do café possui importância indiscutível no cenário socioeconômico nacional, sendo uma cultura tradicional do agronegócio brasileiro e que emprega representativa mão-de-obra nas diversas etapas de produção.

Atualmente diversos métodos e tecnologias de cultivo têm sido colocados à disposição dos cafeicultores, para que o café apresente qualidade suficiente para atender às exigências de um mercado consumidor cada dia mais seletivo e exigente. Se por um lado já é possível alcançar uma produção com alto rendimento e qualidade, vencendo fatores limitantes como pragas e doenças, é na etapa de formação de mudas que ainda existem alguns dos mais antigos desafios.

As mudas de *Coffea arabica* L. são provenientes de sementes, as quais agregam tecnologias desenvolvidas por programas de melhoramento, mas, no entanto apresentam fatores que ainda limitam a sua produção. O gênero *Coffea* produz sementes recalcitrantes e intermediárias impossibilitando o seu armazenamento e conservação da viabilidade por períodos prolongados. A deterioração de sementes é um processo natural inerente às espécies e é devida aos danos em macromoléculas causada por espécies reativas de oxigênio, quando a capacidade antioxidante dos tecidos vegetais é inadequada, ocorre estresse oxidativo letal aos tecidos. Neste sentido, deve haver um bom equilíbrio entre a produção e a eliminação destes agentes oxidantes.

Diversos fatores da produção e pós-colheita afetam a qualidade de sementes de café, as quais apresentam alta sensibilidade à dessecação e baixa longevidade, o que pode acelerar os processos deteriorativos e comprometer a

qualidade das sementes. Os problemas causados por níveis nocivos das espécies reativas de oxigênio geradas durante processos deteriorativos podem ser atenuados pelo potencial antioxidante da semente, seja por fontes naturais endógenas ou fontes exógenas de redutores. Pesquisas recentes têm buscado o desenvolvimento de novos sistemas antioxidantes, sendo a água catódica uma dessas novas opções.

A água catódica, gerada por eletrólise de uma solução contendo cloreto de magnésio e cloreto de cálcio, pode exercer efeitos antioxidantes em materiais vegetais, permitindo a “limpeza” dos radicais livres. Essa solução apresenta considerável poder redutor, que neutraliza os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio, proporcionando uma melhora na condição fisiológica dessas sementes.

Assim, objetivou-se neste projeto, verificar o efeito antioxidante da água catódica em sementes das espécies *Coffea arabica* L. de baixa qualidade com a finalidade de investigar nova técnica para melhorar a qualidade fisiológica das sementes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cafeicultura e sêmen

2.2 te de café

O café é uma planta dicotiledônea pertencente à família Rubiaceae e ao gênero *Coffea* e as espécies mais conhecidas e estudadas são *Coffea arabica* L. e *Coffea canephora* Pierre, pois apresentam o maior valor comercial e características mais apreciadas pelo mercado consumidor (EL-ABASSY; DONFACK; MATERNY, 2011). Estas espécies correspondem, respectivamente, a 70 e 30% do volume de café comercializado no mundo,

sendo o Brasil o líder absoluto na produção e exportação de café, responsável por 33,60% da produção mundial (ABIC, 2015).

Visando potencializar a produtividade e atender a demanda do mercado consumidor mundial, as instituições de pesquisa têm buscado o aperfeiçoamento de técnicas de cultivo para uma produção mais eficiente, introdução de cultivares resistentes a pragas e doenças, dentre outros fatores. Apesar de todos os esforços, a produção e qualidade das sementes de café ainda necessitam de mais estudos e aprimoramento de metodologia de produção e conservação.

2.3 Características da semente de café

O fruto de cafeeiro é uma drupa elipsoide que, geralmente, contém dois *locus* e duas sementes. As sementes são plano-convexas, elípticas ou ovais, sulcadas longitudinalmente na face plana e que se constituem de embrião, endosperma e uma película prateada ou espermoderma (RENA; MAESTRI, 1986).

No passado, as sementes de café foram classificadas como recalcitrantes (KING; ROBERTS, 1979) e mais tarde como ortodoxas, quanto ao comportamento após secagem e armazenamento (ROBERTS et al., 1984). Posteriormente foram consideradas como intermediárias (ELLIS et al., 1990; 1991; HONG; ELLIS, 1995; EIRA et al., 1999), baseado em resultados de pesquisa, em que as sementes sobreviveram por aproximadamente doze meses, quando armazenadas em temperatura de 15°C, após dessecação até aproximadamente 10% (-90 MPa), tendo apresentado redução na germinação com progressivas reduções no teor de água e na temperatura de armazenamento.

Vários fatores podem afetar a qualidade de sementes de café, principalmente em função da sua alta sensibilidade à dessecação e baixa longevidade. Sementes tolerantes à dessecação, as quais têm sua longevidade

favorecida pela redução da temperatura e umidade relativa do ar, apresentam mecanismos associados à tolerância à dessecação, como a síntese e o acúmulo de proteínas *late embryogenic abundant (lea)* ou *lea-like* (WALTERS et al., 1997; WOLKERS et al., 2001) e açúcares como a sacarose e alguns oligossacarídeos bem como a presença de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (BERJAK, 2006).

O comportamento fisiológico de sementes de café durante o armazenamento tem sido investigado há vários anos, onde se observa grande controvérsia entre os resultados (SILVA; DIAS, 1985; MIRANDA et al., 1993; HONG; ELLIS, 1992, 1995; 1993; DUSSERT et al., 1999; ROSA et al., 2005, 2007, 2011; VEIGA et al., 2007; VIEIRA et al., 2007; BRAGHINI; FAZUOLI, 2007; SANTOS et al., 2014a, b; ABREU et al., 2014; SANTOS et al., 2015; COELHO et al., 2015) e estudos ainda são realizados para o entendimento das causas da baixa longevidade e melhor forma de obter e conservar sementes de café de melhor qualidade.

Desta forma, tornam-se importantes estudos que visem o desenvolvimento de técnicas para a obtenção e conservação de sementes de café com alta qualidade, que contribuam para a produção de mudas em épocas favoráveis à implantação da lavoura e para garantir a preservação do café em bancos de germoplasma.

2.4 Deterioração de sementes: espécies reativas de oxigênio e antioxidantes

A deterioração pode levar à perda de viabilidade das sementes, desnaturação de enzimas, peroxidação de compostos e à geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou radicais livres (BENSON; BREMNER, 2004; BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011; ROACH et al., 2008; WHITAKER et al., 2010). Um radical livre é qualquer molécula, que contém um

ou mais elétrons desemparelhados e incluem o oxigênio singleto ($1O_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH) e ânion superóxido (O_2^-) (MITTLER, 2002), e são capazes de reagir com compostos de membrana, ácidos nucleicos, proteínas, enzimas, lipídeos e outras moléculas alterando as funções biológicas normais das células, podendo ocasionar a sua deterioração, envelhecimento e até morte celular. Muitos destes radicais estão envolvidos em funções celulares normais, mas alguns são mais produzidos sob certas condições.

O papel das espécies reativas de oxigênio tem sido bem documentado na literatura, indicando que eles são o centro de danos associados com desidratação e deterioração, mas a produção de radicais livres também está associada a eventos de desenvolvimento, como a germinação de sementes e crescimento de plântulas (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011). Segundo estes autores, a diferença entre a atividade de radicais livres e eventos do desenvolvimento, por um lado, e a atividade e danos por outro lado, está no nível de controle e na capacidade celular antioxidante.

A base bioquímica e fisiológica do comportamento de sementes intermediárias, como as de café, durante o armazenamento foi investigada por Dussert et al. (2006), que avaliou os efeitos da secagem e do armazenamento sobre a viabilidade das sementes e as alterações em antioxidantes, lipídios e açúcares. Os autores concluíram que a deterioração de sementes de café durante o armazenamento está também associada à perda e oxidação de sistemas antioxidantes.

Em estudos recentes têm sido observado que a perda de viabilidade das sementes durante a secagem é acompanhada pelo aumento das espécies reativas de oxigênio (EROS) e peroxidação de lipídeos (OLIVEIRA et al., 2011; PARK et al., 2011). As EROS são formas parcialmente reduzidas do oxigênio atmosférico (O_2) e essas moléculas são capazes de oxidar vários componentes

celulares e podem levar a morte celular (VANDENABEELE et al., 2000). Elas interferem no DNA e no RNA, e conseqüentemente na síntese de enzimas associadas à qualidade de sementes, tais como a superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, dehidroascorbato redutase, monodehidroascorbato redutase, glutathiona redutase, glutathiona peroxidase e guaiacol peroxidase.

A peroxidação lipídica começa com a geração de radicais livres (um átomo ou molécula com um elétron não pareado) e também pela autoxidação por enzimas. Frequentemente a peroxidação de lipídeos de membrana celular leva a danos celulares caracterizados pela alteração da fluidez, a modificação estrutural dos sistemas enzimáticos e a destruição das membranas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1989). Durante a fase de senescência, é sabido que ocorre o acúmulo de produtos da peroxidação.

A discussão mais frequente no contexto dos fenômenos intracelulares são o superóxido (O_2^-), H_2O_2 , o radical hidroxila (OH^\cdot) e o oxigênio singlete (1O_2). O ânion superperóxido O_2^- é produzido por autoxidação de hidroquinonas, leucoflavinas e tióis bem como enzimaticamente. Já o peróxido de hidrogênio H_2O_2 é produzido espontaneamente ou por dismutação do O_2 ou pela redução de dois elétrons do O_2 .

A flavoenzima, como monoamina oxidase presente no exterior da membrana mitocondrial, é provavelmente, a mais importante contribuição intracelular na geração de H_2O_2 . Estas enzimas as quais normalmente usam o O_2 como um substrato, catalisam a reação de transferência de dois elétrons que produzem H_2O_2 . O radical hidróxido OH^\cdot é formado por O_2^- e H_2O_2 na presença de catalisadores, que são os metais de transição (reação de Fenton) o qual catalisa a reação. O OH^\cdot é de longe o radical oxigênio mais reativo e ele reage quase imediatamente com qualquer molécula localizada onde este foi gerado. O principal mecanismo de toxidez do H_2O_2 e o O_2^- pode ser sua habilidade de

combinar para formar o OH^\cdot (Reação de Haber-Weiss) (FERREIRA, 2005). O O_2^\cdot é gerado durante a peroxidação de lipídeos (MCDONALD, 2004).

Os radicais livres atacam outros compostos além dos lipídeos e mudanças em estruturas de proteínas das sementes foram observadas e atribuídas aos radicais livres (MCDONALD, 1999), além de ataques em DNA cromossomal.

Dentre os componentes químicos que protegem as sementes contra os efeitos do armazenamento estão os antioxidantes, os quais eliminam substâncias tóxicas resultantes de reações mediadas por radicais livres. Situações de estresse, como a remoção severa de água das células, induzem aos processos oxidativos e produção dos radicais livres. A capacidade das sementes resistirem à dessecação pode ser também relacionada à sua capacidade de remover espécies de oxigênio ativado, para evitar eventos deletérios, tais como a peroxidação lipídica causada por esses compostos (VERTUCCI; FARRANT, 1995; HENDRY, 1993).

Duas abordagens para a proteção contra os efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio são a atuação de tratamento para reduzir a sua produção, ou a aplicação exógena de antioxidantes que podem exercer um efeito direto e ainda melhorar a atividade antioxidante endógena (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011). A atividade e/ou presença de sistemas enzimáticos removedores de radicais livres são utilizados como marcadores da deterioração e sua correlação com o desempenho fisiológico permite um melhor entendimento da perda de qualidade das sementes. Diversas enzimas antioxidantes são detectadas em células vegetais, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalases (CATS), ascorbato peroxidase (APX), várias outras peroxidases, redutases mono e desidro-ascorbato, glutathiona redutase (GR), glutathiona-S-transferases (GST) e da peroxidase (GPX) (KRANNER; BIRTIC, 2005).

Em sementes de café, inúmeros trabalhos também são encontrados na literatura, em que são demonstradas as relações entre o desempenho fisiológico e a atividade de enzimas removedoras de radicais livres.

Por outro lado, a aplicação exógena de antioxidantes em sementes também tem sido investigada em sementes de café. Em experimento com sementes de *Coffea arabica* L., Kikuti et al. (2002), com o objetivo de avaliar o efeito da aplicação de antioxidantes, visando a obtenção de melhor desempenho e armazenabilidade, concluíram que a imersão das sementes em solução de ácido ascórbico e EDTA após a secagem contribuiu para melhorar o desempenho das sementes logo após a colheita e após quatro meses de armazenamento.

Assim, sabe-se que o envelhecimento celular ocorre devido à formação endógena de radicais livres, os quais oxidam macromoléculas constituintes das membranas, bem como de outros componentes das células. Elétrons removidos de macromoléculas intracelulares tornam-se radicais livres altamente reativos, os quais podem facilmente formar produtos de peroxidação mediante reação com o oxigênio molecular.

Além da ação de enzimas antioxidantes e a atuação de outros antioxidantes endógenos e exógenos, outra forma de ataque aos radicais livres tem sido investigada em seres vivos, na qual a peroxidação pode ser evitada, em parte, por meio do fornecimento de elétrons que reagem com esses radicais livres. Esta é a base da proteção catódica, cujos estudos iniciaram na década de setenta e ainda é alvo de pesquisas mais recentes (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011).

2.5 Proteção catódica contra o ataque de radicais livres

A utilização de água catódica, gerada por eletrólise de uma solução contendo cloreto de cálcio e cloreto de magnésio tem demonstrado efeitos

antioxidantes (SHIRAHATA et al., 1997; HANAOKA, 2001; HANAOKA et al., 2004; HIRAOKA et al., 2004) atribuídos à água reduzida com “hidrogênio ativo”. Essa fração catódica apresenta um grande potencial para melhorar as respostas ao estresse relacionado aos procedimentos que podem deteriorar materiais vegetais (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011). Os trabalhos se basearam no tratamento contra o envelhecimento de ratos (MOLNAR, 1973), em técnicas contra a corrosão de metais, em que a aplicação de potencial elétrico negativo promoveu a redução do ataque de radicais livres, devido à fonte de elétrons e não pela adição de antioxidantes.

2.6 Proteção catódica - conceitos e princípios

Shirahata et al. (1997) caracterizou a água catódica lançando mão do princípio da eletrólise de Michael Faraday, postulado no período de 1791-1867. Neste princípio ocorre o processo de redução no catodo e de oxidação no anodo, sendo essa a base da proteção catódica. A dissociação de H_2O produz íons H^+ e OH^- . No catodo, os íons H^+ ganham elétrons e se tornam hidrogênio ativo (H). Hidrogênio ativo apresenta alto potencial redutor. No anodo, os íons OH^- perdem elétrons e formam o OH , que resulta na produção de O_2 e H_2O . A água catódica (água reduzida) é abundante em hidrogênio dissolvido, possui um alto pH (9,0-10,0), enquanto que a água anódica (água oxidada) é abundante em oxigênio dissolvido e possui pH ácido podendo agir como um descontaminante e, aparentemente, uma potente antimicrobiano (HANAOKA et al., 2004).

Nos estudos de Shirahata et al. (1997), foi também demonstrado que a água catódica elimina espécies reativas de oxigênio e protege o DNA contra danos por radicais livres. Os autores enfatizam que no catodo ocorre redução e no anodo ocorre oxidação. A dissociação de H_2O produz íons OH^- e H^+ . No catodo, os íons H^+ ganham elétrons para se transformarem em hidrogênios

atômicos ativos (H). Hidrogênios atômicos ativos apresentam alto potencial de redução e são, então, transformados em moléculas de hidrogênio (H_2), que são quimicamente inertes em temperatura ambiente. No anodo, os íons OH^- perdem elétrons para formarem OH, o que resulta na produção de O_2 e H_2O . A água alcalina catódica (água reduzida) é abundante em hidrogênio dissolvido, enquanto que a água ácida anódica (água oxidada) é abundante em oxigênio dissolvido.

2.7 Proteção catódica - efeitos contra danos de espécies reativas de oxigênio em sementes

Os trabalhos sobre a proteção catódica se basearam no tratamento contra o envelhecimento de camundongos (MOLNAR, 1973), nos efeitos benéficos do tratamento de diversas doenças e em técnicas contra a corrosão de metais, em que a aplicação de potencial elétrico negativo (proteção catódica) promoveu a redução no ataque de radicais livres, devido à fonte de elétrons e não pela adição de antioxidantes. Nestes estudos, houve a tentativa de reduzir o ataque de radicais livres, não por meio do fornecimento de antioxidantes na dieta, mas mantendo os camundongos em gaiolas com uma carga negativa, aplicada de maneira análoga à técnica de proteção catódica de metais contra a corrosão.

Molnar (1973) relatou que a expectativa de vida média e máxima de camundongos mantidos em gaiolas, nas quais eram aplicados potenciais negativos foram, respectivamente, de 25 e 32% maior do que aqueles mantidos em gaiolas carregadas com um potencial positivo. Além disso, a contagem de glóbulos brancos dos camundongos mantidos a um potencial negativo foi quase duas vezes superior ao dos camundongos de controle, colocados em gaiolas sem potencial, e mais de duas vezes comparados aos mantidos em gaiolas com

potencial positivo. Foi também sugerido que a carga negativa proporcionou uma relativa proteção contra os efeitos de radiação.

O aumento na viabilidade de sementes de milho envelhecidas artificialmente, quando mantidas num condutor elétrico negativamente carregado foi demonstrado por Berjak (1978). A utilização de carga de eletricidade estática de -300 V, durante o envelhecimento de sementes e após um período de envelhecimento, proporcionou maior porcentagem de germinação e maior crescimento das plântulas de milho. Nesta pesquisa, a análise ultraestrutural, feita por meio de microscopia eletrônica, revelou que em sementes submetidas à proteção catódica, ocorreu melhora significativa subcelular, em relação às sementes não tratadas. Os benefícios da proteção catódica, segundo os autores, não se restringem à superfície da cobertura das sementes, uma vez que o exame microscópico dos pericarpos das sementes de milho revelou alterações no apoplasto, por meio da análise das três fases da peroxidação de componentes da membrana: deterioração do citoplasma afetando principalmente as mitocôndrias, danos nas membranas e perda de controle subcelular e, o terceiro estágio com a lise celular ou ruptura e dissolução da membrana.

Outro estudo foi desenvolvido por Pammenter et al. (1974), em que sementes de *Zea mays* foram submetidas ao tratamento de envelhecimento artificial e proteção catódica. As sementes submetidas à proteção catódica apresentaram uma diminuição significativa na perda de viabilidade. Já no teste de condutividade elétrica essas sementes apresentaram degradação de membranas consideravelmente menor do que as sementes que não foram protegidas. Também foi observado que após 10 dias do envelhecimento acelerado a porcentagem de aberrações cromossômicas foi três vezes menor nas sementes protegidas. Os autores concluíram que a proteção catódica reduz o ataque de radicais livres sobre macromoléculas biológicas, presumivelmente

porque funciona como uma fonte de elétrons, os quais reagem com estes radicais livres.

Segundo Shirahata et al. (1977; 1999) a água catódica pode penetrar em todas as membranas, em todas as partes do corpo, incluindo a barreira hematoencefálica, podendo ser considerada um poderoso e ideal antioxidante em organismos vivos, eliminando EROS, protegendo moléculas de DNA e RNA, podendo suprimir o crescimento de células humanas cancerosas e a aceleração do consumo de glicose pelas células de ratos que apresentavam diabetes. Shirahata et al. (1999) também declararam que o “hidrogênio ativo” pode estar presente em vários meios aquosos naturais ou artificiais.

Berjak; Sershen; Pammenter (2011) demonstraram que a utilização da água catódica proporcionou melhoria nos danos oxidativos relacionados aos procedimentos de criopreservação de eixos de espécies recalcitrantes. Neste caso, a ação da água catódica foi relatada mais provavelmente como um estimulante da atividade antioxidante endógena do que eliminando diretamente os radicais livres. Após essas publicações de Shirahata (1997;1999), algumas empresas, como a Nihon Trim (Osaka, Japão), Instituto da Água (Atarashii Mizuno Kai) (Tóquio, Japão) e Hita Tenryo Sui Kabushikigaisha (Oita, Japão) entre outras, têm desenvolvido e vendido vários produtos relacionados à produção de água catódica para a saúde, anunciando que tais mercadorias produzem potentes “limpadores” de radicais livres do organismo (HIRAOKA et al., 2004).

Portanto, a água catódica proporciona um meio não-tóxico de melhoria de danos oxidativos relacionados aos estresse, danos e degradação celular, juntamente com uma atividade fortemente fungicida da fração ácida da solução. Sendo assim, a fração catódica (reduzida) de uma solução aquosa de eletrólitos pode possuir uma propriedade direta antioxidante, sem a aplicação de quaisquer outros compostos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Espécie utilizada

Foram utilizadas sementes da espécie *Coffea arabica* L. armazenadas em câmara fria e seca $\pm 10^{\circ}\text{C}$ e 55 UR. Após a avaliação da qualidade inicial, as sementes foram envelhecidas, para obtenção de um lote de baixa qualidade, e posteriormente secadas até atingirem 13% de umidade.

3.2 Estudo da proteção catódica em lotes de sementes de café de diferentes níveis de qualidade fisiológica

Lotes de sementes de *Coffea arabica* L. de diferentes níveis de qualidade fisiológica foram utilizadas neste estudo, com a finalidade de se investigar os efeitos da imersão em água catódica. As sementes sem pergaminho foram submetidas à avaliação fisiológica por meio do teste de germinação, após imersão em água destilada e em água catódica. Foi avaliada a porcentagem de plântulas normais aos 30 dias e porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas aos 45 dias da semeadura.

A imersão foi realizada em caixas tipo “gerbox”, contendo 240 sementes em 125 mL de água catódica ou de água destilada, e posteriormente as caixas foram incubadas em BOD a 25°C por 1 hora.

3.3 Estudo dos efeitos da luz e de períodos de embebição na ação da água catódica

Neste estudo, a finalidade foi investigar os efeitos da presença ou ausência da luz, bem como de diferentes períodos de tempo de imersão sobre a ação da água catódica em sementes de café.

As sementes foram imersas em água catódica por oito períodos de tempo distintos (1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5; 9,0; 10,5 e 12,0 horas), com ausência e presença de luz. Foram também avaliadas sementes não submetidas ao tratamento de imersão em água catódica, as quais foram hidratadas em água destilada, pelos mesmos períodos de tempo.

Foram utilizadas caixas tipo “gerbox” para imersão de 240 sementes em 125 mL de água catódica, ou água destilada, e posteriormente foram incubadas em BOD a 25°C seguindo metodologia citada. Após os tratamentos, as sementes foram submetidas à determinação do teor de água e à avaliação da qualidade fisiológica.

Os resultados foram analisados para a seleção das condições de imersão das sementes na água catódica que proporcionaram melhoria do desempenho fisiológico das sementes.

3.4 Avaliações fisiológicas

As sementes tiveram os pergaminhos retirados manualmente e foram submetidas à determinação do teor de água e à avaliação da qualidade fisiológica, por meio dos testes de germinação e de viabilidade em solução de tetrazólio. Além disso, as sementes da segunda etapa do experimento foram submetidas ao envelhecimento acelerado para obtenção de um lote com qualidade fisiológica inferior.

- **Determinação do teor de água:**

Foi realizado pelo método de estufa a 105°C, durante 24 horas (BRASIL, 2009), com duas repetições de 10 sementes. Os resultados foram expressos em porcentagem com base no peso seco das sementes.

- **Teste de germinação:**

Foi realizado com quatro repetições de 25 sementes para cada tratamento, semeadas em rolos de papel toalha tipo "germitest" umedecidos com água destilada na quantidade de duas vezes e meia o peso do papel seco. Foram utilizadas placas de acrílico para realizar a semeadura e os rolos de papel contendo as sementes foram acondicionadas em germinador, regulado a 30°C, na presença de luz (BRASIL, 2009).

Foi determinada a porcentagem de protrusão radicular e de plântulas normais aos 15 dias após semeadura, em que foram computadas as sementes que apresentaram raiz principal e pelo menos duas raízes laterais sadias e normais; e a porcentagem de plântulas normais aos 30 dias após semeadura. No teste de germinação foram também determinadas: a porcentagem de plântulas normais fortes e fracas, sendo computadas como fortes aquelas que apresentaram alça hipocotiledonar com três centímetros ou mais, e fracas as que se encontraram abaixo deste padrão; e a porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas e massa seca de plântulas aos 45 dias.

- **Teste de tetrazólio:**

Foi realizado com quatro repetições de 25 sementes. As sementes foram embebidas em água por 36 horas para extração dos embriões, os quais foram mantidos em solução de antioxidante polivinilpirrolidona (PVP) até o momento da imersão em solução de tetrazólio 0,5% utilizando-se frascos escuros, em temperatura de 30°C por 3 horas (CLEMENTE, 2011).

A análise da viabilidade dos embriões foi realizada com auxílio de lupa estereoscópica com aumento de 10 vezes para melhor visualização das estruturas internas e externas dos mesmos. Para tanto, foi realizado um corte longitudinal ao meio dos embriões, os quais foram classificados em viáveis e inviáveis de acordo com a localização e extensão dos danos (CLEMENTE, 2011).

- **Envelhecimento acelerado**

As sementes armazenadas de *Coffea arabica* L. foram submetidas ao envelhecimento acelerado para a obtenção de nível de qualidade inferior. Para o envelhecimento acelerado foi utilizado o procedimento, modificado, proposto pela AOSA (1983) e descrito por Marcos Filho (2015). As sementes sem pergaminho foram distribuídas em camada única sobre uma tela de alumínio, fixada em caixa plástica tipo “gerbox”, contendo 40 mL de água. As caixas contendo as sementes foram fechadas e mantidas em $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 40 horas em BOD.

3.5 Produção da água catódica

A água catódica foi produzida segundo metodologia descrita por Berjak; Sershen; Pammenter (2011), com modificações: solução contendo como eletrólitos 0,5 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 0,5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, foi eletrolisada aplicando uma diferença de potencial de 60V, utilizando cuba própria para corrida eletroforética. O conteúdo da solução foi dividido em duas porções iguais e a eletrólise foi realizada durante 1 hora, em temperatura ambiente, produzindo 500 ml de água anódica (oxidada) com pH próximo a 3-4, e 500 ml de água catódica (reduzida) com pH próximo a 11-12. O circuito foi completado utilizando-se uma ponte salina à base de ágar contendo cloreto de potássio. A água catódica foi utilizada nos dois experimentos.

3.6 Análise estatística dos resultados

No primeiro estudo foi realizada uma análise preliminar da utilização da água catódica em lotes com diferentes níveis de qualidade. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 20x2 (20 - lotes; 2 - presença e ausência de luz), com quatro repetições.

No segundo estudo, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 8x2x2 (8 - tempos de embebição; 2 - presença e ausência de luz; 2 - água catódica e água destilada), com quatro repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância, seguindo modelos matemáticos próprios para o delineamento empregado, utilizando-se o programa SISVAR® (FERREIRA, 2011). As médias foram comparadas por meio do teste de *Scott-Knott*, ao nível de 5% de probabilidade.

Os dados do efeito do tempo de embebição nas sementes de café sobre as variáveis analisadas foram apresentados através de curvas de médias acumuladas com a utilização do programa *Sigma Plot* 11.0. Os desvios-padrão foram apresentados na forma de barras para facilitar a interpretação dos dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da proteção catódica em lotes de sementes de café de diferentes níveis de qualidade fisiológica

Na Figura 1 estão representados os resultados do teste de germinação das sementes dos diferentes lotes de sementes de café, após imersão em água catódica e em água destilada. Observa-se que, para a maioria dos lotes utilizados

no estudo, houve efeito significativo da água catódica, com melhoria do desempenho fisiológico das sementes, no teste de germinação. Muito embora na análise de variância tenha sido observado efeito significativo da interação entre os fatores, para alguns lotes, não houve efeito protetor da água catódica.

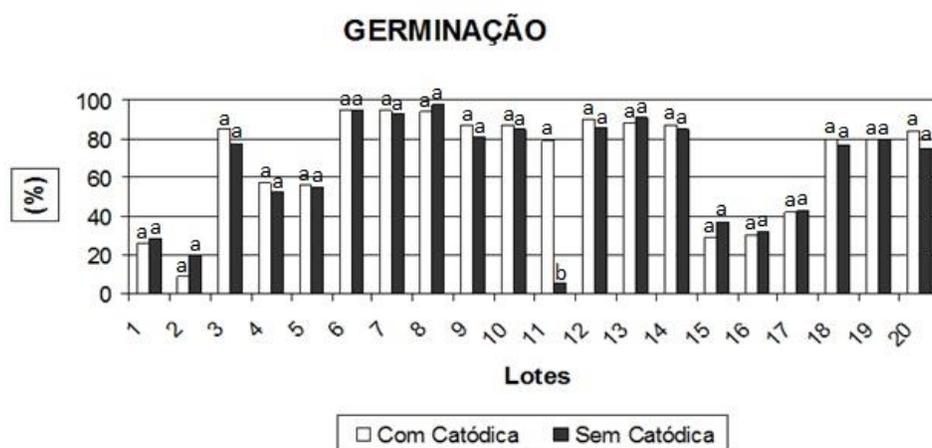


Figura 1 - Porcentagem de plântulas normais no teste de germinação, de sementes de diferentes lotes, submetidas à embebição em água catódica ou em água destilada.

Observa-se na Figura 2, os resultados da porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas, de sementes que foram imersas em água catódica e em água destilada. Neste caso, considerando o vigor das sementes utilizadas, observou-se também que houve efeito positivo da água catódica, para a maioria dos lotes, os quais apresentaram pequena melhora na qualidade fisiológica.

É importante observar que neste trabalho, foi realizado um estudo preliminar dos efeitos da proteção catódica em sementes de diferentes níveis de qualidade fisiológica. Outros estudos mais avançados devem ser realizados, em

sementes submetidas a diferentes tipos de danos, para que possam ser obtidos resultados mais consistentes e conclusivos.

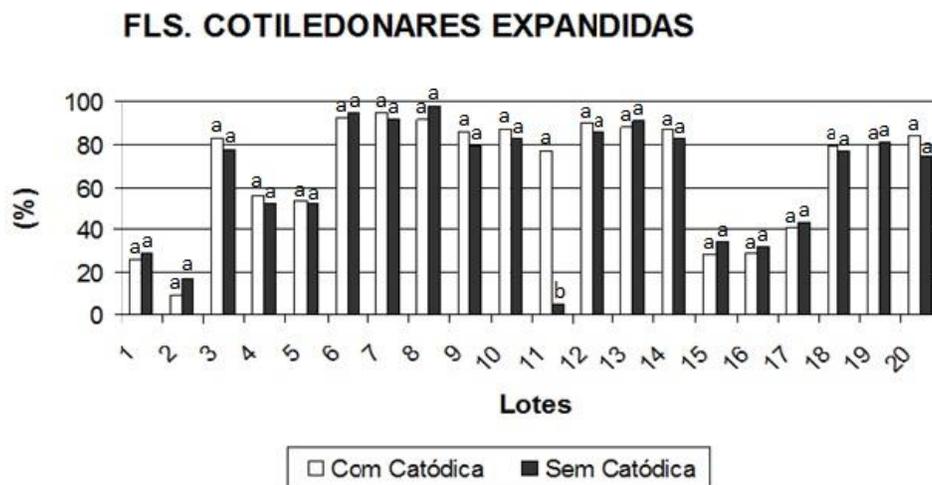


Figura 2 - Porcentagem de plântulas com folhas cotiledonares expandidas de diferentes lotes de sementes de café submetidas à embebição em água catódica ou em água destilada.

4.2 Estudo dos efeitos da luz e de períodos de embebição na ação da água catódica

Observa-se na Figura 3, o grau de umidade (%) das sementes após cada período de embebição. Antes da imersão em água catódica e em água destilada, as sementes apresentavam 13% de umidade inicial. À medida que foi aumentando gradativamente o período de embebição, ocorreu ganho de umidade até atingir cerca de 40%, no tempo de embebição de 12 horas, em água destilada e em água catódica, na presença ou ausência de luz.

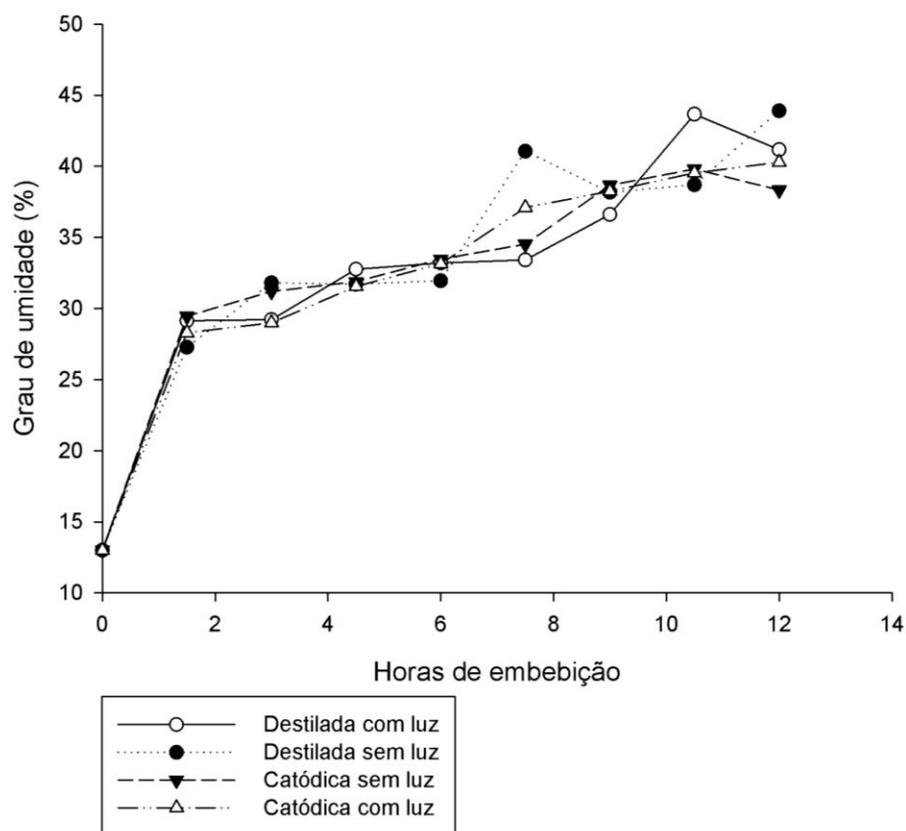


Figura 3 - Grau de umidade das sementes de café em função dos tempos (horas) de embebição em água destilada e em água catódica, na presença ou ausência de luz.

Por meio da análise de variância verificou-se interação significativa dos fatores luz, água e períodos de embebição. Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da avaliação de embriões viáveis, protrusão radicular, germinação, plântula normal forte e folhas cotiledonares expandidas.

Tabela 1 - Porcentagem média de embriões viáveis, protrusão radicular, germinação, plântulas normais fortes e plântulas com folhas cotiledonares expandidas, de sementes de café submetidas à embebição em água catódica e em água destilada por diferentes períodos de tempos, na presença ou ausência de luz.

Tempo (horas)	Água	Embriões Viáveis		Protrusão radicular		Germinação		Normais fortes		Folhas cotiledonares	
		Luz									
		Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem	Com	Sem
1,5	Catódica	47 Aa	57 Aa	14 Bb	22 Aa	2 Ab	0 Bb	0 Aa	0 Aa	2 Aa	0 Ba
	Destilada	67 Aa	67 Aa	24 Aa	18 Aa	8 Aa	5 Aa	0 Aa	0 Aa	1 Aa	1 Aa
3,0	Catódica	80 Aa	40 Bb	24 Aa	26 Aa	5 Bb	9 Aa	0 Ab	0 Ab	0 Bb	8 Aa
	Destilada	60 Ab	65 Aa	16 Ab	17 Ab	10 Aa	10 Aa	2 Aa	1 Ba	10 Aa	9 Aa
4,5	Catódica	62 Aa	70 Aa	26 Ab	17 Ba	5 Ba	14 Aa	0 Bb	2 Aa	5 Ba	9 Aa
	Destilada	57 Aa	57 Aa	13 Aa	17 Aa	6 Aa	2 Bb	4 Aa	0 Bb	6 Aa	2 Bb
6,0	Catódica	72 Aa	57 Ba	30 Aa	28 Aa	9 Aa	2 Bb	2 Aa	0 Ba	8 Aa	2 Ba
	Destilada	40 Ab	70 Ba	23 Ab	26 Aa	8 Aa	8 Aa	0 Ab	0 Aa	6 Aa	5 Aa
7,5	Catódica	85 Aa	62 Ba	16 Ba	29 Aa	8 Aa	8 Aa	0 Aa	2 Ba	1 Ba	8 Aa
	Destilada	72 Aa	65 Aa	10 Aa	16 Ab	2 Ab	1 Ab	0 Aa	0 Ab	2 Aa	0 Bb
9,0	Catódica	62 Aa	65 Aa	16 Aa	22 Aa	0 Bb	6 Aa	0 Ab	0 Aa	0 Bb	6 Aa
	Destilada	65 Aa	67 Aa	21 Aa	19 Aa	9 Aa	1 Bb	1 Aa	0 Ba	9 Aa	1 Bb
10,5	Catódica	60 Aa	65 Aa	15 Ba	24 Aa	0 Ba	4 Ab	0 Aa	0 Aa	0 Ba	4 Ab
	Destilada	62 Aa	57 Aa	17 Aa	20 Aa	0 Ba	10Aa	0 Aa	0 Aa	0 Ba	9 Aa
12,0	Catódica	87 Aa	62 Ba	11 Aa	10 Ab	1 Ba	8 Aa	0 Ba	2 Aa	2 Aa	1 Aa
	Destilada	72 Aa	72 Aa	13 Ba	20 Aa	2 Aa	1 Ab	0 Aa	0 Ab	2 Aa	2 Aa
CV		15,08		23,69		24,97		33,59		25,65	

Médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si, pelo teste de *Scott-Knott*, ao nível de 5% de probabilidade.

Analisando os resultados do teste de tetrazólio (TABELA 1), com relação aos efeitos da luz e da embebição em água catódica nos diferentes tempos, observou-se que nos períodos de 3 e 6 horas de embebição em água catódica na presença de luz, ocorreu maior porcentagem de embriões viáveis quando comparados às sementes que foram embebidas em água destilada na presença de luz. Para os demais tempos, de uma maneira geral, não houve diferença significativa da embebição em água catódica e água destilada.

Quando as sementes de café foram embebidas, na ausência de luz, observou-se efeito significativo apenas na viabilidade das sementes submetidas ao tratamento de embebição por 3 horas, em água destilada, com maiores valores de embriões viáveis quando se utilizou água destilada. Nos demais períodos de embebição, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos.

Comparando o efeito da luz na embebição de sementes de café em água catódica, observou-se, nos períodos de 3; 6; 7,5 e 12 horas, em água catódica e na presença de luz, maiores porcentagens de embriões viáveis, quando comparadas às sementes embebidas em água catódica na ausência de luz. Para os demais tempos não houve diferenças significativas.

Em estudos sobre a eficiência da água catódica como agente protetor contra os efeitos da dessecação de eixos embrionários das espécies recalcitrantes *Strychnos gerrardii* e *Boophae distich*, durante as etapas da criopreservação (BERJAK; SERSHEN; PAMMENTER, 2011), foi mencionado que a água catódica é um provável estimulante da atividade antioxidante endógena, melhorando os possíveis danos oxidativos relacionados aos procedimentos de criopreservação. No presente trabalho, também foi observado este efeito positivo da água catódica na viabilidade dos embriões, em alguns tratamentos, provavelmente pela ação antioxidante da água catódica durante a embebição das sementes de café.

De uma maneira geral, no teste de tetrazólio, as sementes embebidas em água catódica na presença de luz apresentaram maior porcentagem de embriões viáveis quando comparadas às embebidas em água destilada. Desta forma, parece que o efeito da água catódica pode ser influenciado pela presença de luz, podendo melhorar a viabilidade das sementes de café, nestas condições.

Para os resultados de protrusão radicular, houve interação significativa entre os fatores água catódica, luz e período de embebição. No período inicial (1,5 h) de embebição, os melhores resultados de protrusão radicular ocorreram para as sementes de café embebidas em água destilada, em comparação às embebidas em água catódica, na presença de luz. Na presença de luz, para os períodos de 3; 4,5 e 6 horas de embebição, observou-se maior valor de protrusão radicular das sementes embebidas em água catódica quando comparado à embebição em água destilada. Nos demais períodos não houve efeito da água catódica, na presença de luz (TABELA 1). Quando as sementes foram embebidas na ausência de luz, houve efeito positivo da água catódica no desempenho fisiológico das sementes, nos períodos de 3 e 7,5 horas.

Analisando o efeito da luz na eficiência da água catódica, foi observado melhores resultados quando as sementes foram embebidas no escuro (1,5; 7,5 e 10,5 h), ou na presença de luz, quando embebidas em água catódica por 4,5 horas.

De maneira geral, para a protrusão radicular, melhores resultados foram observados em sementes embebidas em água catódica, mas o efeito da presença ou ausência da luz foi variável de acordo com os tempos de embebição, indicando não haver consistência quanto aos efeitos deste fator.

Na Tabela 1 também estão apresentados os resultados do teste de germinação de sementes de café embebidas em água catódica e destilada, por diferentes períodos e na presença e ausência de luz. Observou-se efeito significativo da água catódica, quando as sementes foram embebidas no escuro,

nos tempos de 4,5; 7,5; 9 e 12 horas, com resultados superiores de germinação em relação à embebição em água destilada. Na presença de luz, foi observada maior porcentagem de germinação apenas para as sementes embebidas em água catódica por 7,5 horas. Nos demais períodos de embebição, não houve diferenças significativas.

Quando foi analisado apenas o efeito da luz na embebição em água catódica, observou-se que sementes embebidas no escuro por 3; 4,5; 9; 10,5 e 12 horas apresentaram melhores resultados de germinação do que as sementes embebidas em água catódica, na presença de luz. Já para a embebição em água destilada, de modo geral, não foram observadas diferenças significativas, seja na presença ou na ausência de luz.

Apesar de pouco expressivo, o efeito positivo da embebição ocorreu sobre a germinação das sementes embebidas em água catódica na ausência de luz e esta proteção catódica proporcionou um incremento nos resultados, sendo o melhor tratamento aquele em que as sementes foram embebidas em água catódica, na ausência de luz, no período de 4,5 horas de embebição.

Pammenter et al. (1974) e Berjak (1978), trabalhando com sementes de milho envelhecidas e submetidas ao tratamento de proteção catódica observaram uma diminuição significativa da perda de viabilidade das sementes. Os autores afirmaram que a proteção catódica diminui o ataque de radicais livres sobre macromoléculas biológicas.

No presente trabalho, as sementes de café foram preliminarmente expostas a condições adversas para obtenção de lote com qualidade mais baixa. Isto foi necessário, devido o interesse de investigar a proteção catódica em sementes, visando melhorar o seu desempenho fisiológico. No entanto, o efeito do envelhecimento acelerado (tratamento utilizado para reduzir a qualidade fisiológica das sementes no segundo experimento), seguido da secagem, foi acentuado levando a alta incidência de fungos, como foi observado durante a

avaliação da germinação, durante o teste. No entanto, apesar da baixa germinação, foi observado, pelo teste de tetrazólio, que as sementes mantiveram alta porcentagem de viabilidade.

Levando-se em consideração que o teste de germinação em laboratório é realizado sob condições ideais de umidade e temperatura para a germinação das sementes, essas condições também propiciam o desenvolvimento de fungos, durante o teste. O ambiente favorável aliado ao tempo do teste de germinação das sementes, de 30 dias, contribui para a disseminação dos fungos, das sementes infestadas para as sementes saudáveis, o que pode prejudicar a avaliação da qualidade das sementes de café ao final do teste de germinação (CLEMENTE, 2009).

Por outro lado, a baixa porcentagem de germinação também pode ser reflexo da alta sensibilidade do endosperma às condições adversas, principalmente à secagem, como foi observado por Coelho et al. (2015), sugerindo que o endosperma é mais susceptível a danos, em comparação aos embriões das sementes de café.

Avaliando os resultados de plântulas normais fortes (TABELA 1), com relação aos efeitos da luz e da embebição em água catódica nos diferentes tempos, observou-se que com 4,5; 7,5 e 12 horas de embebição em água catódica com ausência de luz, obteve-se maior porcentagem de plântulas fortes quando comparados às sementes que foram embebidas em água destilada na ausência de luz.

Quando as sementes foram embebidas em água catódica na presença de luz, observou-se efeito significativo nas sementes embebidas por 6 horas, com maiores valores de plântulas normais ao se utilizar água catódica na presença de luz.

Ao se comparar o efeito da luz na embebição de sementes de café em água catódica, observou-se nos tempos de 4,5 e 12 horas em água catódica com

ausência de luz, maiores porcentagens de plântulas normais fortes, quando comparadas às sementes embebidas em água catódica na ausência de luz. Já nos tempos de 6 e 7,5 horas de embebição em água catódica com presença de luz foi observado maiores porcentagens de plântulas normais, quando comparados as sementes embebidas em água catódica com ausência de luz.

De uma maneira geral, as sementes de café embebidas em água catódica apresentaram maior porcentagem de plântulas normais fortes quando comparadas às sementes embebidas em água destilada. Porém, o efeito da luz nos resultados de plântulas normais fortes durante a embebição foi variável de acordo com o tempo.

Para os resultados de folhas cotiledonares expandidas (TABELA 1), também houve interação significativa entre os fatores água catódica, luz e período de embebição. Foram obtidos melhores resultados de folhas cotiledonares expandidas quando as sementes foram embebidas em água catódica na ausência de luz por 4,5; 7,5 e 9 horas, quando comparadas as sementes embebidas em água destilada na ausência de luz. Para as sementes embebidas na presença de luz, de maneira geral, não houve diferença significativa entre as sementes embebidas em água catódica e água destilada.

Analisando apenas o efeito da luz na embebição em água catódica, para a variável folhas cotiledonares expandidas, observou-se melhores resultados para os períodos de 1,5 e 6 horas de embebição em água catódica com presença de luz. Entretanto, nos períodos de 3; 4,5; 7,5; 9 e 10,5 horas de embebição em água catódica foram observadas maiores porcentagens de folhas cotiledonares expandidas nas sementes embebidas em água catódica na ausência de luz.

Os efeitos do tempo de embebição das sementes de café sobre variáveis analisadas estão representados nos gráficos de desvio padrão (FIGURAS 4 e 5), para o melhor entendimento dos resultados. Os intervalos de confiança foram utilizados na comparação das médias dos dados, sendo que duas médias foram

consideradas diferentes entre si quando uma estimativa não estiver contida no intervalo do desvio padrão da outra média.

Na Figura 4, foi demonstrado o comportamento fisiológico, por meio o teste de tetrazólio das sementes de café embebidas em água catódica e na presença e ausência de luz, por diferentes períodos.

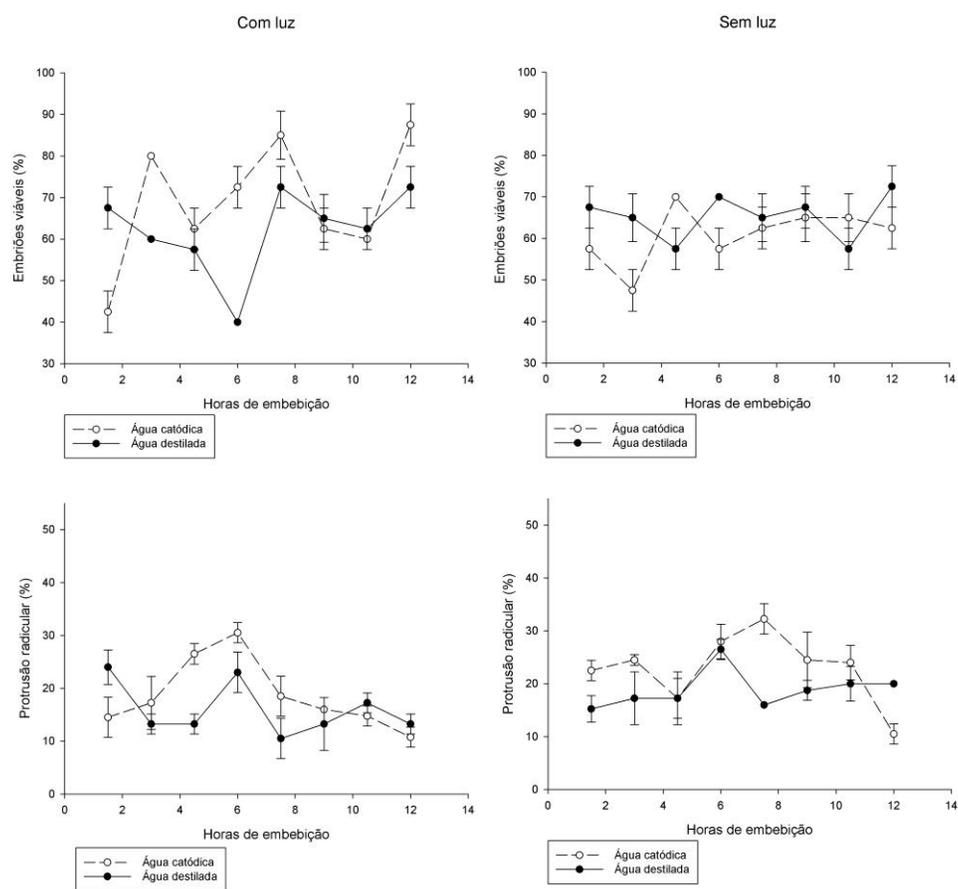


Figura 4 - Porcentagem de protrusão radicular e embriões viáveis de sementes de café submetidas a diferentes períodos de embebição em água catódica ou destilada, na presença e ausência de luz.

Na presença de luz, observou-se uma tendência de maior viabilidade dos embriões quando a embebição das sementes de café se deu em água catódica para a maioria dos períodos de embebição, com exceção do tempo 1,5 h. Quando a embebição se deu na ausência de luz, de maneira geral, não foi observado efeito da água catódica na viabilidade dos embriões.

Para a variável protrusão radicular (FIGURA 4), na presença de luz observou-se efeito positivo da água catódica nos períodos intermediários de embebição (4,5 a 7,5 h). A partir do período de 7,5 horas de embebição, não houve diferenças. Na ausência de luz, foram observados maiores médias quando se utilizou a água catódica, com superioridade da porcentagem de protrusão no período de 7,5 horas de embebição.

Pela Figura 5, observam-se os resultados do teste de germinação das sementes de café ao longo do período de embebição. Para as sementes embebidas em água catódica na presença de luz, não houve influência do tipo de água na germinação das sementes, com exceção do período de 7,5 horas, onde a água catódica parece ter tido efeito positivo.

Em contrapartida, na ausência de luz, a embebição em água catódica melhorou a germinação das sementes nos períodos intermediários.

Analisando os resultados das plântulas normais fortes (FIGURA 5), observou-se efeito negativo das embebidas em água catódica, na presença de luz, com valores nulos para a maioria dos períodos. Por outro lado, na ausência de luz, foram observados resultados efetivos da utilização da água catódica.

Sendo assim, parece que a presença de luz pode influenciar negativamente a ação da água catódica nas sementes de café, podendo piorar o desempenho dessas sementes.

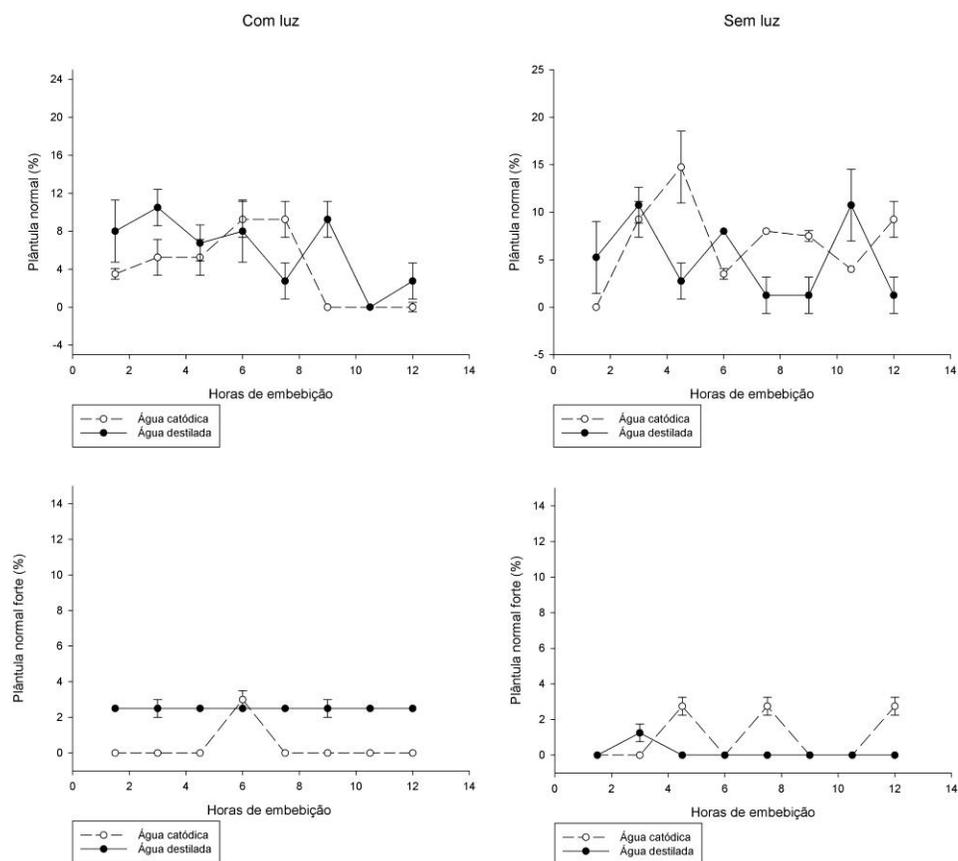


Figura 5 - Porcentagem de plântulas normais e plântulas normais fortes de sementes de café submetidas a diferentes períodos de embebição em água catódica ou destilada, na presença e ausência de luz.

5 CONCLUSÕES

A água catódica influencia positivamente o desempenho fisiológico das sementes de café de baixa qualidade, principalmente quando embebidas nos períodos entre 4,5 a 7,5 horas na ausência de luz.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. S. et al. Behavior of coffee seeds to desiccation tolerance and storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 4, p. 399-406, Oct./Dec. 2014.
- ALFENAS, A. C. et al. **Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos**. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006. 627 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE CAFÉ. **Estudo da OIC analisa mercado de café nos últimos 50 anos**. Disponível em: <<http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=59&inoid=3298>>. Acesso em: 09 dez. 2015.
- BENSON, E. E.; BREMNER, D. Oxidative stress in the frozen plant: a free radical point of view. In: FULLER, B.J.; LANE, N.; BENSON, E.E. (Eds.). **Life in the frozen state**. 1st ed. Boca Raton: CRC Press, 2004, cap. 6, p. 205-241.
- BERJAK, P. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 16, n. 1, p. 1-15, Mar. 2006.
- _____. Viability extension and improvement of stored seeds. **South African Journal of Science**, Pretoria, v. 74, n. 10, p. 365, Oct. 1978.
- BERJAK, P.; SERSHEN, B. V.; PAMMENTER, N. W. Cathodic amelioration of the adverse effects of oxidative stress accompanying procedures necessary for cryopreservation of embryonic axes of recalcitrant-seeded species. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 21, n. 3, p. 187-203, Sept. 2011.
- BRAGHINI, M. T.; FAZUOLI, L. C. Armazenamento de sementes de café. **O Agrônomo**, Campinas, v. 59, n. 1, p. 44-45, 2007.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - Secretaria de Defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**, Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.
- CLEMENTE, A. C. **Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade de semente de café no armazenamento**. 2009. 49 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

CLEMENTE, A. C. S. et al. Preparo das sementes de café para a avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 38-44, jul. 2011.

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

DUSSERT, S. et al. Quantitative estimation of seed desiccation sensitivity using a quantal response model: application to nine species of the genus *Coffea* L. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 9, n. 2, p. 135-144, Feb. 1999.

_____. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 127, n. 2, p. 192-204, June 2006.

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

EL-ABASSY, R. M.; DONFACK, P.; MATERNY, A. Discrimination between Arabica and Robusta green coffee using visible micro Raman spectroscopy and chemometric analysis. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 3, p. 1443-1448, June 2011.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, E. H. An intermediate category of seed storage behavior? I. Coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 9, p. 1167-1174, Jan. 1990.

_____. An intermediate category of seed storage behavior? II. Effects of provenance, immaturity, and imbibition on desiccation-tolerance in coffee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 238, p. 653-657. May 1991.

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

FERREIRA, E. A. **Avaliação do potencial antioxidante e hipotrigliceridêmico de análogos sintéticos da acetofenona**. 2005. 84 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. 2nd ed. Oxford: University Press, 1989. 936 p.

HANAOKA, K. Antioxidant effects of reduced water produced by electrolysis of sodium chloride solutions. **Journal of Applied Electrochemistry**, Springer, v. 31, n. 12, p. 1307–1313, Dec. 2001.

HANAOKA, K. et al. The mechanism of enhanced antioxidant effects against superoxide anion radicals of reduced water produced by electrolysis. **Biophysical Chemistry**, Amsterdam, v. 107, n.1, p. 71–82, Jan. 2004.

_____. Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of ‘active hydrogen’. **Journal of Health Science**, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 456–465, June 2004.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 3, n. 3, p. 141-153, Sept. 1993.

HIRAOKA, A. et al. Studies on the properties and real existence of aqueous solution systems that are assumed to have antioxidant activities by the action of ‘active hydrogen’. **Journal of Health Science**, Tokyo, v. 50, n. 5, p. 456–465, 2004.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. Optimum air-dry seed storage environments for arabica coffee. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 20, n. 3, p. 547-560, 1992

_____. Interspecific variation in seed storage behaviour within two genera – *Coffea* and *Citrus*. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, n. 1, p. 165-181, 1995.

KIKUTI, A. L. P. et al. Aplicação de antioxidantes em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica* L.) visando a preservação da qualidade. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 4, p. 663-672, 2002.

KING, M. W.; ROBERTS, E. H. The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches. **International Board for Plant Genetic Resources**. Rome, 1979. 96p.

KRANNER, I.; BIRTIC, S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. **Integrative and Comparative Biology**, McLean, v. 45, n. 5, p. 734-740, Nov. 2005.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 659 p.

_____. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999, cap. 3, p. 1-24.

MCDONALD, M. B. Orthodox seeds deterioration and its repair. In: BENECH-ARNOLD, R. L.; SANCHEZ, R. A. (Eds.). **Handbook of Seed Physiology: Application to Agriculture**. New York: The Haworth Press, 2004, p. 125-165.

_____. Seed deterioration: Physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 27, n. 1, p. 177-237, Dec. 1999.

MIRANDA, J. M. et al. Estudos de alguns fatores que influenciam a duração da viabilidade de sementes de café. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 15, n. 2, p. 215-220, 1993.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant in Science**, Cambridge, v. 7, n. 9, p. 405-410, Sept. 2002.

MOLNAR, K. MECH. Subbiological aspects of ageing and the concept of biological cathode protection. **Mechanisms of Ageing and Development**, Athens, v. 1, n. 5, p. 319-326, Mar. 1973.

PAMMENTER N. W.; ADAMSON J. H.; BERJAK P. Viability of stored seed: extension by cathodic protection. **Science**, Washington, v. 186, n. 4169, p. 1123-1124, Dec. 1974.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: SIMPÓSIO SOBRE FATORES QUE AFETAM A PRODUTIVIDADE DO CAFEEIRO, 1986, Poços de Caldas. **Anais...** Piracicaba: POTAFÓS, 1986. p.13-85.

ROACH, T. et al. An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 133, n. 2, p. 131-139, Jun. 2008.

ROBERTS, E. H.; KING, M. W.; ELLIS, R. H. Recalcitrant seeds: their recognition and storage. In: Holden, J.H.W.; Williams, J.T. (Eds.). **Crop genetic resources: conservation and evaluation**. London: George Allen & Unwin, 1984, p. 38-52.

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

_____. Formação de mudas de *Coffea arabica* L., cv Rubi, utilizando sementes e frutos em diferentes estádios de desenvolvimento. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 2, p. 349-356, Mar./Apr. 2007.

_____. The effect of storage conditions on coffee seed and seedling quality. **Seed Science and Technology**, Londrina, v. 39, n. 1, p.151-164, Apr. 2011.

SANTOS, F. C. et al. Endo- β -mannanase and β -tubulin gene expression during the final phases of coffee seed maturation. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 14, n. 4, p.11719-11728, Oct. 2015.

_____. Gene expression of antioxidant enzymes and coffee seed quality during pre- and post-physiological maturity. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, n. 4, p. 10983-10993, Dec. 2014a.

_____. Desiccation sensitivity from different coffee seed phenological stages. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 36, n. 1, p. 25-31, 2014b.

SHIRAHATA, S. Medical treatment and water, Oxygen-radical scavenging activity and inhibition of growth of cancer cells by electrolyzed-reduced water (in Japanese). In: **Science and Application Technology of Functional Water** (in Japanese), Water Science Association (Water Science Kenkyukai), Osaka, 1999a, p. 137–138.

SHIRAHATA, S. et al. Electrolyzed-reduced water scavenges active oxygen species and protects DNA from oxidative damage. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Martinsried, v. 234, n. 1, p. 269–274, May 1997.

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

VILLIERS, T. A. Ageing and longevity of seeds under field conditions. In: Heydecker, W. (Ed.). **Seed Ecology**. London: Butterworth, 1973, p. 265-288.

VEIGA, A. D. et al. Armazenabilidade de sementes de cafeeiro colhidas em diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 83-91, abr. 2007.

VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: KIGEL, J.; GALILI, G. (Eds.). **Seed development and germination**. New York: Basel-Hang Yong, 1995, p. 237-271.

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

WALTERS, C et al. Heat-soluble proteins extracted from wheat embryos have tightly bound sugars and unusual hydration properties. **Seed Science Research**, Wageningen, v. 7, n. 2, p. 125-134, Jun. 1997.

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

WOLKERS, W.F. Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. **Biochim Biophys Acta**, New Brunswick, v. 12, n. 1544, p. 196-206, Jan. 2001.

ANEXO

- Tabela 1A** – Resumo da Análise de Variância dos resultados de plântulas normais (PN%), aos 30 dias (germinação) e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC%), aos 45 dias de diferentes lotes de sementes de café, após imersão em água catódica e em água destilada.....49
- Tabela 2A** – Resumo da análise de variância para porcentagem de embriões viáveis (EV%), protrusão radicular (PR%), germinação (G%), plântulas normais fortes (PNF%) e folhas cotiledonares expandidas (FCE%) de sementes de café submetidas à embebição em água catódica e em água destilada por diferentes períodos de tempos, na presença ou ausência de luz.....50

Tabela 1A – Resumo da Análise de Variância dos resultados de plântulas normais (PN%), aos 30 dias (germinação) e de plântulas com folhas cotiledonares expandidas (FC%), aos 45 dias de diferentes lotes de sementes de café, após imersão em água catódica e em água destilada.

FV	GL	QM	
		PN	FC
TRATAMENTO	19	5580,21*	5640,02*
CATÓDICA	1	705,60*	644,00*
TRT*CAT	19	588,08*	555,54*
Erro	120	65,31	64,23
CV		12,07	12,12

*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste *Scott-Knott* ($p < 0,05$).

Tabela 2A – Resumo da análise de variância para porcentagem de embriões viáveis (EV%), protrusão radicular (PR%), germinação (G%), plântulas normais (PN%), plântulas normais fortes (PNF%) e folhas cotiledonares expandidas (FCE%) de sementes de café submetidas à embebição em água catódica e em água destilada por diferentes períodos de tempos, na presença ou ausência de luz.

FV	GL	QM				
		EV	PR	G	PNF	FC
TEMPO	7	456,13*	2,81*	3,97*	0,63*	3,84*
LUZ	1	344,53	3,48*	1,17*	0,02	1,39*
CATÓDICA	1	38,28	2,00*	0,12	0,04	0,97*
TEM*CAT	7	252,56*	1,63*	3,55*	0,79*	1,90*
TEM*LUZ	7	401,67*	0,67*	3,15*	0,51*	2,92*
LUZ*CAT	1	1313,28*	0,16	5,81*	2,42*	6,85*
TE*LU*CA	7	548,99*	1,06*	3,53*	0,98*	3,92*
Erro	96	94,01	0,25	0,25	0,09	0,24
CV		15,08	11,33	22,53	33,59	25,65

*Significativo a 5% de probabilidade, pelo teste *Scott-Knott* ($p < 0,05$).