



**MELINE DE OLIVEIRA SANTOS**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO  
DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS DE  
CAFEIROS CULTIVADOS EM UM  
GRADIENTE DE ALTITUDE NA SERRA DA  
MANTIQUEIRA**

**LAVRAS – MG**

**2013**

**MELINE DE OLIVEIRA SANTOS**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS  
DE CAFEIROS CULTIVADOS EM UM GRADIENTE DE ALTITUDE  
NA SERRA DA MANTIQUEIRA**

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 Doutor.

Orientador

Dr. José Donizeti Alves

**LAVRAS – MG**

**2012**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Santos, Meline de Oliveira.

Aspectos fisiológicos do desenvolvimento de frutos de cafeeiros  
cultivados em um gradiente de altitude na Serra da Mantiqueira /  
Meline de Oliveira Santos. – Lavras : UFLA, 2013.

77 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2012.

Orientador: José Donizeti Alves.

Bibliografia.

1. *Coffea arabica*. 2. Maturação. 3. Invertases. 4. Sistema  
antioxidante. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 583.52043

**MELINE DE OLIVEIRA SANTOS**

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO DE FRUTOS  
DE CAFEIROS CULTIVADOS EM UM GRADIENTE DE ALTITUDE  
NA SERRA DA MANTIQUEIRA**

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 Doutor.

APROVADA em 31 de julho de 2012.

Dr. Sidnei Deuner

EMBRAPA

Dr. Marcelo Murad Magalhães

EMBRAPA

Dr. João Paulo Rodrigues Alves Delfino Barbosa

UFLA

PhD. Antonio Chalfun Junior

UFLA

Dr. José Donizeti Alves  
Orientador

**LAVRAS – MG**

**2012**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas bênçãos maravilhosas em minha vida.

A minha família, por tudo que eu sou e por ser meu porto seguro.

À Universidade Federal de Lavras, pela oportunidade da realização da pós-graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos.

À APROCAM e a todos os produtores de Carmo de Minas, por terem cedido suas fazendas para que esse trabalho pudesse ser realizado, sempre oferecendo todo o apoio necessário. Muito obrigada pela hospitalidade e simpatia.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Donizeti Alves, por todo incentivo, orientação e apoio em todos esses anos de convívio profissional.

Aos professores do setor de Fisiologia Vegetal, pelos ensinamentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e contribuição.

Aos funcionários, Evaristo, Tanhan, Lena, Joel, Odorêncio, Barrinha e Manu, pela simpatia, amizade e ajuda sempre prestada.

Aos amigos do Laboratório, Kamila, Helbert, Cinthia, Isabel, Dayane, Lissa, Lorena, Sandro, Gustavo, Lethícia, Ian e Jéssica, pela amizade, companheirismo e ajuda imprescindível na realização do meu trabalho.

Aos colegas do curso, pela agradável convivência.

Às minhas amigas do coração Nádia, Solange, Larissa e Thamiris, minha “família” aqui em Lavras, por todos os momentos que passamos juntas, pela ajuda, incentivo, companheirismo e amizade. Meninas vocês estarão para sempre em meu coração.

## RESUMO

Objetivou-se com este estudo caracterizar os aspectos fisiológicos do desenvolvimento de frutos de cafeeiros cultivados em três altitudes no município de Carmo de Minas, na região da Serra da Mantiqueira. Para isto, foram selecionadas três faixas de altitude (< de 1.000, 1.000 a 1.200, > de 1.200 m) e dois talhões com diferentes incidências de radiação: soalheira (com predominância de radiação no período da tarde) e contra face (com predominância de radiação pela manhã). As avaliações foram realizadas mensalmente, de janeiro a julho, no terço médio das plantas, de ramos voltados para os dois sentidos da rua, sendo um que recebe o sol da manhã e outro o da tarde. Após a colheita, os frutos foram separados, a partir de uma amostra de 100 frutos, nos estádios chumbinho, frutos em expansão, verde, verde cana, cereja, passa e seco, sendo avaliada a massa seca e o volume de cada estádio de desenvolvimento. Em frutos nos estádios em expansão, verde, verde cana e cereja foram realizadas as análises das invertases, SOD, APX, CAT e quantificação de ascorbato, peróxido de hidrogênio e peroxidação lipídica. Os resultados comprovam que o aumento da altitude prolonga e uniformiza a maturação, e que, de modo geral, nos talhões soalheira, o ciclo de maturação foi mais curto. Em relação à massa seca e volume, embora algumas diferenças tenham sido observadas entre as três altitudes, em junho e julho, não foram observadas diferenças nessas características entre os frutos cereja, mostrando que o tempo de duração do ciclo de maturação não interferiu no tamanho final dos frutos. A atividade da invertase neutra foi maior que a da invertase ácida, com pico de atividade em frutos cereja da menor altitude, nas coletas de abril, maio e junho, oriundos do talhão soalheira, no lado da tarde, os quais exibiram um ritmo mais rápido de crescimento. Frutos oriundos da maior altitude apresentaram, nas primeiras coletas, uma alta atividade da SOD compensada por uma maior atividade das enzimas APX e CAT, que resultou em baixos níveis de  $H_2O_2$  e MDA, retardando a passagem do estádio de fruto verde para verde cana, prolongando o período de maturação. Entretanto, o ciclo de maturação mais curto nas menores altitudes, possivelmente, foi resultado de uma soma de fatores que se iniciaram nas primeiras coletas, como uma maior atividade das invertases ácida e neutra, baixos níveis da CAT, APX e ascorbato, com consequente aumento nos níveis de  $H_2O_2$  e MDA.

Palavras-chave: *Coffea arabica*. Maturação. Invertases. Sistema antioxidante.

## ABSTRACT

The aim of this work was to characterize the physiological aspects of the development of coffee fruits cultivated at different altitudes in the municipality of Carmo de Minas, in the region of Serra da Mantiqueira, State of Minas Gerais, Brazil. Three different altitudes (< 1.000, 1.000 to 1.200 and > 1.200 m) and two plots with different solar radiation named “soalheira” (radiation predominance in the afternoon) and “contra face” (radiation predominance in the morning) were used. The evaluations were performed monthly, from January to July, in the medium third of the plant on branches facing both sides of the road, one receiving morning sunlight and the other, afternoon sunlight. After the harvest, from a sample of 100, the fruits were separated into seven groups according to their ripening state: in expansion, green, yellowish green, cherry, over-ripe and dried; and the dry mass and volume were analyzed in each state. In fruits characterized as in expansion, green, yellowish green and cherry, the activity of the invertases, superoxide dismutase (SOD), ascorbate peroxidase (APX) and catalase (CAT) were analyzed and the ascorbate, hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and lipid peroxidation were quantified. The results confirmed that higher altitudes contribute to a longer and more uniform ripening. In general, the “soalheira” plots demonstrated shorter ripening cycle. Considering dry mass and volume, though some differences were observed between the three altitudes analyzed in June and July, there were no differences in these characteristics between the cherry fruits, showing that the duration of the ripening cycle does not affect the final size of the fruits. The activity of neutral invertase was higher than the acid invertase, with activity peak of cherry fruits at a lower altitude, in the “soalheira” plot in the afternoon side, in the harvests of April, May and June. Fruits derived from the higher altitude presented, in the first harvestings, high SOD activity compensated by higher activity of the APX and CAT enzymes, which resulted in low levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and malondialdehyde (MDA), prolonging the ripening period. However, a shorter ripening cycle on the lower altitudes was possibly resulted from a combination of factors observed since the first harvest, such as high activity of neutral and acid invertases, lower levels of CAT, APX and ascorbate, consequently increasing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and MDA level.

Key-words: *Coffea arabica*. Ripening. Invertases. Antioxidant System.

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Massa seca de frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC), cereja (C), passa (P) e seco (S), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho. As barras representam o erro padrão da média (n=4). ..... 36
- Gráfico 2 Volume de frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC), cereja (C), passa (P) e seco (S), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho. As barras representam o erro padrão da média (n=4). ..... 38
- Gráfico 3 Atividade da invertase ácida (IAV) em frutos de cafeeiros cultivados, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho ..... 42
- Gráfico 4 Atividade da invertase neutra do citosol (INC) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho ..... 44

Gráfico 5	Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho.....	49
Gráfico 6	Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S), em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho.....	52
Gráfico 7	Atividade da catalase (CAT) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho .....	55
Gráfico 8	Conteúdo de ascorbato (AsA) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho .....	58

- Gráfico 9 Conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho..... 61
- Gráfico 10 Conteúdo malondialdeído (MDA) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho ..... 64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Porcentagem de frutos em cada estágio de desenvolvimento, provenientes de cafeeiros cultivados a uma altitude inferior a 1000 metros na região da Serra da Mantiqueira, colhidos em diferentes épocas .....	30
Tabela 2	Porcentagem de frutos em cada estágio de desenvolvimento, provenientes de cafeeiros cultivados a uma altitude entre 1000 e 1200 metros na região da Serra da Mantiqueira, colhidos em diferentes épocas .....	31
Tabela 3	Porcentagem de frutos em cada estágio de desenvolvimento, provenientes de cafeeiros cultivados a uma altitude superior a 1200 metros na região da Serra da Mantiqueira, colhidos em diferentes épocas .....	32

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	14
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
<b>3.1</b>	<b>Seleção dos ambientes a serem estudados</b> .....	22
<b>3.2</b>	<b>Avaliações fenológicas</b> .....	23
<b>3.3</b>	<b>Análises bioquímicas</b> .....	23
<b>3.3.1</b>	<b>Enzimas invertase neutra do citosol (INC) e invertase ácida do vacúolo (IAV)</b> .....	24
<b>3.3.2</b>	<b>Atividade de enzimas do metabolismo antioxidante</b> .....	24
<b>3.3.2.1</b>	<b>Dismutase do superóxido</b> .....	25
<b>3.3.2.2</b>	<b>Catalase</b> .....	25
<b>3.3.2.3</b>	<b>Peroxidase do ascorbato</b> .....	25
<b>3.3.3</b>	<b>Ascorbato</b> .....	26
<b>3.3.4</b>	<b>Peróxido de hidrogênio</b> .....	26
<b>3.3.5</b>	<b>Peroxidação lipídica</b> .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	69

## 1 INTRODUÇÃO

O café se destaca no cenário econômico como uma das mais importantes *commodities*, sendo o Brasil o maior produtor e exportador. Minas Gerais é o estado que apresenta a maior produção nacional e, mais precisamente no Sul de Minas Gerais, a região da Serra da Mantiqueira tem se destacado pela alta qualidade apresentada pelos seus cafês e pelo bom desempenho em concursos de qualidade. Entretanto, a grande variedade de condições edafoclimáticas, presente nessa região, reflete na qualidade da bebida, que se apresenta de maneira distinta.

A altitude é reconhecida como um dos fatores que mais influencia a qualidade, já que interfere no desenvolvimento dos frutos, uma vez que seu aumento prolonga o tempo de desenvolvimento e leva a uma maior uniformização da maturação. Um ciclo de maturação mais longo permite um maior tempo para completar o enchimento do grão e garante a completa manifestação de todos os passos bioquímicos requeridos para o desenvolvimento da qualidade de bebida, com aroma e sabor muito mais intensos. Esse efeito se deve ao fato de que a altitude tem influência direta na temperatura, radiação, no padrão de distribuição de chuvas e na pressão parcial dos gases, fatores que interferem na velocidade das reações enzimáticas, afetando processos como a respiração e fotossíntese.

A relação entre o desenvolvimento dos frutos e o metabolismo de açúcar tem atraído estudos em virtude da função que essas macromoléculas desempenham no crescimento vegetal e seus impactos na qualidade dos mesmos. A sacarose é um dos principais compostos responsáveis pela formação da cor, sabor e aroma, peculiares da bebida, durante o processo de torração do grão de café. Entretanto, ainda existe pouca informação científica disponível

sobre o papel de enzimas como as invertases no metabolismo de açúcares em frutos de café, principalmente sob influência da altitude.

A atividade das invertases é responsável pela mobilização de sacarose em órgãos drenos, fornecendo substratos para a respiração e síntese de composto para o crescimento celular, influenciando diretamente a relação sacarose/hexoses.

O processo de maturação de frutos é descrito como uma forma modificada de senescência, que se caracteriza por uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, um declínio da atividade antioxidante e consequente danos às membranas celulares, pelo aumento da peroxidação lipídica. Em decorrência de menores temperaturas e maior radiação, ambientes em altitudes mais elevadas podem ocasionar uma maior produção de espécies reativas de oxigênio, que podem ter um efeito deletério nas células, se não forem eficientemente removidas pelo sistema antioxidante.

Assim fatores que possam afetar a translocação de fotoassimilados para os frutos e a produção de espécies reativas de oxigênio, influenciam diretamente o seu desenvolvimento, prolongando ou encurtando o tempo de amadurecimento. Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar os aspectos fisiológicos do desenvolvimento de frutos de cafeeiros cultivados em três altitudes no município de Carmo de Minas, na região da Serra da Mantiqueira, por meio da análise do padrão de crescimento, da atividade das invertases e do comportamento do sistema antioxidante.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

O cafeeiro é uma espécie originária do continente africano, pertencente ao gênero *Coffea* L. da família Rubiaceae, o qual apresenta cerca de 100 espécies identificadas, das quais *C. arabica* e *C. canefora* são as espécies de maior valor econômico. Depois do petróleo, o café é a *commoditie* mais comercializada no mundo, com vendas globais estimadas em 90 bilhões de dólares. O Brasil domina o mercado internacional de café, com produção anual na ordem de 50,45 milhões de sacas, das quais 38,1 milhões são de cafeeiro arábica e 12,3 milhões de robusta. A área cultivada com café no Brasil é de 2,35 milhões de hectares, dos quais 2,07 milhões estão em produção e 275 mil hectares em formação. Nesse contexto Minas Gerais se destaca com 52,8% da produção nacional, sendo a região Sul de Minas a maior produtora de café do estado e do Brasil com uma produção de 26,63 milhões de sacas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB 2012). Entretanto, o Sul de Minas é marcado 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). Dentro dessa região, destaca-se a microrregião da Serra da Mantiqueira, pela elevada qualidade sensorial dos cafés produzidos, os quais vêm obtendo crescente reconhecimento pelo mercado internacional, sendo classificados entre os melhores cafés do mundo (TAVEIRA et al., 2011).

Tanto no mercado nacional quanto no internacional, observa-se uma crescente demanda por cafés especiais, onde os consumidores têm buscado cafés com sabores e aromas excepcionais e características balanceadas de doçura, acidez e corpo. Além de tais características, há um grande interesse por produtos que agreguem informações sobre o ambiente de produção e localização geográfica (RODRIGUES et al., 2009). A qualidade do café é determinada

principalmente pelo sabor e aroma formados durante a torração, que são originados a partir de precursores presentes no grão cru, os quais dependem de fatores genéticos, ambientais, fenológicos e tecnológicos (ALPIZAR; BERTRAND, 2004; FARAH et al., 2006; PEREIRA, 1997; VILELA; PEREIRA, 1998).

A relação entre o desenvolvimento dos frutos e o metabolismo de carboidratos tem atraído muitos estudos em consequência da função que os açúcares desempenham no crescimento vegetal e seus impactos na qualidade dos frutos (FILS-LYCAON et al., 2011; GEROMEL et al., 2006, 2008; LAVIOLA et al., 2007; NONIS et al., 2007). Em *C. arabica*, a sacarose é um dos principais compostos presentes no grão variando entre 5 e 9,5% da matéria seca e, embora seja degradada durante a torra, a sacarose ainda pode ser encontrada em concentrações de 0,4 a 2,8% nos grãos depois desse processo, o que contribui para a doçura da bebida. Outro fator de importância é que sua degradação fornece açúcares redutores, os quais estão envolvidos nas reações de Maillard e/ou caramelização que ocorrem durante o processo de torração, sendo responsáveis pela formação da cor, sabor e aroma peculiares da bebida. O alto conteúdo de sacarose em grãos arábica pode explicar parcialmente a melhor qualidade, a qual depende de vários outros fatores ambientais (CHAGAS; CARVALHO; COSTA, 1996; FARAH et al., 2006; GUYOT et al., 1996; KY et al., 2001).

Nas folhas ocorre a síntese de carboidratos, os quais são translocados para os tecidos drenos na forma de sacarose para suprir o metabolismo e desenvolvimento vegetal, e/ou para o acúmulo na forma de sacarose ou amido. As enzimas invertases e a sacarose sintase (Susy) catalisam a hidrólise da sacarose em hexoses, disponibilizando carbono e energia para a manutenção da respiração e para a síntese de inúmeros compostos orgânicos, vitais para todas as fases do ciclo de vida vegetal (KOCH, 2004; TROUVERIE et al., 2004).

As invertases desempenham um importante papel no particionamento da sacarose e no transporte a longa distância, uma vez que criam um gradiente de concentração entre os sítios de carregamento e descarregamento do floema, regulando a partição dos fotossintetizados entre armazenamento e crescimento, pelo controle da força relativa do dreno (KOCH, 2004; ROITSCH; GONZÁLEZ, 2004). As diferentes isoformas de invertases podem ser classificadas de acordo com a sua localização subcelular, pH ótimo de atividade e seus respectivos pontos isoelétricos. Invertases ácidas, localizadas no interior do vacúolo e da parede celular, estão associadas com o transporte de açúcares para a zona de crescimento ativo em de diversos órgãos drenos. Já as invertases neutras ou alcalinas ocorrem no citosol de células vegetais, sendo consideradas enzimas de manutenção, por estarem envolvidas na mobilização da sacarose, mantendo a concentração de hexoses no citosol para atender à demanda metabólica da célula (ALBERTSON; PETERS; GROF, 2001; STURM, 1999; WESCHKE et al., 2003; YAO et al., 2009). Ainda existe pouca informação sobre sua função no metabolismo e no desenvolvimento vegetal, entretanto, nos últimos anos, novos estudos têm revelado que as invertases neutro-alcalinas apresentam outras localizações celulares que não apenas citosólica, o que pode levar à descoberta de novas funções dessas enzimas (NONIS et al., 2007; RUAN et al., 2010; VARGAS; SALERNO, 2010; XIANG et al., 2011; YAO et al., 2009).

Pela falta de informação detalhada sobre a sua função, tem sido sugerido que a localização citoplasmática de invertase neutra pode estar relacionada não apenas em fornecer substratos metabólicos para processos celulares, mas também na geração de sinais de açúcares por si só, ou conjuntamente aos hormônios (LEON; SHEEN, 2003), e também pelo fato de que a glicose produzida no citoplasma pode ser facilmente detectada por hexoquinases (MOORE et al., 2003; WINTER; HUBER, 2000). Estudos sobre a importância

do metabolismo da sacarose no desenvolvimento da planta, por meio da geração de sinais de açúcar, centravam-se principalmente na ação das enzimas invertases ácidas e sintase da sacarose (KOCH, 2004; STURM; TANG, 1999). Nos últimos anos, as invertases neutro-alcálicas citosólicas vêm emergindo como importantes reguladores de crescimento e desenvolvimento nas plantas, por também estarem envolvidas em processos de sinalização, especialmente sob condições de estresse (XIANG et al., 2011).

As fases vegetativas e reprodutivas passam por estádios de desenvolvimento que determinam fases fenológicas importantes, que resultam na uniformidade da floração e consequente qualidade do café (PEZZOPANE et al., 2003). O ciclo fenológico para cafeeiros da espécie *C. arabica* pode ser dividido, conforme Camargo e Camargo (2001), nas seguintes fases: crescimento vegetativo e formação das gemas florais; indução e maturação das gemas florais; florada; granação dos frutos; maturação dos frutos; repouso e senescência dos ramos terciários e quaternários.

De maneira geral, nas regiões cafeeiras do Brasil como as do Sul de Minas Gerais, ocorre um crescimento vegetativo rápido na estação quente e chuvosa (setembro a março) e outro de baixa atividade na estação seca e fria (março a setembro) (ALVES; LIVRAMENTO, 2003; AMARAL, 1991; NACIF, 1997). Já a fase reprodutiva se caracteriza por apresentar várias floradas, sendo uma principal seguida de outras, cujo número varia de um ano para outro, de acordo com as diferenças climáticas, genéticas e de manejo. Esta anomalia fisiológica acontece, porque os botões experimentam antese em períodos diferentes, ocorrendo floradas sucessivas, já que a iniciação dos primórdios florais se dá por períodos mais ou menos extensos. Floradas sucessivas resultam em várias colheitas, o que num sistema de cultura extensiva representa uma séria desvantagem, pois esse comportamento do cafeeiro provoca a desuniformidade

da maturação (ALVES, 2008) que, por sua vez, terá grande influência na qualidade final do produto (RENA; MAESTRI, 1986).

Após a fecundação, inicia-se a formação dos frutos, fase denominada “chumbinho”, quando esses não apresentam um crescimento visível. Posteriormente, os frutos se expandem rapidamente, atingindo seu crescimento máximo, ocorre a formação do endosperma, que segue a fase de grão verde, com a granação dos frutos. A partir da fase “verde cana”, que caracteriza o início da maturação, os frutos começam a mudar de cor (verde para amarelo), evoluindo até o estágio “cereja”, onde é possível diferenciar a cultivar de fruto amarelo ou vermelho. A seguir, os frutos começam a secar até atingir o estágio “seco” (PEZZOPANE et al., 2003). Entretanto, pouco se sabe sobre a influência da fenologia da planta durante o crescimento do fruto na qualidade da bebida e sua relação com componentes químicos, com isso fatores que influenciam o tempo de maturação podem ter efeito na qualidade final do produto (FAGAN et al., 2011). Desta forma, o conhecimento de técnicas viáveis para a uniformização da floração ou da maturação dos frutos é de fundamental importância para a organização, redução dos custos da colheita e para a obtenção de um produto de melhor qualidade e maior valor agregado.

Em regiões montanhosas, como no sul de Minas Gerais, é comum observar, em uma mesma lavoura, variações no crescimento e desenvolvimento dos componentes vegetativo e reprodutivo das plantas, dentro e entre talhões (ALVES, 2008), o que leva a índices de produção e qualidade distintos desses cafés. A altitude constitui um dos fatores mais importantes para a diferenciação de regiões cafeeiras (AVELINO et al., 2005; DECAZY et al., 2003; GUYOT et al., 1996; JOËT et al., 2010; LAVIOLA et al., 2007), pois exerce influência direta sobre a temperatura, a radiação, o regime de distribuição de chuvas, a pressão parcial dos gases, a velocidade dos ventos, e essas mudanças podem

ocorrer em uma curta distância dentro do gradiente altitudinal (KOFIDIS; BOSABALIDIS; MOUSTAKAS, 2007; ÖNCEL et al., 2004; ZHU et al., 2010).

Nas regiões mais altas há maior índice de precipitação pluviométrica e a cada 100 metros de aumento da altitude, a temperatura diminui cerca de 1°C, o que é favorável para a obtenção de uma maturação mais uniforme (VAAST et al., 2006). Em resultados de análises sensoriais de cafés cultivados em diferentes altitudes na região de Patrocínio, no estado de Minas Gerais, foi evidenciado que a altitude exerce grande influência sobre a qualidade da bebida do café, que se manifesta com o aumento da acidez (ORGANIZACION INTERNACIONAL DEL CAFÉ - OIC, 1991). Por outro lado, nas regiões de clima mais quente e/ou úmido, no período da colheita, o ciclo de maturação é mais curto, os frutos passam rapidamente do estágio cereja para passa e há grande risco da fermentação inicial dos frutos (acética e láctica) evoluir rapidamente para as fases seguintes (propiónica e butirica), que são extremamente prejudiciais à qualidade do café (CORTEZ, 1993).

Laviola et al. (2007) concluíram que o ciclo de maturação dos frutos do cafeeiro ocorre em um período mais longo em altitudes maiores, possivelmente em razão da ocorrência de temperaturas máximas mais baixas, o que ocasiona uma menor velocidade das reações enzimáticas e, conseqüentemente, menores taxas fotossintéticas, menor respiração, menor taxa de transporte de fotoassimilados e diminuição da velocidade de acúmulo de massa seca.

Em maiores altitudes, as menores temperaturas e a alta radiação podem causar danos à proteína D1 do PSII e inativar a enzima catalase, interferindo na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (ÖNCEL et al., 2004; REN et al., 1999). EROs, tais como o radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $OH^-$ ) são inevitavelmente gerados nas células das plantas, incluindo frutos em amadurecimento, como uma consequência do metabolismo normal, no transporte de elétrons no cloroplasto, mitocôndria e

membrana plasmática, ou como subproduto de várias rotas metabólicas localizadas em diferentes compartimentos celulares (MONDAL et al., 2009; SHARMA et al., 2012). O sistema antioxidante de defesa, incluindo enzimas como a dismutase do superóxido (SOD), peroxidases do ascorbato (APX), catalase (CAT), redutase do deidroascorbato (DHAR), redutase da glutatona (GR) e redutase do monodeidroascorbato (MDHAR) e compostos como ácido ascórbico e glutatona, ajudam na remoção de EROs (MITTLER et al., 2004).

Apesar da presença de um eficiente sistema antioxidante, danos oxidativos ainda ocorrem nas células vegetais, quer devido à produção descontrolada ou pela remoção ineficiente das EROs, podendo causar danos em moléculas como lipídeos, proteínas e DNA (SHARMA et al., 2012). Por causa de uma maior produção de EROS em decorrência das menores temperaturas e maior radiação, plantas alpinas geralmente apresentam um mecanismo de proteção contra danos oxidativos muito mais eficientes quando comparados a plantas que crescem em menores altitudes, o que garante uma alta eficiência fotossintética nesse ambiente (ÖNCEL et al., 2004).

Algumas EROs, como o radical superóxido e o peróxido de hidrogênio, apesar de serem potencialmente tóxicos, em baixas concentrações, desempenham funções importantes como mensageiros secundários na percepção de estresse, reconhecimento de patógenos, morte celular programada e desenvolvimento vegetal (MITTLER et al., 2004; SHARMA et al., 2012). A senescência dos tecidos vegetais verdes é geralmente acompanhada por um aumento no conteúdo de malondialdeído, um dos produtos finais da peroxidação de ácidos graxos insaturados em fosfolipídeos, responsável por danos na membrana celular (SHARMA et al., 2012; YE et al., 2000), maior produção de EROs (RIO et al., 1998) e perda gradual da capacidade de remoção pelas enzimas para neutralizar os radicais livres (KANAZAWA et al., 2000; PASTORI; RIO et al., 1997). Uma vez que todo o processo de maturação do

fruto é considerado como uma senescência funcionalmente modificada, o mecanismo de deterioração da membrana durante o amadurecimento pode também ser semelhante ao caracterizado em sistemas senescentes, envolvendo acúmulo de EROs (MONDAL et al., 2004, 2009). Assim, o ciclo de maturação mais curto em regiões mais quentes ou com menor altitude pode estar relacionado com uma maior produção de EROs ou um sistema de remoção menos eficiente nesses ambientes.

Embora a altitude seja empiricamente conhecida por ter um efeito benéfico na qualidade da bebida (AVELINO et al., 2005; DECAZY et al., 2003; GUYOT et al., 1996; JOËT et al., 2010; LAVIOLA et al., 2007), poucos trabalhos científicos têm documentado atualmente seus efeitos, principalmente no que se diz respeito aos aspectos fisiológicos do desenvolvimento dos frutos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Seleção dos ambientes a serem estudados

O estudo foi realizado no município de Carmo de Minas, localizado na Serra da Mantiqueira. Foram selecionadas talhões de *Coffea arabica* L. em três faixas de altitude (inferior a 1.000m, entre 1.000 e 1.200m, superior a 1.200m) e dois talhões por altitude. Os talhões selecionados apresentam características distintas quanto à incidência de radiação, em que soalheira (S) recebe predominantemente a radiação do período da tarde (N, NO) e, contra face (CF) recebe maior radiação no período da manhã (SE, S).

Na faixa de altitude inferior (< 1000m), o talhão contra face estava localizado a uma altitude de 965m, com cafeeiros da cultivar Bourbon amarelo com 7 anos de idade, enquanto que, no talhão soalheira, localizado a 995m, encontrou-se cafeeiros da cultivar Mundo Novo, com 32 anos de idade.

Na faixa intermediária de altitude (1000 a 1200m), no talhão contra face, situado a 1145m de altitude, foram analisados cafeeiros da cultivar Catuai vermelho com 14 anos de idade. Já no talhão soalheira, que se encontrava a 1195m de altitude, encontrou-se cafeeiros da cultivar Bourbon amarelo com 60 anos de idade.

Na maior faixa de altitude (>1200m), o talhão contra face se encontrava a 1310m de altitude, enquanto que o talhão soalheira se encontrava a 1430m. Em ambos os talhões foram analisados cafeeiros da cultivar Bourbon amarelo com seis anos de idade.

### **3.2 Avaliações fenológicas**

As avaliações fenológicas foram realizadas mensalmente nos meses de janeiro a julho de 2011, em quatro repetições de uma planta cada, no terço médio das plantas, nos dois sentidos da rua, sendo um lado o que recebe o sol da manhã e outro que recebe o da tarde. Após a colheita de uma amostra de 100 frutos de cada repetição, os frutos foram separados, nos estádios fruto em expansão, verde, verde cana, cereja, passa e seco, e os resultados expressos em porcentagem. Foram avaliadas, adicionalmente, características como a massa seca, pela secagem em estufa de ventilação forçada a 60° C até peso constante e, volume, pelo deslocamento de uma coluna de água em uma proveta. Os resultados finais foram obtidos pela relação entre cada fase de maturação e o número de frutos que se encontravam em cada fase. As avaliações foram feitas utilizando a escala fenológica proposta por Pezzopane et al. (2003).

### **3.3 Análises bioquímicas**

As avaliações bioquímicas foram realizadas em frutos colhidos mensalmente entre os meses de janeiro e julho, nos terços médios das plantas voltados para os dois lados da rua, nos estádios fruto em expansão, verde, verde-cana e cereja. Em seguida a coleta, os frutos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80° C. Para as análises dos dados foi utilizada a média das três repetições biológicas com três replicatas de laboratório cada.

### **3.3.1 Enzimas invertase neutra do citosol (INC) e invertase ácida do vacúolo (IAV)**

A extração e a incubação das invertases solúveis, invertase neutra do citosol (INC) e invertase ácida do vacúolo (IAV), foram realizadas conforme descrito por Zeng et al. (1999). A extração foi realizada por meio da homogeneização de 0,2 g de matéria fresca de frutos em 2 mL do tampão de extração contendo HEPES 200 mM, pH 7,5, 1 mM de PMSF, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de DTT e 50 mM de ácido ascórbico, seguida pela centrifugação a 18.000 g, por 20 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi coletado e uma alíquota de 0,5 mL foi acrescida ao meio de reação contendo tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5 para a INC e em tampão citrato de sódio 200 mM, pH 4,5 para a IAV, 5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 200 mM de sacarose. A incubação foi realizada em banho-maria, a 30°C, por 1h. Os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método do DNS (MILLER, 1959).

### **3.3.2 Atividade de enzimas do metabolismo antioxidante**

Para a extração das enzimas antioxidantes, 200 mg de tecido dos frutos foram macerados em N<sub>2</sub> líquido e homogeneizados em 1,5 mL do tampão de extração contendo: 1,47 mL de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), 15  $\mu$ L de EDTA 0,1 M (pH 7,0), 6  $\mu$ L de DTT 0,5 M, 12  $\mu$ L de PMSF 0,1 M, ácido ascórbico 0,001 M e 22 mg de PVPP. Os homogeneizados foram centrifugados a 12.000 g, por 30 minutos, a 4°C, coletando-se os sobrenadantes para as análises enzimáticas da dismutase do superóxido (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) (BIEMELT; KEETMAN; ALBRECHT, 1998).

### **3.3.2.1 Dismutase do superóxido**

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a fotorredução do azul de nitrotetrazólio (NBT), proposta por Giannopolitis e Ries (1977). Foram adicionados 10  $\mu$ L do extrato enzimático a 190  $\mu$ L do meio de incubação composto por: tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, EDTA 0,1  $\mu$ M, NBT 75  $\mu$ M e riboflavina 2  $\mu$ M. As placas, contendo o meio de incubação mais amostra e o controle (mesmo meio de incubação sem a amostra), foram iluminados com lâmpada fluorescente de 20 W por 7 minutos e as leituras realizadas a 560 nm. Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a fotorredução do NBT nas condições do ensaio.

### **3.3.2.2 Catalase**

Para a avaliação da atividade da catalase (CAT), uma alíquota de 10  $\mu$ L do extrato enzimático foi adicionada a 190  $\mu$ L do meio de incubação, contendo tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0) e peróxido de hidrogênio 12,5 mM. A atividade foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 240 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, monitorado pelo consumo de peróxido de hidrogênio (HAVIR; MCHALE, 1987).

### **3.3.2.3 Peroxidase do ascorbato**

A atividade da peroxidase do ascorbato (APX) foi determinada pelo acompanhamento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a cada 15 segundos, por 3 minutos, segundo (NAKANO; ASADA, 1981). Uma alíquota de 10  $\mu$ L do extrato enzimático foi adicionada a 190  $\mu$ L de tampão de

incubação composto por tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio 0,1 mM.

### **3.3.3 Ascorbato**

O conteúdo de ascorbato (Asc) foi determinado conforme descrito por Arakawa et al. (1981). Duzentos miligramas de tecido de frutos foram macerados em TCA 5% (m/v) e o homogeneizado centrifugado a 10.000 x g, por 15 minutos, a 4°C. Dez microlitros do sobrenadante foram adicionados ao meio de reação composto por TCA 5% (m/v), etanol 99,8% (v/v), ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 0,4% em etanol (v/v), bathophenantrolina 0,5% em etanol (p/v) e FeCl<sub>3</sub> 0,03% em etanol (m/v), homogeneizando-se a mistura vigorosamente e incubando-a, a 30°C, por 90 minutos. As leituras foram realizadas a 534 nm.

### **3.3.4 Peróxido de hidrogênio**

Duzentos miligramas de tecido dos frutos foram macerados em nitrogênio líquido, homogeneizados em 1,5 mL de TCA (0,1%) e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos, a 4°C. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi determinado medindo-se a absorvância a 390 nm de um meio de reação, contendo 250 µL do extrato, 500 µL tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0 e 1000 µL de iodeto de potássio 1M (VELIKOVA; YORDANOV; EDREVA, 2000).

### **3.3.5 Peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi determinada por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, conforme descrito por Buege e Aust (1978). Duzentos miligramas de tecido dos frutos foram macerados em N<sub>2</sub>

líquido, acrescido de 20% de PVPP (m/v) e homogeneizados em ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 10.000 g, por 10 minutos. Aliquotas de 250  $\mu$ L do sobrenadante foram adicionadas a 1mL do meio de reação (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 baixa massa 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:  $\xi$  (coeficiente de extinção =  $1,56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}$ ); b (comprimento ótico = 1). A peroxidação foi expressa em nmol de MDA  $\text{g}^{-1}$  de matéria fresca.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas coletas de janeiro e fevereiro não foram observadas diferenças entre os tratamentos na porcentagem de frutos que se encontravam nos estádios em expansão e verde (Tabelas 1, 2 e 3). Em abril, cerca de 43% dos frutos colhidos já se encontravam no estádio cereja, na menor altitude, no talhão soalheira, no lado ensolarado pela tarde (Tabela 1). Na altitude intermediária, apenas 9% dos frutos se encontravam no estádio cereja, exceto no talhão contra face, no lado ensolarado pela manhã em que os frutos ainda se encontravam nos estádios verde e verde cana (Tabela 2). Na maior altitude, cerca de 6% dos frutos eram cereja, no talhão soalheira, enquanto que, no talhão contra face, os frutos se encontravam em expansão e verdes (Tabela 3). Na coleta do mês de maio, enquanto na menor altitude os frutos se encontravam nos estádios verde cana e cereja, na maior altitude e na intermediária ainda era possível encontrar frutos verdes, além de verde cana e cereja (Tabelas 1,2 e 3).

Na coleta de junho, foram encontrados, na menor altitude, frutos nos estádios cereja, passa e, os frutos secos apenas foram encontrados no lado da manhã do talhão contra face e no lado da tarde do talhão soalheira (Tabela 1). Já na altitude intermediária, no talhão contra face, foram encontrados frutos nos estádios verde cana, cereja e passa, enquanto que no talhão soalheira os frutos estavam em estádio mais avançado de maturação, apresentando-se nos estádios cereja, passa e seco (Tabela 2). Na maior altitude foram encontrados apenas frutos nos estádios verde cana e cereja, na coleta de junho (Tabela 3). No mês de julho, na menor altitude, o talhão contra face apresentou porcentagens iguais de frutos nos estádios cereja, passa e seco, enquanto que, no talhão soalheira, no lado da manhã, cerca de 63% dos frutos ainda estavam no estádio cereja e, no lado da tarde, esse valor estava por volta de 29% (Tabela 1). Na altitude intermediária, no talhão contra face, os frutos se encontravam nos estádios cereja

e passa, com cerca de 89% dos frutos cereja, enquanto que no talhão soalheira já era possível encontrar frutos secos (Tabela 2). Na maior altitude, 100% dos frutos eram cereja no talhão contra face e soalheira manhã. Frutos passas foram encontrados apenas no talhão soalheira, no lado da tarde (Tabela 3).

Tabela 1 Porcentagem de frutos em cada estágio de desenvolvimento, provenientes de cafeeiros cultivados a uma altitude inferior a 1000 metros na região da Serra da Mantiqueira, colhidos em diferentes épocas

	<b>Contra face</b>											
	<b>Janeiro</b>		<b>Fevereiro</b>		<b>Abril</b>		<b>Maió</b>		<b>Junho</b>		<b>Julho</b>	
	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>
	%											
<b>Em expansão</b>	24	15	19	14								
<b>Verde</b>	76	85	81	86	83	93						
<b>Verde cana</b>					17	6	48	44				
<b>Cereja</b>						1	52	56	23	83	32	28
<b>Passa</b>									47	17	34	32
<b>Seco</b>									30		34	40
	<b>Soalheira</b>											
	<b>Janeiro</b>		<b>Fevereiro</b>		<b>Abril</b>		<b>Maió</b>		<b>Junho</b>		<b>Julho</b>	
	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>
	%											
<b>Em expansão</b>	17	19	14	14								
<b>Verde</b>	83	81	86	86	46	23						
<b>Verde cana</b>					38	34	69	61				
<b>Cereja</b>					16	43	31	39	78	41	63	29
<b>Passa</b>									22	31	32	57
<b>Seco</b>										28	5	14

Tabela 2 Porcentagem de frutos em cada estágio de desenvolvimento, provenientes de cafeeiros cultivados a uma altitude entre 1000 e 1200 metros na região da Serra da Mantiqueira, colhidos em diferentes épocas

	<b>Contra face</b>											
	<b>Janeiro</b>		<b>Fevereiro</b>		<b>Abril</b>		<b>Maió</b>		<b>Junho</b>		<b>Julho</b>	
	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>
	%											
<b>Em expansão</b>	18	18	14	15								
<b>Verde</b>	82	82	86	85	85	94	30	39				
<b>Verde cana</b>					16	6	22	37	10	16		
<b>Cereja</b>					9		48	24	83	80	92	85
<b>Passa</b>									7	4	8	15
<b>Seco</b>												
	<b>Soalheira</b>											
	<b>Janeiro</b>		<b>Fevereiro</b>		<b>Abril</b>		<b>Maió</b>		<b>Junho</b>		<b>Julho</b>	
	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>
	%											
<b>Em expansão</b>	26	27	13	18								
<b>Verde</b>	74	73	87	82	40	47	17					
<b>Verde cana</b>					52	42	42	41				
<b>Cereja</b>					8	11	41	59	34	48	17	30
<b>Passa</b>									34	31	42	43
<b>Seco</b>									32	21	41	27

Tabela 3 Porcentagem de frutos em cada estágio de desenvolvimento, provenientes de cafeeiros cultivados a uma altitude superior a 1200 metros na região da Serra da Mantiqueira, colhidos em diferentes épocas

	<b>Contra face</b>											
	<b>Janeiro</b>		<b>Fevereiro</b>		<b>Abril</b>		<b>Maió</b>		<b>Junho</b>		<b>Julho</b>	
	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>
	%											
<b>Em expansão</b>	30	28	23	19	25	22						
<b>Verde</b>	70	72	77	81	75	78	48	47				
<b>Verde cana</b>							29	39	18	46		
<b>Cereja</b>							25	14	68	42	100	100
<b>Passa</b>									14	12		
<b>Seco</b>												
	<b>Soalheira</b>											
	<b>Janeiro</b>		<b>Fevereiro</b>		<b>Abril</b>		<b>Maió</b>		<b>Junho</b>		<b>Julho</b>	
	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>	<b>Manhã</b>	<b>Tarde</b>

Os resultados desse trabalho corroboram com os dados encontrados na literatura, os quais demonstram que, com o aumento da altitude, a temperatura diminui favorecendo uma maturação mais uniforme (LAVIOLA et al., 2007). Entretanto, apenas a partir da terceira coleta foi possível observar diferenças no padrão de maturação entre as três altitudes, sendo que na maior altitude, no talhão contra face, os frutos ainda se encontravam nos estádios fruto em expansão e verde (Tabela 3), enquanto que nas demais já se observava a presença de frutos verde cana e cereja. O fato de apenas na terceira coleta, que corresponde ao mês de abril, ser possível observar tais diferenças, evidencia novamente a influência da altitude na fase de maturação dos frutos, a qual, segundo Camargo e Camargo (2001), inicia-se justamente no mês de abril.

Cortez (2001) afirma que o intervalo médio entre o início da floração e a máxima maturação dos frutos situa-se em torno de 220 dias, mas que em condições de temperatura mais baixa ( $< 20^{\circ} \text{C}$ ) o ciclo de maturação pode levar de 250 a 300 dias. Laviola et al. (2007) observaram que, na altitude de 720 m, o fruto necessitou de 211 dias para sua formação, ao passo que, a 950 m, a formação do fruto foi até 262 dias após a antese (DAA). Os autores acreditam que o ciclo de maturação mais longo de frutos de cafeeiros cultivados em maiores altitudes, esteja associado a uma soma de fatores como uma menor velocidade das reações enzimáticas, menor respiração, menor taxa de transporte de fotoassimilados e diminuição da velocidade de acúmulo de massa seca, ocasionados pelas temperaturas mais baixas. Por outro lado, os resultados encontrados na coleta do mês de junho confirmam o fato relatado na literatura que, nas regiões de clima mais quente no período da colheita, o ciclo de maturação é mais curto e os frutos passam rapidamente do estágio cereja para passa (CORTEZ, 1993), como o observado na menor altitude e na intermediária, que já apresentavam também frutos secos.

O processo de amadurecimento mais lento em altitudes elevadas, com menor temperatura do ar, ou sobre sombreamento, permite um maior tempo para completar o enchimento do grão e garante a completa manifestação de todos os passos bioquímicos requeridos para o desenvolvimento da qualidade de bebida, produzindo grãos que são mais densos, com aroma e sabor muito mais intensos que aqueles produzidos em menores altitudes (DAMATTA et al., 2007; SILVA et al., 2005; VAAST et al., 2006).

A influência do lado da planta de onde os frutos eram provenientes foi evidente já na coleta de abril onde, na menor altitude, no talhão soalheira, no lado da tarde, 43% dos frutos eram cereja e, no lado da manhã, esse valor ainda era de 16%. Na coleta de junho, também na menor altitude, frutos secos foram encontrados apenas no lado da manhã do talhão contra face e no lado da tarde do talhão soalheira (Tabela 1) e no mês de julho, no talhão soalheira, no lado da manhã, cerca de 63% dos frutos ainda estavam no estágio cereja, enquanto que no lado da tarde esse valor estava por volta de 29% (Tabela 1). Na maior altitude, essa influência foi observada na coleta do mês de julho, em que frutos passas foram encontrados apenas no talhão soalheira, no lado da tarde (Tabela 3). A maturação mais rápida dos frutos provenientes do lado da manhã, do talhão contra face ou do lado da tarde do talhão soalheira, pode ser explicada pelo fato de que esses são os lados de maior exposição à radiação solar em cada talhão, uma vez que o talhão contra face é o que recebe maior parte da radiação no período da manhã, e o talhão soalheira é aquele que recebe maior radiação no período da tarde.

Em relação à massa seca dos frutos, não foram observadas diferenças entre os tratamentos nas duas primeiras coletas (Gráficos 1A e 1B). Na terceira coleta, em abril, observou-se que não houve um acúmulo diferenciado de matéria seca entre frutos verdes, mas para frutos verde cana os maiores valores foram encontrados na altitude intermediária em ambos os talhões (CF e S) no

lado da planta que recebe o sol da tarde. Por outro lado, um maior acúmulo em frutos cereja foi encontrado na maior altitude no talão soalheira (Gráfico 1C).

No mês de maio, as maiores diferenças no padrão de alocação de massa seca foram encontradas na menor faixa de altitude (Gráfico 1D). No talhão contra face observou-se uma inversão no padrão de acúmulo de massa seca, onde, no lado da manhã, os maiores valores foram encontrados em frutos cereja, enquanto que no lado da tarde a maior massa seca foi encontrada em frutos no estágio verde cana. No talhão soalheira, destacaram-se os frutos no estágio cereja do lado da manhã, que apresentaram valores de massa seca maiores que todos os demais tratamentos. Comportamento semelhante foi observado na altitude intermediária e na maior, onde os maiores valores de massa seca foram apresentados também pelos frutos cereja do talhão soalheira, no lado da manhã.

Já nas duas últimas coletas, foram observadas menores diferenças nos padrões de acúmulo de massa seca entre os tratamentos (Gráfico 1E e 1F) e de um modo geral, apenas na última coleta, a qual ocorreu em julho, pôde-se observar uma diminuição na massa seca de frutos no estágio seco, quando comparado aos demais estágios de desenvolvimento.

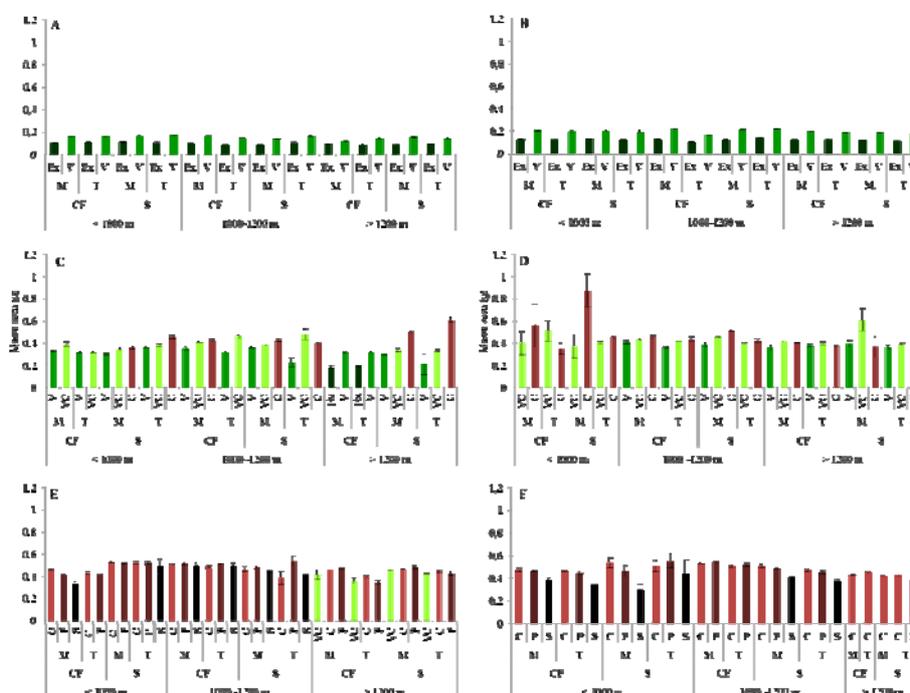


Gráfico 1 Massa seca de frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC), cereja (C), passa (P) e seco (S), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média (n=4).

Ao se analisar o valor absoluto de massa seca pôde-se observar um aumento em seu acúmulo entre a segunda e terceira coletas (Gráfico 1B e 1C), período que compreende a passagem da fase de granação para a de maturação dos frutos, dando formação aos grãos (CAMARGO; CAMARGO, 2001). Nessa fase o fruto atinge sua massa seca final quando ainda está verde (MORAIS et al., 2008), representando o final do período de crescimento e consequente início da maturação. Entretanto, na terceira coleta, o talhão contra face da maior altitude ainda apresentava frutos em expansão com menor incorporação de massa seca,

enquanto que nas demais altitudes se observavam apenas frutos verdes, verde cana e cereja. Esse resultado corrobora com o observado por Laviola et al. (2007), de que em uma maior altitude há uma diminuição da velocidade de acúmulo de massa seca nos frutos.

O fato de não terem sido observadas diferenças no acúmulo de massa seca entre os frutos cereja das três altitudes, mostrou que o ciclo de maturação mais curto nas menores altitudes não afetou o tamanho final dos frutos.

Quanto ao volume dos frutos, foi encontrado o mesmo padrão da característica massa seca nas duas primeiras avaliações, não sendo observadas diferenças entre os tratamentos (Gráficos 2A e 2B). Entretanto, em abril, pode-se observar um padrão diferenciado entre as altitudes (Gráfico 2C). Na menor altitude, os frutos do talhão soalheira, no lado da tarde apresentaram um maior volume quando comparado aos demais, sobressaindo o maior volume dos frutos cereja. Na altitude intermediária, no talhão contra face, os frutos verde cana apresentaram os maiores valores de volume, enquanto que no talhão soalheira os frutos verdes e cereja do lado da manhã apresentaram maior volume que os do lado da tarde. Já na maior altitude, no talhão soalheira, os frutos cerejas apresentaram-se com o maior volume.

Na coleta de maio (Gráfico 2D), os maiores volumes foram apresentados pelos frutos cereja da menor altitude, do lado da manhã, de ambos os talhões, enquanto que os demais tratamentos não apresentaram grandes diferenças entre frutos verde cana e cereja, com menores valores de volume encontrados em frutos verdes. Já na quinta coleta, em junho (Gráfico 2E), de um modo geral não foram encontradas diferenças de volume entre os frutos verde cana, cereja e passa, sendo observada apenas uma redução de volume nos frutos secos. Na última coleta, no mês de julho a menor altitude novamente apresentou um comportamento diferenciado em relação às demais, juntamente com o talhão soalheira, no lado da manhã, na altitude intermediária, onde se observou uma

escala decrescente de volume entre os estádios cereja, passa e seco, enquanto que nos demais tratamentos não foram observadas diferenças entre os volumes de frutos cereja e passa.

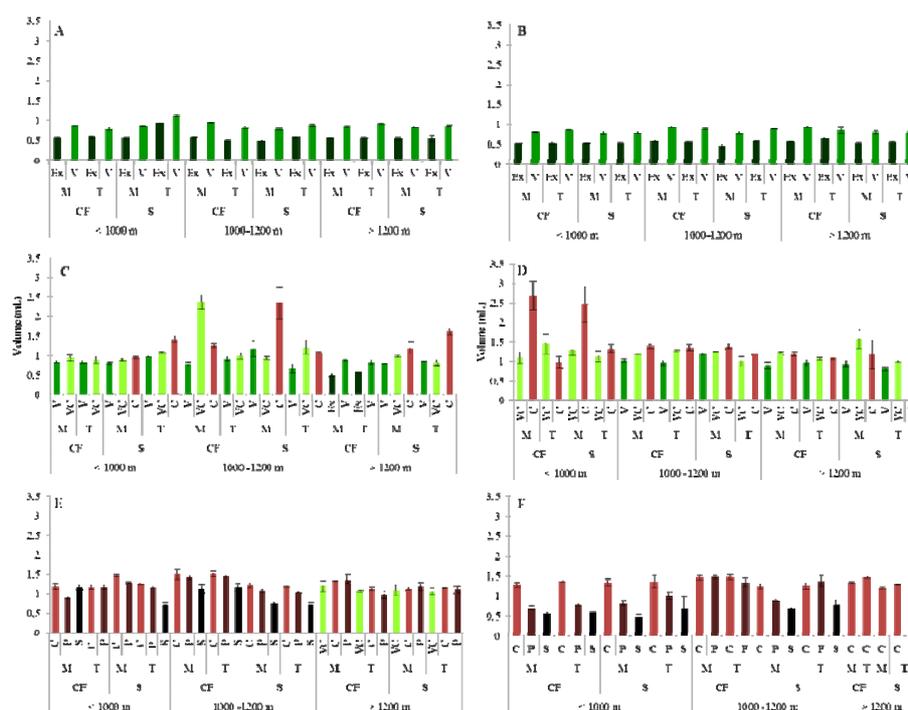


Gráfico 2 Volume de frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC), cereja (C), passa (P) e seco (S), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média (n=4).

De um modo geral, foi observado um aumento mais evidente no volume dos frutos entre a passagem do estádio fruto em expansão para fruto verde e nos frutos cereja, salvo algumas exceções. Isso ocorre, porque o período de expansão dos frutos se caracteriza pela rápida expansão celular, que leva a um aumento

em tamanho e massa fresca, e determina o tamanho máximo do grão. A fase seguinte é marcada por um crescimento lento que pode se estender por até duas semanas, quando o tamanho final do fruto verde é atingido, mas a matéria seca ainda é baixa, como o observado nas duas primeiras coletas, quando os frutos atingiram o seu volume médio máximo (Gráfico 2), mas a massa seca ainda não tinha completado seu acúmulo total, que foi alcançado apenas na terceira e quarta coletas (Gráfico 1). Nesse ponto o crescimento cessa por um longo período até o início da maturação, quando esse se reinicia, o fruto aumenta rapidamente de tamanho com acúmulo de massa fresca e seca, ocorrendo mudanças no pericarpo e o fruto atinge o ponto cereja (DAMATTA et al., 2007; MORAIS et al., 2008; NOGUEIRA et al., 2005).

Ao analisar conjuntamente os dados de massa seca e de volume, observou-se que nem sempre há uma relação direta entre eles. Na terceira coleta, na menor altitude, apesar de não ter havido diferenças entre as massas secas (Gráfico 1), os frutos do talhão soalheira no lado da tarde apresentaram maior volume que os demais (Gráfico 2). Enquanto que, na altitude intermediária, apesar dos frutos verde cana, do lado da manhã, do talhão contra face e dos frutos cereja do lado da manhã, do talhão soalheira, não terem se diferenciado quanto à massa seca (Gráfico 1C), ambos apresentaram os maiores valores de volume (Gráfico 2C). Dessa maneira, pode se concluir que o maior volume apresentado por esses frutos não se deve a um maior acúmulo de massa seca, mas sim por um maior conteúdo de água. Da mesma forma, na última coleta, embora os frutos cereja e passa não terem apresentado diferenças no acúmulo de massa seca (Gráfico 1F), para a característica volume, os frutos cereja apresentaram valores superiores (Gráfico 2F). Ocorre que no estágio passa, após o amadurecimento total (café cereja), os frutos entram em um período em que o catabolismo predomina sobre o anabolismo, iniciando-se a fase de senescência

dos frutos (NOGUEIRA et al., 2005) e início de desidratação (MORAIS et al., 2008).

Pode-se observar que, embora tenha havido diferenças no padrão de acúmulo de massa seca e no volume, no final do período amostral, o qual coincide com o momento da colheita do café no campo, não foram encontradas grandes diferenças nos cafés cereja entre as faixas de altitude e entre os talhões analisados (Gráficos 1F e 2F).

Em relação à atividade da enzima invertase ácida, na primeira coleta, observou-se que, na maior altitude, tanto no talhão contra face quanto soalheira, os frutos provenientes do lado da tarde apresentaram maior atividade que os provenientes do lado da manhã, enquanto que nos demais tratamentos não foram observadas diferenças (Gráfico 3A). Por outro lado, na segunda coleta, em fevereiro, na menor altitude, no talhão soalheira foi encontrado um comportamento oposto, com maiores valores de atividade nos frutos do lado da manhã. Já na altitude intermediária, no talhão contra face foi encontrado o mesmo comportamento que o observado para a menor altitude na primeira coleta. Na maior altitude, no talhão soalheira, a atividade da IAV foi maior em frutos verdes do que em frutos em expansão (Gráfico 3B). Em abril, os frutos em expansão e verdes apresentaram valores inferiores da atividade da IAV, e na menor altitude, os maiores valores foram encontrados em frutos cerejas do lado da tarde em ambos os talhões, enquanto que na altitude intermediária, as maiores atividades foram encontradas em frutos verde cana do talhão soalheira (Gráfico 3C).

Na coleta de maio, na menor altitude, de um modo geral, as maiores atividades da IAV foram encontradas em frutos cereja, enquanto que na altitude intermediária apenas no talhão contra face, no lado da manhã, os frutos cereja se sobressaíram, sendo que os maiores valores de atividade encontrados em frutos verde cana do lado da tarde de ambos os talhões. Já na maior altitude, os frutos

verde cana apresentaram maior atividade (Gráfico 3D). No decorrer dos meses de maio para junho, observou-se uma queda na atividade da IAV, mas não foram observadas grandes diferenças entre os tratamentos (Gráfico 3E), enquanto que na coleta de julho, foi observado um novo aumento na atividade enzimática. Na altitude intermediária os maiores valores de atividade da IAV foram encontrados em frutos cereja, oriundos do lado da manhã do talhão contra face e na maior altitude os frutos do talhão soalheira apresentaram menores valores que os do talhão contra face. Na menor altitude, não foram encontradas diferenças (Gráfico 3F).

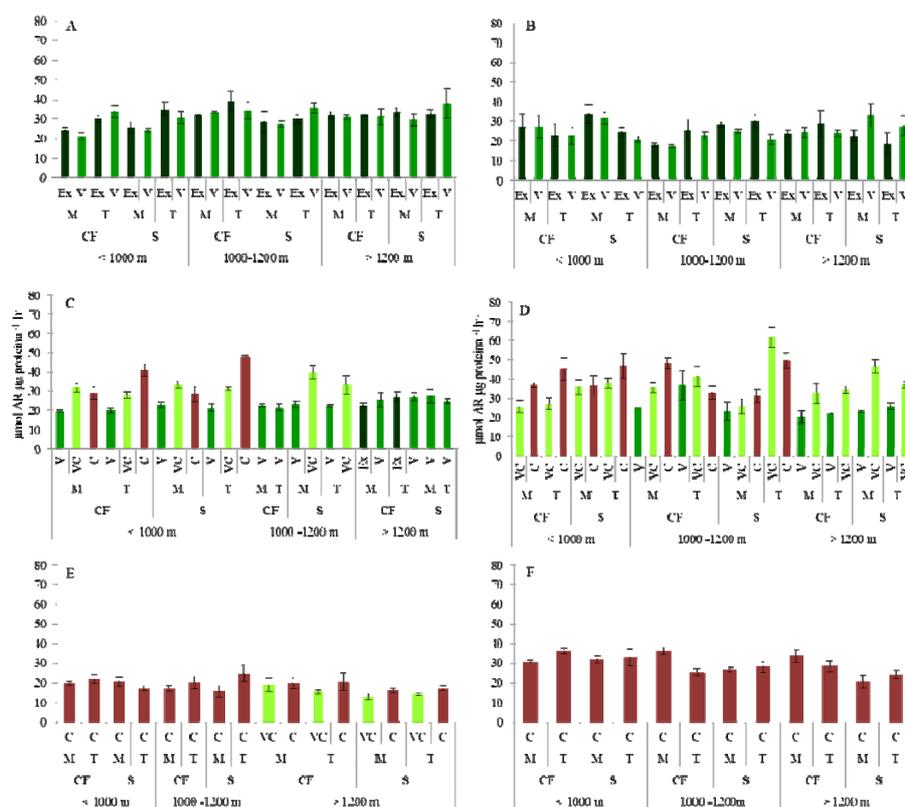


Gráfico 3 Atividade da invertase ácida (IAV) em frutos de cafeeiros cultivados, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média (n=3).

A enzima invertase neutra, na coleta do mês de janeiro, apresentou menor atividade nos frutos oriundos do lado da manhã, no talhão contra face, nas três altitudes (Gráfico 4A). Na segunda coleta, em fevereiro na menor altitude uma maior atividade da enzima foi encontrada em frutos do talhão soalheira, do lado da manhã, enquanto que, na altitude intermediária, no talhão soalheira os maiores valores foram apresentados pelos frutos em expansão de

ambos os lados da planta. Já na maior altitude, a maior atividade da INC foi encontrada em frutos do talhão contra face no lado da tarde (Gráfico 4B). Em abril, na menor altitude, maiores atividade da INC foram encontradas em frutos cereja, exceto no talhão soalheira no lado da manhã, que não houve diferença na atividade de frutos verde cana e cereja. Já na altitude intermediária, os maiores valores de atividade foram observados em frutos verde cana do talhão soalheira, enquanto que, na maior altitude, não foram encontradas grandes diferenças entre os tratamentos (Gráfico 4C).

Na coleta de maio, na menor altitude e na intermediária, os maiores valores de atividade da INC foram encontrados em frutos cereja, enquanto que, na maior altitude, as maiores atividades foram encontradas em frutos verde cana (Gráfico 4D). Em junho, na menor altitude, maiores valores de atividade foram encontrados em frutos do talhão soalheira, enquanto que na altitude intermediária, a maior atividade foi observada em frutos cereja do lado da tarde em ambos os talhões. Já na maior altitude a atividade foi maior em frutos cereja de ambos os talhões e lados das plantas. Na ultima coleta, em julho, na menor altitude, os frutos do talhão soalheira continuaram a apresentar os maiores valores de atividade da INC, mas na intermediária não foram encontradas diferenças entre os talhões e lados da planta. Já na maior altitude, os frutos do talhão soalheira apresentaram uma maior atividade da enzima INC.

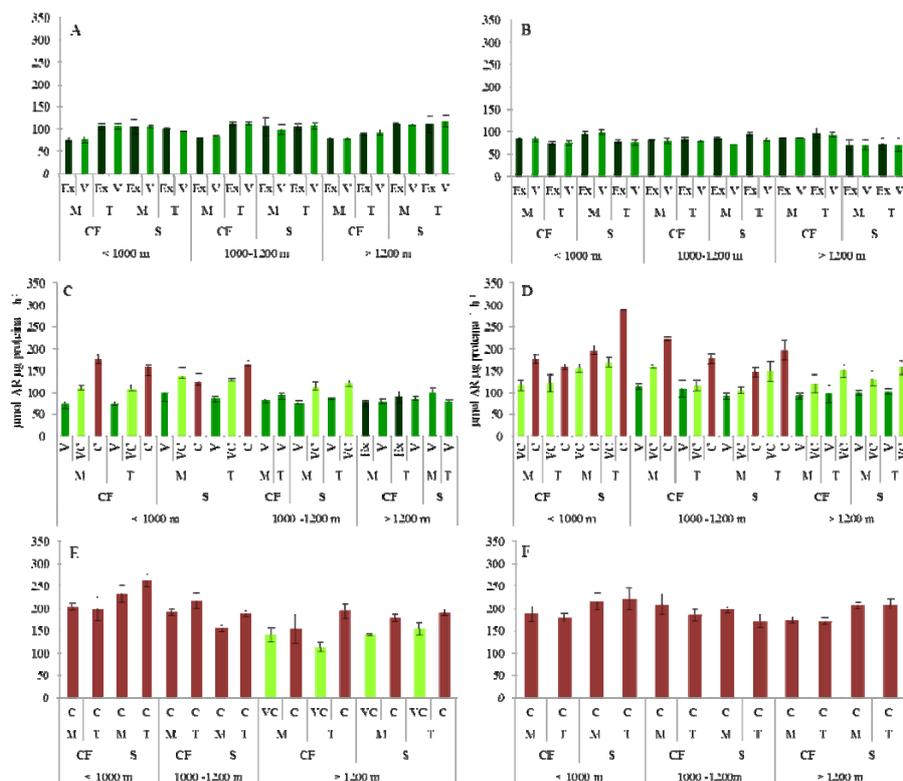


Gráfico 4 Atividade da invertase neutra do citosol (INC) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média (n=3).

Observou-se que maiores valores de atividade da IAV foram encontrados em frutos verde cana e cereja (Gráfico 4), o que corrobora com os resultados encontrados por Geromel et al. (2008) que observaram, em endospermas de frutos de cafeeiros de plantas controle, um pico de atividade da IAV no último estágio por volta de 230 dias após o florescimento, enquanto que

no pericarpo dos frutos foram encontrados dois picos de atividade aos 120 e 197 dias.

Nas coletas dos meses de abril e maio, pôde-se observar uma maior atividade de da IAV em frutos das menores altitudes (Gráfico 3C e 3D), o que pode estar ligado ao ciclo de maturação mais curto apresentado por essas altitudes.

A invertase ácida vacuolar contribui em destaque para a importação de sacarose, possibilitando a entrada de hexoses no metabolismo citoplasmático, especialmente durante a expansão do crescimento em diversas estruturas drenos (ANDERSEN et al., 2002; KOCH, 2004; STURM; TANG, 1999; WESCHKE et al., 2003), como os frutos de café, que são drenos preferenciais de fotoassimilados durante o período reprodutivo (LAVIOLA et al., 2007). Esse papel para a invertase vacuolar é adicional às já reconhecidas funções de regulação do turgor, expansão celular e a regulação do balanço de açúcar em tecidos de frutos e tubérculos maduros (FILS-LYCAON et al., 2011; STURM; TANG, 1999).

Mas, neste estudo, foi encontrada uma maior atividade da invertase neutra em relação à ácida vacuolar (Gráficos 3 e 4). Geromel et al. (2008) também encontraram valores muito baixos para a atividade da IAV em seu trabalho, sugerindo que outras isoformas de invertases como a neutra, por exemplo, poderiam estar envolvidas na regulação da relação sacarose/hexoses. Estudos recentes têm mostrado que a INC pode estar relacionada não apenas em fornecer substratos metabólicos para processos celulares, mas também na geração de sinais de açúcares por si só, ou conjuntamente aos hormônios especialmente sob condições de estresse, emergindo como importantes reguladores de crescimento e desenvolvimento nas plantas (NONIS et al., 2007; RUAN et al., 2010; VARGAS; SALERNO, 2010; XIANG et al., 2011; YAO et al., 2009).

Em frutos de café, a enzima invertase neutra parece desempenhar um papel predominante na determinação da relação entre sacarose e glicose + frutose, quando comparada à invertase ácida, situação contrária à encontrada durante o amadurecimento de banana por Fils-Lycaon et al. (2011), que concluíram ter a invertase ácida papel determinante nessa relação, por apresentar uma atividade muito superior à da invertase neutra.

De um modo geral, a atividade da INC não diferiu entre frutos em expansão e frutos verdes, e, após esse estágio, a atividade enzimática apresentou valores crescentes passando pelo estágio verde cana até atingir o estágio de fruto cereja (Gráfico 4). Uma maior atividade, tanto da INC quanto da IAV, em frutos nos estádios verde cana e cereja pode estar relacionada, conforme constataram Pereira et al. (2005), a um rápido aumento na produção de etileno em frutos verde-cana, após o final da formação do endosperma, com um decréscimo nos frutos cereja indicando uma fase climatérica da maturação. O aumento da produção de etileno vem acompanhado de um concomitante aumento da respiração e no conteúdo de açúcares totais, redutores e não redutores (MONDAL et al., 2004; PEREIRA et al., 2005). As invertases são enzimas envolvidas no fornecimento de hexoses para a respiração, o que foi comprovado por Hajirezaei et al. (2000) que observaram, em tubérculos de batata transgênicos, que superexpressavam o gene de uma invertase citosólica, um aumento no fluxo de carbono através da glicólise e um acúmulo de intermediários fosforilados.

Em cana-de-açúcar, atribui-se à capacidade efetiva de armazenamento de sacarose nos colmos aos elevados níveis da invertase neutra. Nos tecidos maduros do colmo, onde os processos de crescimento estão praticamente finalizados, ocorre declínio da concentração da invertase ácida e, então, a invertase neutra torna-se predominante, situando-se, aparentemente, no citoplasma. Essa enzima, com o baixo nível da invertase ácida, governa o

acúmulo ativo de sacarose no vacúolo. Posteriormente, nos tecidos com maior maturidade, os quais apresentam teores de sacarose em torno de 15 e 20%, há armazenamento de sacarose nos espaços intercelulares (LEITE et al., 2009; LINGLE, 1999).

Nonis et al. (2007) mostraram haver uma regulação diferencial de um gene que codifica para uma invertase neutra, durante o desenvolvimento de frutos de pêssigo, e uma correlação com os conteúdos de sacarose, glicose e frutose no mesocarpo. Em uma cultivar de maturação precoce, a qual se caracteriza por um crescimento quase monofásico dos frutos, apenas um pico de expressão do gene foi encontrado, enquanto dois picos puderam ser detectados na cultivar de maturação mais tardia, que exhibe um padrão bifásico duplo-sigmoidal de crescimento. Além disso, a transcrição do gene pareceu ser regulada em resposta a sinais de açúcares apenas na fase de expansão fruto, coincidente com o início do acúmulo de sacarose, o que aponta para uma relação entre a dinâmica de crescimento dos frutos e metabolismo de açúcares, sugerindo um papel regulador no desenvolvimento da planta para esta classe de enzima.

Maiores valores de atividade da INC foram encontrados com predominância em frutos cereja da menor altitude, oriundos do talhão soalheira, no lado da tarde, já na coleta do mês de abril enquanto que na maior altitude um aumento na atividade das invertases pôde ser observado apenas na coleta de maio (Gráfico 4). Tal fato pode ser explicado pela maior temperatura nesse ambiente, influenciada pela menor altitude e pela maior exposição desse talhão à radiação solar. A maior atividade da INC pode ter ocasionado o ciclo de maturação mais curto, uma vez que, na menor altitude, no talhão soalheira, 43% dos frutos já estavam no estágio cereja na coleta do mês de abril (Tabela 1), enquanto que nas demais altitudes essa porcentagem era por volta de 8% (Tabelas 2 e 3). Considerando que os fotoassimilados acumulados, durante o

crescimento dos frutos, são importantes para a qualidade da bebida qualquer fator que encurte essa fase, como temperaturas elevadas, pode prejudicar o acúmulo dessas moléculas (FAGAN et al., 2011). Já a menor atividade das invertases, na maior altitude (Gráfico 3 e 4), pode ser devido ao fato que, a exposição de um tecido dreno a baixas temperaturas pode restringir a atividade dessas enzimas, diminuindo a velocidade do transporte de fotoassimilados no floema (LAVIOLA et al., 2007). Esses autores observaram que, na altitude de 720 m, o ciclo de maturação de frutos de cafeeiros foi mais curto e, o acúmulo de amido, açúcares solúveis totais, açúcares redutores e açúcares não-redutores aconteceu em um período anterior ao da altitude de 950m.

O que se observa é que, durante a fase de maturação dos frutos, várias alterações morfológicas e fisiológicas podem ocorrer. Alguns estudos têm mostrado o envolvimento de EROs e de antioxidantes durante o amadurecimento tanto de frutos climatéricos quanto não climatéricos (LÓPEZ; GOCHICOA; FRANCO, 2010; MONDAL et al., 2004, 2009).

Em relação ao sistema antioxidante, a atividade da enzima dismutase do superóxido (SOD) não foram observadas diferenças entre talhões, lados da planta e estádios de desenvolvimento (Gráfico 5). Na primeira coleta, em janeiro, não foram encontradas diferenças entre os tratamentos (Gráfico 5A), enquanto que na coleta do mês de fevereiro os maiores valores da atividade foram encontrados em frutos oriundos da maior altitude (Gráfico 5B). Na coleta do mês de abril, novamente não foram encontradas diferenças entre os tratamentos, porém, pôde-se observar um aumento na atividade da SOD em frutos provenientes da menor altitude e da intermediária, igualando a atividade da maior altitude (Gráfico 5C). Já na coleta do mês de maio, a atividade da SOD foi levemente maior em frutos provenientes da menor altitude (Gráfico 5D). No mês de junho as atividades nos frutos das três altitudes se igualaram, apresentando valores mais altos que as coletas anteriores, (Gráfico 5E), enquanto

que na última coleta, no mês de julho, as maiores atividades da SOD voltaram a ser encontradas na maior altitude (Gráfico 5F). De um modo geral, observa-se que houve um aumento gradual da atividade da SOD, durante o amadurecimento dos frutos de café com o decorrer dos meses, uma vez que em janeiro a atividade da SOD apresentava valores próximos a 500U, em abril atividade estava entre 600-700U, alcançando nos meses de junho e julho valores máximos por volta de 700-800U.

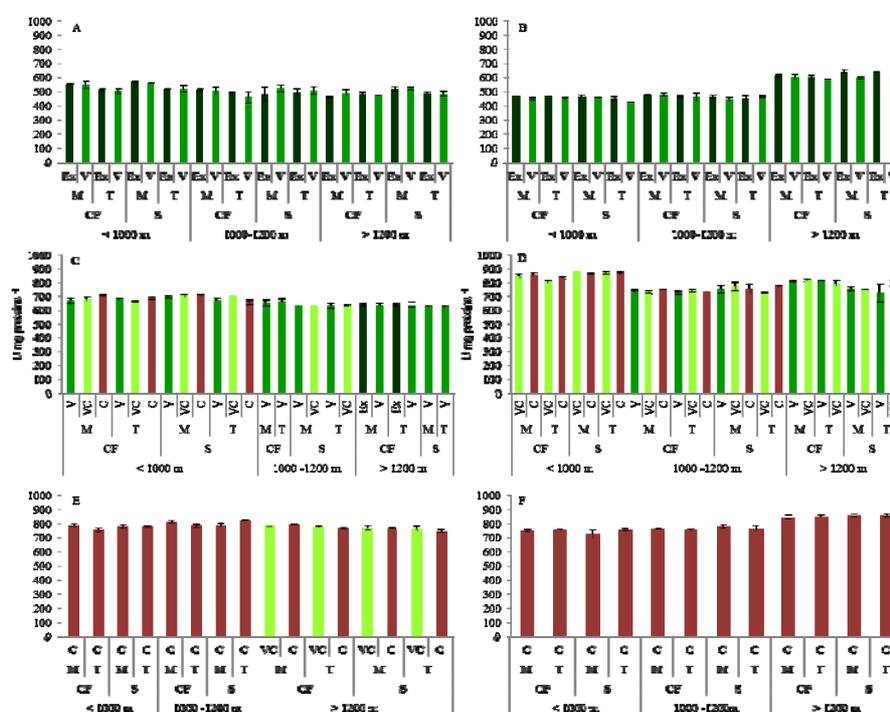


Gráfico 5 Atividade da dismutase do superóxido (SOD) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média (n=3).

Como se pode observar, a atividade da SOD pouco alterou com os tratamentos ao longo das coletas. Apesar de não ter sido observada uma diferença entre os estádios de desenvolvimento, houve um aumento na sua atividade ao longo dos meses, durante o amadurecimento dos frutos, com valores máximos em frutos verde cana e cereja (Gráfico 5). A SOD desempenha um papel central na defesa contra o estresse oxidativo em todos os organismos aeróbicos, sendo responsável pela dismutação do radical superóxido em  $O_2$  e  $H_2O_2$  (SHARMA et al., 2012).

Mondal et al. (2009), trabalhando com goiaba, observaram um aumento sucessivo na atividade da SOD com o progresso do amadurecimento até o estágio completamente maduro, seguido de uma queda da atividade em frutos supermaduros. Em função do substancial aumento da respiração em frutos climatéricos, a produção do radical superóxido provavelmente aumenta nos estádios finais do desenvolvimento, o que pode explicar o aumento da atividade da SOD com o progresso do amadurecimento do fruto, como uma tentativa de remover tais radicais, evitando danos oxidativos. Já em tomate, em outro trabalho realizado por Mondal et al. (2004), observou-se uma maior atividade da SOD em frutos verdes que já haviam completado seu crescimento, e uma subsequente diminuição da atividade com o decorrer do amadurecimento do fruto, até se tornar totalmente vermelho. López, Gochicoa e Franco (2010) encontraram resultados semelhantes, trabalhando com morango, com aumento da atividade da SOD concomitante ao aumento em tamanho do fruto, até um pico de atividade em frutos brancos, seguido de uma forte queda conforme o fruto foi ficando vermelho. Os autores atribuem essa queda às mudanças bruscas de pigmentação e textura nos frutos, que vem acompanhada de um estresse oxidativo.

Por outro lado, a atividade da enzima peroxidase do ascorbato (APX) foi influenciada tanto pela altitude quanto pelo talhão, lado da planta e estágio de

desenvolvimento (Gráfico 6). Na primeira coleta, no mês de janeiro, os maiores valores de atividade da APX foram encontrados, na menor altitude, em frutos em expansão do lado da manhã do talhão soalheira, enquanto que na altitude intermediária, a maior atividade foi observada em frutos verdes do lado da tarde, também no talhão soalheira. Já na maior altitude não foram encontradas grandes variações na atividade da APX (Gráfico 6A). Na coleta do mês de fevereiro, observou-se um mesmo padrão entre as altitudes, com maiores valores de atividade predominantemente em frutos verdes, com o lado da manhã se sobressaindo sobre o da tarde em ambos os talhões, entretanto com valores bem superiores de atividade nos talhões soalheira. De um modo geral, os valores de atividade da APX, na maior altitude, foram ligeiramente menores, quando comparados cada estágio de desenvolvimento, dentro de cada lado da planta e talhão, entre as três altitudes (Gráfico 6B).

Na terceira coleta no mês de abril, pode-se observar uma queda na atividade enzimática, tanto na menor altitude quanto na intermediária, com maiores valores encontrados em frutos verdes do talhão contra face da altitude intermediária. Já na maior altitude, não foi observada uma queda na atividade da APX, com maiores valores sendo apresentados por frutos verdes do lado da manhã dentro de cada talhão, mas com valores superiores de atividade em frutos do talhão soalheira quando comparados cada lado da planta entre os talhões (Gráfico 6C). Na coleta do mês de maio, voltou-se a observar um mesmo padrão entre as altitudes, com maiores valores de atividade da APX em frutos oriundos dos talhões soalheira, não apresentando diferença entre os estágios de desenvolvimento, mas com valores crescentes de atividade com o concomitante aumento da altitude. Entretanto, na maior altitude, uma maior atividade da APX foi encontrada em frutos do lado da manhã em ambos os talhões (Gráficos 6D). No mês de junho, maiores valores da APX foram encontrados na altitude intermediária e na maior, em frutos do talhão soalheira do lado da manhã

(Gráfico 6E). Já na última coleta, não foram observadas grandes diferenças entre as altitudes com valores baixos de atividade da APX em frutos cereja (Gráfico 6F).

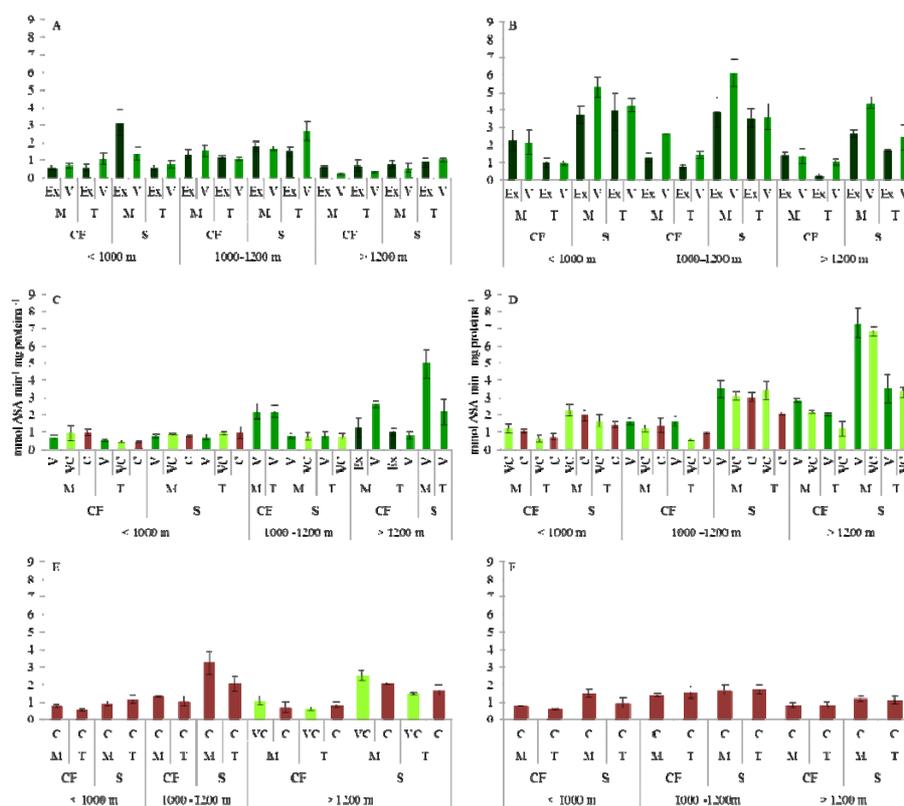


Gráfico 6 Atividade da peroxidase do ascorbato (APX) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S), em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média (n=3).

A peroxidase do ascorbato é um componente central do ciclo glutationa-ascorbato, desempenhando um papel essencial no controle dos níveis intracelulares de EROs, usando duas moléculas de ácido ascórbico para reduzir  $H_2O_2$  em água com uma concomitante geração de duas moléculas de monodeidroascorbato. A APX é reconhecida como uma das enzimas antioxidantes mais amplamente distribuídas em plantas, apresentando uma grande afinidade pelo  $H_2O_2$ , o que a torna eficiente sob condições estressantes (SHARMA et al., 2012).

Pode-se observar que houve um aumento da atividade da APX entre os estádios frutos em expansão e verde seguido de uma queda na atividade em frutos verde cana e cereja (Gráfico 6). Resultados semelhantes foram encontrados em tomate por Mondal et al. (2004), que observaram um pico de atividade da APX em frutos verdes seguido de uma queda nos estádios seguintes, à medida em que o fruto foi se tornando vermelho. Já em goiaba, Mondal et al. (2009) encontraram uma maior atividade em frutos que se encontravam na transição entre os estádio verde e maduro, com uma subsequente queda.

Nas coletas dos meses de abril e maio, foi possível observar uma maior atividade da APX em frutos da maior altitude, principalmente no talhão soalheira (Gráficos C e D), resultando em uma remoção mais eficiente do  $H_2O_2$ , o que possivelmente contribuiu para o ciclo de maturação mais longo apresentado por esses frutos, quando comparados às demais altitudes. Um declínio da atividade do sistema antioxidante associado a um aumento do estresse oxidativo, pode mediar as mudanças bioquímicas que ocorrem durante o amadurecimento dos frutos (MONDAL et al., 2009).

Em relação à enzima catalase, sua atividade apresentou valores menores que os da enzima APX (Gráficos 6 e 7), com efeitos menos pronunciados da altitude. Na primeira coleta em janeiro, a atividade da CAT, na menor altitude

foi ligeiramente maior em frutos em expansão, quando comparados aos frutos verdes, enquanto que na altitude intermediária não foram observadas diferenças entre os tratamentos. Na maior altitude maiores valores foram encontrados em frutos verdes do lado da tarde do talhão soalheira (Gráfico 7A). Na coleta de fevereiro, maiores valores da CAT foram encontrados em frutos verdes da maior altitude (Gráfico 7B). Na coleta em abril, enquanto que, no talhão contra face da menor altitude, maiores atividades da CAT foram encontradas em frutos verde cana, nos demais tratamentos, maiores valores de atividade foram encontrados em frutos verdes (Gráfico 7C). Em maio, uma maior atividade da CAT foi encontrada em frutos verdes dos lados da manhã em ambos os talhões da maior altitude (Gráfico 7D). Na coleta do mês de junho, de um modo geral, foi observado um aumento da atividade da CAT em frutos cereja da menor altitude e da intermediária. Já na maior altitude, onde ainda se encontravam frutos verde cana, esses apresentaram maior atividade da CAT, exceto no lado da tarde do talhão contra face, em que os frutos cereja apresentaram maior atividade enzimática (Gráfico 7E). Na última coleta, em julho, houve uma queda na atividade da CAT nos frutos cereja em todos os tratamentos (Gráfico 7F).

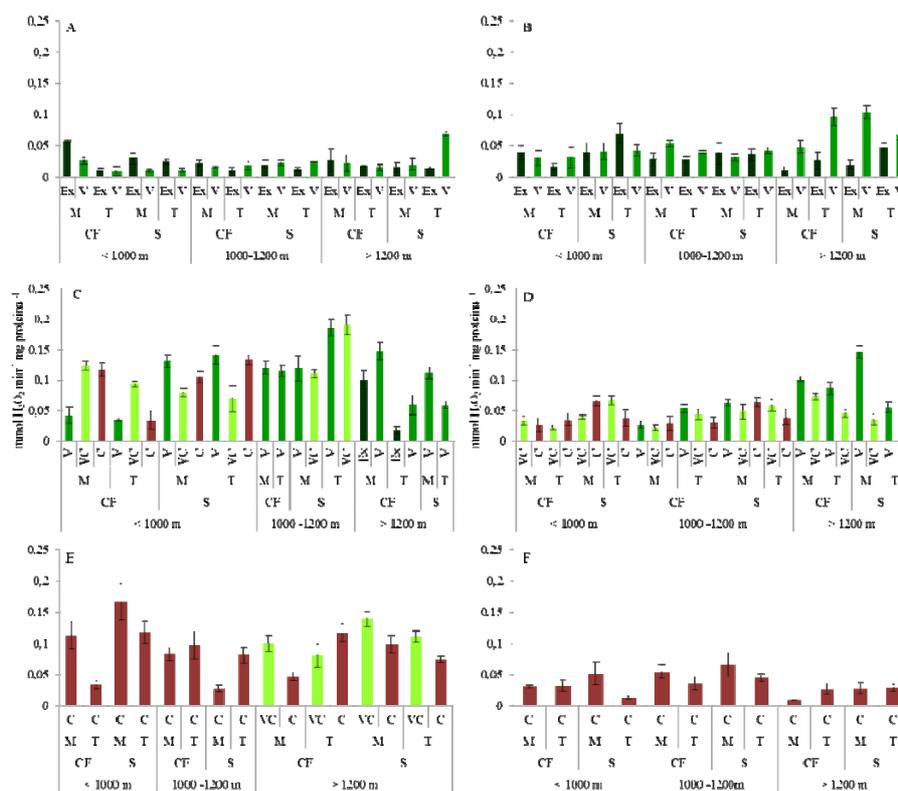


Gráfico 7 Atividade da catalase (CAT) em frutos de café em diferentes condições de cultivo, altitude e época de colheita. Os dados são apresentados para três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média (n=3).

A catalase é considerada uma das defesas primárias contra o estresse oxidativo induzido pela senescência (ZIMMERMANN et al., 2006), catalisando a dismutação de duas moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água e oxigênio. Embora tenha uma alta especificidade pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sua afinidade é muito menor que a da APX (SHARMA et al., 2012), o que possivelmente explica sua menor atividade nos frutos quando comparada a APX.

A CAT apresentou um comportamento semelhante ao da APX, com um aumento da atividade entre os estádios frutos em expansão e verde seguido de uma queda na atividade em frutos verde cana e cereja, exceto na coleta do mês de junho em que houve um aumento na atividade da CAT em frutos verde cana e cereja, em relação à coleta anterior (Gráfico 7). Em goiaba, Mondal et al. (2009) encontraram uma maior atividade em frutos que se encontravam na transição entre os estádio verde e maduro, com subsequente queda com o progresso do amadurecimento. Já em tomate, atividade da CAT aumentou ligeiramente até o estádio vermelho maduro (MONDAL et al., 2004), enquanto que em morango, López, Gochicoa e Franco (2010) encontraram dois picos de atividade da CAT, sendo um no início do desenvolvimento dos frutos, quando estes ainda se encontravam em crescimento, e outro em frutos vermelhos completamente maduros.

O fato que, na coleta de fevereiro, os frutos da menor altitude e da intermediária apresentaram menores atividades da SOD e CAT, pode explicar o fato de que na coleta posterior, no mês de abril, nessas altitudes já era possível encontrar frutos verde cana e cereja, enquanto que na maior altitude os frutos se encontravam em expansão e verdes (Gráficos 5 e 7). Mondal et al. (2004, 2009) concluíram que, uma menor atividade das enzimas SOD, CAT e APX reduz a habilidade de remoção de radicais livres, mediando mudanças bioquímicas que levam a um processo de amadurecimento mais rápido, o que pode ter contribuído para um ciclo de maturação mais curto nas menores altitudes.

Em se tratando de antioxidantes não enzimáticos, o conteúdo de ascorbato variou em função da altitude, do talhão, do lado da planta e da época de coleta (Gráfico 8). Na primeira coleta ocorrida em janeiro, menores valores médios de ascorbato foram encontrados na menor altitude. Tanto na menor altitude quanto na intermediária, maiores níveis de ascorbato foram encontrados em frutos do talhão soalheira. Na maior altitude, maiores valores foram

encontrados em frutos dos lados da manhã, no estágio de frutos em expansão, no talhão contra face, e em frutos em expansão e verdes do talhão soalheira (Gráfico 8A). No mês de fevereiro, houve um aumento nos conteúdos de ascorbato na menor altitude, com valores máximos em frutos verdes, do lado da tarde, do talhão contra face. Enquanto que, na altitude intermediária, foi observada uma queda nos níveis de ascorbato em relação à coleta anterior, na maior altitude, também foi observado um aumento (Gráfico 8B). Em abril, observou-se uma ligeira queda no conteúdo de ascorbato, na menor e na maior altitude, e um aumento na altitude intermediária. Na menor altitude, no talhão contra face, enquanto que, o lado da manhã, apresentou maiores conteúdos de ascorbato em frutos verde cana e cereja, no lado da tarde, foram os frutos verdes que apresentaram maiores valores. Na altitude intermediária, maiores valores foram apresentados por frutos oriundos do lado da tarde, de ambos os talhões. Já na maior altitude, no talhão contra face, maiores conteúdos de ascorbato foram encontrados em frutos expansão, enquanto que, no talhão soalheira, os frutos verdes, do lado da manhã, apresentaram maiores valores (Gráfico 8C). Na coleta de maio, menores conteúdos de ascorbato foram encontrados em frutos oriundos da menor altitude (Gráfico 8D). Em junho, novamente menores valores de ascorbato foram encontrados na menor altitude, enquanto que na maior altitude, maiores valores foram encontrados em frutos cereja, do talhão soalheira (Gráfico 8E). Na coleta de julho, maiores níveis de ascorbato continuaram a ser apresentados por frutos cereja, do talhão soalheira (Gráfico 8F).

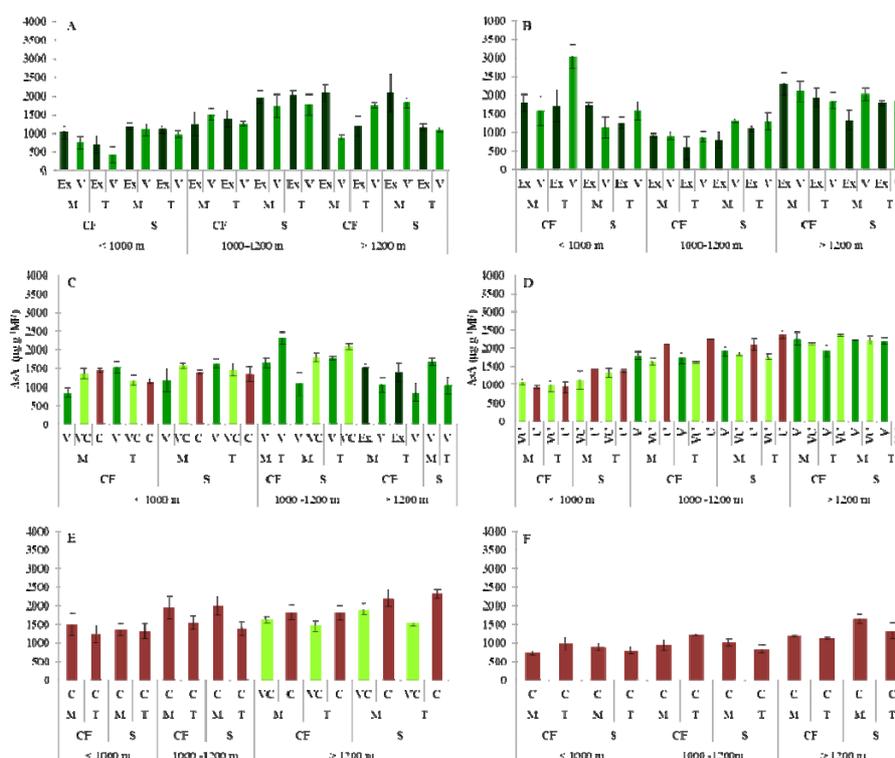


Gráfico 8 Conteúdo de ascorbato (AsA) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média (n=3).

O ascorbato é um dos mais abundantes antioxidantes de baixo peso molecular, atuando na defesa contra o estresse oxidativo, causado pelo aumento nos níveis de EROs. Ele é considerado um poderoso antioxidante, pela sua habilidade de doar elétrons a um grande número de reações enzimáticas e não enzimáticas, mostrando grande importância em muitos processos fisiológicos em plantas, como o crescimento, diferenciação e metabolismo (SHARMA et al., 2012).

Pôde-se observar que os conteúdos de ascorbato não apresentaram um mesmo padrão entre as três altitudes. Na altitude intermediária e na maior, os níveis de ascorbato se mantiveram mais constantes, apresentando uma queda em seus níveis apenas na segunda e terceira coletas, respectivamente (Gráfico 8B e 8C), o que, possivelmente, resultou na passagem do estágio verde para verde cana, evidenciado nas coletas seguintes, na terceira coleta, para a altitude intermediária e, quarta coleta, para a maior altitude (Gráfico 8C e 8D). Enquanto isso, na menor altitude, onde foi possível observar a presença de frutos verde cana e cereja já na terceira coleta, os níveis de ascorbato apresentaram oscilações ao longo das coletas (Gráfico 8). Entretanto, para todas as altitudes, foi observada uma queda nos níveis de ascorbato nos frutos cerejas, da coleta do mês de julho, embora que, frutos, da maior altitude, tenham apresentado valores um pouco maiores em relação às demais (Gráfico 8F). Resultados semelhantes foram encontrados tanto em tomate quanto em goiaba, por Mondal et al. (2004, 2009), com valores máximos de ascorbato em frutos que se encontravam no estágio de transição para frutos vermelhos, seguido de uma queda em frutos vermelhos completamente maduros.

Em relação ao estresse oxidativo, os níveis de peróxido de hidrogênio sofreram influência do estágio de desenvolvimento, da altitude, do talhão e em menor grau do lado da planta (Gráfico 9). Na coleta de janeiro, não foram encontradas diferenças de atividade entre frutos em expansão e verdes, porém com maiores níveis de  $H_2O_2$  encontrados em frutos oriundos da menor altitude no talhão contra face no lado da tarde (Gráfico 9A). Já na segunda coleta, menores valores foram apresentados por frutos da maior altitude e, em frutos verdes foram encontrados maiores conteúdos médios de  $H_2O_2$  (Gráfico 9B). Na coleta de abril, maiores conteúdos de  $H_2O_2$  foram encontrados no talhão soalheira da menor altitude e no talhão contra face e no soalheira do lado da tarde na altitude intermediária, não diferindo entre os estágios de

desenvolvimento (Gráfico 9C). Em maio, frutos oriundos do talhão soalheira da menor altitude apresentaram uma queda nos níveis de  $H_2O_2$ , enquanto que em frutos do talhão soalheira da menor altitude do lado da manhã e em frutos da maior altitude foi observado um aumento em seus níveis (Gráfico 9D). Já em junho menores conteúdos de  $H_2O_2$  foram apresentados por frutos dos talhões contra face tanto da menor altitude quanto da intermediária (Gráfico 9E). Em julho menores níveis de  $H_2O_2$  foram apresentados por frutos da menor altitude oriundos do lado da manhã do talhão contra face e do lado da tarde do talhão soalheira.

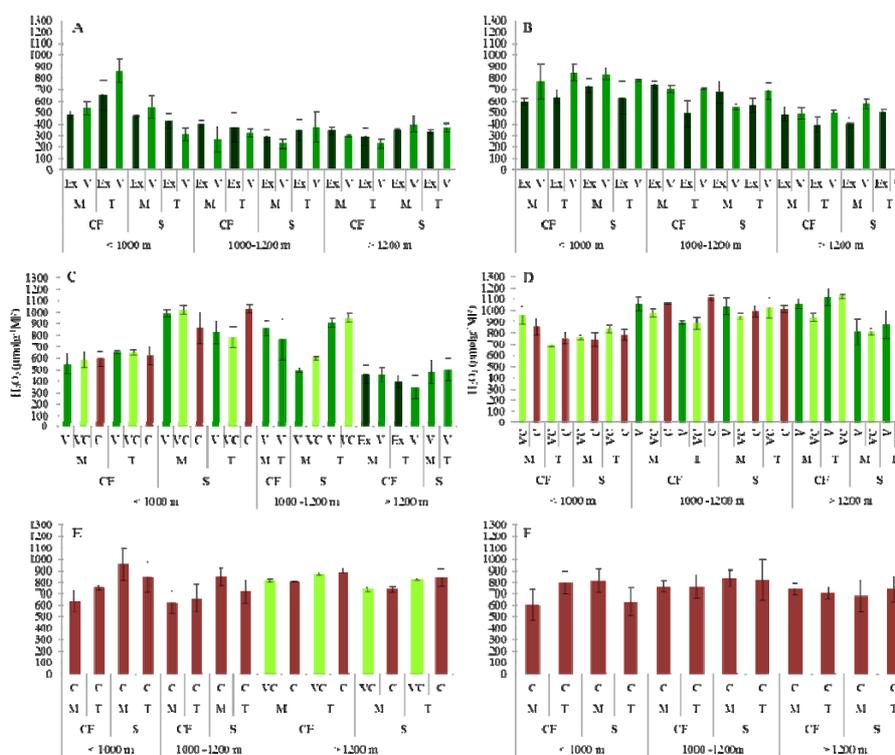


Gráfico 9 Conteúdo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média ( $n=3$ ).

Na menor altitude, observou-se um maior conteúdo de  $H_2O_2$  nas duas primeiras coletas (Gráfico 9A e 9B), quando os frutos ainda estavam nos estádios em expansão e verde, e um ligeiro novo aumento nas coletas de maio e junho (Gráfico 9D e 9E), enquanto que na altitude intermediária houve um aumento crescente a partir das coletas dos meses de fevereiro, abril e maio (Gráfico 9B, 9C e 9D). Tais resultados podem ser explicados pela manutenção da atividade da SOD, enzima produtora de  $H_2O_2$ , e das baixas atividades das

enzimas APX e CAT, que são enzimas removedoras de  $H_2O_2$ , nas menores altitudes em algumas coletas (Gráficos 6 e 7). O balanço entre a SOD e as diferentes enzimas removedoras de  $H_2O_2$  nas células é crucial na determinação dos níveis constantes de superóxido e peróxido de hidrogênio (SHARMA et al., 2012). Por outro lado, na maior altitude, um aumento no conteúdo de  $H_2O_2$  foi observado apenas a partir da coleta do mês de maio, quando frutos verde cana passaram a ser encontrados (Gráfico 9D). Mondal et al. (2004) encontraram níveis ligeiramente decrescentes de  $H_2O_2$  em frutos de tomate com o decorrer do amadurecimento, como um possível resultado de uma queda na atividade da SOD e um aumento na atividade da CAT.

Apesar de ter sido observada uma maior atividade da APX e da CAT no talhão soalheira das nas menores altitudes (Gráfico 6 e 7), os níveis de peróxido de hidrogênio não foram menores nesses talhões, evidenciando que a produção dessa molécula excedeu a capacidade de remoção dessas enzimas. Conforme Mullineaux, Karpinsk e Baker (2006), em ambientes com maior exposição à radiação, como no caso do talhão soalheira, há uma maior produção de  $H_2O_2$ , o que induz a expressão de genes do sistema antioxidante, aumentando a capacidade de remoção de EROs.

Os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados a partir do conteúdo de malondialdeído (MDA), um dos produtos finais da peroxidação de ácidos graxos insaturados em fosfolipídeos (SHARMA et al., 2012).

Nas coletas dos meses de janeiro e fevereiro, quando os frutos se encontravam nos estádios cereja e verde em todas as altitudes, baixos conteúdos de MDA foram encontrados, indicando baixos níveis de peroxidação lipídica (Gráfico 10A e 10B). Em abril, foram encontrados valores mais altos de MDA na menor altitude e intermediários na altitude intermediária, enquanto que na maior altitude, os níveis mais baixos foram encontrados no lado da tarde do talhão contra face (Gráfico 10C). Na coleta de maio, menores conteúdos de

MDA foram apresentados por frutos do talhão contra face, da menor altitude e, do talhão soalheira, da maior altitude (Gráfico 10D). Já na coleta de junho, não foram encontradas diferenças entre a menor altitude e a intermediária, enquanto que os frutos, da maior altitude, apresentaram um aumento nos níveis de MDA em relação à coleta anterior (Gráfico 10E). Na última coleta, em julho, os maiores valores de conteúdo do MDA foram encontrados em frutos do talhão contra face, da altitude intermediária.

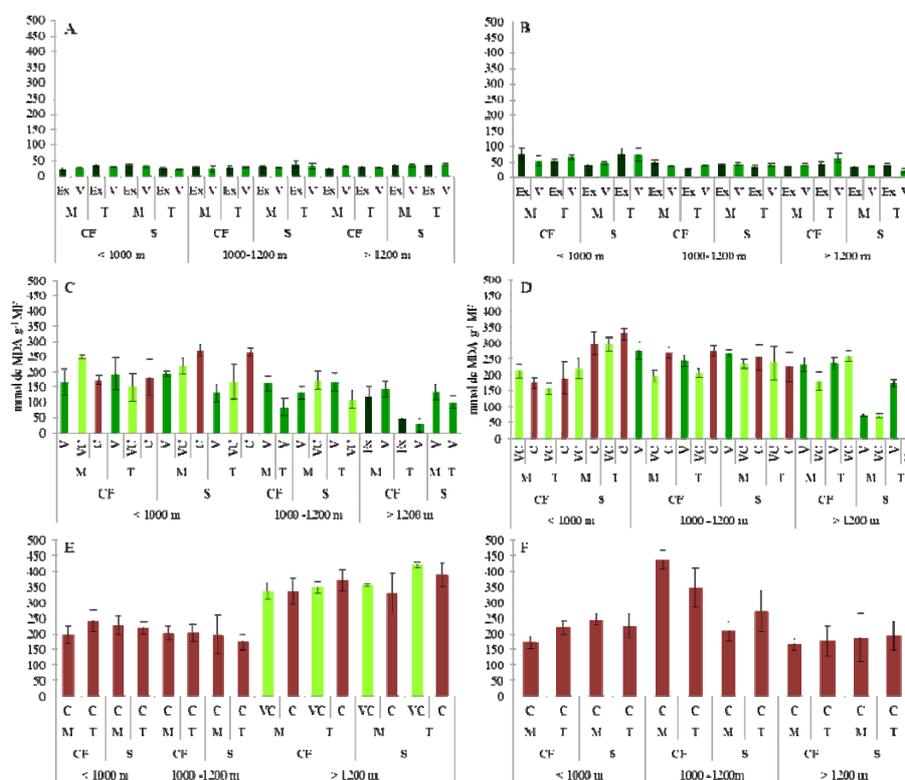


Gráfico 10 Conteúdo malondialdeído (MDA) em frutos de cafeeiros, nos estádios de fruto em expansão (Ex), verde (V), verde cana (VC) e cereja (C), cultivados em três faixas de altitude (< 1000m, 1000-1200 m e >1200m), colhidos nos talhões contra face (CF) e soalheira (S) em diferentes épocas: (A) janeiro, (B) fevereiro, (C) abril, (D) maio, (E) junho, (F) julho

Nota: As barras representam o erro padrão da média (n=3).

Com base nos resultados, pôde-se observar que um aumento nos níveis de MDA foi subsequente ao aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na menor altitude, os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumentaram na segunda coleta (Gráfico 9B), resultando em um aumento da peroxidação lipídica, evidenciada pelo aumento no conteúdo de MDA na coleta seguinte (Gráfico 10C). Na altitude intermediária, foi encontrado um aumento crescente nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a partir da segunda coleta (Gráfico

9B, 9C e 9D), o que resultou em um aumento nos níveis de MDA a partir da terceira coleta (Gráfico 10C e 10D). Já na maior altitude, tanto os níveis de  $H_2O_2$  quanto de MDA aumentaram apenas a partir da quarta coleta e, o aumento no conteúdo de MDA foi mais evidente apenas na quinta coleta (Gráfico 10E).

Os níveis de peroxidação lipídica têm sido amplamente usados como um indicador dos danos a membrana celular mediados pelas EROs, sob condições estressantes, uma vez que, um aumento na peroxidação lipídica ocorre paralelamente a uma maior produção de EROs (SHARMA et al., 2012).

Em goiaba, Mondal et al. (2009) observaram que um aumento nos níveis de  $H_2O_2$  foi acompanhado por um aumento nos níveis de MDA, enquanto que, em tomate (MONDAL et al., 2004), embora os níveis de  $H_2O_2$  tenham apresentado uma ligeira queda com o progresso do amadurecimento, os níveis de MDA foram crescentes.

Os baixos níveis de  $H_2O_2$  e MDA apresentados nas três primeiras coletas por frutos oriundos da maior altitude (Gráficos 9 e 10), possivelmente são devido ao resultado de um eficiente sistema de remoção de EROs nesses frutos, uma vez que na segunda coleta, foi observada uma maior atividade da SOD foi compensada por uma maior atividade das enzimas APX (Gráfico 6B) e CAT (Gráfico 7B) e um maior conteúdo de ascorbato (Gráfico 8B). Dessa forma, evitou-se que danos oxidativos ocorressem, adiando a passagem do estágio de fruto verde para verde cana, o que foi observado apenas na coleta seguinte no mês de maio. Enquanto isso, conteúdos mais altos de  $H_2O_2$  e MDA já na terceira coleta, ainda no mês de abril (Gráficos 9 e 10), podem explicar os ciclos de maturação mais curtos na menor altitude e na intermediária.

Conforme Öncel et al. (2004), plantas alpinas geralmente apresentam um mecanismo de proteção contra danos oxidativos muito mais eficientes, quando comparadas com plantas que crescem em menores altitudes, embora nem sempre seja necessária uma presença efetiva de todos os componentes

antioxidantes. Algumas plantas de baixas altitudes também podem apresentar altos níveis de antioxidantes, compatíveis aos das plantas alpinas, em decorrência dos fatores estressantes presentes em seu local de desenvolvimento.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados comprovam que o aumento da altitude prolonga e uniformiza a maturação e, de modo geral, nos talhões soalheira o ciclo de maturação foi mais curto.

Em todas as características analisadas, percebeu-se que uma maior diferenciação entre as altitudes foi encontrada na coleta do mês de abril, período em que iniciou-se o processo de amadurecimento nas menores altitudes, com passagem do estágio verde para verde cana e para fruto cereja.

Em relação à massa seca e volume, embora nas coletas de janeiro a maio algumas diferenças tenham sido observadas entre as três altitudes, em junho e julho, não foram encontradas diferenças nessas características entre os frutos cereja, mostrando que o tempo de duração do ciclo de maturação não interferiu no tamanho final dos frutos.

A atividade da invertase neutra foi maior que a da invertase ácida, e maiores valores de atividade de ambas as enzimas foram encontrados com predominância em frutos cereja da menor altitude, nas coletas de abril, maio e junho, oriundos do talhão soalheira, no lado da tarde, os quais exibiram um ritmo mais rápido de crescimento.

Frutos oriundos da maior altitude apresentaram, nas primeiras coletas, um sistema de remoção de EROs mais eficiente pelas enzimas, com uma alta atividade da SOD compensada por uma maior atividade das enzimas APX e CAT e um alto conteúdo de ascorbato, resultando em baixos níveis de  $H_2O_2$  e MDA, o que evitou que danos oxidativos ocorressem, adiando a passagem do estágio de fruto verde para verde cana, prolongando o período de maturação. Entretanto, o ciclo de maturação mais curto nas menores altitudes, possivelmente, foi resultado de uma soma de fatores que se iniciaram na terceira coleta no mês de abril, como uma maior atividade das invertases ácida e neutra,

baixos níveis da CAT, APX e ascorbato, com consequente aumento nos níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e MDA.

## REFERÊNCIAS

ALBERTSON, P. L.; PETERS, K. F.; GROF, C. P. L. An improved method for the measurement of cell wall invertase activity in sugarcane tissue. **Australian Journal of Plant Physiology**, Melbourne, v. 28, n. 4, p. 323-328, Apr. 2001.

ALPIZAR, E.; BERTRAND, B. Incidence of elevation on chemical composition and beverage quality of coffee in Central America. In: INTERNATIONAL CONFERENCE IN COFFEE SCIENCE, 20., 2004, Bangalore. **Proceedings...** Bangalore: ASIC, 2004. 1 CD-ROM.

ALVES, J. D. Morfologia do cafeeiro. In: CARVALHO, C. H. S. (Ed.). **Cultivares de café: origem, características e recomendações**. Brasília: EMBRAPA Café, 2008. p. 35-57.

ALVES, J. D.; LIVRAMENTO, D. E. **Morfologia e fisiologia do cafeeiro**. Lavras: UFLA, 2003. v. 1, 49 p.

AMARAL, J. A. T. **Crescimento vegetativo estacional do cafeeiro e suas interações com fontes de nitrogênio, fotoperíodo, fotossíntese e assimilação do nitrogênio**. 1991. 139 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1991.

ANDERSEN, M. N. et al. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize. **Plant Physiology**, Davis, v. 130, n. 2, p. 591-604, Oct. 2002.

ARAKAWA, N. et al. A rapid and sensitive method for the determination of ascorbic acid using 4,7-diphenyl-1,10-phenanthroline. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 45, n. 5, p. 1289-1290, May 1981.

AVELINO, J. et al. Effects of slope exposure, altitude and yield on coffee quality in two altitude terroirs of Costa Rica, Orosi and Santa Maria de Dota. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 85, n. 11, p. 1869-1876, Aug. 2005.

BARBOSA, J. N. et al. Coffee quality and its interactions with environmental factors in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 4, n. 5, p. 181-190, May 2012.

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**, Waterbury, v. 116, n. 2, p. 651-658, Feb. 1998.

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

CAMARGO, A. P.; CAMARGO, M. B. P. Definição e esquematização das fases fenológicas do cafeeiro arábica nas condições tropicais do Brasil. **Bragantia**, Campinas, v. 60, n. 1, p. 65-68, jan. 2001.

CHAGAS, S. J. R.; CARVALHO, V. D.; COSTA, L. Caracterização química e qualitativa de cafés de alguns municípios de três regiões produtoras de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 8, p. 555-561, ago. 1996.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Segunda estimativa**: maio 2012. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_05\\_10\\_08\\_56\\_04\\_boletim\\_cafe\\_-\\_maio\\_2012.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_05_10_08_56_04_boletim_cafe_-_maio_2012.pdf)>. Acesso em: 10 jul. 2011.

CORTEZ, J. G. Controle de fermentações do café e a qualidade da bebida. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS CAFEEIRAS, 19., 1993, Três Pontas. **Resumos...** Rio de Janeiro: MARA, 1993. p. 86.

\_\_\_\_\_. **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.

DAMATTA, F. M. et al. Ecophysiology of coffee growth and production. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 19, n. 4, p. 485-510, Mar. 2007.

DECAZY, F. et al. Quality of different honduran coffees in relation to several environments. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 68, n. 7, p. 2356-2361, 2003.

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, n. 5, p. 729-738, Sept./Oct. 2011.

FARAH, A. et al. Correlation between cup quality and chemical attributes of Brazilian coffee. **Food Chemistry**, London, v. 98, n. 2, p. 373-380, Apr./June 2006.

FILS-LYCAON, B. et al. Acid invertase as a serious candidate to control the balance sucrose versus (glucose + fructose) of banana fruit during ripening. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 129, n. 2, p. 197-206, June 2011.

GEROMEL, C. et al. Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 57, n. 12, p. 3243-3258, Aug. 2006.

\_\_\_\_\_. Effects of shade on the development and sugar metabolism of coffee (*Coffea arabica* L.) fruits. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 46, n. 5/6, p. 569-579, May/June 2008.

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

GUYOT, B. et al. Influence de l'altitude et de l'ombrage sur la qualité des cafés arábica. **Plantations, Recherche, Developpement**, Paris, v. 3, n. 4, p. 272-280, July/Aug. 1996.

HAJIREZAEI, M. R. et al. Impact of elevated cytosolic and apoplasmic invertase activity on carbon metabolism during potato tuber development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 439-445, Feb. 2000. Supplement.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 84, n. 2, p. 450-455, June 1987.

JOËT, T. et al. Influence of environmental factors, wet processing and their interactions on the biochemical composition of green Arabica coffee beans. **Food Chemistry**, London, v. 118, n. 3, p. 693-701, Feb. 2010.

KANAZAWA, S. et al. Changes in antioxidative enzymes in cucumber cotyledons during natural senescence: comparison with those during dark induced senescence. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 109, n. 2, p. 211-216, June 2000.

KOCH, K. E. Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. **Plant Biology**, Stuttgart, v. 7, n. 3, p. 235-246, June 2004.

KOFIDIS, G.; BOSABALIDIS, A. M.; MOUSTAKAS, M. Combined effects of altitude and season on leaf characteristics of *Clinopodium vulgare* L. (Labiatae). **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 60, n. 1, p. 69-76, May 2007.

KY, C. L. et al. Caffeine, trigonelline, chlorogenic acids and sucrose diversity in wild *Coffea arabica*, L. and, *C. canephora*, P. accessions. **Food Chemistry**, London, v. 75, n. 2, p. 223-230, Nov. 2001.

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. H. P. et al. Reguladores vegetais e atividade de invertases em cana-de-açúcar em meio de safra. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 3, p. 718-725, maio/jun. 2009.

LEON, P.; SHEEN, J. Sugar and hormone connections. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, n. 3, p. 110-116, Mar. 2003.

LINGLE, S. E. Sugar metabolism during growth and development in sugarcane internodes. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 1, p. 480-486, Mar. 1999.

LÓPEZ, A. P.; GOCHICOA, M. T. N.; FRANCO, A. R. Activities of antioxidant enzymes during strawberry fruit development and ripening. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 54, n. 2, p. 349-352, 2010.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 490-498, Oct. 2004.

MONDAL, K. et al. Antioxidant systems in ripening tomato fruits. **Biologia Plantarum**, Copenhagen, v. 48, n. 1, p. 49-53, 2004.

\_\_\_\_\_. Oxidative stress and antioxidant systems in Guava (*Psidium guajava* L.) fruits during ripening. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, New York, v. 15, n. 4, p. 327-334, Oct. 2009.

MOORE, B. et al. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. **Science**, New York, v. 300, n. 11, p. 332-336, Apr. 2003.

MORAIS, H. et al. Escala fenológica detalhada da fase reprodutiva de *Coffea arabica*. **Bragantia**, Campinas, v. 67, n. 1, p. 257-260, Aug. 2008.

MULLINEAUX, P. M.; KARPINSKI, S.; BAKER, N. R. Spatial dependence for hydrogen peroxide-directed signaling in light-stressed plants. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 141, p. 346-350, June 2006.

NACIF, A. P. de. **Fenologia e produtividade do cafeeiro (*Coffea arabica* L.) cv. Catuaí sob diferentes densidades de plantio e doses de fertilizantes, no cerrado de Patrocínio, MG**. 1997. 124 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1997.

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

NOGUEIRA, A. et al. Avaliação da maturação dos frutos de linhagens das cultivares Catuaí Amarelo e Catuaí Vermelho (*Coffea arabica* L.) plantadas individualmente e em combinações. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 18-26, jan./fev. 2005.

NONIS, A. et al. Differential expression and regulation of a neutral invertase encoding gene from peach (*Prunus persica*): evidence for a role in fruit development. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 129, n. 2, p. 436-446, Feb. 2007.

ÖNCEL, I. et al. Role of antioxidant defense system and biochemical adaptation on stress tolerance of high mountain and steppe plants. **Acta Oecologia**, Paris, v. 26, n. 3, p. 211-218, Dec. 2004.

ORGANIZACION INTERNACIONAL DEL CAFÉ. **Estudios de investigación de evaluación sensorial sobre la calidad del café cultivado en la región de Patrocinio en el Estado de Minas Gerais en Brasil: reporte de evaluación sensorial**. London, 1991. 28 p.

PASTORI, G. M.; RIO, L. A. del. Natural senescence of pea leaves: an activated oxygen-mediated function for peroxisomes. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 113, n. 2, p. 411-418, Feb. 1997.

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, n. 3, p. 283-289, Sept. 2005.

PEREIRA, R. G. F. A. **Efeito da inclusão de grãos defeituosos na composição química e qualidade do café (*Coffea arabica* L.) “Estritamente Mole”**. 1997. 96 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

PEZZOPANE, J. R. M. et al. Escala para avaliação de estádios fenológicos do cafeeiro Arábica. **Bragantia**, Campinas, v. 62, n. 3, p. 499-505, 2003.

REN, H. X. et al. Antioxidative responses to different altitudes in *Plantago major*. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 42, n. 1, p. 51-59, Aug. 1999.

RENA, A. B.; MAESTRI, M. Fisiologia do cafeeiro. In: RENA, A. B. et al. (Ed.). **Cultura do cafeeiro**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: POTAFOS, 1986. p. 13-85.

RIO, L. A. del et al. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 116, n. 4, p. 1195-1200, Apr. 1998.

RODRIGUES, C. I. et al. Stable isotope analysis for green coffee bean: a possible method for geographic origin discrimination. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 22, n. 5, p. 463-471, Aug. 2009.

ROITSCH, T.; GONZÁLEZ, M. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations. **Trends in Plant Science**, London, v. 9, n. 12, p. 606-613, Dec. 2004.

RUAN, Y. L. et al. Boyer sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. **Molecular Plant**, Saint Paul, v. 3, n. 6, p. 942-955, Nov. 2010.

SHARMA, P. et al. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, London, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jb/2012/217037/cta>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

SILVA, E. A. et al. The influence of water management and environmental conditions of the chemical composition and beverage quality of coffee beans. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Piracicaba, v. 17, n. 2, p. 229-238, Apr./June 2005.

STURM, A. Invertases: primary structure, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 121, n. 1, p. 1-7, Jan. 1999.

STURM, A.; TANG, G. Q. The sucrose-cleaving enzymes of plants are crucial for development, growth and carbon partitioning. **Trends in Plant Science**, London, v. 4, n. 10, p. 401-407, Oct. 1999.

TAVEIRA, J. H. S. et al. O ambiente e a qualidade do café desmucilado produzido na microrregião da Serra da Mantiqueira. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 7., 2011, Araxá. **Anais...** Araxá: Sbicafé, 2011. 1 CD-ROM.

TROUVERIE, J. et al. Regulation of vacuolar invertase by abscisic acid or glucose in leaves and roots from maize plantlets. **Planta**, Berlin, v. 219, n. 5, p. 894-905, Sept. 2004.

VAAST, P. et al. Fruit thinning and shade improve bean characteristics and beverage quality of coffee (*Coffea arabica*, L.) under optimal conditions. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 86, n. 2, p. 197-204, Jan. 2006.

VARGAS, W. A.; SALERNO, G. L. The Cinderella story of sucrose hydrolysis: alkaline/neutral invertases, from cyanobacteria to unforeseen roles in plant cytosol and organelles. **Plant Science**, Shannon, v. 178, n. 1, p. 1-8, Jan. 2010.

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**, Shannon, v. 151, n. 1, p. 59-66, Feb. 2000.

VILELA, E. R.; PEREIRA, R. G. F. A. Pós-colheita e qualidade do café. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 14., 1998, Lavras. **Resumos...** Lavras: UFLA/SBEA, 1998. p. 219-274.

WESCHKE, W. et al. The role of invertases and hexose transporters in controlling sugar ratios in maternal and filial tissues of barley caryopses during early development. **Plant Journal**, Oxford, v. 33, n. 2, p. 395-411, Jan. 2003.

WINTER, H.; HUBER, S. S. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, Boca Raton, v. 35, n. 4, p. 253-289, 2000.

XIANG, L. et al. Neutral invertase, hexokinase and mitochondrial ROS homeostasis emerging links between sugar metabolism, sugar signaling and ascorbate synthesis. **Plant Signaling & Behavior**, Bonn, v. 6, n. 10, p. 1567-1573, Oct. 2011.

YAO, S. et al. Analysis of the rice SHORT-ROOT5 gene revealed functional diversification of plant neutral/alkaline invertase family. **Plant Science**, Clare, v. 176, n. 5, p. 627-634, May 2009.

YE, Z. et al. The developmental transition to flowering represses ascorbate peroxidase activity and induces enzymatic lipid peroxidation in leaf tissue in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Science**, Clare, v. 158, n. 1/2, p. 115-127, Sept. 2000.

ZENG, Y. et al. Rapid repression of maize invertases by low oxygen: invertase/sucrose synthase balance, sugar signaling potential, and seedling survival. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 121, n. 2, p. 599-608, Oct. 1999.

ZHU, J. T. et al. Ecophysiological adaptation of *Calligonum roborovskii* to decreasing soil water content along an altitudinal gradient in the Kunlun mountains, Central Asia. **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 57, n. 6, p. 826-832, June 2010.

ZIMMERMANN, P. et al. Senescence specific regulation of catalase in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 29, n. 6, p. 1049-1060, June 2006.