

SIMONE NADUR MOTTA LEDUC

**Indução de Tolerância à Dessecação e Variações de  
Carboidratos Solúveis em Sementes de *Caesalpinia  
echinata* Lam. (Pau-Brasil) durante a Maturação**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

São Paulo

2007

SIMONE NADUR MOTTA LEDUC

**Indução de Tolerância à Dessecação e Variações de  
Carboidratos Solúveis em Sementes de *Caesalpinia  
echinata* Lam. (Pau-Brasil) durante a Maturação**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do Título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na área de Plantas Vasculares em Análises Ambientais

**ORIENTADORA: Dra. RITA DE CÁSSIA L. FIGUEIREDO RIBEIRO**

## Aos meus pais

Sílvia de Oliveira Motta (*in memoriam*) e Magali Nadur Motta

“Foi com seus sonhos, de seus esforços que germinou, cresceu e amadureceu o fruto de suas aspirações.”

Ao meu pai

“Existir não é estar vivo, é viver em alguém, eternamente lembrado”

## A minha preciosa família

Eduardo, meu esposo que tanto estimo,  
pelo apoio, companheirismo, paciência, estímulo em nunca me deixar desistir e  
acima de tudo pelo amor dedicado.

Aos meus filhos,  
Pedro Arthur, Nathaly e Raíssa por achar o máximo a mamãe estudar...

E aos meus irmãos,  
Sílvia, Adriana e Ricardo que tanto admiro

Dedico

## Homenagem Especial

À minha mestra,

Por ter me recebido como aluna, ter acreditado e confiado em mim. Ter sido meu porto seguro nesta conquista, respeitando e valorizando os meus limites e esforços. Ter permitido meu sonho acontecer e ter tido uma infinita paciência.

**Dra. Rita de Cássia L. Figueiredo Ribeiro**

Esta conquista tem a vossa presença.

## Agradecimentos

Um especial agradecimento ao Professor Dr. Claudio José Barbedo, pelo valioso e eficiente auxílio nesta conquista, apoio e incentivo no meu aperfeiçoamento profissional.

Agradeço também:

À FAPESP, pelo auxílio financeiro ao Projeto temático Processo 2000/06422-4, ao qual este trabalho estava inserido e a CAPES, pela concessão da Bolsa de Mestrado.

Aos funcionários da Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu pela gentileza e cordialidade, particularmente dos Pesquisadores João Del Giudice Neto e Marcos Mecca Pinto, pela receptividade e apoio nos experimentos desenvolvidos na Fazenda Campininha.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, especialmente à Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelas facilidades oferecidas e às Coordenadoras Dra. Sônia M. de Campos Dietrich e Dra. Solange C. Mazzoni Viveiros, do Curso de Pós-graduação do Instituto de Botânica de São Paulo, pela oportunidade para formação de futuros cientistas.

À Dra. Márcia Regina Braga, Chefe da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas pelo apoio e por valiosas sugestões na redação deste trabalho.

Aos professores pesquisadores, Dra. Maria Angela M. Carvalho, Dr. Marco Aurélio S. Tiné, Dra. Marília Gaspar Maïs, Dr. Edison Paulo Chu por contribuições valiosas nos experimentos laboratoriais.

Às funcionárias da Seção de Fisiologia e Bioquímica de Plantas do Instituto de Botânica pela amizade e inestimável auxílio durante a realização desse trabalho, em especial Ana Alice, Cida e Mary e à Marcinha, Secretária da Pós Graduação, pela atenção dispensada.

Aos meus amigos do Index pelo companheirismo: Angélica Diaz, Carmem Cinira, Carolina Oliveira, Denise Cardoso, Igor Borges, João Paulo Molina, Edmir Lamarca, Liliana Delgado, Márcio Bonjovani, Nestor Martini e Paulo Santana.

Às meninas da Fisiologia, pelo auxílio infinito no decorrer deste trabalho, pelas discussões científicas, pelas conversas engraçadas que pautaram uma convivência rica e harmoniosa, pela cumpridão acima de tudo nos momentos difíceis, são elas: Amanda Asega, Amanda de Souza, Amanda Pereira de Souza, Claudia Alves, Fernanda Macedo, Vanessa Oliveira, Kelly Simões, Tatiana Botelho, Ludmila Raggi, Roberta Moretto, Roberta Agopian, Aline Cavalari, Paola Garcia, Patrícia Pinho, Marina Martins, Vanessa Costa e também aos meninos Moacir Hellmann, Rodrigo Cáccere, Marcelino Souza, João Paulo Naldi e Fábio Dalle Molle.

Um grande agradecimento à Fernanda Kretzschmar, pela ajuda e disponibilidade constante na execução desse trabalho.

Agradeço também à Juliana Iura de Oliveira Mello, pelo valioso auxílio em todos os meus momentos no laboratório e na realização dos experimentos e redação dessa dissertação.

A Cristina Rita Radics Kozsco pelo incentivo e amizade.

Ao casal Moacir e Denise Marco pelo apoio e disponibilidade constante nas análises laboratoriais e preparo de apresentações.

E, finalmente, mas o mais importante, a Deus que colocou tanta gente competente e de boa vontade no meu caminho, para suprir minhas deficiências, permitindo que eu chegasse ao término desse trabalho.

Cada passo da vida, é dado, normalmente, porque buscamos algo. Têm passos rápidos, outros lentos, com tropeços, espinhos, lama ou flores, risos e alegrias. Cada um, no seu tempo. A voz do coração fala alto e dá forças para não desistir. Mas haja paciência !!! Têm passos que levam 20 anos!!! Esperanças não ficam para trás...andam à frente, e na certeza que esta hora chegaria, jamais desisti. A maior emoção é saber que o passo foi dado!!!

Aqui deixo uma lição de vida...

Nunca desista de um sonho, mesmo que este lhe custe  
20 anos para acontecer.....

“Não é apenas sorte. Eu acredito que todas as coisas boas que nos acontecem são de acordo com nosso merecimento. Se lhe acontecem coisas boas é porque você as merece. O mesmo, para coisas ruins. Assim, agradeço a Deus por ter me dado mais coisas boas do que ruins em minha vida.”

(Faria, J. M. R., 2006 PhD tese)

# Índice

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	BIODIVERSIDADE E MATA ATLÂNTICA.....	1
1.2	CAESALPINIA ECHINATA LAM. (PAU-BRASIL).....	3
1.3	A SEMENTE.....	9
1.4	MATURIDADE FISIOLÓGICA DE SEMENTES.....	10
1.5	SEMENTES ORTODOXAS E RECALCITRANTES.....	11
1.6	TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO E COMPOSTOS DE RESERVA.....	15
1.7	CARBOIDRATOS SOLÚVEIS E TOLERÂNCIA À DESSECAÇÃO .....	17
1.8	RELAÇÕES HÍDRICAS EM SEMENTES.....	21
1.9	CONDICIONAMENTO OSMÓTICO DE SEMENTES.....	25
1.10	JUSTIFICATIVAS E HIPÓTESE .....	28
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	31
3.2	DETALHAMENTO DO MATERIAL DE ESTUDO.....	32
3.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA, CONTEÚDO DE MATÉRIA SECA E POTENCIAL HÍDRICO DAS SEMENTES .....	35
3.4	SECAGEM E CONDICIONAMENTO OSMÓTICO DAS SEMENTES .....	36
3.5	GERMINAÇÃO.....	38
3.6	EXTRAÇÃO E ANÁLISE DE CARBOIDRATOS SOLÚVEIS .....	39
3.7	PURIFICAÇÃO DOS CARBOIDRATOS E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (HPLC).....	40
3.8	QUANTIFICAÇÃO DE AMIDO .....	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
4.1	EXPERIMENTOS PRELIMINARES.....	43
4.1.1	Avaliação do comportamento de sementes imaturas de pau-brasil desidratadas com polietilenoglicol (PEG) e sacarose.....	44
4.1.2	Alterações do potencial hídrico de sementes imaturas de pau-brasil induzidas por PEG e seu efeito na qualidade fisiológica das sementes .....	47
4.1.3	Efeito de diferentes métodos de secagem e nível de tolerância à dessecação sobre a germinabilidade de sementes imaturas de pau-brasil (Lote 2005) .....	51
4.2	VARIAÇÃO NOS TEORES E NA COMPOSIÇÃO DE AÇÚCARES SOLÚVEIS E AMIDO DE SEMENTES DE PAU-BRASIL EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO E APÓS SEREM SUBMETIDAS A DIFERENTES MÉTODOS DE SECAGEM (LOTE 2006).....	59
4.2.1	Variações dos teores de açúcares solúveis e amido nas sementes submetidas a diferentes métodos de secagem.....	61

4.2.2	Variações nos teores dos principais açúcares solúveis das sementes em diferentes estádios de maturação e após diferentes métodos de secagem.....	67
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>85</b>
5.1	VARIAÇÕES DE MATÉRIA SECA, CARBOIDRATOS DE RESERVA E CAPACIDADE GERMINATIVA DE SEMENTES DE <i>C. ECHINATA</i> NOS DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO E SUBMETIDAS A DIFERENTES TRATAMENTOS DE SECAGEM.....	85
5.2	VARIAÇÕES NOS PRINCIPAIS CARBOIDRATOS SOLÚVEIS.....	89
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>COMENTÁRIOS FINAIS.....</b>	<b>92</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>93</b>
<b>9</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>103</b>
<b>10</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>106</b>
<b>11</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>108</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Biodiversidade e Mata Atlântica

Apesar da biodiversidade brasileira ser uma das mais ricas do mundo, abrigando cerca de 20% das espécies do planeta, as informações sobre essa riqueza ainda são escassas. Na atualidade, manter a biodiversidade é uma das principais preocupações da humanidade devido aos efeitos da degradação ambiental e do crescente aumento do número de espécies ameaçadas de extinção.

Os impactos das mudanças climáticas, que incluem o aumento da temperatura e as emissões de gás carbônico, podem ter efeitos positivos sobre o crescimento das plantas, a princípio, porém, à medida que a temperatura aumenta, o fenômeno se inverte e a vegetação começa a ser prejudicada. O avanço das ações antrópicas sobre áreas naturais vem debilitando cada vez mais os ecossistemas e, em especial, a biodiversidade, ocasionando o desaparecimento de muitas espécies, reduzindo a variabilidade genética e facilitando a proliferação de espécies invasoras. Importante salientar que o desmatamento das florestas tropicais responde por 25% das emissões globais de dióxido de carbono, o principal gás do efeito estufa (Laboratório de Ciências do Clima e do Meio Ambiente (LSCE), Jornal do Estado de São Paulo, 2007-04-04).

No Brasil, grande parte dos problemas ambientais, relaciona-se com a ausência de uma cultura de ocupação dos seus espaços, respeitando as características dos diversos biomas, notadamente suas riquezas, diversidade e dinâmica funcional e estrutural (Mantovani 2000).

Estima-se que as florestas tropicais contenham, pelo menos, 50% de todas as espécies da superfície terrestre, não obstante cubram apenas 7% de sua área. Apesar da sua importância, as espécies dessa região estão sendo exauridas mais rapidamente do que as de qualquer outra região do planeta; possuem alto grau de endemismo, isto é, um grande número de espécies encontradas exclusivamente em determinada área (Myers *et al.* 2000). Dentre as florestas tropicais, destaca-se a Mata Atlântica, segunda floresta neotropical em tamanho, depois da Floresta Amazônica. Originalmente correspondia a cerca de 20% do território brasileiro espalhando-se por 17 estados. Hoje está reduzida a apenas 7,3% de sua cobertura original, em grande parte fragmentada e ainda sob ameaça de destruição em várias regiões (Adams 2000).

A Mata Atlântica é um complexo e exuberante conjunto de ecossistemas de grande importância, por abrigar uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil. É um dos biomas tropicais com maior diversidade biológica, não possui fisionomia uniforme e é o mais ameaçado do mundo devido às constantes agressões ou ameaças de destruição dos habitats nas suas variadas tipologias e ecossistemas associados (INPE 2003).

Devido à alta diversidade florística, a Mata Atlântica está incluída entre os cinco maiores ecossistemas do mundo em número de espécies. É considerada um “*hot spot*” de biodiversidade por ser um bioma que contém pelo menos 0,5% das 300.000 espécies endêmicas de plantas do planeta e já ter sido intensamente devastada, com descaracterização de pelo menos 70% da vegetação nativa (Myers *et al.* 2000). No entanto, pouco se conhece sobre o ciclo de vida de inúmeras espécies e, conseqüentemente, sua importância para a manutenção desse complexo mosaico de ecossistemas. Sua destruição para fins diversos, ainda verificados nos dias atuais, precisa ser revertida para que a diversidade possa ser conservada (Rocha 2004).

Diversas espécies arbóreas nativas com grande potencial de utilização na arborização urbana e reflorestamento têm seu uso limitado em função da carência de informações científicas que permitam subsidiar tais iniciativas e de informações técnicas sobre o manejo de suas sementes.

Alternativas para a manutenção da variabilidade genética de plantas incluem o cultivo de mudas em viveiros ou implantação de bosques. Esses métodos apresentam várias dificuldades, como alto custo financeiro, disposição de amplo espaço físico para o cultivo e manutenção dos exemplares, mão-de-obra qualificada, além de cuidados periódicos, como irrigação, adubação, controle de pragas e doenças (Barbedo *et al.* 2005). O cultivo e a utilização de plantas arbóreas em espaços urbanos também vem sendo considerado uma alternativa para a conservação de espécies (Rocha 2004).

Uma forma para a preservação da variabilidade genética de plantas, seria a manutenção em bancos de germoplasma, a -20 °C (Salomão 2002), ou através da criopreservação, que consiste na conservação de materiais biológicos a -196 °C, empregando-se nitrogênio líquido, buscando-se a paralisação dos processos metabólicos. Essa técnica é eficiente, por exemplo, para a conservação de sementes ortodoxas de *Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl. (Medeiros & Cavallari 1992) e para embriões de *Araucaria hunsteinii* K. Schum (Pritchard & Prendergast 1986). No entanto, tal técnica é muitas vezes inviável devido ao alto custo.

Assim, o armazenamento de sementes é a forma mais simples, viável e econômica de conservar e preservar os genótipos de plantas *ex situ* (conservação de espécies vegetais fora do seu ambiente natural).

## 1.2 *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-brasil)

*Caesalpinia echinata* Lam. (**Figura 1**) é uma espécie nativa do Brasil, pertencente à família Leguminosae, e subfamília Caesalpinioideae, sendo conhecida na linguagem tupi-guarani, como ibirapitanga (pau-vermelho) (Cunha & Lima 1992; Lorenzi 1992). É uma espécie endêmica originária da floresta pluvial atlântica, a Mata Atlântica, e é considerada uma das árvores mais raras desse bioma devido à exploração excessiva e ao desmatamento em grande escala ocorrido nos últimos 500 anos. Esta árvore foi muito valorizada como madeira de tintura e, de 1501 até cerca de 1850, enormes quantidades foram extraídas da costa oriental brasileira. Em função dessa ampla exploração, sua distribuição original reduziu-se a pequenos remanescentes (Rocha 2004), uma vez que a produção racional da árvore não tem sido estimulada; para este fim são necessárias árvores com pelo menos 30 anos de vida (Carvalho 1994).

No início da colonização brasileira, século XVI, iniciou-se a extração, o comércio e o tráfico da madeira de pau-brasil, constituindo-se o primeiro ciclo econômico da colônia. A espécie era utilizada na construção civil e naval, e o principal interesse era para extração do corante encontrado em seu cerne, a brasilina. Esta substância é incolor naturalmente, mas quando em contato com soluções alcalinas e em reação com o oxigênio atmosférico se torna vermelha, transformando-se em brasileína, utilizada no tingimento de tecidos de algodão, penas e como tinta para máquinas de escrever (Vianna 1944 *in* Rocha 2004). Por ser de madeira pesada, compacta e resistente, ainda é explorada para a confecção de arcos de violino (Longui 2005).

A espécie faz parte das raízes socio-culturais da colonização do Brasil e foi o único produto do primeiro ciclo econômico brasileiro. Esta espécie movimentou a economia européia nos séculos XVI, XVII e XVIII pelo comércio de brasileína e durante 375 anos sua madeira foi exaustivamente extraída do litoral brasileiro. É a única planta que deu nome a um país (Rocha 2004).



**Figura 1.** Árvore de pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), tronco com acúleos visíveis, porte elegante, copa arredondada e folhas verde-brilhantes.

Tem ocorrência natural desde o Estado do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro, numa extensa faixa de 3.000 km. Quando a árvore ficou escassa na região mais próxima ao litoral, os índios percorriam distâncias de até 120 km, para sua exploração. É uma árvore que cresce tipicamente em floresta primária densa, sendo raramente encontrada em formações secundárias; atualmente há poucos exemplares de pau-brasil ocorrendo naturalmente nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Alagoas, Pernambuco e Rio Grande do Norte (Rocha 2004).

*Caesalpinia echinata* tem potencial ornamental (**Figuras 1 e 2**) devido à beleza e porte da árvore, copa arredondada, folhas verde-brilhantes e flores em cacho amarelo-ouro, suavemente perfumadas. As flores de uma mesma árvore ou de uma mesma inflorescência geralmente não são polinizadas ou fecundadas simultaneamente, de modo que a completa uniformidade de desenvolvimento das sementes nunca é esperada. Portanto, pesquisas que envolvem o estudo de maturação de sementes com este comportamento devem ser conduzidas mediante a coleta de amostras com intervalos definidos e avaliação do desenvolvimento individual a partir de etiquetagem das flores nas inflorescências (Marcos Filho 2005).



**Figura 2.** Inflorescência de *Caesalpinia echinata* com botões florais e flores em diferentes estágios de desenvolvimento.

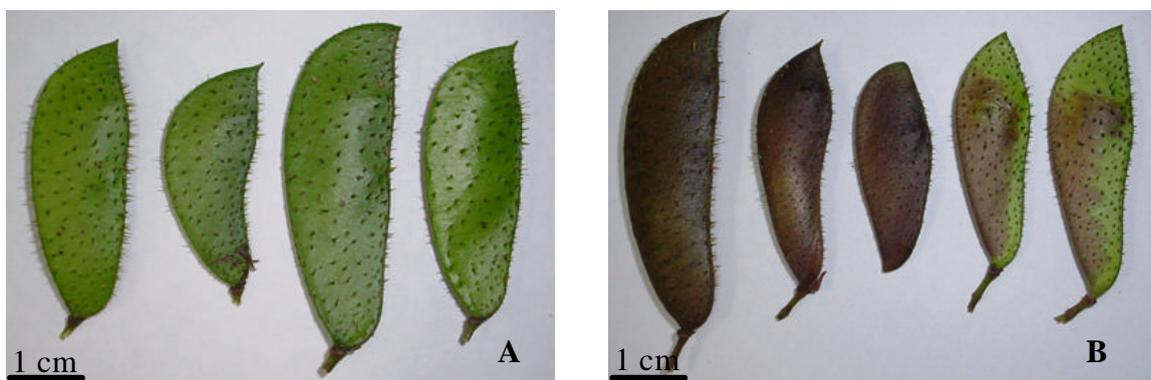
A árvore adulta possui cerca de 8 a 12 metros de altura, com tronco variando de 30 a 40 centímetros de diâmetro à altura do peito. Registros apontam em áreas naturais crescimento de até 30 metros de altura, podendo atingir até 70 centímetros de diâmetro (Aguiar 2000). Apresenta acúleos resistentes, folhas compostas, bipinadas de 10 a 15 centímetros, com 3 a 7 pinas e de 8 a 21 folíolos. Os frutos com 6 a 8 centímetros de comprimento e 2 a 3 centímetros de largura são oblíquos, podendo ser mais largos no ápice (**Figuras 3 e 4**). Suas sementes (**Figuras 5 e 6**), de coloração acastanhada, são normalmente planas e irregularmente orbiculares, com 1 a 1,50 cm de diâmetro (Cunha & Lima 1992). No estado de São Paulo, o período de floração ocorre entre setembro e outubro e a maturação dos frutos entre novembro e dezembro, podendo estender-se até janeiro. Da antese até a deiscência dos frutos ou maturação completa ocorre em média de 65 a 70 dias, variando conforme as mudanças do ciclo sazonal e intempéries (Borges *et al.* 2005).



**Figura 3.** Infrutescência de *Caesalpinia echinata* com frutos em início de desenvolvimento, aproximadamente 25 dias após a antese (DAA).

As sementes de pau-brasil perdem a germinabilidade, em aproximadamente um mês, quando armazenadas, sob temperatura superior a 15 °C, mas quando armazenadas a 8 °C mantêm a capacidade germinativa por até 18 meses. Possuem comportamento de sementes ortodoxas em relação à água no final do período de maturação e são tolerantes à dessecação (Barbedo *et al.* 2002). A germinação é epígea, com início entre o segundo e terceiro dia após a sementeira. O poder germinativo é alto, em média 80%, podendo chegar a 100% (Mello 2004).

A árvore de pau-brasil vem sendo indicada para arborização urbana devido ao seu porte elegante, entre outros atributos favoráveis (Barbedo *et al.* 2005), apesar de ser sensível, enquanto jovem, aos poluentes aéreos de grandes cidades (Bulbovas 2005). Iniciativas públicas e privadas para a conservação do pau-brasil foram feitas através de implantação de bosques homogêneos, algumas vezes em áreas de ocorrência não natural da espécie (Rocha 2004), como os mantidos pelo Instituto de Botânica, no Estado de São Paulo, no Parque Estadual Fontes do Ipiranga, em São Paulo e na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (SP).



**Figura 4.** Frutos de pau-brasil com aproximadamente 45 DAA (A) e 55 DAA (B).

A espécie é indicada para a composição de plantios heterogêneos destinados à recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente, incluindo-se no potencial de utilização a arborização urbana e a fabricação de instrumentos musicais (Aguiar & Barbosa 1985). De importância histórica e sócio-cultural para o Brasil, esta espécie figura entre as ameaçadas de extinção (Rocha 2004).



**Figura 5.** Sementes de *Caesalpinia echinata* em diferentes estádios de maturação, coletadas em 2006, após beneficiamento de frutos imaturos (A); sementes selecionadas com 45 DAA (B) e com 55 DAA (C).



**Figura 6.** Sementes recém-colhidas de *Caesalpinia echinata* com 65 DAA, após beneficiamento de frutos maduros.

### 1.3 A semente

As sementes representam, para a maioria das espécies, não apenas a estrutura básica de propagação, fundamental para o sucesso da atividade agrícola, mas também um reservatório genético que pode ser preservado de maneira segura, econômica e por longos períodos.

As sementes são indivíduos independentes da planta mãe, podendo se desenvolver em outro local com suas próprias reservas nutritivas, armazenadas principalmente na forma de carboidratos, lipídios e proteínas. Tais reservas são consumidas durante a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula capacitada a se manter de forma autotrófica, ou seja, capaz de retirar do ambiente os nutrientes necessários para seu estabelecimento e desenvolvimento (Buckeridge *et al.* 2004a).

São formadas por tecidos diplóides originários da planta-mãe, constituídas pelo embrião que pode ser envolvido pelo tegumento e endosperma, de acordo com a espécie (Bewley & Black 1994, Beltrati & Paoli 2003). Na maioria das espécies, embrião e endosperma ocupam a maior parte do volume da semente, enquanto os tegumentos se transformam em revestimento da mesma, sofrendo considerável redução em espessura e desorganização parcial (Esau 1974).

A germinação de sementes inclui diversos eventos como embebição, reativação do metabolismo, aumento na atividade respiratória, atividade enzimática e de organelas, síntese de proteínas e ácidos nucleicos, hidratação das proteínas, mudanças estruturais subcelulares e alongamento celular, que de modo integrado transformam a semente com baixo teor de água e metabolismo reduzido em uma estrutura com metabolismo vigoroso, culminando no crescimento do embrião (Bewley & Black 1994).

O processo de desenvolvimento ou maturação de sementes é controlado geneticamente e envolve uma seqüência ordenada de alterações morfológicas, físicas, fisiológicas e bioquímicas que ocorrem a partir da fecundação do óvulo e prosseguem até o momento em que as sementes se desligam fisiologicamente da planta, ou seja, atingem a maturidade fisiológica. Após a fertilização, há um período de formação da estrutura da semente, mediante a divisão, expansão e diferenciação celulares. Durante essa fase, ocorre o aumento do tamanho das sementes, mas o grau de umidade permanece constante e elevado, passando a decrescer à medida que as sementes perdem água sem que ocorram acréscimos significativos da massa seca (Beltrati & Paoli 2003).

Andrews (1966) avaliou a seqüência de variações do grau de umidade, tamanho, massa seca, germinação e vigor durante o desenvolvimento de sementes de soja, identificando quatro estádios de desenvolvimento durante o processo de maturação: no primeiro, destacou o crescimento lento dos frutos e das sementes e do baixo teor de matéria seca, enquanto o grau de umidade permanecia entre 80% e 90%. O segundo estágio caracterizou-se pelo rápido crescimento dos frutos e das sementes, aproximando-se de seu máximo tamanho, o mesmo ocorrendo com o acúmulo de matéria seca; durante este período as sementes tornaram-se capazes de germinar. No terceiro estágio, os frutos atingiram e mantiveram a máxima espessura, enquanto a morfologia das sementes passou a exibir as características peculiares do cultivar estudado, inclusive a forma globosa. Durante o quarto e último estágio, as sementes secaram rapidamente, apresentaram ligeiro decréscimo no tamanho, o grau de umidade situou-se entre 10% e 15%, enquanto a germinação e o vigor mantiveram níveis elevados e estáveis.

#### 1.4 Maturidade fisiológica de sementes

Maturidade fisiológica, ponto de maturação, ponto de colheita, maturidade agrônômica ou maturidade da semente, são termos adotados para definir o momento em que as sementes cessam o acúmulo de matéria seca (Marcos Filho 2005). É o momento a partir do qual não ocorrem mais acréscimos significativos na massa seca das sementes. Contudo, devido ainda à presença de elevado teor de água, esta fase, muitas vezes, não é a recomendada para colheita das sementes (Araújo *et al.* 2006).

Esse período marca a suspensão do transporte no floema e, em alguns casos, ocorrem mudanças específicas nos tecidos que ligam a semente à planta-mãe. A interrupção da importação de fotoassimilados pelo floema e/ou a separação da semente da planta-mãe na região do funículo podem ser o sinal para o início da fase final do processo de desenvolvimento da semente. Conforme a espécie, os últimos 5 a 10 dias do desenvolvimento antes da deiscência dos frutos e completa desidratação natural, têm uma influencia importante na qualidade e no vigor da semente (Demir & Ellis 1992 a e b, Sanhewe & Ellis 1996).

O grau de umidade das sementes, o conteúdo de matéria seca e aspectos morfológicos do fruto e/ou semente, bem como o número de dias após o início do florescimento ou dias após antese (DAA) figuram entre os critérios propostos e mais

aceitos para identificar a fase de maturidade das sementes (Carvalho & Nakagawa 2000).

Borges *et al.* (2005) verificaram que em sementes de *Caesalpinia echinata* a matéria seca aumentou dos 32 até os 70 DAA, quando atingiu, em média, o valor máximo de 316 mg/semente, indicando que a fase de maturidade fisiológica destas sementes provavelmente estaria próxima a 60 - 65 DAA. Esse período pode variar de acordo com as condições de temperatura e umidade durante o ciclo sazonal de desenvolvimento no ano da colheita. O crescimento dos frutos e das sementes aumentou até os primeiros 48 DAA, modificando-se pouco até o final do processo. Com relação à capacidade germinativa, aos 40 DAA, as sementes já apresentavam cerca de 40% de germinação, atingindo 100% aos 52 DAA, ou seja, muito antes das sementes atingirem o máximo acúmulo de matéria seca (70 DAA), permanecendo alto até o final do desenvolvimento. Com relação ao desenvolvimento de plântulas vigorosas, os maiores valores foram observados para sementes colhidas aos 59 DAA (Borges *et al.* 2005).

Um dos problemas determinantes da queda da qualidade das sementes após a maturidade fisiológica é sua permanência no solo, o que as expõe na fase final de maturação, a alternância de períodos secos e úmidos, aliados a temperaturas elevadas. Essa situação predispõe à ocorrência de injúrias no tegumento, como consequência de expansões e contrações após uma série de ciclos de umedecimento e secagem. Como o tegumento não é perfeitamente elástico, a primeira consequência dessa situação é o enrugamento e, se houver continuidade de condições desfavoráveis, ocorre ruptura, como observado em sementes de *C. echinata* (Hellmann *et al.* 2006).

## 1.5 Sementes ortodoxas e recalcitrantes

Durante o período de formação e maturação de sementes a água assume papel crucial e seu teor permanece elevado até o final do desenvolvimento. De acordo com Roberts (1973), as sementes podem apresentar dois tipos de comportamento distintos em relação à água ao final da maturação. As sementes ortodoxas (anidrobióticas) são aquelas que podem ser desidratadas até o valor final de cerca de 5% de água e armazenadas a -18°C. Hoekstra *et al.* (2001) designaram como anidrobióticas as sementes que apresentam elevado grau de sobrevivência em ambientes sem a presença de água. Nessas condições, a longevidade das sementes pode ser prolongada por muitas

décadas de forma previsível e, por esta razão, tais condições de armazenamento são freqüentemente adotadas. As sementes ortodoxas ao final da maturação, não só toleram a dessecação, mas, provavelmente, dependem desse processo para redirecionar seu metabolismo para a germinação (Barbedo & Marcos Filho 1998).

A maioria das espécies agrícolas produz sementes ortodoxas, como o trigo, arroz, feijão, soja, milho, cevada, etc. Sementes de várias espécies arbóreas também apresentam esse comportamento, como jatobá (*Hymenaea courbaril*), tamboril (*Enterolobium contortisiliquum*), angico (*Adenanthera peregrina*), canafístula (*Peltophorum dubium*), pau-brasil (*Caesalpinia echinata*) e sesbania (*Sesbania virgata*) (Faria 2006).

As sementes recalcitrantes (não anidrobióticas), em contraste às ortodoxas, não passam por um período de secagem durante seu desenvolvimento, sendo dispersas com grau elevado de umidade, uma vez que são sensíveis à dessecação, tanto antes como após a dispersão e, portanto, têm longevidade muito limitada. Além disso, muitas sementes recalcitrantes, particularmente as de origem tropical, são também sensíveis a baixas temperaturas, não podendo ser armazenadas abaixo de 15°C (Pammenter & Berjak 1999). Essas sementes são produzidas principalmente por espécies arbóreas dos trópicos úmidos, tendo como exemplos mais conhecidos algumas espécies economicamente importantes, como o cacau (*Theobroma cacao*), a seringueira (*Hevea brasiliensis*), o abacate (*Persea americana*) e a manga (*Mangifera indica*), além de algumas espécies de interesse ecológico como os ingás (*Inga* spp.) (Faria 2006).

Uma terceira categoria de sementes, denominada “intermediária” foi proposta por Ellis *et al.* (1990). Tais sementes se caracterizam pelo comportamento intermediário pós-dispersão, isto é, são relativamente tolerantes à dessecação, mas não suportam a remoção de água a níveis tão baixos quanto as sementes ortodoxas, podendo geralmente ser armazenadas por períodos de tempo intermediários. Essas sementes são freqüentemente sensíveis ao frio, mesmo no estado desidratado. O café (*Coffea* spp.) (Ellis *et al.* 1990) e o nim (*Azadirachta indica*) são exemplos de espécies com sementes intermediárias (Faria 2006).

De acordo com Walters (2000) há gradientes de tolerância à dessecação entre as sementes, oscilando das mais intolerantes (altamente recalcitrantes) até as mais tolerantes (ortodoxas clássicas).

O desenvolvimento das sementes ortodoxas é geralmente separado em três fases ou estágios distintos, sendo o estágio I correspondente à histodiferenciação, quando o

zigoto unicelular sofre sucessivas divisões mitóticas, seguidas de diferenciação para formar o eixo embrionário, o(s) cotilédono(s) e o endosperma triplóide; o teor de água é superior a 80% (base úmida). Esse valor decresce gradualmente e lentamente, pois a transferência de massa da planta-mãe para semente deve ocorrer em meio líquido. Contudo, o acúmulo de matéria seca nesta fase é relativamente lento, pois a divisão e a expansão celular são predominantes (Marcos Filho 2005).

Na segunda fase, ou estágio II, há expansão celular, deposição de reservas nas células e alterações nas membranas. O acúmulo de matéria seca é intensificado a seguir (inclusive com a produção de proteínas do tipo LEA - Late Embryogenesis Abundant), até atingir o valor máximo, iniciando-se lentamente a desidratação, concomitante ao acúmulo de reservas. Considera-se que no final dessa fase as sementes desligam-se fisiologicamente da planta-mãe, passando a atuar como indivíduos independentes e a desidratação é acelerada. A perda de água ocorre mesmo sob períodos chuvosos, de modo que a influência do ambiente afeta apenas a rapidez do processo (Marcos Filho 2005).

A fase final, ou estágio III corresponde à secagem até que as sementes atinjam o ponto de equilíbrio com a umidade relativa do ar, havendo redução do metabolismo e passagem do embrião para um estado metabolicamente menos ativo ou quiescente. Esta etapa final do processo de maturação, em espécies ortodoxas, é caracterizada pela desidratação máxima da semente, paralelamente à redução dos níveis de ácido abscísico e organização do sistema de membranas. O período de manutenção de níveis elevados de matéria seca depende diretamente da influência do ambiente, pois condições menos favoráveis de umidade relativa, temperatura e a ação de insetos e microorganismos geralmente contribuem para aceleração do processo respiratório e a conseqüente hidrólise das substâncias de reserva, com redução do peso das sementes (Jiang & Kermode 1994 *in* Marcos Filho 2005).

Nos estágios iniciais de desenvolvimento, os embriões são extremamente sensíveis ao estresse hídrico (Berjak *et al.* 1993). A tolerância à dessecação é adquirida continuamente durante o desenvolvimento do embrião, que acumula matéria seca e se torna germinável, atingindo o máximo de tolerância quanto mais maduro estiver (Kermode 1990).

Coincidindo com esses eventos, a tolerância à redução de água é adquirida. Em sementes ortodoxas há uma fase de transição (determinado estágio de maturação) entre o estado de relativa intolerância para tolerância total à dessecação (Kermode 1990). Esta

transição pode ser prematuramente induzida ou prolongada por modificações do meio ou manipulação química. Uma vez induzido o processo, os embriões imaturos podem tornar-se tolerantes à dessecação em poucos dias (Kermode 1990, Blackman *et al.* 1991).

Estudos do efeito de colheitas prematuras sobre o vigor e a viabilidade sugerem que a máxima tolerância à dessecação, em sementes ortodoxas, é adquirida após serem completados com sucesso os três primeiros estágios da embriogênese e o início do quarto estágio, de acordo com os critérios estabelecidos por Vertucci & Ferrant (1995).

Como o aumento do nível de tolerância à dessecação (TD) é alcançado rapidamente, torna-se difícil avaliar o momento preciso em que ocorre transição dos diferentes níveis de maturação. Embora frequentemente não sejam documentados os procedimentos experimentais no momento da colheita das sementes, incluindo a manipulação para secagem das mesmas, há uma evolução nesse período, com ganho de TD. Assim, torna-se difícil avaliar se as sementes já haviam adquirido TD no estágio em que foram colhidas ou se adquiriram essa tolerância após a colheita (Vertucci & Ferrant 1995). Há, portanto, dois períodos distintos quando se considera apenas o fator secagem das sementes. Um período em que a semente é intolerante à secagem (primeira fase e parte da segunda) e um período em que as sementes passam a ser tolerantes à secagem, podendo estar na segunda fase de desenvolvimento ou na terceira fase. Assim, embora a TD das sementes ortodoxas seja adquirida, acredita-se que o processo possa ser controlado. As sementes adquirem o máximo vigor e longevidade quando armazenadas secas e com o máximo acúmulo de matéria seca (Kermode 1990).

A principal diferença entre sementes ortodoxas e recalcitrantes em um estágio específico de desenvolvimento é que as ortodoxas são habilitadas para reversivelmente parar seu metabolismo e estabilizar a organização subcelular. Com isso, adquirem tolerância à perda de água do tipo 3 (água intracelular que forma pontes com sítios hidrofóbicos das macromoléculas, entre -4 MPa e -11 MPa) e perda de água do tipo 2 (água intracelular com características de estado vítreo, que interage com sítios hidrofílicos das macromoléculas, entre -12 MPa e -150 MPa). Por outro lado, as sementes recalcitrantes podem tolerar certo nível de perda de água, mas não há paralisação no seu metabolismo, progredindo-o para a imediata germinação (Farrant *et al.* 1992, Berjak *et al.* 1993).

## 1.6 Tolerância à dessecação e compostos de reserva

Tolerância à dessecação em sementes pode ser definida como a capacidade de sobrevivência e manutenção do vigor depois de quase completa remoção de água. Para tal, é necessário que as sementes possuam habilidade de manter a integridade estrutural da membrana celular e das organelas para reparar danos quando a água estiver novamente disponível (Vertucci & Ferrant 1995). Portanto, é a capacidade específica do protoplasma de tolerar perda severa de água e de se reidratar de forma coordenada quando houver disponibilidade de água.

Durante o desenvolvimento de sementes ortodoxas, o teor de água é alto no início e, geralmente, diminui no estágio final de desenvolvimento, culminando com a dessecação natural ou desidratação. Portanto, as sementes atravessam diversos níveis críticos de umidade que afetam a atividade metabólica e podem causar danos aos tecidos intolerantes à desidratação (Vertucci & Ferrant 1995, Walters 2000).

Acredita-se que a tolerância à dessecação não pode ser atribuída a um simples mecanismo de proteção; ao contrário, parece ser um fenômeno multifatorial em que cada componente é igualmente crítico, agindo em sinergismo e controlado pelo genoma (Leprince *et al.* 1993).

Vários processos e compostos são considerados fundamentais para que uma semente seja tolerante à dessecação, como por exemplo, o desenvolvimento de características físicas dos constituintes celulares, o acúmulo de reservas solúveis e insolúveis, a desdiferenciação intracelular, a redução do metabolismo, a presença de um eficiente sistema antioxidante, o acúmulo de proteínas e outros compostos protetores como oligossacarídeos, açúcares álcoois e presença e operação de um sistema de reparo durante a reidratação (Pammenter & Berjak 1999). Parece ser medida pela presença de sistemas protetores que previnem danos letais em diferentes componentes celulares, incluindo membranas, proteínas e citoplasma. Três importantes sistemas têm sido caracterizados: (1) o acúmulo de açúcares não redutores; (2) a habilidade para prevenir, tolerar ou reparar ataque de radicais livres e (3) a presença de proteínas LEA (Vertucci & Ferrant 1995).

Existem evidências de que o acúmulo de açúcares e proteínas que estabilizam membranas em sementes secas atuam como “substitutos da água”, podendo ter importante papel na tolerância à dessecação, por proteger membranas de mudanças de

fase lipídica e também por proteger proteínas, pela formação do estado vítreo em temperaturas fisiológicas (Leprince *et al.* 1993).

Algumas proteínas, açúcares e oligossacarídeos específicos são sintetizados de forma tardia no desenvolvimento da semente e podem estar associados ao desenvolvimento da tolerância à dessecação ou à longevidade da semente (Castro *et al.* 2004). Assim, os açúcares que podem estar associados à tolerância à dessecação também são aqueles que são acumulados tardiamente no desenvolvimento da semente. Entretanto, assim como no caso das proteínas LEA, a contribuição específica dos oligossacarídeos para a tolerância à dessecação e para a longevidade de sementes no estado seco ainda não foi esclarecida (Buitink *et al.* 2000).

Sobre a habilidade para prevenir, tolerar ou reparar a ação de radicais livres durante a dessecação sabe-se que são naturalmente produzidos durante o metabolismo das plantas, particularmente em cloroplastos e mitocôndria (Puntarulo *et al.* 1991). Moléculas antioxidantes e sequestradoras de radicais livres, como antioxidantes lipossolúveis (ácido ascórbico, glutathione), estão contidas em altas concentrações nas sementes, variando em diferentes tecidos e diferentes sementes. Sistemas enzimáticos processadores de radicais livres incluem enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione reductase, e peroxidases, entre outras. Sistemas enzimáticos estão mais envolvidos na resposta antioxidante inicial pela neutralização de oxigênios ativados e potencialmente tóxicos, formados durante a restrição hídrica (Franzen & Haas 1991).

Estudos moleculares sobre a expressão e regulação gênica, em resposta à severa perda de água durante a maturação de sementes, têm sido realizados em diversas espécies, como, por exemplo, embriões de cevada (Bartels *et al.* 1988), de milho (Bochicchio *et al.* 1988) e sementes de soja (Blackman *et al.* 1991). Diversos grupos de proteínas têm sido correlacionados temporariamente com a transição da intolerância para tolerância. Esses grupos, caracterizados como LEA, têm sido detectados em grande número de sementes incluindo cevada, cenoura, algodão, milho, ervilha, nabo, arroz, girassol, tomate e trigo (Dure *et al.* 1989, Skriver & Mundy 1990, Lane 1991). Tratamentos com ABA exógeno, que regula a aquisição de tolerância à dessecação, propiciaram o aparecimento dessas proteínas em embriões cultivados *in vitro*. Entretanto, nenhum desses mecanismos anteriormente citados permite explicar completamente a tolerância à dessecação.

Há evidências de que as membranas celulares são particularmente vulneráveis à desidratação e constituem os sítios primários das injúrias celulares (Leprince *et al.*, 1990). A desidratação pode causar alterações irreversíveis nas propriedades físicas da camada dupla de fosfolipídios e favorecer o acúmulo de vários produtos resultantes da peroxidação de lipídeos, com danos evidentes à estrutura das membranas; conseqüentemente, há perda da capacidade de conduzir à síntese de DNA, de RNA, de enzimas e de proteínas durante a reidratação.

Portanto, a aquisição de TD é um fenômeno complexo, envolvendo a interação e ajustes no metabolismo de modo a permitir que as células se adaptem à extensa perda de água com o mínimo dano. A tolerância à dessecação contribui para a dispersão de sementes e permite que uma espécie sobreviva durante os períodos desfavoráveis para o crescimento da planta.

### **1.7 Carboidratos solúveis e tolerância à dessecação**

Os estádios iniciais de desenvolvimento das sementes são usualmente caracterizados por mudanças dinâmicas no padrão de síntese e degradação de carboidratos. Carboidratos de reserva solúveis e os de parede celular desempenham papel fundamental nos mecanismos de embebição de água, proteção do embrião contra o dessecação e o ataque de patógenos e na manutenção da viabilidade das sementes durante o armazenamento (Barbedo & Marcos Filho 1998 e referências contidas). Assim, o levantamento de informações a respeito das variações dos carboidratos durante a aquisição de tolerância à dessecação é fundamental para o conhecimento potencial de armazenamento e de conservação das sementes.

De um modo geral, os carboidratos, as proteínas e os lipídios são as principais substâncias de reserva das sementes e suas proporções variam de acordo com a espécie e numa mesma espécie, com o estágio de maturação em que as sementes se encontram. As sementes armazenam reservas no endosperma e/ou no embrião; nas dicotiledôneas, geralmente situam-se nos cotilédones.

Os carboidratos constituem as principais substâncias armazenadas nas sementes e sua principal função é o fornecimento de energia para a retomada de desenvolvimento do embrião durante a germinação.

Os carboidratos podem ser agrupados em monossacarídeos, oligossacarídeos e

polissacarídeos. Os monossacarídeos são carboidratos simples, que não sofrem hidrólise, com fórmula geral  $C_n (H_2)_n$ , onde n geralmente varia de 3 a 7. As pentoses e as hexoses (glucose, frutose e galactose), respectivamente com cinco e seis átomos de carbono em suas moléculas, são os monossacarídeos mais comuns e mais importantes nos seres vivos.

Os oligossacarídeos são carboidratos formados pela conexão de dois a dez monossacarídeos que se separam por hidrólise. Os mais importantes para os seres vivos são os dissacarídeos, como a sacarose ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ ), maltose e lactose. A maioria tem ação energética após a hidrólise, atuando durante a germinação.

Os polissacarídeos são moléculas grandes, formadas pela junção de vários monossacarídeos; tem a fórmula geral  $(C_6H_{10}O_5)_n$  e são representados nas sementes pelo amido, hemiceluloses e celulose.

A composição química das sementes é definida geneticamente, podendo em alguns casos, ser influenciada pelas condições ambientais a que foram submetidas as plantas que as originaram (Carvalho & Nakagawa 2000). Os açúcares solúveis representam uma pequena porcentagem entre os carboidratos presentes nas sementes, destacando-se a glucose, frutose, manose e galactose, a sacarose e oligossacarídeos da série rafínosica. Estes, além de atuar como reservas de utilização rápida constituem importante proteção, limitando os danos causados pela dessecação em sementes maduras (Buckeridge *et al.* 2000).

A sacarose é praticamente universal nas plantas superiores, sendo o principal açúcar solúvel encontrado nas sementes. Pode ser acumulada em quantidades apreciáveis ao final do processo de desenvolvimento e ser utilizada para síntese dos oligossacarídeos da série rafínosica, entre outros carboidratos (Castilho *et al.* 1990).

Nas sementes, assumem importante papel, além da sacarose, os oligossacarídeos da família da rafinose (RFOs), que incluem a rafinose, estaquiose e verbascose, sendo muito freqüentes em sementes de leguminosas. São acumulados durante o desenvolvimento e desaparecem rapidamente durante a germinação. A biossíntese dos oligossacarídeos desta série parece ocorrer nos vacúolos, através da ação catalítica de galactosil transferases que apresentam afinidade pela sacarose e também pelos próprios oligossacarídeos formados por sua ação. O galactinol, derivado do *myo*-inositol, age como um doador de galactosila para a síntese da rafinose, sendo liberado o *myo*-inositol. Assim, maiores concentrações de *myo*-inositol na semente poderiam indicar um aumento na síntese de oligossacarídeos da série da rafinose (Peterbauer & Richter

2001). Os galactosil-ciclitóis também são importantes na biossíntese de RFOs especialmente o galactinol que declina durante a maturação da semente por sua função precursora na síntese de RFOs (Peterbauer & Richter 2001).

Uma das primeiras observações sobre a função dos açúcares na tolerância à dessecação foi feita por Koster & Leopold (1988), em sementes de soja, ervilha e milho. Esses autores observaram alta correlação entre a tolerância à secagem e a composição de açúcares solúveis, principalmente sacarose, rafinose e estaquiose, sugerindo que estes açúcares teriam importante papel na estabilidade das membranas celulares durante a secagem e a exposição das sementes a altas temperaturas.

A rafinose e a estaquiose parecem desempenhar papel relevante na estabilidade das membranas celulares e conferem, juntamente com a sacarose, tolerância à dessecação em sementes durante a desidratação. Por apresentar tendência de acúmulo maior em sementes ortodoxas com relação às recalcitrantes e por serem degradados logo no início da germinação, supõe-se que além de compostos de reserva, têm como principal função a estabilização das membranas celulares durante o processo de secagem.

De acordo com Lin & Huang (1994), a razão entre sacarose e oligossacarídeos da série da rafinose é provavelmente controlada geneticamente e varia de espécie para espécie, sendo que a longevidade de algumas sementes pode ser determinada tanto pela razão de massa como de concentração molar entre oligo/dissacarídeos.

O dissacarídeo trealose tem um papel fundamental na tolerância à dessecação em leveduras e em outros organismos tolerantes à dessecação (Crowe *et al.* 1992). A molécula de trealose tem estrutura apropriada para a interpolação entre os grupos polares dos fosfolipídios de membranas enquanto ocorre a perda de água. A substituição da água pela trealose faz com que seja mantida a estrutura de bicamada (ou camada dupla da membrana) quando no estado seco. Similarmente, a trealose pode impedir o “desenovelamento” e a desnaturação das proteínas durante o processo de desidratação. Em sementes que não contêm trealose, a sacarose, possivelmente junto com os oligossacarídeos, pode exercer a mesma função na preservação das estruturas de membranas e proteínas. Além disso, esses açúcares podem promover a formação de um estado de gel ou vítreo em tecidos secos, o qual se caracteriza por ser um estado amorfo contínuo que tem viscosidade muito elevada. A presença do estado vítreo retarda extremamente as reações que podem conduzir à degradação de componentes celulares da semente, impedindo, ainda, a fusão de membranas e o conseqüente rompimento dos

compartimentos celulares (Hoekstra *et al.* 2002). O estado vítreo contribui provavelmente para a longevidade de sementes secas (Leopold *et al.* 1994, Buitink *et al.* 2000).

Kuo *et al.* (1990) verificaram que durante a germinação, sementes de soja convertem óleos e oligossacarídeos solúveis, como sacarose e rafinose, em monossacarídeos, para utilizá-los na rápida expansão do eixo embrionário. A prioridade seria para a utilização da sacarose, ocorrendo aumento da atividade de invertase e conseqüentemente grande aumento no conteúdo de glicose e frutose nos tecidos. Ainda, observaram que a atividade de síntese de sacarose era consideravelmente maior nos cotilédones que nos eixos enquanto a atividade de degradação de sacarose era maior nos eixos. Isso reforça a idéia de que a sacarose é sintetizada nos cotilédones durante a germinação a partir do metabolismo de produtos de reserva, como óleos e amido, enquanto que enzimas como a invertase, quebram a sacarose vinda do cotilédone para o eixo, disponibilizando glicose e frutose durante a germinação. Os mesmos autores observaram uma via de produção de sorbitol, um açúcar álcool presente em grande quantidade no eixo embrionário de sementes de soja, caracterizando uma via alternativa para a produção de substrato para a respiração e crescimento de sementes.

Blackman *et al.* (1992), estudando tolerância à dessecação em sementes imaturas de soja, verificaram que houve um incremento do conteúdo de sacarose e estaquiose durante a secagem lenta das sementes.

Estudando sementes de várias espécies, Steadman *et al.* (1996) encontraram conteúdo de sacarose maior nos eixos embrionários do que nos cotilédones quando as sementes foram submetidas à secagem, porém não se pode afirmar que este fato seja um indício de tolerância à dessecação.

Lin & Huang (1994) verificaram que sementes com insuficiente conteúdo de oligossacarídeos e altas quantidades de sacarose podem sofrer danos nas membranas durante longos períodos de armazenamento, e estas podem se deteriorar durante a embebição, tornando a semente inviável à germinação.

A presença de grande quantidade de açúcares solúveis em sementes ortodoxas poderia prevenir efeitos danosos na dessecação, formando pontes de hidrogênio e, assim substituindo a água na manutenção das estruturas hidrofílicas em sua orientação quando hidratada (Koster & Leopold 1988).

Segundo Obendorf (1997), os açúcares livres estão relacionados a componentes macromoleculares, como as enzimas, em sementes tolerantes à dessecação, estando

diretamente relacionados com o processo de tolerância à dessecação, principalmente durante a maturação e o armazenamento das sementes.

Segundo Borges *et al.* (2006), a estabilidade e a manutenção da estrutura das membranas celulares são fundamentais para a semente suportar a dessecação e, conseqüentemente, manter o seu vigor durante o armazenamento. Os autores verificaram que o *myo*-inositol e outros açúcares álcoois, além da sacarose variaram durante o desenvolvimento de sementes de *Caesalpinia echinata* e poderiam estar envolvidos com a tolerância à dessecação dessas sementes.

Em sementes de algumas espécies, principalmente de Leguminosae, ocorre acúmulo de ciclitóis livres e, principalmente, ciclitóis galactosilados. Estes, juntamente com a sacarose, poderiam contribuir para a estabilidade estrutural de organelas, membranas, enzimas e outras macromoléculas e para a formação do estado vítreo, fundamental na tolerância das sementes à dessecação (Obendorf 1997, Peterbauer & Richter 2001).

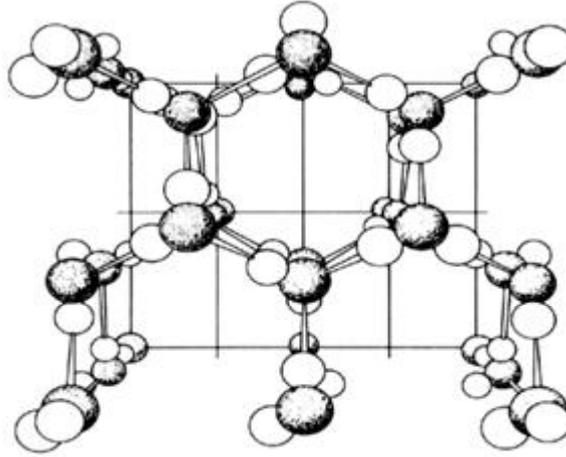
O acúmulo de oligossacarídeos da família da rafinose poderia ser resultado da conversão dos monossacarídeos, diminuindo assim, a disponibilidade de substrato para a respiração e, conseqüentemente, a atividade metabólica durante a dessecação e armazenamento (Leprince *et al.* 1992, Pammenter & Berjak 1999).

## 1.8 Relações hídricas em sementes

Um dos objetivos dos estudos referentes à tolerância à dessecação e armazenamento de sementes é o do controle da perda de água. A água controla reações metabólicas na semente sendo o veículo de transporte e mobilização de substâncias nas células. Reduzindo-se seu teor para valores mínimos, é possível diminuir o metabolismo da semente podendo, assim, aumentar seu período de armazenamento (Kermode 1990). Contudo, as sementes de cada espécie apresentam valores críticos mínimos de umidade, os quais precisam ser determinados experimentalmente. Uma das técnicas para se determinar esse valor é a secagem controlada pela temperatura.

Para o entendimento das relações hídricas e seu envolvimento com os processos vitais da semente, algumas características da água, tornam-se relevantes.

A grande quantidade de pontes de hidrogênio presentes na molécula de água (**Figura 7**) no estado líquido é responsável por suas características únicas e biologicamente importantes (Kramer & Boyer 1995).



**Figura 7.** Esquema da estrutura “aberta” da água no estado sólido. Modificado de Kramer & Boyer (1995).

As pontes de hidrogênio constituem uma força de atração entre as moléculas de água, inibindo a sua separação e escape na forma de vapor, permitindo que a água esteja em estado líquido a 20°C.

Devido às suas propriedades referentes a viscosidade, tensão superficial, forças de adesão e coesão, a água penetra na maioria dos espaços capilares, estabelecendo um meio contínuo através das paredes celulósicas e permeando totalmente o corpo da planta.

A célula viva consiste de diversos compartimentos separados por membranas semipermeáveis seletivas. Canais nas membranas, formados por proteínas, permitem a passagem da água, mas impedem a de solutos. A parede celular relativamente rígida resiste à expansão, gerando uma pressão hidrostática interna.

A água está quimicamente associada aos constituintes do protoplasma. Por isso há gradientes de potencial hídrico entre o meio externo e interno à membrana que propiciam o movimento da água, sempre de valores de potencial hídrico mais elevados para os mais baixos ou negativos (Castro *et al.* 2004).

Uma vez que a água permeia a membrana plasmática, o potencial hídrico dentro das células equilibra-se com o ambiente circundante em poucos segundos, ainda que seja preciso mais tempo para que todas as células de um tecido se equilibrem com a

solução exterior. As condições da água na semente podem ser relevantes para sua manutenção, uma vez que a água controla todo seu “status” metabólico (Marcos Filho 2005). A energia da água na semente ou em suas estruturas representa um melhor indicador do estado da água do que a quantidade absoluta ou o teor de água, fornecendo subsídios para explicar o comportamento fisiológico de sementes. Em sementes, a natureza e a forma de ligação da água afetam o estado fisiológico das células. Uma análise do comportamento das sementes sob o ponto de vista termodinâmico exige, portanto, o conhecimento das propriedades da água, cujas alterações discretas que ocorrem num potencial químico específico denominam-se mudanças de fase (Marcos Filho 2005).

Para compreender os mecanismos de tolerância à dessecação, é necessário entender a natureza dos danos causados ao se remover a água destes organismos. Vertucci & Farrant (1995) propuseram uma classificação com cinco tipos de água nas sementes: a do tipo 5 pode ser considerada água livre e sua ocorrência é observada em potenciais hídricos acima de -2MPa; a água do tipo 4 encontra-se entre -2MPa e -4MPa, ocupando poros e capilares e não interagindo com a superfície das proteínas; a água do tipo 3 forma pontes com sítios hidrofóbicos de macromoléculas, sendo observada entre -4MPa e -11MPa; a água do tipo 2 tem características do estado vítreo e interage com sítios hidrofílicos das macromoléculas e encontra-se entre -12 MPa e -150 MPa e; a água do tipo 1, corresponde à água ligada quimicamente por grupos iônicos ocorrendo abaixo de -150 MPa.

Outro aspecto importante da energia da água nas sementes, é que, sob uma mesma atmosfera, com umidade relativa do ar constante, sementes de diferentes espécies apresentam diferentes teores de água, mas o potencial hídrico normalmente é muito próximo (Villela & Marcos Filho 1998). Portanto, as relações entre umidade e potencial hídrico em sementes de diferentes espécies podem afetar diferentemente seus comportamentos com relação aos comportamentos germinativos e, provavelmente, bioquímicos.

As relações hídricas, portanto, exercem importante papel na biologia da semente, particularmente no desenvolvimento e no processo de germinação (Villela 1998). Além disso, as relações hídricas podem fornecer subsídios para explicar o comportamento fisiológico das sementes.

A seqüência de modificações no teor de água da semente constituiu um parâmetro relativamente eficiente para caracterizar o desenvolvimento podendo até

indicar o estágio de maturidade fisiológica. No entanto, esse parâmetro tem-se mostrado inadequado para indicar o estado da água durante o desenvolvimento das sementes, uma vez que não fornece informações sobre a disponibilidade hídrica ou seu estado energético (Villela & Marcos Filho 1998).

Nos estágios iniciais de desenvolvimento, os embriões são extremamente sensíveis ao estresse hídrico (Berjak *et al.* 1993). Há poucas informações de quanto de água é realmente requerido nos primeiros estágios de desenvolvimento, mas o suficiente para que ocorram as divisões celulares. Esses autores propuseram que o potencial hídrico mais adequado seria *ca.* -1,6 MPa e observaram que, durante a fase de maturação, com o acúmulo de matéria seca, é adquirida a tolerância à perda de água.

Embora os limites de desidratação apresentem variação entre as sementes ortodoxas de diferentes espécies, pouco se sabe sobre a magnitude das diferenças no potencial hídrico das mesmas, ou seja, da real atividade energética da água em cada um dos níveis de hidratação das sementes de cada espécie.

A atividade da água nas sementes é responsável por uma série de reações e, além disso, pode interferir na solubilidade e concentração de solutos nas células (Leopold & Vertucci 1989). Villela & Marcos Filho (1998) destacaram que sementes ortodoxas, de diferentes espécies com mesmo teor de água e sob mesmas condições climáticas, podem apresentar diferentes potenciais hídricos, resultando em diferenças na sua velocidade de deterioração.

O potencial químico, denominado potencial hídrico da água por unidade de volume molal parcial da água, representa o *status* da energia livre da água, denominado também de energia potencial. É uma expressão quantitativa da energia livre a ela associada. É expresso pela disponibilidade de água, ou seja, sua capacidade de trabalho e translocação, representado pela letra grega psi ( $\Psi$ ) tendo por referência o potencial da água pura (0 MPa).

Quanto mais negativo for o potencial hídrico do sistema considerado, menor será também a disponibilidade de água nesse sistema e quanto mais solutos são adicionados à água, esta usa a energia para dissolvê-los, diminuindo assim o seu potencial. Uma maneira prática de se conhecer a energia da água em uma planta é através da medição de seu potencial hídrico (Larcher 2000).

O potencial hídrico total tem vários componentes e resulta da somatória destes componentes num dado sistema: em que,  $\Psi_{\pi}$ ,  $\Psi_p$ ,  $\Psi_m$  e  $\Psi_g$  são os componentes devidos,

$$\Psi = \Psi_{\pi} + \Psi_p + \Psi_m + \Psi_g$$

respectivamente às forças osmóticas, de pressão, matricial e gravitacional (Larcher 2000).

Os componentes do potencial hídrico que são relevantes numa célula vegetal são os potenciais osmóticos e de pressão (Larcher 2000). A umidade relativa do ambiente também pode interferir na energia da água nas sementes.

O conhecimento do potencial hídrico das sementes faz-se necessário para a compreensão das alterações que ocorrem durante o processo de armazenamento e na manutenção da viabilidade durante o processo de dessecação. Atualmente, não existem equipamentos específicos para medidas de potencial hídrico de sementes, exceto um aparelho (WP4 Dewpoint Potentiometer, Decagon) apropriado para análise da energia da água em solos, que foi adaptado para determinação do potencial hídrico de sementes florestais, no Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica de São Paulo (SP) (Barbedo, C.J. 2007, comunicação pessoal).

O conceito de potencial hídrico é útil porque permite prever o modo como a água se moverá sob diversas condições.

### **1.9 Condicionamento osmótico de sementes**

O condicionamento osmótico, também denominado osmocondicionamento, consiste na hidratação controlada de sementes até um determinado nível, de modo a permitir a ocorrência das etapas iniciais do processo de germinação, sem, contudo, ocorrer a protrusão da radícula (Carvalho *et al.* 2000). Consiste na imersão destas em soluções osmóticas com potencial hídrico conhecido, em temperatura específica e por períodos definidos, até atingirem equilíbrio com o potencial osmótico da solução.

O método de pré-condicionamento de sementes, mediante exposição das mesmas a atmosfera controlada, embebição em substratos úmidos ou imersão em soluções osmóticas, pode ser realizado continuamente até níveis de umidade programados ou em ciclos de hidratação e secagem (Vazquez, 1995) e vem sendo utilizado com sucesso em leguminosas como um método de pré-condicionamento das sementes (Borges *et al.* 2002).

É uma das técnicas mais promissoras utilizadas para aumentar a capacidade de germinação das sementes e sua tolerância a diversos ambientes, bem como reduzir o

tempo entre a semente e a emergência das plântulas (Braccini *et al.* 1996). Permite maior uniformidade e velocidade de emergência de plântulas pelo acúmulo de solutos (açúcares, ácidos orgânicos e íons) provenientes da retomada do metabolismo da semente, resultando em maior turgescência na reidratação e promovendo a protusão da raiz primária em menor tempo (Bradford 1990). O vigor das sementes mostra-se elevado com o uso desta técnica, bem como a taxa, sincronia e porcentagem de emergência das plântulas, e os resultados são superiores aos obtidos com sementes não tratadas de várias espécies, particularmente sob condições de estresse, como temperatura sub ou supra ótima, déficit hídrico ou salinidade. Esta técnica de hidratação lenta permite a reparação ou reorganização das membranas plasmáticas, o que possibilita a formação ordenada dos tecidos, reduzindo os riscos de danos ao eixo embrionário (Faria 2006).

Durante a desidratação ou secagem lenta ocorre um drástico redirecionamento no metabolismo de sementes maduras sob desidratação controlada, levando à paralisação na formação de proteínas de reserva, acompanhada de hidrólise dos polipeptídeos armazenados. A secagem, então, pode modificar o padrão de síntese protéica, reduzindo a produção de RNAm no eixo embrionário. Com isso, enzimas associadas exclusivamente aos processos pós-germinativos têm sua produção induzida pela secagem da semente durante seu processo de desenvolvimento e maturação (Bewley & Black 1994).

Corbineau *et al.* (2000) observaram que o acúmulo de RFOs poderia ser induzido experimentalmente em sementes imaturas ou embriões pela secagem lenta (*ex-planta*), sendo que a tolerância à dessecação poderia ser adquirida simultaneamente ao acúmulo de RFOs. Corbineau *et al.* (2000) e Bailly *et al.* (2001) observaram também que, em eixos embrionários de ervilha, a biossíntese de oligossacarídeos era regulada pela taxa de perda de água, sendo tanto maior o conteúdo de oligossacarídeos quanto mais lento era o processo de desidratação.

Uma das maneiras de promover a secagem lenta das sementes seria o osmocondicionamento em soluções com potenciais hídricos mais negativos que os das sementes. Bansal *et al.* (1980 *in* Hebling, 1997) observaram o comportamento de sementes incubadas em soluções com potenciais hídricos menos negativos que o das sementes, especialmente no início da embebição, destacando que esse tratamento inviabilizava a seqüência de seus eventos germinativos durante a absorção de água.

Poucas informações existem a respeito da aplicação do condicionamento osmótico em sementes de espécies florestais nativas. De acordo com Barbedo *et al.* (1997), este tratamento, associado a condições ideais de armazenamento, poderia contribuir para o melhor aproveitamento de sementes de espécies arbóreas florestais, pois a produção de frutos dessas espécies nem sempre é regular e a coleta das sementes é trabalhosa e onerosa.

Vários fatores influenciam no condicionamento osmótico, entre eles, o tipo de solução osmótica, o potencial osmótico, a temperatura, o período de embebição, a aeração, a luz, a lavagem e a secagem das sementes, além da qualidade inicial das mesmas (Larcher 2000).

As soluções osmóticas mais utilizadas para o osmocondicionamento são o polietilenoglicol (PEG), o manitol, sacarose e sais inorgânicos como NaCl, MgSO<sub>4</sub> e KNO<sub>3</sub> (Vasquez 1995). A sacarose como agente osmocondicionador em sementes imaturas, poderia auxiliar na estabilização das membranas, além de atuar como fonte de carbono e energia, regulador do potencial osmótico das células, sinalizador de processos biológicos, substrato para síntese de enzimas que participam no processo germinativo da semente, regulador de morfogênese entre outros, limitando os danos causados pela dessecação, como ocorre em sementes maduras (Buckeridge *et al.* 2000). O PEG é um agente osmótico macromolecular, quimicamente inerte, não degradável, atóxico para as sementes por não penetrar no tegumento devido ao elevado peso molecular (Villela *et al.* 1991). Capaz de estabelecer um gradiente osmótico entre a solução e a semente, esse composto tem sido utilizado com sucesso para simular os efeitos do déficit hídrico em plantas (Hasegawa *et al.* 1984).

O déficit hídrico resultante da incubação de sementes em solução de PEG poderá resultar em embebição ou desidratação lenta causada por um gradiente de potenciais hídricos envolvidos nos dois substratos os quais poderão ser controlados pelo tempo de exposição e potenciais hídricos entre sementes.

Em trabalhos recentes, relacionados à tolerância à dessecação de sementes de espécies domesticadas de *Eugenia* (*E. brasiliensis* Lam.), Delgado (2006) demonstrou que é possível definir uma concentração osmótica adequada, bem como o tempo mínimo necessário para atingir estabilidade hídrica entre a semente e o meio, a partir de resultados obtidos em curvas de embebição. Assim, visto que é possível estabelecer o equilíbrio hídrico entre a solução osmocondicionadora e a semente, bem como a hidratação ou desidratação controlada, é importante ter conhecimento do potencial

hídrico das sementes no momento da incubação para se obter a hidratação ou desidratação desejada.

### 1.10 Justificativas e Hipótese

A produção, beneficiamento e manutenção de sementes com elevado potencial fisiológico têm papel fundamental para a preservação e utilização racional de espécies nativas como o pau-brasil. Para isso, torna-se necessário conhecer as alterações que ocorrem durante a maturação e a eventual necessidade ou sensibilidade das sementes ao processo de secagem, sendo importante quantificar o processo (Carvalho & Nakagawa 2000, Walters 2000).

Teores elevados de água em sementes podem reduzir a longevidade das mesmas, acelerando o metabolismo e favorecendo o crescimento de patógenos prejudiciais à manutenção da capacidade germinativa. Assim, a secagem e o armazenamento de sementes em ambiente frio podem contribuir para aumentar a manutenção da viabilidade do material biológico (Vertucci & Roos 1990).

Sementes recém-dispersas de pau-brasil toleram redução do teor de água até cerca de 8% (Barbedo *et al.* 2002), correspondendo ao comportamento de sementes ortodoxas (Roberts 1973). Através dessa redução, associada ao armazenamento a 6-8°C foi possível conservar a viabilidade dessas sementes por 18 meses. Ao final desse período, as sementes já apresentavam perda de vigor, indicando que a completa perda da capacidade germinativa poderia estar próxima. Sem a secagem associada à redução da temperatura de armazenamento, essas sementes perderam completamente a viabilidade após cerca de seis meses de armazenamento (Barbedo *et al.* 2002). Sementes de pau-brasil, em sua completa maturidade, com teor de água em torno de 12% toleraram o armazenamento a -18 °C (Hellmann *et al.* 2006).

De acordo com Borges *et al.* (2005), sementes de *Caesalpinia echinata* aos 55 dias após antese (DAA) encontram-se na segunda fase de desenvolvimento por já apresentarem redução no teor de água e conteúdo máximo de carboidratos solúveis. Aos 60-65 DAA estão com a deposição máxima de reservas e máximo conteúdo de matéria seca. Durante esta fase, as sementes são desconectadas do sistema vascular do fruto e a desidratação é acelerada, considerando-se assim este período como sendo o da maturidade fisiológica dessas sementes. Os mesmos autores mostraram que esta fase

ocorre antes da completa deiscência dos frutos. Isto implica na possibilidade de coletar frutos maduros ainda na árvore. No entanto, o teor de água das sementes nesta fase não é o indicado para armazenamento, sendo necessários procedimentos de secagem dessas sementes. Todavia, ainda são consideradas imaturas e, provavelmente, não teriam condições para tolerar a desidratação a níveis de umidade desejáveis para armazenamento em câmaras frias (Barbedo *et al.* 2002 , Hellmann *et al.* 2006).

Assim, a tecnologia de sementes de pau-brasil tem, ainda, aspectos importantes a serem esclarecidos especialmente quanto ao grau de maturação a partir do qual passam a tolerar a dessecação.

A impossibilidade de se efetuar a colheita no momento adequado e/ou a possível negligência do produtor podem determinar a permanência das sementes em ambiente menos favorável. Isso contribui para o decréscimo do potencial fisiológico, com velocidade e intensidade diretamente dependentes dos níveis de adversidade ou de estresse, acelerando a deterioração das sementes nos frutos, antes da deiscência natural (tipo explosivo). Assim, prejuízos consideráveis podem ocorrer à qualidade e quantidade das sementes produzidas. Portanto, o conhecimento do processo de maturação, sua relação com as formas de secagem e época adequada para a colheita, devem ser investigados. Com isso poderá ser possível ampliar a capacidade de armazenamento em condições apropriadas, visando à conservação da viabilidade de sementes imaturas dessa espécie. Contudo, não se conhece o comportamento de sementes imaturas de *C. echinata* quanto à tolerância à dessecação e esse conhecimento é essencial para que essas sementes possam ser colhidas precocemente e tratadas de forma a tolerarem dessecação e armazenamento prolongado.

Considerando que sementes imaturas de *C. echinata*, no final da fase de seu desenvolvimento, poderiam tolerar a secagem lenta, mantendo a viabilidade até atingirem níveis de água desejáveis à sua conservação e armazenamento, aventou-se a possibilidade de avaliar os efeitos fisiológicos de substâncias osmocondicionadoras como o polietilenoglicol sobre a qualidade dessas, visando a aumentar a viabilidade de sementes imaturas de pau-brasil, e com isso ampliar o período de colheita para a espécie.

## 2 OBJETIVOS

Este trabalho teve por objetivo identificar o estágio de desenvolvimento no qual sementes imaturas de *Caesalpinia echinata* adquirem tolerância à dessecação, através da determinação dos efeitos imediatos da secagem sobre a capacidade germinativa e sobre o desenvolvimento de plântulas, procurando compará-las a sementes maduras.

O trabalho objetivou, ainda, analisar as eventuais alterações dos carboidratos solúveis durante o processo de secagem controlada nos diferentes estádios de maturação, com vistas a relacionar essas variações com a tolerância à dessecação e capacidade germinativa das sementes da espécie em estudo.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

No presente trabalho foram realizados experimentos preliminares que objetivaram levantar dados e subsidiar o delineamento experimental do trabalho principal, que consistiu na desidratação lenta de sementes imaturas e avaliação de seu comportamento fisiológico após a secagem com prévio osmocondicionamento.

### 3.1 Procedimento Experimental

#### Experimentos preliminares

**3.1.1** Experimento realizado com sementes de *Caesalpinia echinata* aos 45 e 55 dias após a antese (DAA) provenientes da Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (RBEEMG), no município de Mogi-Guaçu, SP colhidas em 2004. Objetivou-se avaliar o comportamento das sementes após tratamento com soluções osmocondicionadoras de polietilenoglicol (PEG) 6000 e sacarose (Sac) nos potenciais hídricos de -2,4 MPa e -12 MPa, com posterior secagem em estufa a 40 °C até 10% de teor de água (denominada secagem lenta) em comparação com sementes secas diretamente em estufa na mesma temperatura, sem prévio osmocondicionamento (denominada secagem rápida) até 10% de teor de água.

**3.1.2** Experimento conduzido na Estação Ecológica e Experimental de Tapacurá (PE) com sementes provenientes de uma população implantada no mesmo local de ocorrência natural colhidas em 2005. As sementes foram separadas em três estádios de maturação de acordo com as características visuais propostas por Borges *et al.* (2005). Objetivou-se avaliar o comportamento dessas sementes após embebição em soluções de PEG com dois potenciais hídricos distintos por três períodos de incubação seguidos de secagem em estufa a 40 °C, por 4 h. Foram utilizadas soluções de PEG com potenciais hídricos de -0,8 MPa, -1,2 MPa e incubação por 8, 16 e 24 horas, a 25 °C.

**3.1.3** Experimento realizado com sementes aos 45, 55 e 65 DAA provenientes da RBEEMG (Lote 2005). Objetivou-se avaliar o teor de água até o qual as sementes imaturas de pau-brasil toleram dessecação por meio de diferentes métodos de secagem. O potencial hídrico da solução de PEG foi de -3,0 MPa e a incubação foi feita a 8 °C por 20 horas e 25 °C por 4 horas em câmaras secas do tipo B.O.D. Após a incubação, as sementes foram secas em estufa a 40 °C com circulação forçada de ar até que atingissem teores de água de 30%, 20%, 12% e 7%.

#### Experimento principal

Neste experimento foram utilizadas sementes com 35, 45, 55 e 65 DAA provenientes da RBEEMG (Lote 2006), objetivando avaliar o efeito de diferentes métodos de secagem sobre a germinabilidade e sobre os carboidratos de reserva de

sementes de *Caesalpinia echinata*. O potencial hídrico da solução de PEG foi de -3,0 MPa e a incubação foi feita a 8 °C, por 20 h e 25 °C por 4 h, em câmaras secas do tipo B.O.D.. Após a incubação, a solução de PEG foi cuidadosamente removida com papel-toalha e as sementes levadas para estufa a 40 °C até atingirem 12% de água.

Os itens descritos a seguir referem-se aos procedimentos e métodos executados neste e nos demais experimentos.

### 3.2 Detalhamento do material de estudo

As sementes utilizadas neste trabalho foram colhidas de plantas cultivadas em arboreto experimental homogêneo de *Caesalpinia echinata* Lam. implantado em 1978 na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (RBEEMG), no município de Moji-Guaçu, SP (22° 15-16' S, 47° 8-12' W) durante o ano de 2004, 2005 e 2006. Foram utilizadas também sementes provenientes da Estação Ecológica e Experimental de Tapacurá (PE), de frutos colhidos de árvores escolhidas ao acaso em 2005.

Com relação às sementes provenientes da Estação Experimental de Moji-Guaçu, foram marcadas inflorescências em cerca de 15 árvores localizadas à margem superior do arboreto. A marcação foi realizada individualmente em cada inflorescência que apresentava pelo menos três flores abertas, logo abaixo do último botão floral (**Figura 8**), nas regiões inferiores, medianas e superiores das árvores, visando possibilitar a obtenção de diferentes estádios de formação e maturação dos frutos e sementes. Para tanto, utilizou-se metodologia proposta por Borges *et al.* (2005). As colheitas dos frutos foram realizadas em quatro estádios de maturação, aos 35, 45, 55 e 65 dias após a antese (DAA), a partir das inflorescências marcadas no campo.

Os frutos foram colhidos diretamente das árvores em datas definidas de acordo com a marcação da antese (**Figura 9**), sendo levados para o Laboratório de Tecnologia de Sementes do Instituto de Botânica de São Paulo (SP).

Frutos provenientes da Estação Ecológica e Experimental de Tapacurá (PE) foram levados ao Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Pernambuco. Após a colheita, os frutos permaneceram sob temperatura ambiente de laboratório por aproximadamente 8 h. Após este período foram abertos manualmente, descartadas as sementes danificadas por insetos e as mal-formadas e separadas em lotes de acordo com o estádio de maturação. O primeiro estádio foi formado por sementes com 35 DAA, o

segundo, por sementes com 45 DAA, o terceiro, por sementes com 55 DAA e o quarto estágio, por sementes com 65 DAA.

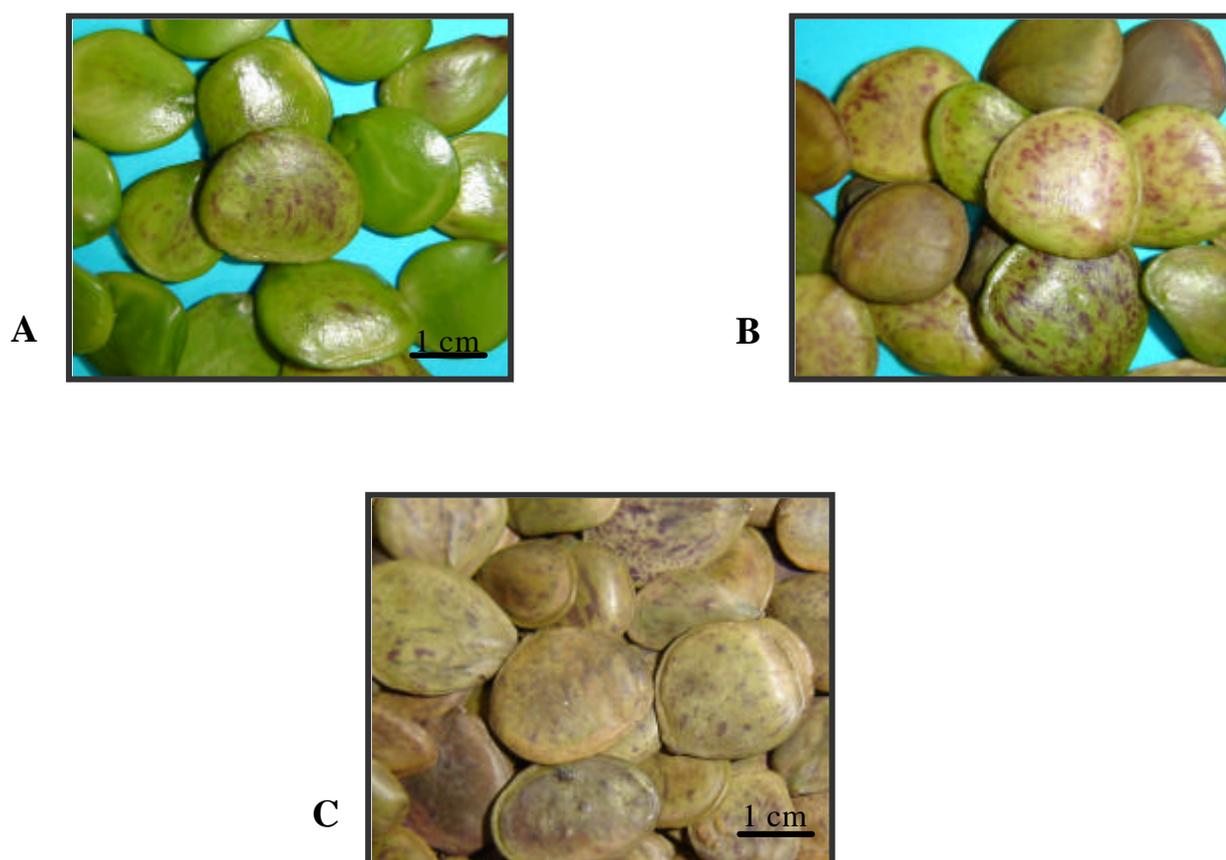


**Figura 8.** Inflorescência de pau-brasil, destacando a marcação no dia da antese.



**Figura 9.** Infrutescência de pau-brasil, destacando a marcação realizada no dia da antese, sendo observados frutos em diferentes fases de maturação.

Para o experimento realizado no Laboratório de Sementes da Universidade Federal de Pernambuco, os frutos foram separados pela coloração de epicarpo, sendo frutos verdes, aqueles que apresentavam casca verde com cerca de 30% de manchas castanhas e assim originaram as sementes consideradas “imaturas”; frutos com mais de 50% de manchas castanhas e acúleos castanhos com pouca flexibilidade, que originaram sementes “semi-maduras” e frutos totalmente castanhos, com acúleos secos e sementes liberadas no seu interior, que originaram as sementes “maduras” (**Figura 10**). Após a formação dos três lotes, foram aferidas as características morfológicas (tamanho, forma, espessura e cor) das sementes, procurando-se identificar as mais representativas para cada estágio de maturação. As sementes foram, então, homogeneizadas e retiradas amostras para determinação do teor de água, potencial hídrico, conteúdo de massa seca e para os testes de germinação.



Pelo fato de que na mesma inflorescência a completa antese ocorre em até 10 dias, conseqüentemente, a infrutescência apresenta frutos em diferentes estádios de maturação. Sendo assim, para separação das sementes quanto ao estágio de maturação, utilizou-se também os parâmetros de caracterização morfo-fisiológicas estudados e caracterizados por Borges *et al.* (2005) para sementes desta espécie.

Devido ao número insuficiente de sementes para conduzir análises estatísticas experimentais, foram coletados frutos não marcados com o objetivo de aumentar o número de sementes nos diferentes estádios estudados.

Para fazer a separação dos frutos não marcados em cada idade e distribuí-los nos diferentes lotes, foram também adotados critérios de separação com base nos estudos de maturação de sementes desta espécie realizados por Borges *et al.* (2005). Os frutos foram colhidos aleatoriamente e transportados em caixas plásticas para laboratório. A triagem foi feita baseando-se em comparações de características morfológicas e fisiológicas primeiramente dos frutos e em seguida, das sementes. As características analisadas para a triagem foram coloração da casca e dimensões dos frutos, rigidez e cor dos acúleos, coloração do tegumento das sementes e características fisiológicas como teor de água, matéria seca e potencial hídrico. As dimensões dos frutos foram aferidas com o auxílio de um paquímetro digital (Mitutoyo, modelo CD-6' Cs), sendo o comprimento tomado a partir do ápice (região com acúleo) até a base do pedúnculo. Para a medida da espessura inclinou-se o paquímetro aproximadamente a 45°, encostando o ápice do fruto na base do paquímetro, procurando-se medir o centro do fruto; a largura foi aferida nas regiões distal ( $\pm 1$  cm abaixo do ápice), mediana ( $\pm$  no centro do fruto) e proximal ( $\pm 1$  cm abaixo da base do pedúnculo) conforme orientação de Borges *et al.* (2005).

Logo após esta seleção, foi realizada a caracterização inicial de cada lote, avaliando-se o teor de água, o conteúdo de matéria seca e a inativação de enzimas para posterior análise dos carboidratos solúveis.

### **3.3 Determinação do teor de água, conteúdo de matéria seca e potencial hídrico das sementes**

O teor de água (%) e o conteúdo de matéria seca das sementes foram determinados pelo método de estufa a  $103 \pm 3^\circ\text{C}$ , por 17 horas (ISTA, 1985), com 4

repetições de 3 sementes para cada amostragem, sendo o peso total das sementes de cada repetição aferido previamente. Após 17 horas, as sementes foram retiradas da estufa, resfriadas em dessecadores contendo sílica-gel e pesadas novamente, obtendo-se então o teor de água e o conteúdo de matéria seca de cada amostra. O cálculo do teor de água foi feito em base úmida (Brasil 1992), sendo expresso em porcentagem.

O potencial hídrico das sementes recém-colhidas e daquelas submetidas aos tratamentos de osmocondicionamento e secagem foi determinado por meio de um psicrômetro de ponto de orvalho, modelo WP4 Dewpoint Potentiometer, da Decagon (USA).

Os potenciais hídricos das soluções de PEG 6000 foram calculados segundo a fórmula de Michel & Kaufman (1973), abaixo discriminada, e as concentrações de sacarose (SIGMA) foram obtidas a partir de medições de potenciais hídricos de soluções com concentrações conhecidas, sendo ambos expressos em valores negativos (-MPa).

Fórmula de Michel & Kaufmann (1973):

$$\Psi_{os} = - (1,18 \times 10^{-2}) C - (1,18 \times 10^{-4}) C^2 + (2,67 \times 10^{-4}) CT + (8,39 \times 10^{-7}) C^2T$$

em que:

$\Psi_{os}$  = potencial osmótico (bar);

C = concentração (gramas de PEG 6000/litro de água);

T = temperatura (°C).

### 3.4 Secagem e condicionamento osmótico das sementes

Para avaliação dos efeitos dos níveis de secagem na manutenção da germinabilidade e composição de carboidratos das sementes de *C. echinata* nos diferentes estádios de maturação foram realizados tratamentos com soluções osmocondicionadoras de polietilenoglicol (PEG) 6000 e sacarose (somente lote 2004), com posterior secagem em estufa a 40 °C até níveis finais de teor de água pré-determinados. Sendo secas até 10%, o lote de 2004, 30, 20, 12, 10 e 7%, o lote de 2005 e até 12%, o lote de 2006.

Para incubação em PEG 6000 ou em sacarose, cerca de 40 sementes foram dispostas em bandejas plásticas, medindo 30 cm de comprimento por 15cm de largura por 5 cm de altura, contendo 3 folhas de papel-filtro utilizados para testes de germinação e cerca de 50 mL (para completa cobertura das sementes) de solução

osmocondicionadora nos potenciais de -2,4 e -12 MPa para o lote de 2004, -0,8 e -1,2 MPa para o lote de 2005 (sementes de Tapacurá- PE) e -3,0 MPa para os lotes de 2005 e 2006.

Após este preparo, as bandejas plásticas foram cobertas com sacos plásticos abertos e armazenadas em germinadores com circulação interna de água, regulados para 25 °C e luz contínua, por um período de 10 dias para o lote de 2004. Para os demais lotes (2005 e 2006), o período de incubação foi ajustado para 24 h, sendo a temperatura a 25 °C para o lote de Tapacurá (2005). Nos demais lotes, a temperatura foi ajustada a 8 °C por 20 h em câmara de refrigeração. Após este período, as bandejas foram transferidas para câmara seca tipo B.O.D. a 25 °C por mais 4 h, totalizando vinte e quatro horas de incubação (lote de 2005 e 2006 de São Paulo).

Após a incubação, as sementes foram cuidadosamente secas com papel toalha, para remoção completa das soluções osmocondicionadoras e em seguida foram, novamente, aferidos o teor de água, o potencial hídrico, a germinação e inativadas enzimas para análise dos carboidratos (somente no lote de 2006) e levadas para secagem até teores de água pré - determinados.

Para secagem em estufa, as sementes foram colocadas sobre uma tela de malha fina (tipo sombrite) para facilitar a circulação de ar e levadas para secagem em estufa, regulada para 40 °C com circulação forçada de ar. A cada 20 minutos, as sementes eram revolvidas para garantir a homogeneidade da secagem das amostras e aferidos seus pesos até que atingissem os teores de água desejados. O tempo de permanência em estufa para secagem até os níveis de água estabelecidos variou com os tratamentos, de 6 a 12 horas. Após atingir cada nível de secagem estabelecido, as sementes foram avaliadas novamente quanto ao teor de água, conteúdo de matéria seca, potencial hídrico, germinação e conteúdos de carboidratos para teores de água em que as sementes imaturas toleraram a dessecação quando osmocondicionadas.

A determinação dos teores de água, após o osmocondicionamento, auxiliaram para os cálculos do peso final após secagem em estufa.

O grau de sensibilidade das sementes submetidas a cada processo de secagem foi avaliado através da perda de qualidade fisiológica após os tratamentos.

Foram realizados dois tratamentos distintos de secagem. Um deles (denominado neste presente trabalho de secagem rápida - Sec), no qual as sementes foram secas diretamente em estufa a 40 °C sem o prévio osmocondicionamento e o outro, (denominado de secagem lenta - PEG+Sec), no qual as sementes foram previamente

osmocondicionadas e depois secas em estufa sob as mesmas condições. As legendas utilizadas foram:

- **(T0):** Sementes analisadas logo que colhidas, sem qualquer tratamento, exceto o próprio manuseio e beneficiamento;
- **(PEG+Sec):** Sementes osmocondicionadas em PEG seguidas de secagem em estufa a 40 °C com circulação de ar forçada até atingir teor de água pré-determinado ou secagem lenta;
- **(Sec):** Sementes sem osmocondicionamento, secas em estufa a 40 °C com circulação de ar forçada, até atingir teor de água pré-determinado ou secagem rápida;
- **(PEG):** Sementes somente submetidas ao osmocondicionamento por polietilenoglicol 6000, sem posterior secagem;
- **(Sac):** Sementes submetidas ao osmocondicionamento por sacarose (SIGMA), sem posterior secagem.

### 3.5 Germinação

A germinação foi avaliada através de teste conduzido em gerbox, sobre papel, tipo germitest, formando o substrato para semeadura, umedecido anteriormente com água destilada até sua saturação (Brasil 1992). As sementes foram previamente lavadas em solução de hipoclorito de sódio a 2% por 1 min, visando à desinfestação superficial. Utilizaram-se quatro repetições de 10 sementes cada. Em seguida, as amostras foram transferidas para germinadores (Marconi tipo MA 400) regulados para 25°C (Mello *et al.* 2004), com fotoperíodo de 12 horas e fluxo de água constante para manter a umidade.

A germinação foi avaliada a cada três dias, sendo consideradas germinadas (G%) aquelas nas quais havia protrusão da radícula com, no mínimo, 3 mm e desenvolvimento de plântulas (DP%) quando o sistema radicular estava completamente desenvolvido e o primeiro par de folhas visível (Barbedo *et al.* 2002).

A avaliação da germinação e desenvolvimento de plântulas foi realizada periodicamente durante 20 dias, após a instalação do teste. Esses dados foram utilizados, respectivamente, para o cálculo da capacidade germinativa e produção de

plântulas normais. A contagem de sementes deterioradas foi feita somente na última avaliação.

O delineamento experimental empregado para os experimentos foi o inteiramente casualizado, constituindo-se em um esquema fatorial de 3x5x2 sendo três estádios de maturação, 5 níveis de secagem e 2 tipos de secagem (rápida e lenta), no primeiro ano (2005) e 4x2x2, sendo quatro estádios de maturação, 2 níveis de secagem e 2 tipos de secagem, no segundo ano (2006). Os resultados foram submetidos à análise de variância (F 0,05) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, visando avaliar alterações nesses parâmetros das sementes (Gomes 1982). Para realização das análises estatísticas, os valores de porcentagem, quando necessário para ajuste da normalidade, foram transformados para  $\arcsin(\%)^{0,5}$  ou na existência de valores nulos, para  $\arcsin(\%+0,5)^{0,5}$ .

### 3.6 Extração e análise de carboidratos não estruturais

A extração dos carboidratos não estruturais (carboidratos solúveis e amido) foi realizada em sementes recém-colhidas (T0) e após os tratamentos de osmocondicionamento e secagem em estufa, com amostras de 15 sementes por tratamento, sendo três repetições de cinco sementes cada.

Para a extração dos carboidratos solúveis, seguiu-se o procedimento adotado por Garcia *et al.* (2006), sendo feita tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários isolados, gerando duas amostras respectivas, para cada um dos lotes de sementes coletadas em 2006. O isolamento do eixo embrionário e dos cotilédones foi feito manualmente com auxílio de lâminas de aço, retirando-se cuidadosamente o tegumento e em seguida feitos cortes longitudinais separando os dois cotilédones e removendo o eixo embrionário para proceder à extração dos carboidratos.

Os cotilédones e os eixos embrionários foram acondicionados em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com água destilada para evitar perda excessiva de água das amostras. Após a separação de eixos e cotilédones as amostras foram pesadas e colocadas em frascos de vidro (cotilédones), ou em microtubos tipo Eppendorf (eixo embrionário), contendo etanol 80 %, 20 mL e 1 mL respectivamente. Em seguida, as amostras foram fervidas por 5 min para a inativação das enzimas e armazenadas a -20 °C até o momento da extração. As amostras de cotilédones foram homogeneizadas em

graal com etanol 80% e centrifugadas por 10 min a 2000 rpm (International Centrifuge - USA), a temperatura ambiente. Ao término da centrifugação, o sobrenadante foi separado e aos resíduos foram adicionados 10 mL de etanol 80% e levados ao banho-maria a 80°C por 15 min. Após esse período, o material foi novamente centrifugado a 2000 rpm por 10 min. Para extração dos açúcares solúveis dos eixos embrionários, as amostras foram colocadas em microtubos tipo Eppendorf com 1 mL de etanol 80%, maceradas nos próprios tubos e em seguida submetidas à extração de forma similar à descrita, sendo neste caso utilizada centrífuga MSE Micro Centaur (UK). Esse procedimento foi realizado três vezes para completa extração dos açúcares solúveis das amostras. Os sobrenadantes foram concentrados com a eliminação do etanol em evaporador rotatório a 40 °C, até quase a secura e ressuspensos em água deionizada até volume final de 2mL e então armazenados a -20 °C, sendo considerados os extratos brutos. A partir desses extratos, o açúcar total foi quantificado pelo método do fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), usando glicose como padrão. Os resultados foram expressos em mg por g de massa seca ( $\text{mg g}^{-1}$  MS).

### **3.7 Purificação dos carboidratos e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC)**

Para obtenção dos carboidratos solúveis neutros, as amostras dos extratos brutos foram deionizadas em coluna de troca iônica Dowex-1 (forma  $\text{Cl}^-$ ) e Dowex - 50 (forma  $\text{H}^+$ ) e em seguida foram filtradas (Millipore 0,25 m) para análises qualitativas de açúcares por cromatografia de troca iônica de alto desempenho com detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD), em cromatógrafo Dionex modelo DX-300, utilizando coluna CarboPac PA-1 (4 x 250 mm). O sistema de eluição foi o isocrático com 100 mM de hidróxido de sódio em água, com fluxo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$ . Alternativamente os carboidratos foram eluídos com um gradiente de mistura do eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) ao eluente A (150 mM de NaOH), com fluxo de  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ , por meio da seguinte programação: 0-1 min, 25mM; 1-2 min 25-50 mM; 2-14 min, 50-500 mM; 14-22 min, 500 mM; 22-30 min, 25mM, de acordo com Itaya *et al.* (1997). Os açúcares foram identificados por co-cromatografia com padrões autênticos. Os potenciais aplicados para E1 (480 ms), E2 (180 ms) e E3 (360 ms) foram 0,05, 0,75 e -0,20, respectivamente. As áreas de cada pico foram corrigidas de acordo com a sensibilidade do detector para cada açúcar, baseado em padronização interna,

sendo diretamente proporcionais à quantidade relativa de cada substância na alíquota analisada.

### 3.8 Quantificação de amido

Os resíduos das extrações dos carboidratos solúveis, tanto dos cotilédones como dos eixos embrionários, foram liofilizados e processados para a quantificação do amido, conforme descrito por Hellmann (2006). Alternativamente o amido foi quantificado pelo método enzimático, sendo utilizados 10 mg de material para cada tratamento. Os açúcares solúveis foram extraídos quatro vezes com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80% a 80 °C por 20 min, totalizando 2,0 mL de extrato etanólico. Após a retirada de açúcares, pigmentos, fenóis e outras substâncias solúveis, o precipitado foi mantido em temperatura ambiente durante uma noite, até a completa evaporação do etanol. A seguir, foram adicionados 0,5 mL ( $120 \text{ U mL}^{-1}$ ) de alfa-amilase termoestável de *Bacillus licheniformis* (MEGAZYME), diluída em tampão MOPS 10 mM pH 6,5. A seguir, as amostras foram incubadas a 75 °C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez totalizando 120 unidades de enzima. As amostras foram resfriadas até 50 °C (em banho-maria), sendo então adicionada uma solução contendo 0,5 mL ( $30 \text{ U mL}^{-1}$ ) de amiloglicosidase (AMG) de *Aspergillus niger* (MEGAZYME) em tampão acetato de sódio 100 mM pH 4,5, seguido por incubação das amostras a 50 °C por 30 min. Este procedimento foi repetido mais uma vez totalizando 30 unidades de enzima. Após as quatro incubações descritas acima, foram acrescentados 100  $\mu\text{L}$  de ácido perclórico 0,8 M para parar a reação e precipitar proteínas. Após centrifugação por 2 min a  $10.000 \text{ g}$ , procedeu-se à dosagem em alíquotas de 20  $\mu\text{L}$  de extrato, às quais foram adicionados 300  $\mu\text{L}$  das enzimas glucose-oxidase e peroxidase e os reagentes 4-aminoantipirina e fenol (Glucose PAP Liquiform, CENTERLAB). Após incubação por 15 min a 30 °C, o teor de glicose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA a 490 nm. A curva padrão foi feita com solução de glicose (SIGMA), nas concentrações 0, 2,5, 5, 7,5 e 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Amaral *et al.* 2007).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Experimentos Preliminares

No processo de germinação, a primeira etapa na seqüência de eventos que culminam com a retomada do crescimento do embrião (emissão da radícula) é a embebição, um tipo de difusão que ocorre quando as sementes absorvem água. Todas as sementes ortodoxas, exceto as dotadas de tegumento impermeável, embebem ou reidratam-se quando expostas à água. A absorção de água dá início a uma série de processos físicos, fisiológicos e bioquímicos no interior da semente, os quais, na ausência de outro fator limitante, resultam na emergência da plântula. Vários fatores podem limitar a embebição, entre eles, a composição e permeabilidade do tegumento, disponibilidade de água no ambiente, área de contato solo-semente, temperatura, pressão hidrostática e condição fisiológica da semente (Mayer & Poljakoff-Mayber 1989, Mian & Nafziger 1994).

Potenciais hídricos muito negativos influenciam a absorção de água pelas sementes, podendo, assim, inviabilizar a seqüência de eventos que culminam com a emergência das plântulas (Bansal *et al.* 1980). Contudo, as informações da literatura não são concordantes quanto às condições mínimas e ótimas de potencial hídrico no solo para a germinação de sementes. Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos utilizando soluções com diferentes potenciais osmóticos para umedecer substratos, onde as sementes são colocadas para germinar, procurando simular condições de baixa umidade do solo (Hardegree & Emmerich 1994). O polietileno glicol (PEG) tem sido utilizado com sucesso em trabalhos de pesquisa para simular os efeitos do déficit hídrico nas plantas, por não penetrar nas células, não ser degradado e não causar toxidez, devido ao seu alto peso molecular (Hasegawa *et al.* 1984).

No osmocondicionamento de sementes, a solução osmótica regula a quantidade de água absorvida, havendo condições para o desenvolvimento das fases iniciais da germinação (fases I e II), mas sem atingir a fase III, correspondente à emergência da radícula, no padrão trifásico proposto por Bewley e Black (1994). Assim, a incubação de sementes em solução osmótica com potencial hídrico inferior ao da água pode simular o déficit hídrico durante a embebição e é esperado que a movimentação hidrostática participe no sistema de regulação que induz a tolerância à dessecação em

sementes, e conseqüentemente influencie os processos fisiológicos dependentes da atividade da água nas células.

Borges *et al.* (1991) mostraram que a pré-embebição de sementes de jacarandá-da-bahia em solução de PEG resulta no aumento da velocidade e porcentagem finais de germinação, quando essas são transferidas para água, após a secagem.

Além do PEG, a sacarose também tem sido utilizada para promover a desidratação de sementes, contribuindo para acelerar as fases finais do processo de amadurecimento. A sacarose é um eficiente estabilizador de membranas, limitando os danos causados pela dessecação. Além de regular o potencial osmótico das células, atua como sinalizador de processos biológicos, substrato para enzimas de síntese que participam no processo germinativo e regulador de morfogênese, além de atuar como reserva de utilização rápida no processo germinativo (Buckeridge *et al.* 2000).

As sementes maduras de pau-brasil apresentam na sua composição 15-20% de carboidratos solúveis, principalmente sacarose, glicose e frutose, além de ciclitois livres e galactosilados (Garcia *et al.* 2006, Borges *et al.* 2006). Assim, o uso de sacarose como solução osmótica, além de promover desidratação lenta, poderia possibilitar seu consumo pelo embrião, contribuindo para o desenvolvimento das etapas finais do processo de amadurecimento das sementes imaturas dessa espécie.

#### **4.1.1 Avaliação do comportamento de sementes imaturas de pau-brasil desidratadas com polietilenoglicol (PEG) e sacarose**

##### **Procedimento experimental e principais resultados**

Objetivando verificar a possibilidade de antecipar artificialmente a maturação das sementes e, conseqüentemente, ampliar o período de colheita e reduzir a exposição destas às intempéries do campo, foi realizado um experimento prévio com sementes imaturas de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 dias após a antese (DAA), sendo as mesmas expostas a duas diferentes concentrações de PEG 6000 e de sacarose por 10 dias, correspondendo ao tempo necessário para que completassem a maturação no campo.

Para a desidratação das sementes foram utilizadas soluções com potenciais hídricos inferiores aos das sementes (-2,4 MPa e -12,0 MPa), baseando-se em

informações de Borges *et al.* (2005), sendo as mesmas mantidas a 25 °C, em câmaras de germinação com umidade relativa de 100% e no escuro, por serem fotoblásticas neutras (Mello *et al.* 2004).

Nota-se na **Tabela 1** que durante os 10 dias de incubação, tanto a -2,4 MPa (PEG 1 e Sac 1) como a -12 MPa (PEG 2 e Sac 2), houve redução do teor de água das sementes nos dois estádios de maturação estudados. Sementes com 45 DAA incubadas com PEG a -2,4 MPa tiveram o teor de água diminuído de 60% para 41% e as sementes com 55 DAA, de 55% para 39% de teor de água. Estes resultados evidenciam que houve desidratação lenta por um gradiente osmótico entre as sementes e as soluções. Contudo, após a secagem até 10% de água, as sementes osmocondicionadas perderam totalmente a capacidade germinativa. Os resultados de germinação sugerem que o tempo de incubação das sementes e concentrações utilizadas foram excessivos, causando a morte das sementes e estimulando o crescimento de fungos oportunistas, principalmente nas sementes incubadas com sacarose.

**Tabela 1.** Germinação (G%), desenvolvimento de plântulas (DP%) e potencial hídrico ( $\Psi$  MPa) em sementes de *C. echinata* com 45 e 55 DAA, sendo T0, sementes recém-colhidas, PEG 1 e PEG 2 e SAC 1 e SAC 2, sementes incubadas por 10 dias em soluções de polietilenoglicol e sacarose a -2,4 MPa e -12 MPa, a 25 °C, respectivamente.

<b>45 DAA</b>						
Tratamento	G%	DP%	U%	$\Psi$ após incub	$\Psi$ Sec 10%	
TO	88	45	60	-1,16	-67,95	
PEG 1	0	0	41	-2,2	-84,45	
PEG 2	0	0	39	-7,1	-102,71	
SAC 1	0	0	51	-2,9	-72,98	
SAC 2	0	0	43	-6,2	-100,89	
SEC 10%	23	0	10	-	-83,75	
<b>55 DAA</b>						
Tratamento	G%	DP%	U%	$\Psi$ após incub	$\Psi$ Sec 10%	
TO	100	75	55	-1,18	-52,32	
PEG 1	0	0	39	-2,1	-81,45	
PEG 2	0	0	43	-7,1	-98,03	
SAC 1	0	0	51	-2,9	-72,94	
SAC 2	0	0	48	-5,5	-97,67	
SEC 10%	75	0	10	-	-65,92	

Embora a redução na capacidade germinativa das sementes recém-colhidas com 55 DAA tenha sido menor que a observada para sementes com 45 DAA após o tratamento por secagem direta em estufa, sem o prévio osmocondicionamento, não ocorreu o desenvolvimento de plântulas a partir das sementes tratadas (**Tabela 1**).

Observou-se, ainda, que não houve germinação durante os 10 dias de incubação das sementes a 25 °C que, de acordo com Mello *et al.* (2004), é a temperatura ideal para a germinação dessas sementes.

Além do estresse hídrico afetar a embebição, o primeiro efeito mensurável da baixa disponibilidade de água é a redução no crescimento, possivelmente causada pela diminuição da expansão celular (Krammer 1974). O processo de alongamento celular e a síntese de parede são extremamente sensíveis ao déficit hídrico (Wenkert *et al.* 1978) e a redução do crescimento, como consequência da diminuição do alongamento celular, seria causada por um decréscimo na turgescência dessas células (Hsiao 1973).

A condição hídrica e a temperatura são fatores que exercem influência decisiva na manutenção de bancos de sementes. Para a maioria das espécies de regiões tropicais, a temperatura ótima para melhor germinabilidade encontra-se entre 15 e 30 °C e temperaturas baixas reduzem o processo, razão pela qual os estudos de tolerância à dessecação em sementes germinadas de *Medicago truncatula*, através de osmocondicionamento com PEG, foram realizados a 10 °C, por diminuir a taxa respiratória das sementes nessas condições (Buitink *et al.* 2003). Além disso, variações na temperatura e nas propriedades da água, dentre outros fatores, atuam no metabolismo das sementes, interferindo no controle endógeno da mobilização de reservas (Buckeridge *et al.* 2004a).

- O estresse hídrico causado pela forte negatividade do potencial hídrico de ambas soluções osmóticas durante a incubação das sementes possivelmente limitou a germinação;
- Houve desidratação das sementes durante o período de incubação, evidenciando movimento de água das sementes (potencial hídrico menos negativo) para a solução osmótica (potencial hídrico mais negativo);
- O tratamento com PEG, mesmo com germinação zero, mostrou-se mais eficiente que a sacarose para o osmocondicionamento, uma vez que houve menor crescimento de microorganismos nessas condições;

- A temperatura de 25 °C para incubação pode ter sido elevada o que propiciou aumento da taxa respiratória, favorecendo também o aumento de microorganismos. Acredita-se que a temperatura de incubação neste experimento tenha sido um dos fatores limitantes do sucesso do processo de secagem lenta das sementes imaturas de *C. echinata*, devendo este aspecto ser considerado nos próximos experimentos, com incubação das sementes a  $10 \pm 2$  °C;
- Devido às inadequadas condições em que as sementes foram expostas quando incubadas a -12 MPa, ao contrário daquelas incubadas a -2,4 MPa, concluiu-se que o potencial hídrico da solução osmocondicionadora deve ser mais próximo ao da semente, porém inferior, para permitir a desidratação das mesmas;
- O período de 10 dias para incubação, correspondendo ao tempo necessário para que completassem a maturação no campo não foi adequado;
- Análise de quantificação de carboidratos solúveis (não mostrado) evidenciou que houve aumento nos açúcares dos cotilédones e eixos embrionários em sementes com 45 e 55 DAA quando incubadas a -2,4 MPa.

Um segundo experimento foi então desenvolvido objetivando definir o tempo de incubação e a concentração adequada da solução de PEG 6000 para o osmocondicionamento das sementes de *Caesalpinia echinata*, visando à indução de tolerância à dessecação de sementes imaturas da espécie.

#### **4.1.2 Alterações do potencial hídrico de sementes imaturas de pau-brasil induzidas por PEG e seu efeito na qualidade fisiológica das sementes**

##### **Procedimento experimental e principais resultados**

O experimento foi conduzido em 2005 na Estação Ecológica e Experimental de Tapacurá (PE) visando induzir tolerância à dessecação através de alterações do potencial hídrico por meio de incubação em soluções osmocondicionadoras de PEG e verificar o melhor tempo de incubação. Frutos foram colhidos aleatoriamente, sem prévia marcação quanto ao dia da antese e separados pela coloração do epicarpo em diferentes estádios de maturação (com até 25%, 50% e acima de 50% de manchas marrons). Das sementes oriundas dos frutos, foi feita uma segunda triagem, separando-

as, finalmente em três estádios de maturação, denominados de sementes imaturas (45-55), semi-maduras (55-60 DAA) e maduras (acima de 60 DAA). Esta classificação foi feita com base nos critérios estabelecidos previamente por Borges *et al.* (2005).

Parte das amostras foram submetidas à secagem em estufa com circulação forçada de ar a 40 °C (Mello *et al.* 2004), procurando-se reduzir o teor de água até 12%. Depois de alcançado esse valor, foram avaliados o teor de água e a germinação das sementes.

Outras amostras foram incubadas em soluções de PEG em duas concentrações distintas (-0,8 MPa e -1,2 MPa) por 8, 16 e 24 horas, a 25 °C e posterior secagem em estufa por 4 horas sob as mesmas condições acima mencionadas.

A germinabilidade das sementes foi avaliada pela porcentagem de germinação (G %), pelo índice de velocidade de germinação (IVG) e pelo desenvolvimento de plântulas normais (DP%) ao final de cada tratamento.

Os valores de teor de água das sementes foram diferentes ao final dos tratamentos. Desta forma, foram comparadas quanto a germinação apenas as amostras de sementes nas quais os teores de água eram similares.

A **Tabela 2** mostra que as sementes imaturas incubadas em PEG -0,8 MPa e -1,2 MPa, por 24 horas, recuperaram a capacidade germinativa após secagem com prévio osmocondicionamento em PEG em valores de porcentagem de germinação semelhantes aos valores iniciais. O IVG e o desenvolvimento de plântulas foram maiores nas sementes incubadas na solução com potencial hídrico de -1,2 MPa. Para os demais estádios de maturação esse tratamento mostrou-se indiferente na recuperação ou perda dos índices analisados.

Hunter & Erickson (1952 *in* Larcher 2000) verificaram que sementes de soja semeadas em solo com potencial hídrico inferior a -0,66 MPa apresentaram problemas de germinação. De acordo com Sá (1987), potenciais hídricos de -0,4 e -0,8 MPa, prejudicaram sensivelmente a germinação, mas não impediram a ocorrência do processo. Segundo Hadas (1976), a redução da germinação de sementes de leguminosas submetidas ao estresse hídrico pode ser devida à menor difusibilidade da água através do tegumento, bem como ao prolongamento da fase estacionária do processo, devido à redução da atividade enzimática e, conseqüentemente, ao menor desenvolvimento meristemático e emergência da radícula. Além disso, potenciais hídricos decrescentes causam redução da atividade respiratória das sementes (Barrueto *et al.* 1981), inibindo a germinação. Essa redução nos processos metabólicos deve-se não só à sensibilidade das

sementes à variação do potencial hídrico, mas também à alta viscosidade das soluções de PEG e baixa taxa de difusão de O<sub>2</sub>, que podem comprometer a disponibilidade de oxigênio para as sementes (Hasegawa *et al.* 1984, Hardegree & Emmerich 1994). Campos & Assunção (1990) atribuem a redução da germinação à inibição de síntese e/ou da atividade das enzimas hidrolíticas necessárias à germinação das sementes, com o aumento da concentração das soluções osmóticas.

Neste experimento, notou-se que a redução do potencial hídrico da solução associada ao tempo de incubação, foi mais eficaz para as sementes imaturas, o que pode estar relacionado com a movimentação hidrostática no interior da célula, possivelmente sua participação no sistema de regulação que induz a tolerância à dessecação em sementes. Provavelmente a solução utilizada apresentava potencial hídrico inferior ao da semente, ocorrendo, desta forma, “desidratação em meio líquido por um gradiente osmótico”.

Os resultados sugerem que soluções com potenciais hídricos inferiores aos das sementes de pau-brasil podem ser críticas, provocando movimentação hidrostática, o que poderia favorecer a indução da tolerância à dessecação.

O período de 24 horas para osmocondicionamento de sementes imaturas de pau-brasil foi suficiente para produzir alterações que favoreceram a aquisição da tolerância à desidratação, com retomada da capacidade germinativa, assim como da velocidade de germinação. Com isso foi possível fundamentar a escolha de níveis de potenciais hídricos da solução de PEG e o tempo adequado para a incubação das sementes nessa solução.

A secagem direta em estufa das sementes imaturas resultou em perda da capacidade germinativa, desenvolvimento de plântulas e diminuição da velocidade de germinação (dados não mostrados). Estes resultados comparados com o tratamento em PEG e posterior secagem confirmam os resultados positivos quando se utiliza PEG para osmocondicionamento das sementes imaturas.

Não foram observadas alterações nas sementes semi-maduras e maduras submetidas aos diferentes tratamentos de secagem.

### **Curva de embebição em água de sementes de pau-brasil**

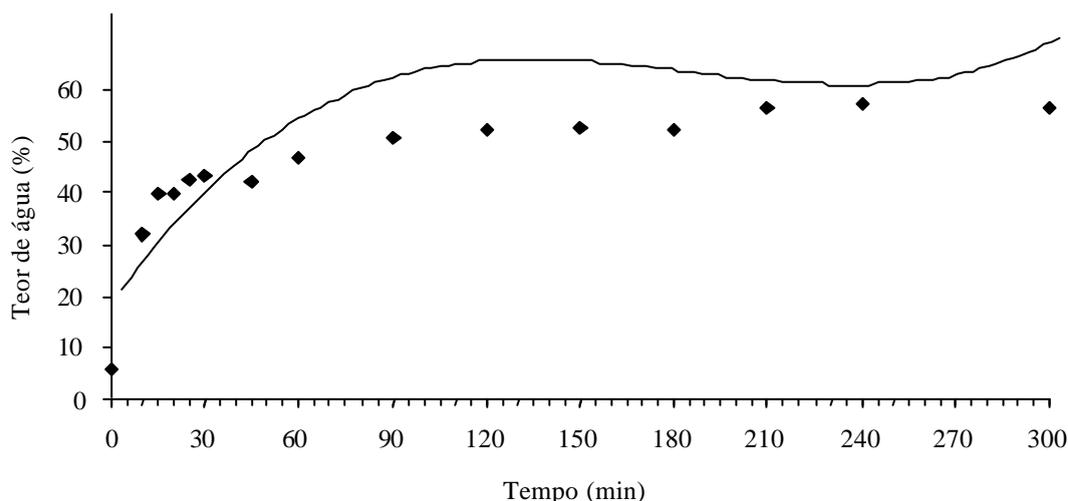
Para complementar as informações deste experimento, foi importante avaliar o tempo em que as sementes de *C. echinata* atingiam estabilidade hídrica com meio. Para

tal, as sementes foram embebidas em água, sendo avaliadas a velocidade de embebição e a variação do potencial hídrico das mesmas durante a embebição.

Os resultados mostraram que as sementes apresentam rápida embebição, atingindo estabilidade hídrica com o meio (equilíbrio higroscópico) em 30 min, a 25 °C, permanecendo estável por aproximadamente 300 min (5 horas) (**Figura 12**), quando as sementes iniciaram o processo de germinação. Barbedo *et al.* (2002) verificaram que as sementes de pau-brasil iniciam a germinação (protrusão de radícula) entre 24 e 48 horas de embebição.

Os dados obtidos sugerem que o tempo de incubação das sementes em PEG (com potenciais hídricos menores que o da semente e temperatura de incubação a  $8\pm 2$  °C) deve ser superior a 5 horas para atingir o equilíbrio. Confirma-se assim que 24 horas são suficientes para que a incubação das sementes em PEG seja efetiva em promover a desidratação lenta, permitindo provavelmente a ocorrência de atividades metabólicas necessárias para aquisição de tolerância à dessecação.

Com os resultados obtidos foi então proposto um novo experimento visando avaliar a capacidade germinativa de sementes imaturas de pau-brasil a diferentes níveis de teor de água e de secagem.



**Figura 12.** Curva de embebição em água de sementes de *Caesalpinia echinata*.

**Tabela 2.** Sementes de *Caesalpinia echinata* em três estádios de maturação (imaturas, semi-maduras e maduras) submetidas ao osmocondicionamento com PEG em duas concentrações (-1,2 MPa e -0,8 MPa), por três períodos (8, 16 e 24 h).

Estádio de maturação	Pot. Hid. $\Psi$ (MPa)	Período (h)	Teor de Água após secagem (%)	Germinação (%)	IVG	Plântulas normais (%)	
Imaturas	Inicial	0	56,9	78	2,94	72	
	Após secagem	-	17,2	47	1,55	45	
	-0,8	8	11,0	42	1,04	40	
		16	26,1	50	1,68	48	
		24	34,3	63	2,46	63	
	-1,2	8	12,8	57	1,99	55	
		16	13,3	37	1,56	36	
		24	17,1	64	2,25	62	
	Semi-maduras	Inicial	0	37,3	100	7,44	95
		Após secagem	-	14,7	97	4,68	95
		-0,8	8	23,4	100	5,17	95
			16	26,8	100	6,28	95
24			29,3	90	6,61	88	
-1,2		8	21,0	100	5,44	94	
		16	23,4	97	4,89	95	
		24	22,3	100	5,17	95	
Maduras		Inicial	0	14,3	100	6,17	98
		Após secagem	-	6,6	100	5,17	98
		-0,8	8	16,5	100	5,28	95
			16	33,5	100	5,39	95
	24		32,1	100	7,39	93	
	-1,2	8	21,6	100	5,78	95	
		16	26,2	100	5,72	94	
		24	19,0	97	6,17	95	

#### 4.1.3 Efeito de diferentes métodos de secagem e nível de tolerância à dessecação sobre a germinabilidade de sementes imaturas de pau-brasil (Lote 2005)

##### Procedimento experimental e principais resultados

A maneira pela qual o condicionamento osmótico é capaz de melhorar a performance das sementes é, ainda, assunto de muita discussão, o que aliás, já havia sido definido por Heydecker *et al.* (1975) como sendo uma técnica simples em conceito, mas fisiologicamente, complexa. Duas linhas de evidência, que são mutuamente exclusivas, podem explicar os efeitos do condicionamento osmótico: a restauração na integridade de membrana perdida durante o processo de desidratação, na maturação das sementes e o aumento na disponibilidade de metabólitos prontos para serem utilizados na germinação e nos processos de crescimento. A reparação inclui, além da reorganização espontânea da membrana plasmática, outros processos metabólicos (Tilden & West 1985).

Este experimento foi realizado com sementes provenientes da RBEEMG, coletadas em 2005, em três estádios de desenvolvimento (45, 55 e 65 DAA), conforme definido por Borges *et al.* (2007), e objetivou avaliar os efeitos do condicionamento osmótico em diferentes níveis de secagem (até pelo menos 12% de água), visando induzir tolerância à dessecação de sementes imaturas de pau-brasil. Com esse teor de água é possível armazenar sementes de pau-brasil por até 24 meses a  $-20\text{ °C}$  (Hellmann *et al.* 2006).

De cada lote foram, inicialmente, avaliados germinação, teor de água, potencial hídrico e desenvolvimento de plântulas. A seguir, os lotes foram divididos em sublotos e estes, submetidos a diferentes tratamentos de secagem, com ou sem osmocondicionamento prévio em PEG  $-3,0\text{ MPa}$  por 24 horas a  $8 \pm 2\text{ °C}$ , seguido por secagem em estufa a  $40 \pm 2\text{ °C}$  com circulação forçada de ar. Os níveis de desidratação propostos inicialmente foram de 30%, 20%, 12% e 7%. Ao final de cada tratamento, os mesmos parâmetros foram reavaliados (**Figura 13 e 14**).

Os resultados mostraram que o conteúdo de matéria seca das sementes nos três estádios de desenvolvimento estudados variou pouco, sendo encontrados valores médios de  $243\text{ mg g}^{-1}$ ,  $310\text{ mg g}^{-1}$  e  $310\text{ mg g}^{-1}$  aos 45, 55 e 65 DAA, respectivamente (**Tabela 3 e Figura 15**). Nos dois últimos estádios, houve menor variação na matéria seca em relação aos 45 DAA, confirmando que sementes de *Caesalpinia echinata* com 55 DAA

estão próximas ao período de maturidade fisiológica (Borges *et al.* 2007). Esses autores verificaram que o conteúdo de matéria seca apresentou aumento considerável de 32 DAA a 70 DAA, quando atingiu  $316 \text{ mg.g}^{-1}$ , indicando, inclusive, diminuição deste acúmulo ao final da maturação.

No presente experimento as sementes apresentaram, inicialmente, 60%, 50% e 22% de teor de água (**Tabela 3**) respectivamente aos 45 DAA, 55 DAA e 65 DAA e cerca de 100% de germinação e elevado vigor (70-80% de desenvolvimento de plântulas) (**Tabela 4**).

Entre os diferentes tratamentos de secagem foram observadas menores diferenças no conteúdo de matéria seca, contudo, a germinação e o vigor variaram significativamente para cada estágio de maturação, reduzindo após os tratamentos, especialmente sem PEG (**Tabelas 3 e 4**).

Sementes com 45 DAA quando previamente osmocondicionadas em PEG, e secas em estufa até 12% de água, mantiveram a germinabilidade em cerca de 75% (**Figuras 15 e 16**). No entanto, a secagem direta em estufa prejudicou a germinabilidade em *ca.* 80% com teor de água de 12%, sendo que com teor de água de 7%, as sementes apresentaram apenas 7% de germinação. Neste estágio de maturação, as sementes toleraram pouco a secagem a níveis inferiores a 12% de teor de água.

Por outro lado, sementes com 55 DAA, que apresentavam inicialmente 100% de germinação, toleraram consideravelmente todos os tratamentos de secagem até níveis de 12% de teor de água, embora tenha ocorrido uma pequena redução na germinação. O osmocondicionamento alterou significativamente o comportamento germinativo e o vigor das sementes com 65 DAA, reduzindo esses parâmetros (**Figuras 15 A e 15 B**).

Excetuando as sementes de 65 DAA, observou-se naquelas cujos potenciais hídricos eram menos negativos do que o da solução de PEG que houve diminuição do potencial hídrico das sementes após o período de incubação, indicando que o osmocondicionamento provocou a desidratação dessas sementes (**Tabela 3**). A **Tabela 3** mostra que sementes coletadas aos 45 DAA apresentavam teores de água médio de 60% e potencial hídrico médio de -2,2 MPa. Após a incubação em PEG a -3,0 MPa por 24 horas, esses valores foram reduzidos para 48% de teor de água e -4,0 MPa para o potencial hídrico. Igualmente, sementes com 55 DAA apresentaram teores de água médios iniciais de 50% e potencial hídrico de -2,5 MPa e após a incubação, estes valores foram reduzidos para 48% de água e -4,0 MPa para o potencial hídrico, comprovando o movimento de água das sementes para a solução de PEG. O

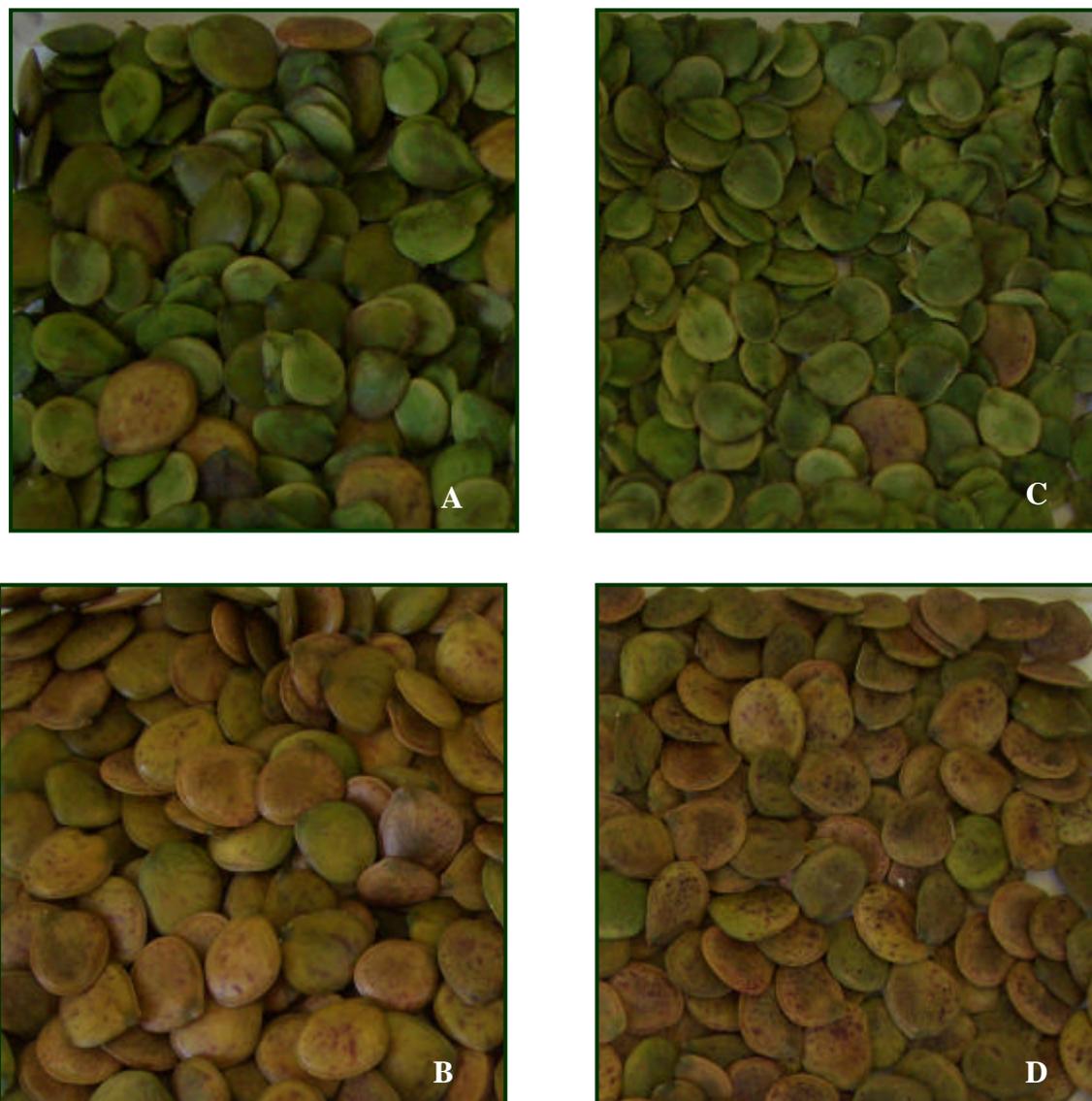
procedimento seguiu com a secagem em estufa a 40°C até atingir os valores pré-estabelecidos de 30%, 20%, 12% e 7% de teor de água.

Por outro lado, sementes com 65 DAA apresentaram teor de água médio de 22% e potencial hídrico médio de - 38 MPa e após a incubação estes valores foram elevados para 51% de água e -13 MPa de potencial hídrico, o que sugere ter ocorrido hidratação lenta durante o período de embebição. Foram observadas mudanças no comportamento fisiológico das sementes com 65 DAA provocadas pelo osmocondicionamento prévio à secagem a 12% de teor de água, havendo redução significativa da germinação.

Esses resultados indicaram que é possível induzir tolerância à dessecação de sementes imaturas de pau-brasil através de osmocondicionamento prévio à secagem, permitindo avaliar na próxima etapa desse trabalho a eventual participação dos carboidratos solúveis durante o processo de tolerância à dessecação. Os resultados sugerem, ainda, que talvez seja possível o armazenamento de sementes imaturas osmocondicionadas de pau-brasil, uma vez que toleraram a dessecação até 12 % de teor de água. Como informado previamente, sementes de *Caesalpinia echinata*, fisiologicamente maduras, quando desidratadas a 12% de teor de água, toleram o armazenamento em câmaras frias (Barbedo *et al.* 2002) e até o congelamento por até 24 meses (Hellmann *et al.*, 2006), sem perda de viabilidade e vigor. Dados adicionais sobre armazenamento de sementes osmocondicionadas estão apresentados nos anexos (Tabela A1).



**Figura 13.** Osmocondicionamento de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45 e 55 DAA em solução de PEG a -3,0 MPa.



**Figura 14.** Aspecto geral das sementes *Caesalpinia echinata* com 45 DAA (A e C) e 55 DAA (B e D) osmocondicionadas em PEG seguido de secagem até 12% de teor de água (A e B) e somente secas em estufa até 12% de água (C e D).

**Tabela 3.** Teor de água (%), conteúdo de massa seca (mg semente<sup>-1</sup>) e potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45, 55 e 65 dias após antese (DAA), submetidas à secagem (em diferentes níveis) com ou sem pré-tratamento com PEG (T0) - Lote 2006.

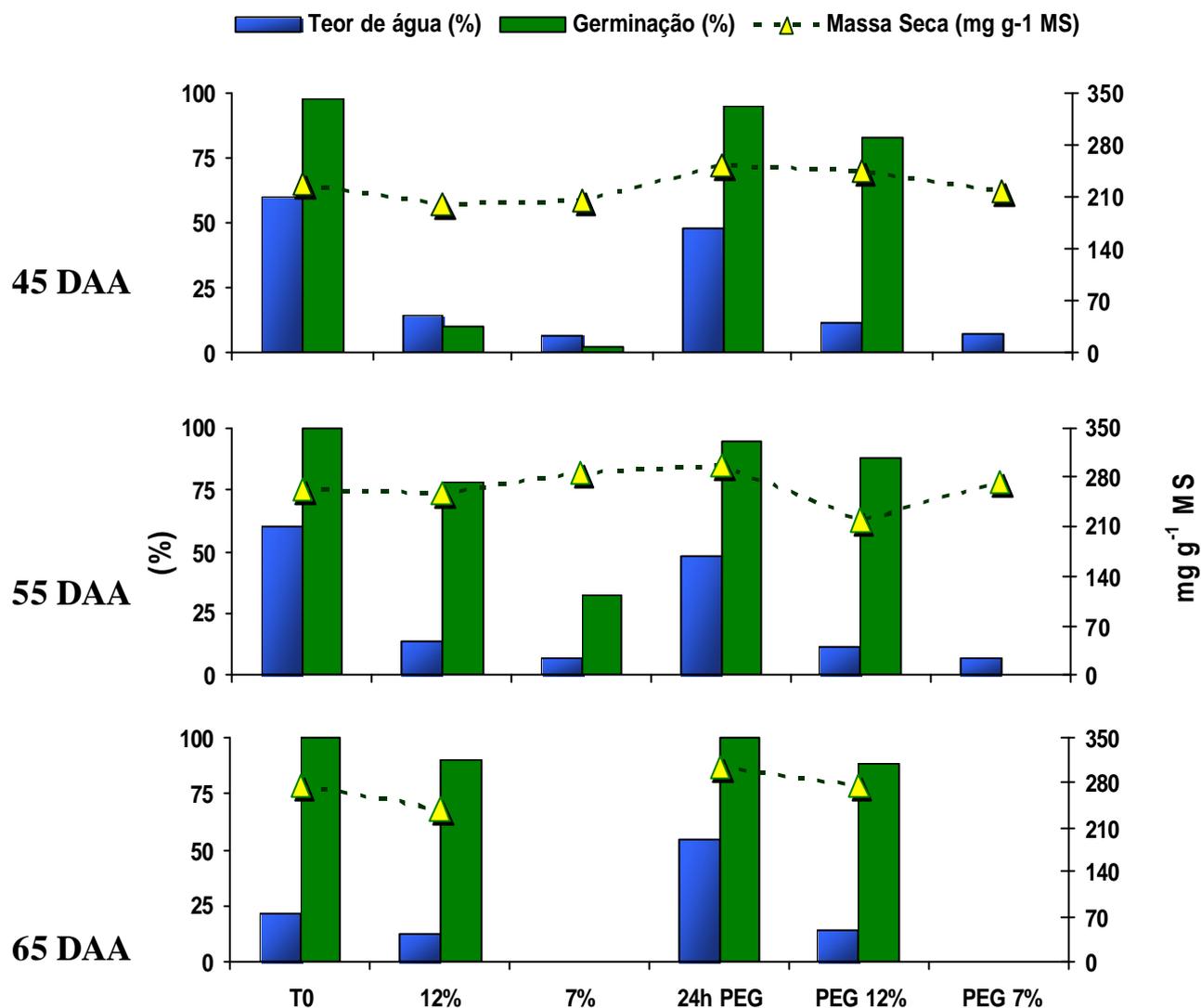
(DAA)	Tratamento das sementes / Níveis de secagem									
	Sem PEG					Com PEG				
	T0	30%	20%	12%	7%	24h PEG	30%	20%	12%	7%
<b>TEOR DE ÁGUA (%)</b>										
45	60 aAa	31 aBa	21 aCa	12 aDa	8 aEa	48 aAb	30 aBa	20 aCa	12 aDa	7 aEa
55	50 bAa	30 aBa	19 aCa	12 aDa	7 aEa	45 bAb	30 aBa	20 aCa	12 aDa	7 aEa
65	22	-	-	11	7	51	31	-	12	8
(Coef. Variação 8,66%)										
<b>MASSA SECA (mg semente<sup>-1</sup>)</b>										
45	243 bAa	219 aAb	228 aAa	252 aAa	218 bAa	225 bBa	321 aAa	251 aBa	238 aBa	234 aBa
55	310 aAa	239 aBb	204 aBa	257 aABa	273 aABa	310 aAa	321 aAa	234 aBa	254 aABa	263 aBa
65	310	-	-	315	237	283	331	-	323	326
(Coef. Variação 23,46%)										
<b>POTENCIAL HÍDRICO (-MPa)</b>										
45	2,2 aCa	12 aCa	24 bCb	78 aBa	131 aAa	4 aDa	15 aDa	42 aCa	80aBa	131 aAa
55	2,5 aCa	10 aCa	47 aBa	24 bCb	131 aAa	4 aDa	9 aDa	38 aCa	87 aBa	130 aAa
65	38	-	-	82	131	13	8	-	78	136
(Coef. Variação 23,29%)										

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam dias após antese; maiúsculas comparam os diferentes níveis de secagem dentro de cada tratamento (Com e Sem PEG) e letras em *itálico* comparam os diferentes níveis de secagem entre os tratamentos (Com PEG e Sem PEG).

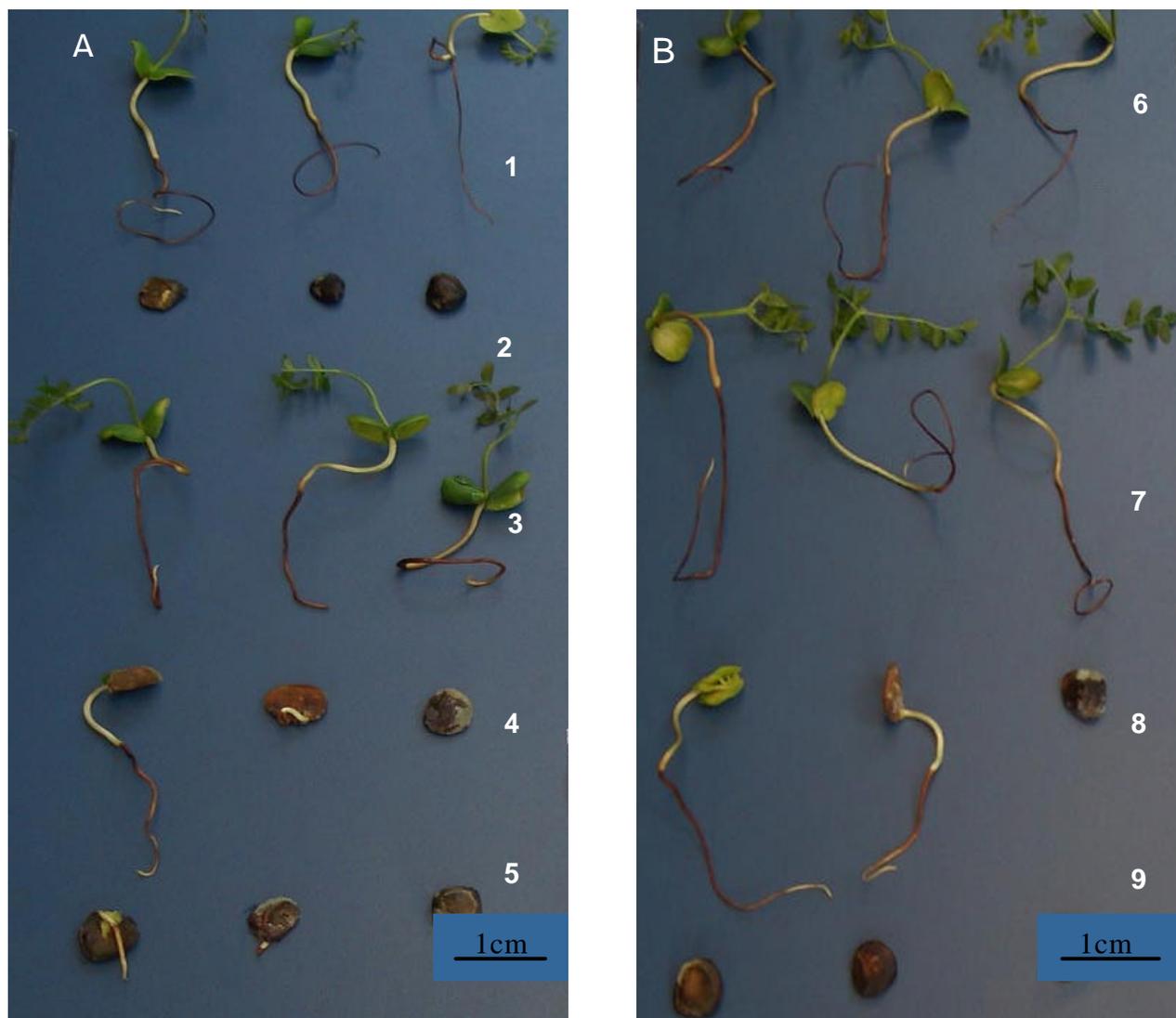
**Tabela 4.** Germinação (%) e desenvolvimento de plântulas (%) de sementes de *Caesalpinia echinata* com 45, 55 e 65 dias após antese (DAA), submetidas à secagem (em diferentes níveis) com ou sem pré-tratamento com PEG (T0) - Lote 2006.

(DAA)	Tratamento das sementes / Níveis de secagem									
	Sem PEG					Com PEG				
	T0	30%	20%	12%	7%	T0	30%	20%	12%	7%
<b>GERMINAÇÃO (%)</b>										
45	98 aAa	95 aAa	65 aBa	28 bCb	20 aCa	92 aAa	80 aAa	78 aABa	55 aBa	15 aCa
55	98 aAa	92 aAa	78 aABa	78 aABa	28 aCa	95 aAa	82 aABa	80 aABa	65 aBa	15 aCa
65	98	-	-	95	52	98	60	-	58	40
Coef. Variação	20,72%									
<b>DESENVOLVIMENTO DE PLÂNTULAS (%)</b>										
45	70 aAa	62 aAa	32 bBb	5 bCb	10 aCa	78 aAa	62 aABa	55 aBa	45 aBa	8 aCa
55	78 aAa	75 aAa	65 aAa	50 aBa	10 aCa	78 aAa	72 aAa	65 aABa	45 aBa	8 aCa
65	88	-	-	82	20	90	48	-	45	20
Coef. Variação	23,46%									

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam dias após antese; maiúsculas comparam os diferentes níveis de secagem dentro de cada tratamento (Com e Sem PEG) e letras em *itálico* comparam os diferentes níveis de secagem entre os tratamentos (Com PEG e Sem PEG).



**Figura 15 A.** Germinação (%), teor de água (%) e conteúdo de matéria seca (mg  $\xi^{-1}$ ) em sementes de *Caesalpinia echinata* com 45, 55 e 65 (DAA) dias após a antese, coletadas em Mogi-Guaçu (SP), em 2005.



**Figura 15 B.** Aspectos gerais de sementes de imaturas de *Caesalpinia echinata* durante os tratamentos de secagem controlada. **(A)** Sementes de **45 DAA**: 1. Análise inicial, sem tratamento, 2. Secas em estufa até 12% de teor de água, 3. Incubadas em PEG -3,0 MPa, por 24 h a 8°C e secas até 12% de água, 4. Secas até 7% de água, 5. Incubadas em PEG -3,0 MPa por 24 h a 8°C e secas até 7% de teor de água. **(B)** Sementes de **55 DAA**: 6. Incubadas em PEG -3,0 MPa, por 24 h a 8°C e secas até 12% de água, 7. Secas artificialmente até 12% de água, 8. Secas artificialmente até 7% de água, 9. Incubadas em PEG -3,0 MPa por 24 h a 8°C e secas até 7% de água.

#### **4.2 Variação nos teores e na composição de açúcares solúveis e amido de sementes de pau-brasil em diferentes estádios de maturação e após serem submetidas a diferentes métodos de secagem (Lote 2006)**

Garcia *et al.* (2006) reportaram aumento na concentração de açúcares solúveis durante o armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* em temperatura ambiente, o que pode ter ocorrido por hidrólise do amido, seu principal composto de reserva.

Diversos autores relacionam tipo e quantidade, ou proporção, dos açúcares solúveis com a tolerância das sementes à dessecação e com a viabilidade das mesmas durante o armazenamento. Hoekstra *et al.* (2001), por exemplo, sugerem a participação dos açúcares, principalmente sacarose e oligossacarídeos da série da rafinose, na manutenção da integridade das membranas. Buitink *et al.* (2003) observaram aumento de açúcares, especialmente a sacarose, em sementes osmocondicionadas por PEG, sendo que este aumento coincidia com a perda de água, sugerindo que o fator responsável pelo estresse osmótico causava o incremento desse açúcar. Surge então a questão: De onde se origina o acúmulo de sacarose? A primeira hipótese é que poderia ser produzido nos cotilédones por uma acelerada quebra de reservas, sendo transportada para as radículas durante a embebição em PEG. Os autores levantaram, então, a hipótese de que o osmocondicionamento induzia alterações no fluxo de carbono, através de diferentes caminhos metabólicos. Esta possibilidade foi avaliada em experimentos nos quais a fonte de carbono endógeno, normalmente alocado para a divisão e expansão celular, era desviado da síntese da parede celular, levando ao acúmulo da sacarose.

O acúmulo de sacarose, rafinose e dehidrinas foi observado por Black *et al.* (1999) durante o desenvolvimento e re-estabelecimento da tolerância à dessecação em sementes de trigo. Como as proteínas do tipo LEA, incluindo dehidrinas, exercem importante papel durante a tolerância à dessecação, os autores sugeriram que essas proteínas interagem com agentes protetores, como oligossacarídeos e sacarose durante o processo.

Nem todos os mecanismos que são induzidos durante a incubação por PEG são necessariamente relacionados com a tolerância à dessecação, podendo também estar relacionados com respostas ao estresse osmótico nos tecidos (Buitink *et al.* 2003).

Como já informado, dentre os compostos celulares, os carboidratos solúveis estão envolvidos com a tolerância à dessecação durante o desenvolvimento e maturação das

sementes (Obendorf 1997, Hoesktra *et al.* 2001). Barbedo *et al.* (2002), sugeriram que a perda da capacidade germinativa de sementes de *C. echinata* durante o armazenamento sob temperatura ambiente poderia estar associada a variações nos açúcares solúveis. Análises desses açúcares durante o armazenamento em diferentes temperaturas mostraram baixos níveis de glicose e frutose em relação à sacarose em sementes de *C. echinata* que perderam a germinabilidade (Garcia *et al.* 2006).

Borges *et al.* (2002) estudando o comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (Tamboril-da-Mata) verificaram que houve aumento na germinação das sementes tratadas com PEG -0,4 MPa por 120 horas. Embora não tenha havido incremento na massa seca das sementes, os teores de arabinose e xilose das paredes celulares decresceram durante o osmocondicionamento. A galactose não foi detectada embora a atividade de alfa-galactosidase tenha mostrado diferenças significativas entre os tratamentos. Os teores de glicose no embrião e nos cotilédones alteraram-se significativamente, diminuindo durante o osmocondicionamento, enquanto a estaquiose e a rafinose não tiveram alterações significativas durante o processo, concluindo-se que o osmocondicionamento potencializou a germinação durante o processo de embebição, resultando em modificações na parede celular. Essas informações sugerem que o osmocondicionamento provoca alterações em componentes específicos das sementes, alertando, portanto, para a necessidade de análises qualitativas dos carboidratos de sementes osmocondicionadas de pau-brasil.

Objetivando avaliar as eventuais alterações dos carboidratos de reserva das sementes de pau-brasil durante o processo de secagem controlada nos diferentes estádios de maturação foram analisados o teor e a composição desses compostos, com vistas a relacionar essas variações com a tolerância à dessecação das sementes da espécie em estudo.

Os principais resultados obtidos serão descritos e discutidos a seguir.

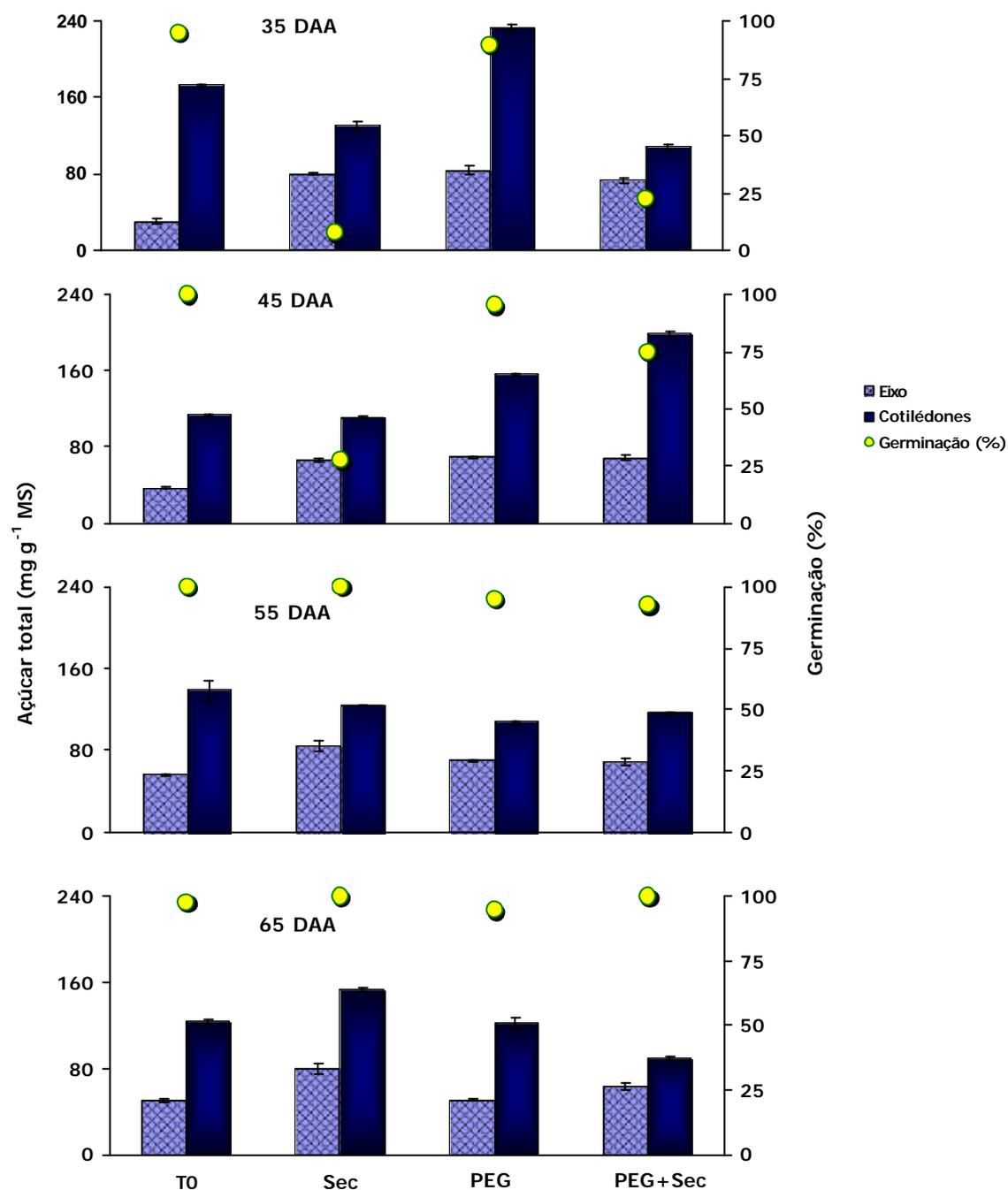
#### 4.2.1 Variações dos teores de açúcares solúveis e amido nas sementes submetidas a diferentes métodos de secagem

Na **Figura 16 e Tabela 5** são apresentadas as variações nos teores de açúcares solúveis em etanol encontrados nos eixos embrionários e nos cotilédones de sementes de *C. echinata* em quatro estádios de maturação, e após serem submetidas a diferentes tratamentos de secagem.

Nas análises iniciais (T0), nota-se que os açúcares solúveis apresentaram maior teor nos cotilédones de sementes imaturas (35 DAA), perfazendo cerca de 17% do peso seco, e decrescendo à medida que as sementes atingiram a maturidade, correspondendo a cerca de 12% nas sementes com 65 DAA. Foram observadas diferenças significativas no teor desses açúcares entre as sementes com 35, 45 e 55 DAA (Tabela 5). No eixo embrionário, inversamente ao que ocorreu nos cotilédones, os açúcares apresentaram maiores teores nas sementes com 45, 55 e 65 DAA, sendo observados maiores teores nas sementes com 55 DAA. Sementes de todos estádios de maturação analisados apresentaram elevada porcentagem de germinação, como também está indicado na **Figura 16**. Todavia somente a partir de 45 DAA, as sementes mostraram-se aptas ao desenvolvimento de plântulas.

No tratamento com secagem até 12% em estufa (secagem rápida) houve diminuição significativa nos teores de açúcares dos cotilédones de sementes com 35 e 55 DAA, quando comparadas aos valores iniciais. Todavia, aos 65 DAA, houve aumento significativo nesses compostos, da ordem de 25%. No eixo embrionário, a secagem proporcionou aumento significativo nos teores de açúcares em todas as idades. As sementes com 35 e 45 DAA não toleraram a secagem até níveis de teor de água a 12%, perdendo a capacidade germinativa como pode ser observado na **Figura 16 e na Tabela 5**.

No tratamento com PEG/24h nota-se que o osmocondicionamento por 24 horas diminuiu os teores de açúcares nos cotilédones de sementes com 55 DAA e aumentou naquelas com 35 e 45 DAA, mantendo-se inalterados nas sementes aos 65 DAA. Já nos eixos embrionários, houve aumento expressivo dos açúcares nas sementes imaturas (35 e 45 DAA), tendendo a diminuir este aumento nas sementes com 55 e mantendo-se inalterados também nas sementes aos 65 DAA. Esse tratamento não afetou a germinação das sementes em nenhum estádio de maturação.



**Figura 16.** Variação do teor de açúcares solúveis totais ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) no eixo embrionário e cotilédones de sementes de *C. echinata* e porcentagem de germinação durante a maturação e quando submetidas a diferentes tratamentos de secagem: T0= Sementes recém-colhidas; Sec= Sementes secas até 12% de água; PEG= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h; PEG+Sec= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h seguido de secagem até 12%. As barras representam desvio padrão das médias ( $n=3$ ). DAA= dias após antese.

Nota-se também na **Figura 16 e Tabela 5** que os açúcares solúveis nos cotilédones de sementes com 45 DAA, aumentaram significativamente durante o osmocondicionamento (PEG) e um aumento ainda maior com a secagem subsequente (PEG + Sec). Observa-se que o teor e a razão entre os açúcares dos cotilédones e eixo para sementes com 45 DAA submetidas ao tratamento PEG + Sec foram similares aos encontrados nos cotilédones e eixo embrionário de sementes com 45 e 55 DAA em sua análise inicial (T0). As sementes com 45 DAA mantiveram a capacidade germinativa após este tratamento, apresentando cerca de 75% de germinação.

Em resumo, os dados mostrados na **Tabela 5 e Figura 16** indicaram que as alterações hídricas provocadas pela secagem favoreceram o incremento de açúcares no eixo embrionário, principalmente em sementes imaturas e diminuição ou estabilização desses açúcares nos cotilédones, mantendo-se a mesma proporção encontrada nas análises iniciais. Observou-se também que o osmocondicionamento em PEG por 24 horas provocou aumento dos açúcares solúveis em sementes imaturas, tanto nos eixos embrionários como nos cotilédones.

Na **Figura 17** nota-se que os teores de amido foram muito elevados nos cotilédones, sendo geralmente superiores a 50% da massa seca, exceto nas sementes com 35 DAA. Houve aumento gradativo do teor de amido nos cotilédones e eixo com a maturação das sementes. A secagem rápida (Sec) provocou aumento no teor de amido, tanto nos cotilédones como no eixo em sementes com 35 DAA. Em sementes com 45 DAA o teor de amido não foi alterado com a secagem nos cotilédones, mas aumentou no eixo, o que não foi observado para sementes com 55 e 65 DAA. Observa-se, ainda, que o osmocondicionamento com PEG (PEG) proporcionou aumento de amido nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes com 35 DAA. Em sementes com 45 DAA, o teor de amido nos cotilédones decresceu ligeiramente, enquanto em sementes com 55 e 65 DAA os valores permaneceram praticamente os mesmos, havendo, contudo, redução no teor de amido nos eixos de sementes com 55 e 65 DAA. A secagem após o osmocondicionamento (PEG + Sec) em sementes com 35 DAA provocou um aumento significativo no teor de amido, principalmente nos cotilédones. Para as sementes com 45 DAA não houve alteração, enquanto que nas sementes com 55 e 65 DAA houve queda no teor de amido do eixo embrionário e manutenção dos valores iniciais nos cotilédones. Não foi possível analisar o teor de amido nos eixos embrionários de sementes com 65 DAA submetidas à secagem.

**Tabela 5.** Resultados das análises de germinação (G%), teor de água (U%), conteúdo de matéria seca ( $\text{g semente}^{-1}$ ), potencial hídrico (MPa) e carboidratos solúveis ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) em sementes de *Caesalpinia echinata* com 35, 45, 55 e 65 dias após a antese (DAA) e após serem submetidas a diferentes tratamentos de secagem. T0= sementes recém-colhidas; Sec= Sementes secas em estufa até 12% de água; PEG= Sementes tratadas com PEG 6000 (-3,0 MPa) por 24 horas e PEG+Sec= Sementes tratadas com PEG seguido de secagem em estufa até 12% de água. Valores seguidos de letras iguais nas colunas não mostraram diferenças significativas entre as médias (Tukey a 5 %). Letras minúsculas comparam os tratamentos de secagem dentro de cada estágio de maturação e maiúsculas comparam os tratamentos entre os diferentes estágios de maturação.

35 DAA						Pot. Hid.	açúc.sol. ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
Tratamento	G%	U%	MS (g)			(MPa)	Eixo		Cotilédone		
T0	95	a	70,70	0,098	b	-1,96	b	30,71	cC	172,73	bA
Sec	8	b	13,87	0,169	a	-64,36	a	79,87	abB	130,16	cB
PEG	95	a	63,03	0,077	b	-2,51	b	85,73	abA	233,17	aA
PEG + Sec	23	b	12,77	0,075	b	-65,13	a	75,24	bB	108,13	dB

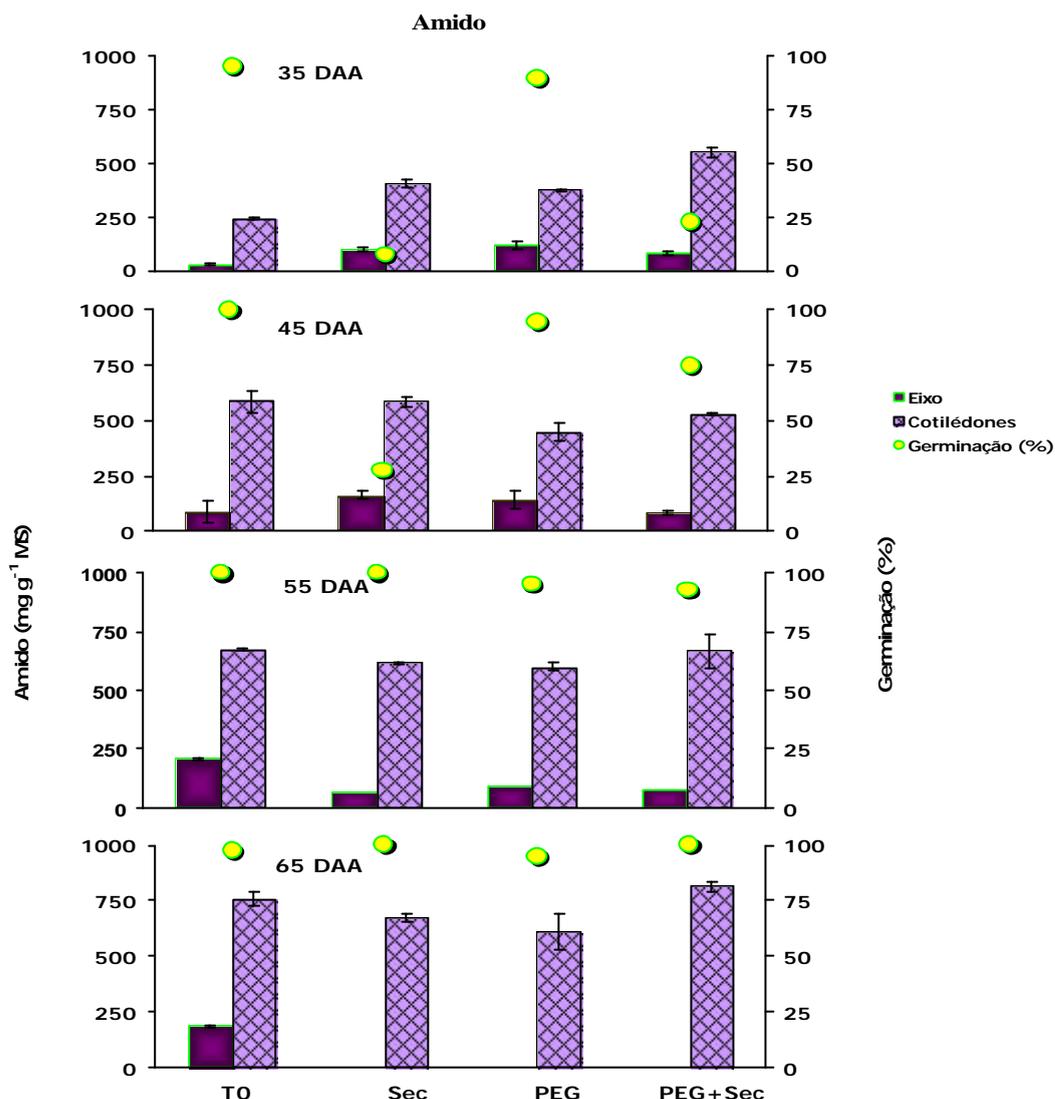
45 DAA						Pot. Hid.	açúc.sol. ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
Tratamento	G%	U%	MS (g)			(MPa)	Eixo		Cotilédone		
T0	100	a	57,98	0,224	b	-1,92	b	51,79	bB	113,60	cC
Sec	28	c	13,68	0,211	b	-73,08	a	66,08	aC	110,51	cC
PEG	100	a	49,14	0,205	b	-3,26	b	66,02	aB	155,57	bB
PEG + Sec	75	b	11,49	0,2493	a	-99,50	a	73,85	aB	198,94	aA

55 DAA						Pot. Hid.	açúc.sol. ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
Tratamento	G%	U%	MS (g)			(MPa)	Eixo		Cotilédone		
T0	100	a	50,07	0,259	ab	-2,63	c	65,87	bA	138,68	aB
Sec	100	a	11,42	0,315	a	-81,94	a	86,36	aA	124,85	bB
PEG	100	a	40,40	0,250	b	-4,58	c	70,38	bB	107,65	cD
PEG + Sec	93	b	12,57	0,264	ab	-78,10	b	68,27	bB	117,17	bcB

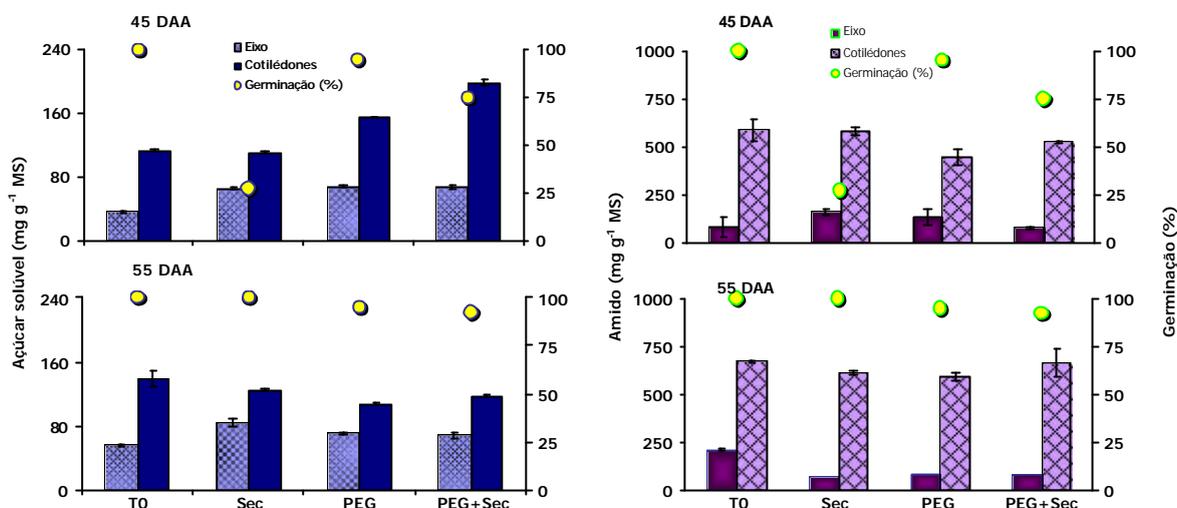
65 DAA						Pot. Hid.	açúc.sol. ( $\text{mg g}^{-1}$ MS)				
Tratamento	G%	U%	MS (g)			(MPa)	Eixo		Cotilédone		
T0	93	a	23,64	0,309	a	-14,86	c	46,46	cB	123,34	bB
Sec	93	a	14,87	0,319	a	-45,28	b	79,68	aB	153,53	aA
PEG	93	a	25,83	0,276	b	-13,07	c	49,84	cC	121,93	bC
PEG + Sec	90	a	12,31	0,324	a	-78,97	a	62,09	bC	89,57	cC



**Figura 17.** Variação do teor de amido ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) no eixo embrionário e cotilédones de sementes de *C. echinata* e porcentagem de germinação durante a maturação e após serem submetidas a diferentes tratamentos de secagem: T0= Sementes recém-colhidas; Sec= Sementes secas até 12% de água; PEG= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h; PEG+Sec= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h seguido de secagem até 12%. As barras representam desvio padrão das médias ( $n=3$ ). DAA= dias após antese.

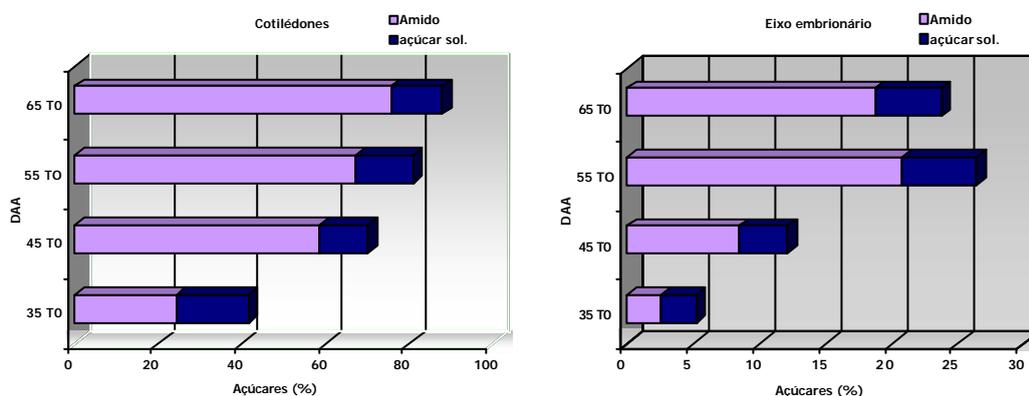
Comparando as variações de açúcares solúveis e amido nos eixos e cotilédones de sementes com 45 e 55 DAA (**Figura 18**) nota-se que aos 45 DAA houve diminuição de amido nos cotilédones, acompanhado de aumento nos açúcares solúveis, principalmente nas sementes incubadas com PEG, sugerindo possível hidrólise do amido nessas condições. Em sementes com 55 DAA, observaram-se alterações similares, porém menos acentuadas, indicando que o metabolismo de carboidratos das

sementes com 55 DAA é menos afetado pelos processos de secagem estudados, igualmente ao que foi observado para sementes maduras (65 DAA).



**Figura 18.** Análise comparativa das variações de açúcares solúveis e amido ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) nos eixos e cotilédones de sementes de *C. echinata* com 45 e 55 DAA. Para as abreviaturas dos tratamentos e demais informações vide legenda da Figura 17.

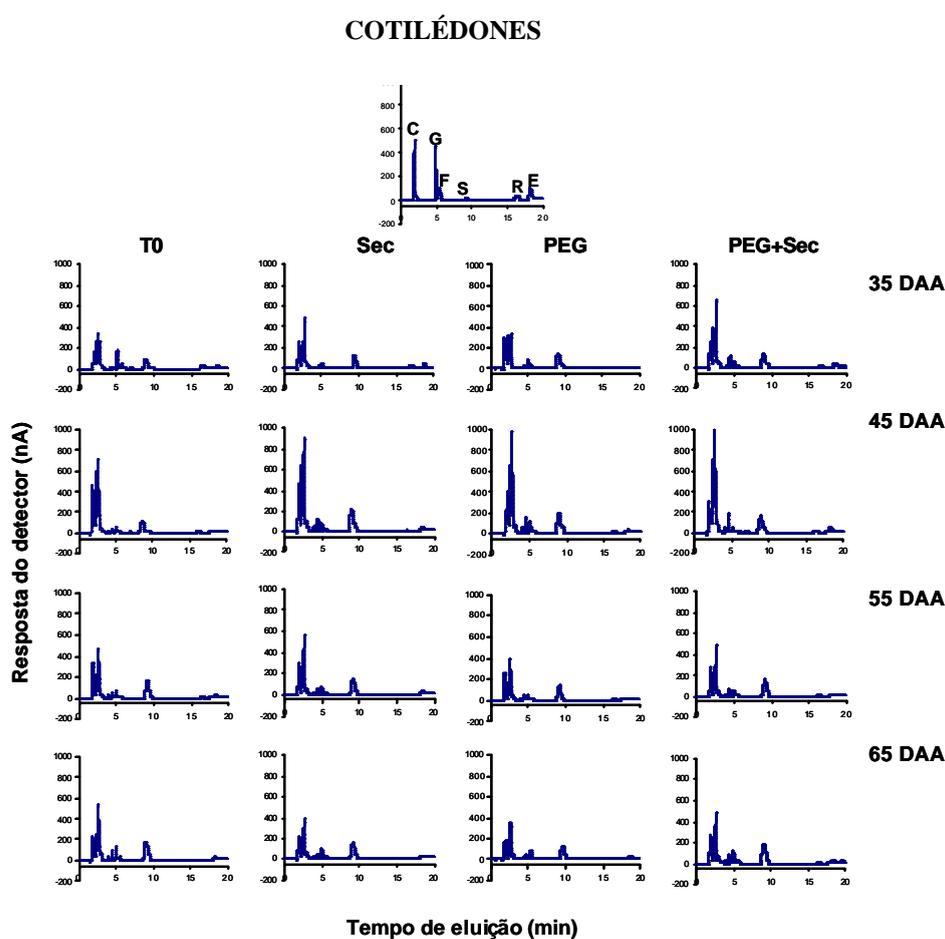
A análise comparativa das proporções de amido (principal composto de reserva das sementes de pau-brasil) e açúcares solúveis durante o desenvolvimento e a maturação evidenciou que o amido aumenta gradativamente (tanto nos eixos quanto nos cotilédones) até o final da maturação, sendo mais expressivo a partir de 45 DAA (Figura 19). Neste estágio também a razão amido/açúcares solúveis aumentou, permanecendo constante até o final da maturação das sementes.



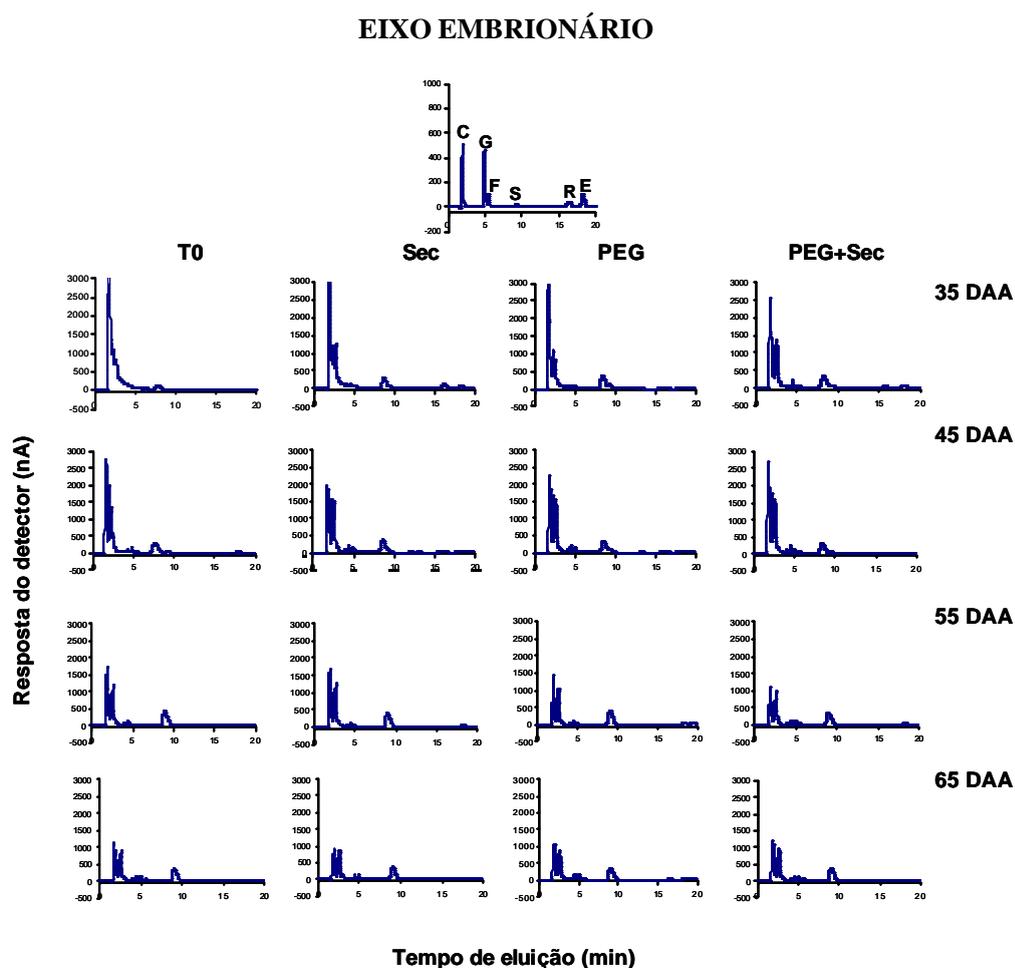
**Figura 19.** Relação entre amido e açúcares solúveis (%) nos cotilédones e eixos embrionários de sementes recém-colhidas (T0) de pau-brasil durante a maturação (dias após antese - DAA).

#### 4.2.2 Variações nos teores dos principais açúcares solúveis das sementes em diferentes estádios de maturação e após diferentes métodos de secagem

A composição dos açúcares solúveis foi analisada por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e quantificados individualmente. Conforme mostrado nas Figuras 20 e 21 os mesmos compostos estavam presentes em todos os estádios de maturação e processos de secagem, variando apenas quanto aos seus teores (Tabelas 6 e 7).



**Figura 20.** Análise por HPAEC/PAD da composição de carboidratos solúveis dos cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 35, 45, 55 e 65 DAA no momento da colheita (T0), após secagem em estufa (Sec), após osmocondicionamento em PEG (PEG) e após osmocondicionamento em PEG seguido de secagem em estufa (PEG+Sec). Ciclitóis (C), Glicose (G), Frutose (F), Sacarose (S), Rafinose (R) e Estaquiouse (E).



**Figura 21.** Análise por HPAEC/PAD da composição de carboidratos solúveis dos eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* com 35, 45, 55 e 65 DAA no momento da colheita (T0), após secagem em estufa (Sec), após osmocondicionamento em PEG (PEG) e após osmocondicionamento em PEG seguido de secagem em estufa (PEG+Sec). Ciclitóis (C), Glicose (G), Frutose (F), Sacarose (S), Rafinose (R) e Estaquiase (E).

As quantificações dos principais açúcares solúveis presentes nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes de pau-brasil nos quatro estádios de desenvolvimento estudados estão apresentadas nas **Tabelas 6 e 7**, evidenciando que a maior proporção deles é representada pelos ciclitóis e pela sacarose. Chamam a atenção, também, os altos níveis de rafinose nas sementes com 35 DAA e de frutose em sementes maduras, tanto nos cotilédones como no eixo embrionário.

**Tabela 6.** Carboidratos solúveis (mg g<sup>-1</sup> MS) de eixos de sementes de *Caesalpinia echinata* com 35, 45, 55 e 65 dias após antese (DAA) submetidas a tratamentos de secagem com ou sem PEG e seguido ou não de secagem.

DAA	Sem PEG		Com PEG	
	Sem secagem	Com secagem	Sem secagem	Com secagem
<b>Ciclitóis</b>				
35	524 aAa	233 aBa	189 aAb	115 bBb
45	138 bAa	109 bBb	112 bBb	157 aAa
55	103 cAa	61 cBa	41 cAb	37 cAb
65	30 dBb	45 dAa	37 cAa	36 cBa
(Coef. Variação 2,034%)				
<b>Glicose</b>				
35	2,22 dBb	3,42 dAb	2,46 cBa	11,5 bAa
45	7,75 bAb	6,8 aBb	10,8 aBa	15,3 aAa
55	13,24 aAa	6,41 bBa	2,58 cBb	4,9 dAb
65	4,48 cBb	5,09 cAb	7,62 bAa	5,31 cBa
(Coef. Variação 1,78%)				
<b>Frutose</b>				
35	6,25 dAb	6,16 cAa	14,03 cAa	7,03 dBa
45	8,68 cAb	7,52 cAb	20,96 bBa	25,86 bAa
55	44,94 aAa	30,90 bBa	20,46 bAb	18,54 cBb
65	19,02 bBb	40,92 aAa	23,76 aAa	32,65 aBb
(Coef. Variação 3,49%)				
<b>Sacarose</b>				
35	135 dBb	412 aAa	597 aAa	230 bBb
45	269 bBb	367 bAa	332 aAa	187 dBb
55	431 aAa	266 dBa	237 cAb	235 aAb
65	161 cBb	275 cAa	192 dAa	193 cAb
(Coef. Variação 0,48%)				
<b>Rafinose</b>				
35	54,52 aAa	56,03 aAa	40,68 aAb	38,58 aBb
45	14,36 bBb	23,83 bAa	29,63 bAa	21,90 bBb
55	9,10 cAa	8,44 dAa	5,18 cBb	7,29 cAa
65	4,31 dBb	13,9 cAa	7,30 cAa	7,28 cAb
(Coef. Variação 4,48%)				
<b>Estaquiase</b>				
35	11,2 bBb	39,8 aAa	12,7 bBa	18,4 aAb
45	14,6 aAa	15,1 bAb	15,0 aBa	17,8 aAa
55	7,4 cAa	7,8 cAa	4,7 cAb	5,8 bAb
65	5,01 dBa	7,1 cAa	5,2 cAa	5,1 bAb
(Coef. Variação 5,73%)				
<b>Matéria Seca</b>				
35	0,022 dBb	0,031 dAb	0,023 dBa	0,039 dAa
45	0,038 bBb	0,043 cAa	0,044 cAa	0,040 cBb
55	0,033 cBb	0,051 aAb	0,061 bAa	0,052 bBa
65	0,078 aAa	0,050 bBb	0,062 aBb	0,067 aAa
(Coef. Variação 0,020%)				

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam dias após antese; letras maiúsculas comparam os níveis de secagem (Sem e Com Secagem) dentro de cada tratamento de secagem (Sem PEG e Com PEG) e letras em *itálico* comparam os mesmos níveis de secagem entre os tratamentos (Sem PEG e Com PEG).

**Tabela 7.** Carboidratos solúveis (mg g<sup>-1</sup> MS) de cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* com 35, 45, 55 e 65 dias após antese (DAA) submetidas a tratamentos de secagem com ou sem PEG e seguido ou não de secagem.

DAA	Sem PEG		Com PEG	
	Sem secagem	Com secagem	Sem secagem	Com secagem
<b>Ciclitois</b>				
35	80 cBb	226 aAa	154 bAa	105 bBb
45	97 bBb	126 dAa	153 bAa	104 bBb
55	82 cBb	173 cAb	171 aBa	203 aAa
65	147 aBa	188 bAa	123 cBb	105 bAb
(Coef. Variação 2,28%)				
<b>Glicose</b>				
35	20,00 aAa	7,06 cBb	19,16 aAa	10,24 bBa
45	3,20 cBb	8,35 bAb	11,24 bAa	11,76 aAa
55	3,94 cBb	9,19 bAb	7,94 cBa	10,73 abAa
65	14,78 bBa	19,19 aAa	8,68 cAb	8,50 cAb
(Coef. Variação 4,82%)				
<b>Frutose</b>				
35	18,85 cBb	30,58 cAa	23,67 dAa	23,75 cAb
45	14,64 dBb	23,15 dAb	36,16 bAa	34,70 bAa
55	21,90 bBb	45,27 bAa	26,78 cBa	33,83 bAb
65	76,11 aAa	76,69 aAa	47,46 aBb	51,85 aAb
(Coef. Variação 2,55 %)				
<b>Sacarose</b>				
35	72 dBb	281 bAa	282 bAa	109 dBb
45	131 cBb	375 aAa	284 bAa	117 cBb
55	180 bBb	282 aAb	276 cBa	320 aAa
65	262 aBb	370 aAa	296 aAa	282 bBb
(Coef. Variação 1,12%)				
<b>Rafinose</b>				
35	39,0 aBa	71,2 aAa	20,3 aAb	21,3 aAb
45	4,0 cBb	8,8 bAb	12,8 bAa	13,4 bAa
55	3,2 cBa	7,8 bAa	5,8 cBa	8,9 cAa
65	8,42 bAa	10,3 bAa	7,2 cAa	5,5 cAb
(Coef. Variação 10,69%)				
<b>Estaquiase</b>				
35	15,19 aBb	38,0 aAa	31,0 aAa	16,0 aBb
45	4,25 bBb	11,0 cAb	14,0 bBa	18,0 aAa
55	3,30 bBb	14,0 bAa	8,0 cBa	12,0 bAb
65	15,0 aAa	16,5 bAa	10,0 cAb	6,0 cBb
(Coef. Variação 8,1%)				
<b>Matéria Seca</b>				
35	0,506 cBa	0,937 cAb	0,628 cBa	1,361 dAa
45	1,601 bAa	1,850 bAa	1,630 bAa	1,719 cAa
55	1,893 bBb	2,44 aAb	2,750 aAa	2,706 bAa
65	2,373 aAb	2,46 aAb	2,750 aBa	3,081 aAa
(Coef. Variação 7,82%)				

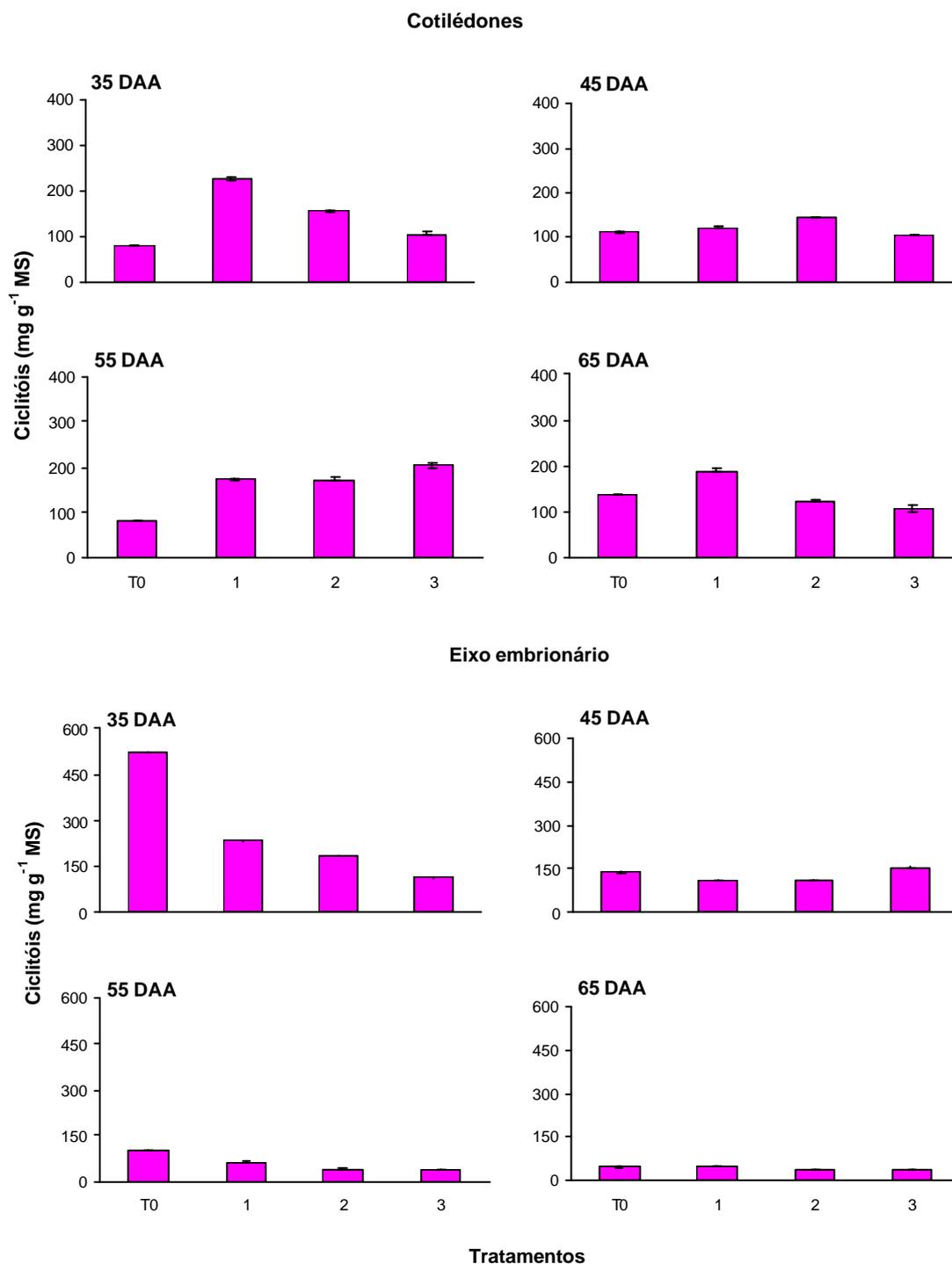
Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade. Letras minúsculas comparam dias após antese; letras maiúsculas comparam os níveis de secagem ( Sem e Com Secagem) dentro de cada tratamento de secagem (Sem PEG e Com PEG) e letras em *itálico* comparam os mesmos níveis de secagem entre os tratamentos (Sem PEG e Com PEG).

### *AÇÚCARES ÁLCOOIS – CICLITÓIS*

Na **Figura 22** são mostrados os teores de ciclitóis encontrados nos cotilédones e eixos embrionários de sementes de pau-brasil analisadas em quatro estádios de maturação, após três tratamentos de secagem. Nesta e nas demais figuras, as análises iniciais (T0) em cada idade foram mostradas para fins de comparação entre os tratamentos de secagem.

Em todos os estádios de maturação foram encontrados, nos cotilédones, valores semelhantes desses açúcares álcoois, variando de 8-13% da massa seca da semente. Nos tratamentos de secagem rápida e osmocondicionamento, respectivamente, houve um aumento de três vezes e duas vezes no teor de ciclitóis em sementes com 35 DAA, e duas vezes em sementes com 45 DAA e 55 DAA osmocondicionadas em relação às análises iniciais (**Tabela 7, Figura 22**). Aos 65 DAA não houve diferença significativa nas sementes osmocondicionadas, embora os ciclitóis tenham sido aumentados nas sementes submetidas à secagem rápida (tratamento **1**).

Os teores de ciclitóis encontrados no eixo embrionário (**Tabela 6**) de sementes de pau-brasil nos quatro estádios de maturação, após os três tratamentos de secagem, em comparação com as análises iniciais (T0). Foram observadas quantidades apreciáveis de ciclitóis nas sementes com 35 DAA, correspondendo a cerca de 50% do peso seco no início das análises. Ao contrário do ocorrido nos cotilédones, esses teores decresceram com o amadurecimento, correspondendo a 5% para as sementes com 65 DAA. Em todos os tratamentos de secagem (rápida, osmocondicionamento e secagem lenta), esses teores diminuíram em relação à análise inicial para cada idade, principalmente nas sementes com 35 DAA. Em sementes com 65 DAA, os teores de ciclitóis não foram alterados com os tratamentos de secagem.



**Figura 22.** Variação do teor de ciclitóis (mg g<sup>-1</sup> MS) nos cotilédones e eixo embrionário de sementes de *C. echinata* em quatro estádios de maturação (35, 45, 55 e 65 DAA - dias após antese) submetidas a diferentes tratamentos de secagem: T0= Sementes recém-colhidas; 1= Sementes secas até 12% de teor de água; 2= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h; 3= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h seguido de secagem até 12%. As barras representam desvio padrão (n=3).

### **GLICOSE**

Na **Figura 23** são mostrados os teores de glicose encontrados nos cotilédones e nos eixos de sementes de pau-brasil analisadas nos quatro estádios de maturação e após os três tratamentos de secagem. Aos 35 DAA nota-se maior teor desse açúcar nos cotilédones em relação aos outros estádios analisados. Nesse estádio, a secagem rápida diminuiu os níveis de glicose drasticamente, enquanto que nas sementes osmocondicionadas com PEG, os níveis foram mantidos próximos ao valor inicial. Para o estádio de 45 DAA, a secagem aumentou em cerca de duas vezes o teor de glicose e o osmocondicionamento prévio triplicou os valores iniciais. O mesmo ocorreu para sementes com 55 DAA, porém de forma menos expressiva. Nas sementes com 65 DAA houve diminuição no teor de glicose com o osmocondicionamento.

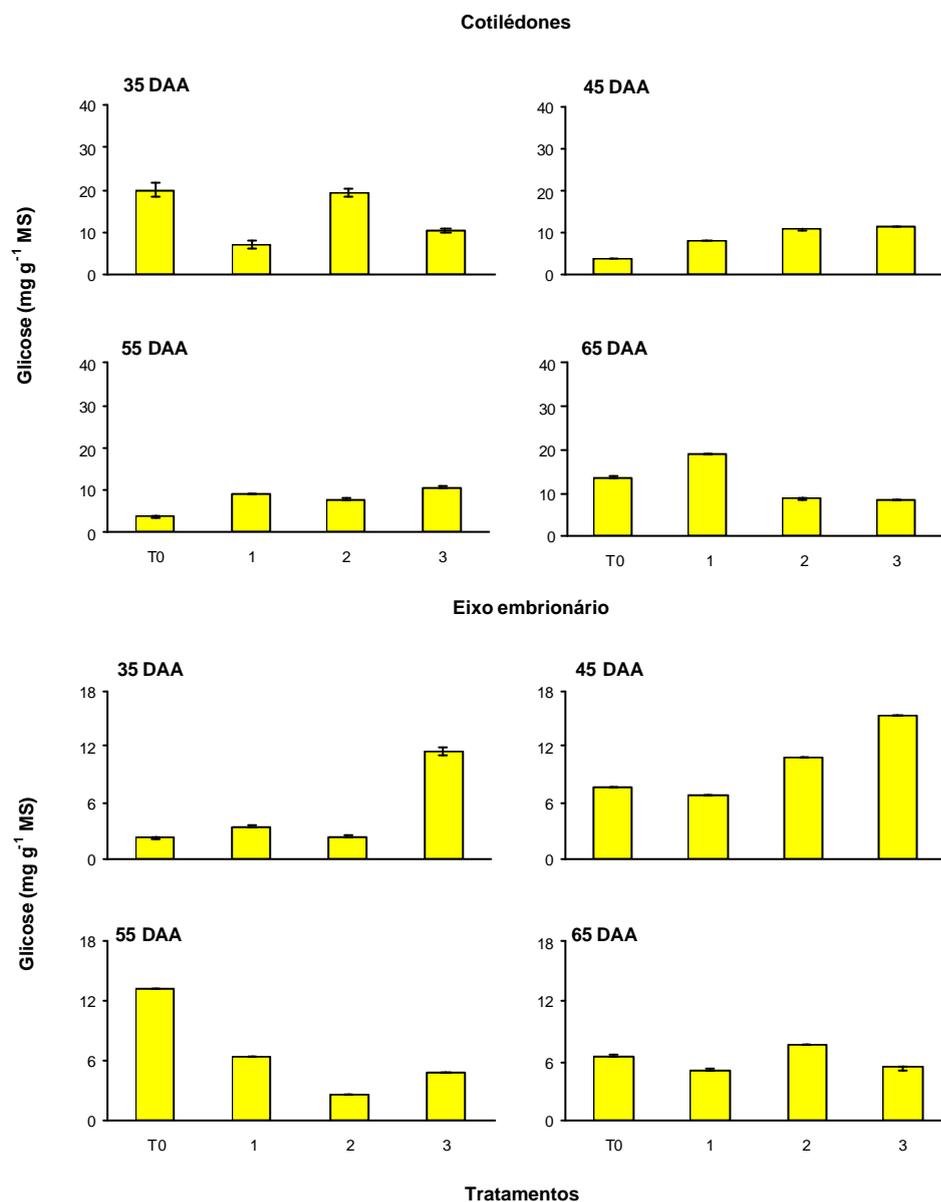
Com relação ao eixo embrionário, a **Figura 23** mostra que os teores de glicose apresentaram uma tendência de aumentar durante a maturação das sementes, alcançando maior valor aos 55 DAA. Nota-se que aos 35 e 45 DAA, os teores de glicose foram aumentados significativamente nas sementes osmocondicionadas com PEG, seguido de secagem (**Tabela 6**). Os teores de glicose também diminuíram com o osmocondicionamento no eixo de sementes com 55 e variaram pouco nas de 65 DAA.

### **FRUTOSE**

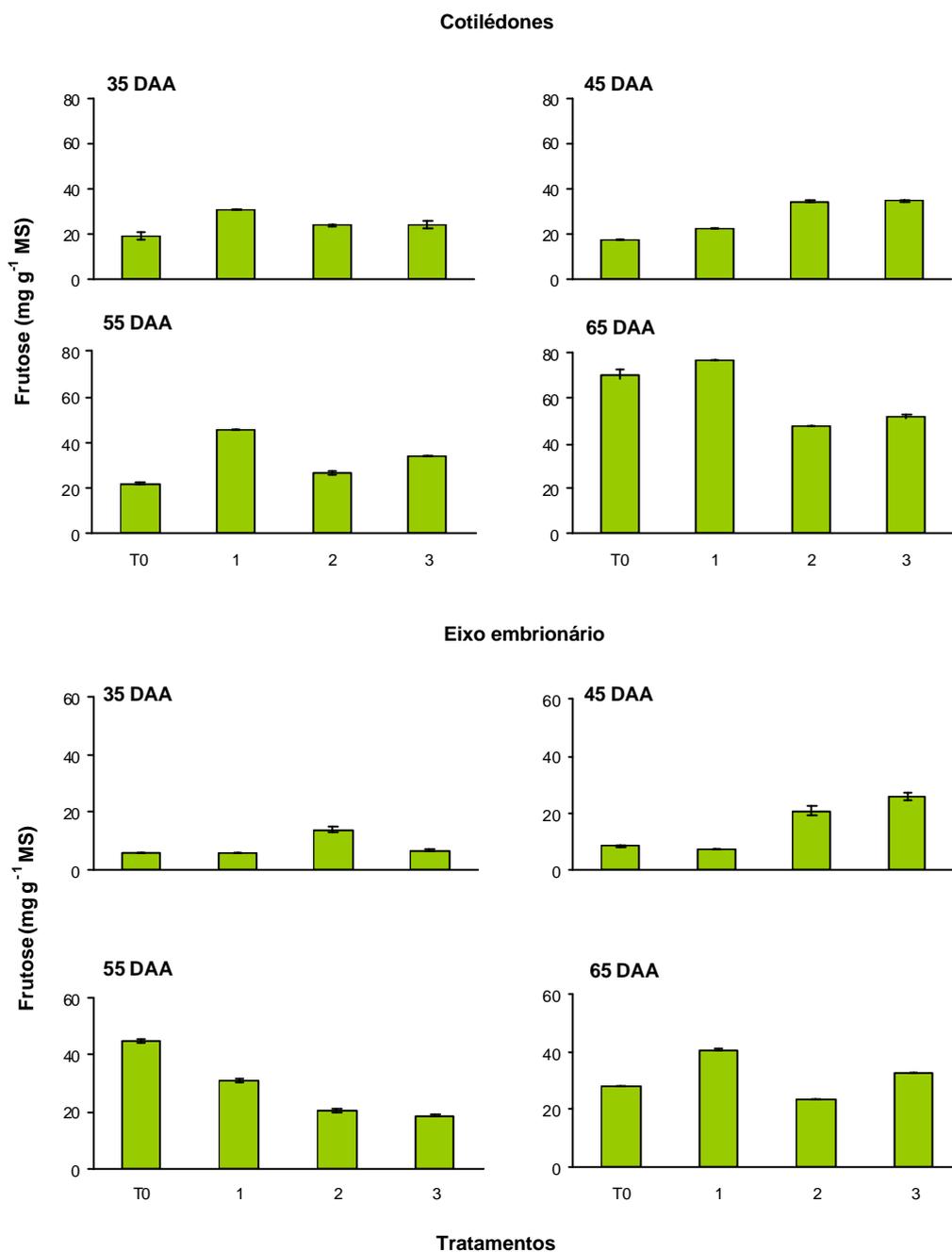
Na **Figura 24** está mostrada a variação nos teores de frutose encontrados nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes de pau-brasil nos quatro estádios de maturação e após os três tratamentos de secagem. Os teores de frutose encontrados nos cotilédones variaram de 2% a 7% ao longo da maturação, com tendência a aumentar durante o processo. A secagem rápida estimulou o aumento de frutose em todos os estádios de desenvolvimento das sementes, da mesma forma que o osmocondicionamento, exceto em sementes com 65 DAA.

A **Figura 24** mostra, ainda, que os teores de frutose encontrados nos eixos embrionários de sementes de pau-brasil aumentaram com a maturação (alcançando maior teor aos 55 DAA) e com o osmocondicionamento das sementes imaturas. Nota-se que a secagem rápida não aumentou o teor de frutose nos extratos analisados, contudo, o

osmocondicionamento em PEG favoreceu o aumento para as sementes com 35 e 45 DAA, alcançando níveis comparáveis aos conteúdos de frutose observados nas sementes com 55 e 65 DAA. Aos 45 DAA, os teores de frutose, aumentaram cerca de três vezes após osmocondicionamento.



**Figura 23.** Variação do teor de glicose ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes de *C. echinata* em quatro estádios de maturação (35; 45; 55 e 65 DAA - dias após antese) submetidas a diferentes tratamentos de secagem: T0= Sementes recém-colhidas; 1= Sementes secas até 12% de teor de água; 2= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h; 3= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h seguido de secagem até 12%. As barras representam desvio padrão ( $n=3$ ).



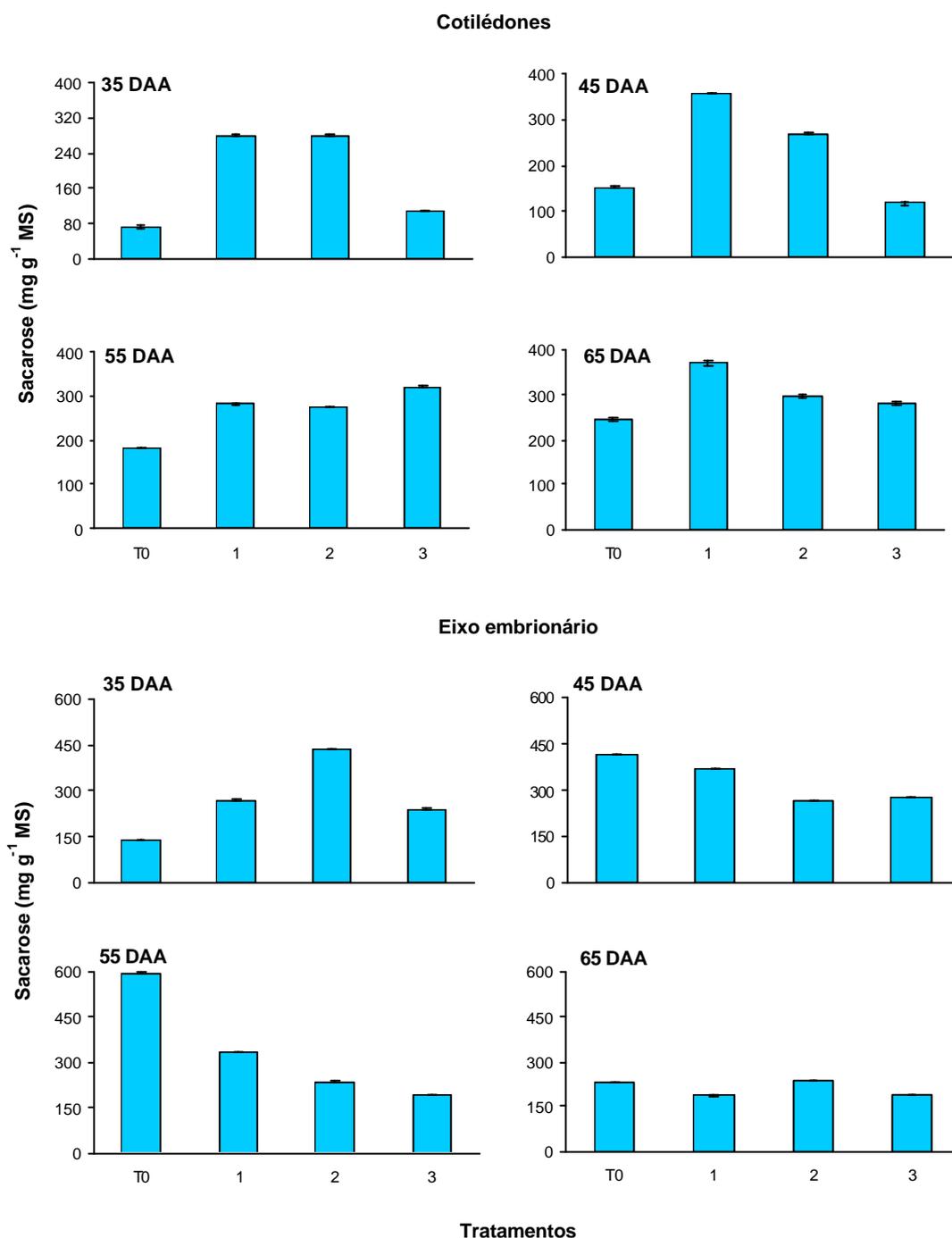
**Figura 24.** Variação do teor de frutose ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes de *C. echinata* em quatro estádios de maturação (35; 45; 55 e 65 DAA - dias após antese) submetidas a diferentes tratamentos de secagem: T0= Sementes recém-colhidas; 1= Sementes secas até 12% de teor de água; 2= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h; 3= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h seguido de secagem até 12%. As barras representam desvio padrão ( $n=3$ ).

## SACAROSE

Na **Figura 25** são mostrados os teores de sacarose encontrados nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes de pau-brasil analisadas nos quatro estádios de maturação e após três tratamentos de secagem. Observa-se que este é o principal açúcar solúvel dos cotilédones, correspondendo a cerca de 20% da massa seca das sementes maduras, aumentando gradativamente com a maturação. A secagem rápida provocou um aumento de quatro vezes no conteúdo de sacarose nas sementes com 35 DAA e cerca de duas vezes nos demais estádios de maturação. O osmocondicionamento prévio à secagem aparentemente impediu o aumento de sacarose nas sementes imaturas, provocado pela secagem nos outros dois tratamentos (**Tabela 7**).

Quanto aos eixos embrionários foram observadas grandes quantidades de sacarose em sementes recém-colhidas com 45 e 55 DAA, correspondendo a cerca de 60% do peso seco em semente com 55 DAA. Para sementes com 35 DAA, a secagem rápida aumentou o teor de sacarose no eixo cerca de duas vezes, sendo este aumento ainda maior quando foram osmocondicionadas em PEG. Todavia, após secagem lenta, o teor foi similar aos valores encontrados nas sementes com secagem rápida. Em sementes com 45 DAA, a secagem lenta assim como o osmocondicionamento provocaram decréscimo no teor de sacarose (**Figura 25 e Tabela 6**).

Com exceção de 35 DAA, os dados sugerem que o teor de sacarose no eixo embrionário aparentemente não tenha sido influenciado pelo osmocondicionamento das sementes em PEG, decaindo seus valores em qualquer tipo de secagem. Em sementes com 65 DAA, os teores de sacarose não foram alterados com os tratamentos de secagem.



**Figura 25.** Variação do teor de sacarose ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes de *C. echinata* em quatro estádios de maturação (35; 45; 55 e 65 DAA - dias após antese) submetidas a diferentes tratamentos de secagem: T0= Sementes recém-colhidas; 1= Sementes secas até 12% de teor de água; 2= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h; 3= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h seguido de secagem até 12%. As barras representam desvio padrão ( $n=3$ ).

### **RAFINOSE**

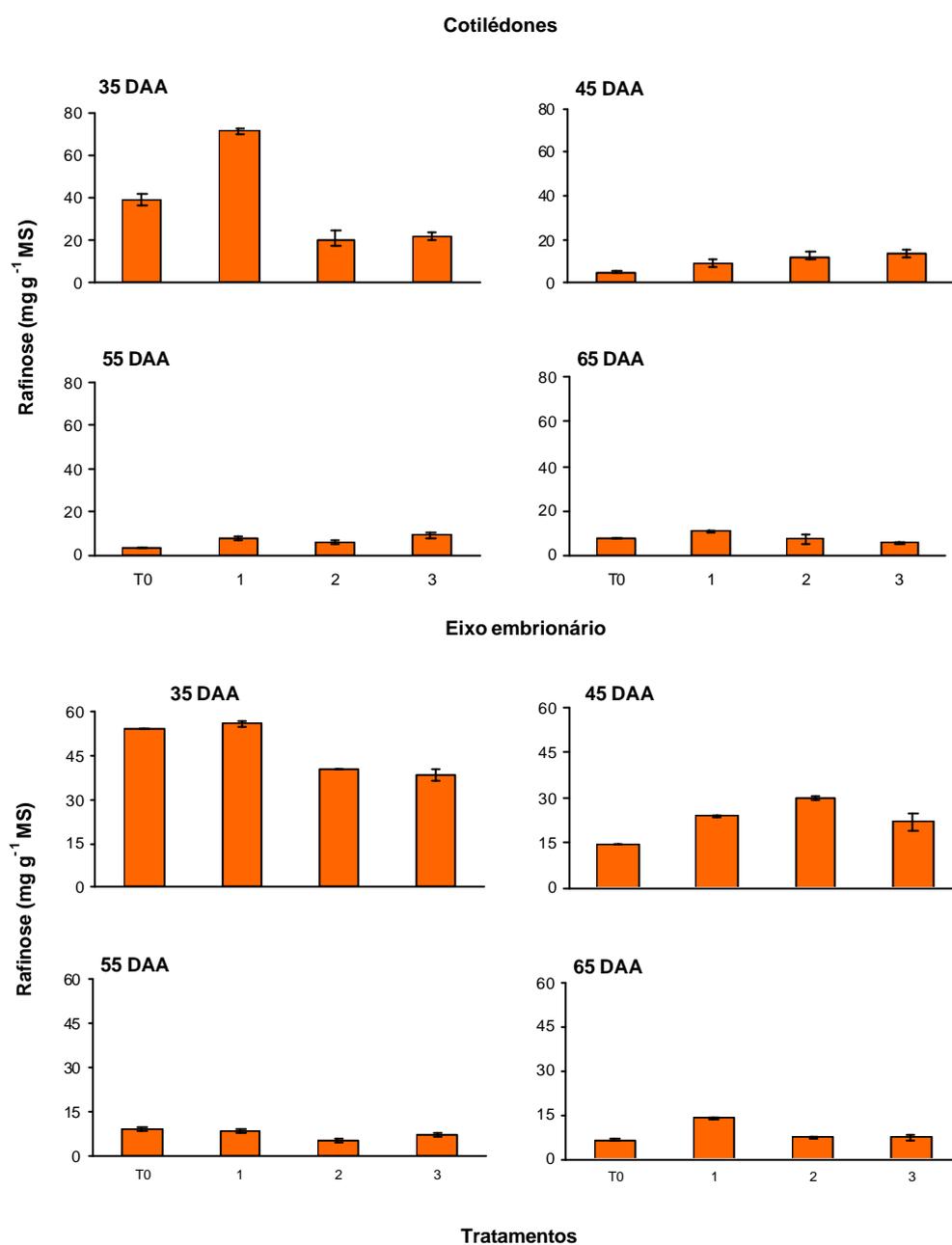
Na **Figura 26** são mostradas as variações nos teores de rafinose encontrados nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes de pau-brasil nos quatro estádios de maturação e após os três tratamentos de secagem. Como já destacado previamente, os cotilédones de sementes com 35 DAA apresentaram elevado teor de rafinose, em relação aos demais estádios, representando cerca de 4% do peso seco da semente. Esse valor praticamente duplicou quando as sementes foram submetidas à secagem rápida. Todavia, com o osmocondicionamento e secagem lenta, os teores de rafinose foram reduzidos para valores inferiores aos encontrados nas análises iniciais (**Tabela 7**). Esses resultados sugerem que o osmocondicionamento de sementes nesse estágio de maturação impede o aumento dos teores de rafinose observado quando as sementes são secas sem o osmocondicionamento. Para os demais estádios de maturação, o osmocondicionamento favoreceu o aumento deste açúcar, principalmente nas sementes com 45 DAA (cerca de três vezes quando comparadas com os teores iniciais)

Quanto aos eixos embrionários (**Figura 26**) nota-se que sementes com 35 DAA também apresentaram maior teor de rafinose, representando cerca de 5% do peso seco quando comparado com os demais estádios de maturação. Esse teor se manteve elevado nos tratamentos de secagem rápida e lenta. Para sementes com 45 DAA, os tratamentos de secagem rápida e osmocondicionamento aumentaram os valores, mantendo-os após secagem lenta em duas vezes mais quando comparados com as análises iniciais. Para sementes de 55 e 65 DAA, os tratamentos de secagem e osmocondicionamento não tiveram efeitos significativos sobre o teor de rafinose, quando comparado com os valores obtidos nas análises iniciais (**Tabela 6**).

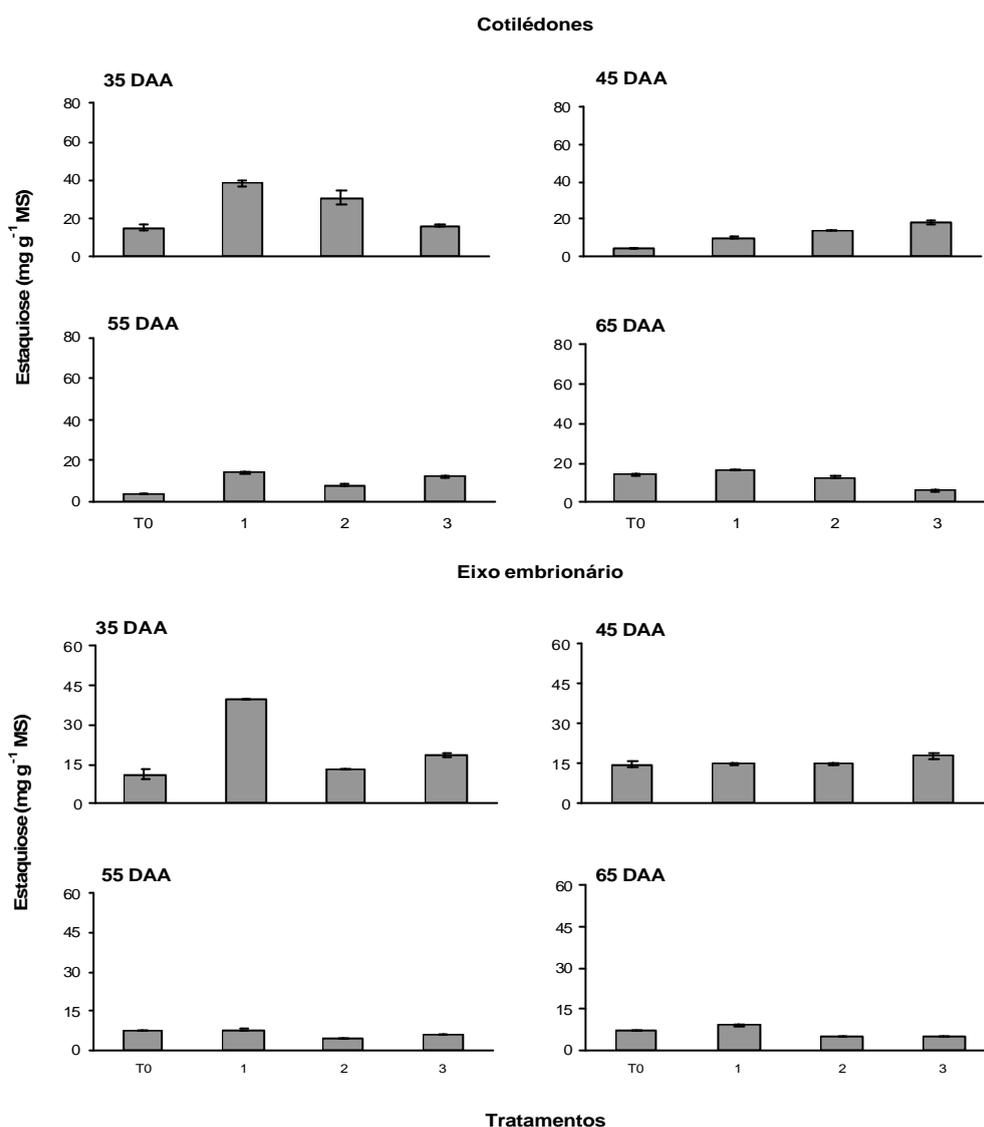
### **ESTAQUIOSE**

Os teores de estaquiose nos cotilédones e nos eixos embrionários apresentaram menor variação durante a maturação das sementes, correspondendo a cerca de 1,5% do peso seco dos eixos. Este açúcar aumentou nas sementes imaturas (35 DAA), principalmente com a secagem. Para as demais idades, os tratamentos de secagem não interferiram nos teores desse açúcar (**Figura 27**). No entanto, as análises estatísticas (**Tabelas 6 e 7**) mostraram que as sementes imaturas que toleraram a dessecação (45

DAA) tiveram aumento significativo desse açúcar, tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários.

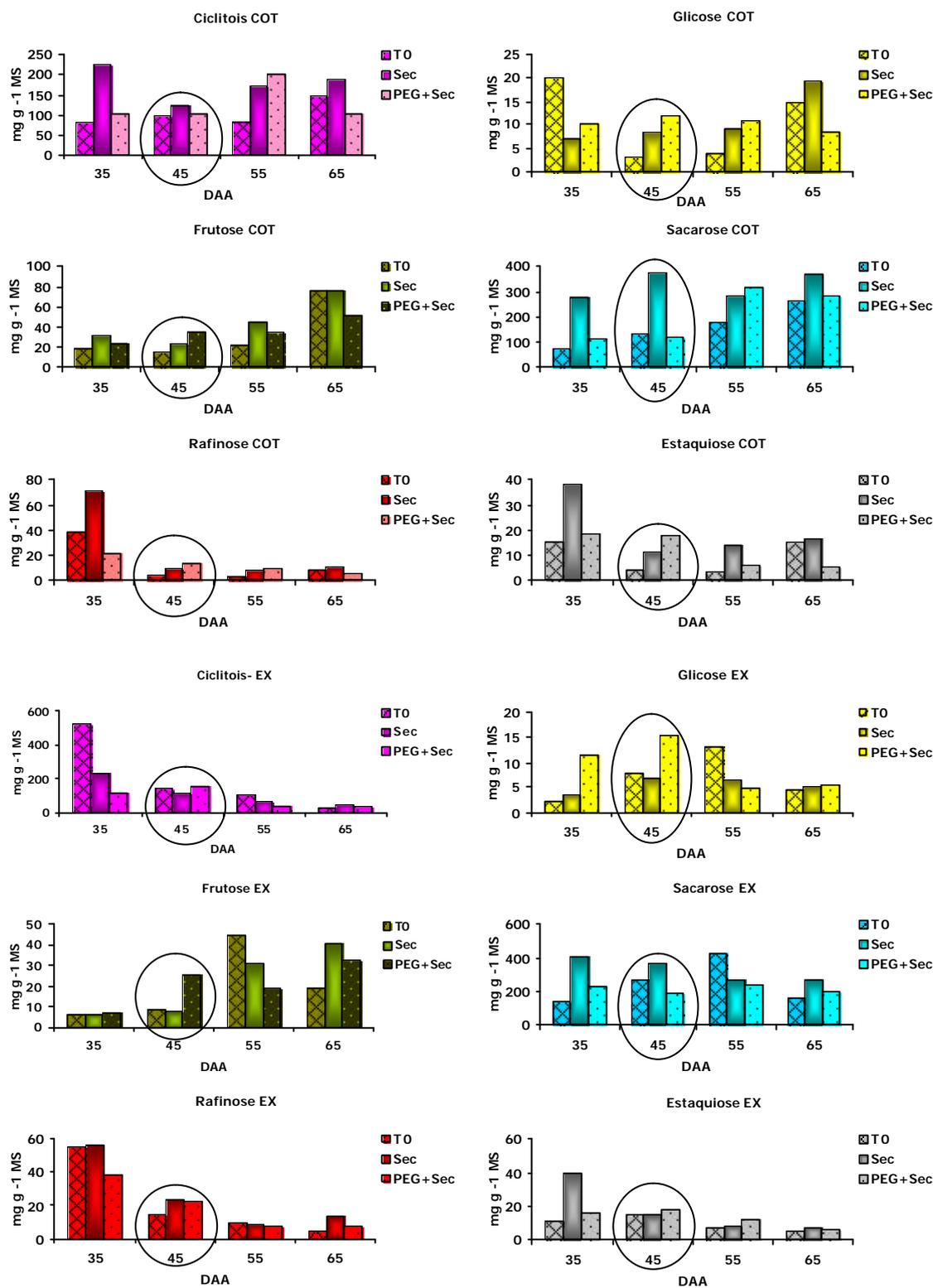


**Figura 26.** Variação do teor de rafinose ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes de *C. echinata* em quatro estádios de maturação (35; 45; 55 e 65 DAA - dias após antese) submetidas a diferentes tratamentos de secagem: T0= Sementes recém-colhidas; 1= Sementes secas até 12% de teor de água; 2= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h; 3= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h seguido de secagem até 12%. As barras representam desvio padrão ( $n=3$ ).



**Figura 27.** Variação do teor de estaquiose ( $\text{mg g}^{-1}$  MS) nos cotilédones e nos eixos embrionários de sementes de *C. echinata* em quatro estádios de maturação (35; 45; 55 e 65 DAA - dias após antese) submetidas a diferentes tratamentos de secagem: T0= Sementes recém-colhidas; 1= Sementes secas até 12% de teor de água; 2= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h; 3= Sementes tratadas com PEG -3,0 MPa por 24 h seguido de secagem até 12%. As barras representam desvio padrão ( $n=3$ ).

Comparação das variações de todos os carboidratos solúveis analisados nos cotilédones e eixos embrionários durante a maturação das sementes submetidas à secagem rápida e lenta estão apresentadas na **Figura 28**, sendo destacadas as principais alterações nos açúcares de sementes com 45 DAA que toleraram a dessecação durante após o processo de secagem lenta.



**Figura 28.** Comparação das variações de açúcares solúveis ( $\text{g g}^{-1}$  MS) nos cotilédones (COT) e eixos embrionários (EX) de sementes de *C. echinata* durante a maturação (dias após antese - DAA) e processos de secagem, sendo T0 = análise inicial, Sec = secagem rápida e PEG+Sec= secagem lenta.

## 5 DISCUSSÃO GERAL

### 5.1 Variações de matéria seca, carboidratos de reserva e capacidade germinativa de sementes de *C. echinata* nos diferentes estádios de maturação e submetidas a diferentes tratamentos de secagem

O conteúdo de matéria seca das sementes de *C. echinata* aumentou gradualmente nos quatro estádios de desenvolvimento analisados (35 a 65 dias após a antese - DAA), variando de cerca de 2,0 a 6,1 mg de massa seca por semente nos eixos e de 80 a 267 mg por semente nos cotilédones. Os carboidratos de reserva, de maneira geral, acompanharam o aumento da matéria seca, principalmente nos cotilédones.

As variações nos conteúdos de matéria seca e açúcares solúveis foram mais acentuadas tanto nos eixos, quanto nos cotilédones, entre os estádios iniciais de desenvolvimento da semente, tendendo a diminuir naquelas com 55 e 65 DAA. Esses resultados confirmam os dados de Borges *et al.* (2005) em que o conteúdo de matéria seca das sementes de *C. echinata* aumentou de 32 DAA a 70 DAA, quando atingiu 316 mg por semente, no final do processo de maturação, com máximo acúmulo de açúcares totais por volta de 55 DAA. De acordo com esses autores, a maturidade fisiológica das sementes de pau-brasil poderia estar entre 60 e 65 DAA.

No presente trabalho, as sementes com 65 DAA não tiveram aumento expressivo nos conteúdos de matéria seca e açúcares quando comparadas com as sementes de 55 DAA. Durante o processo de dessecação artificial as sementes com 55 DAA também toleraram a secagem direta em estufa até 12% de água, preservando sua viabilidade, assim como as sementes com 65 DAA. Sendo assim, como não houve expressivo aumento nos conteúdos de matéria seca e açúcares solúveis entre 55 DAA a 65 DAA e as sementes de ambos lotes toleraram a dessecação até níveis de 12% de água, que é apropriado para a conservação de sementes de *C. echinata* a -18 °C (Hellmann *et al.* 2006), sugere-se que, a partir de 55 DAA, as sementes dessa espécie já possuem características da fase de maturidade fisiológica.

Durante a formação do embrião há um acúmulo massivo de reservas no endosperma de sementes em geral (Raven *et al.* 2001). Isso poderia explicar o maior conteúdo açúcares solúveis nos cotilédones e menor nos eixos embrionários das sementes de *C. echinata* nas fases iniciais do desenvolvimento. Sementes com 35 DAA,

ainda em formação, poderiam ser enquadradas na faixa de transição entre o final da fase I (embriogênese) e início da fase II (acúmulo de reservas). O tratamento prévio com PEG não foi eficaz na manutenção da capacidade germinativa dessas sementes, embora tenham sido aumentados significativamente os conteúdos de matéria seca e açúcares solúveis nos cotilédones e eixo embrionário. A remoção de água das células pode ter resultado em danos aos eixos embrionários, que normalmente são mais sensíveis à perda de água quando imaturos. A tolerância à dessecação geralmente é adquirida com o acúmulo de reservas, que pode minimizar o estresse causado pela desidratação (Vertucci & Ferrant 1995).

Embora as sementes com 35 DAA já apresentassem capacidade germinativa a níveis considerados altos (95%) não desenvolveram plântulas e não toleraram secagem até 12% de água. Bailly *et al.* (2001) verificaram que em algumas espécies de leguminosas, como nas ortodoxas, soja e feijão, as sementes tornavam-se tolerantes à dessecação no final do processo de maturação, ou alguns dias após o acúmulo máximo de matéria seca. Embora o PEG tenha favorecido um aumento no conteúdo de matéria seca, não foi suficiente para que essas sementes tolerassem a dessecação. Assim, o conteúdo máximo de matéria seca parece ser um sinal da maturação e a tolerância à dessecação em sementes ortodoxas pode ser um forte indício de que essas sementes já atingiram a fase de maturidade fisiológica.

Sementes de pau-brasil com 45 DAA mantiveram a capacidade germinativa em até 75% quando previamente osmocondicionadas por PEG e secas até 12% de água (secagem lenta). O desenvolvimento de plântulas também foi observado para as sementes neste tratamento, perfazendo 69% das germinadas. Apresentaram em suas análises iniciais, valores de massa seca e açúcares solúveis relativamente baixos quando comparadas com sementes com 55 DAA, no entanto, tiveram esses valores aumentados significativamente, durante o tratamento com a secagem lenta, ou seja, secagem em estufa com prévio osmocondicionamento em PEG.

Nesse estágio (45 DAA), as sementes não toleraram a secagem direta em estufa (secagem rápida). Embora tenha havido aumento significativo no conteúdo de açúcares solúveis nos cotilédones e eixo, não ocorreu aumento correspondente de matéria seca, como observado nas sementes submetidas à secagem lenta.

O fato de as sementes imaturas adquirirem tolerância à dessecação em fase próxima à maturação, antes da deposição máxima de reservas e da secagem natural,

também foi observado em sementes de mamona, feijão-fava, lentilha, grão-de-bico, tremoço-branco, soja e ervilha (Marcos Filho 2005).

Há evidências de que as membranas celulares são particularmente vulneráveis à desidratação e constituem os sítios primários das injúrias celulares. A desidratação pode causar alterações irreversíveis nas propriedades físicas da camada dupla de fosfolípidios e favorecer o acúmulo de produtos resultantes da peroxidação de lipídios, com danos evidentes à estrutura das membranas; conseqüentemente, há perda da capacidade de síntese de DNA, RNA, enzimas e outras proteínas durante a re-hidratação (Leprince *et al.* 1990).

As sementes passam por diversos níveis críticos de umidade que afetam a atividade metabólica e podem causar danos aos tecidos sensíveis à desidratação (Vetucci & Ferrant 1995, Walters *et al.* 2002). Em soja, esses danos puderam ser minimizados através da secagem lenta das sementes imaturas (Adams *et al.* 1983) resultando em sementes viáveis, com enzimas específicas do processo de germinação ativas, enquanto que a secagem rápida resultou em sementes inviáveis e com baixos níveis dessas enzimas.

O osmocondicionamento com PEG proporcionou lenta desidratação das sementes de pau-brasil, minimizando as alterações nos níveis de teor de água, que afetariam a atividade metabólica, causando danos irreversíveis ao embrião, como já verificado por Vertucci & Ferrant (1995) e Walters *et al.* (2002). Igualmente, o osmocondicionamento propiciou o aumento dos conteúdos de matéria seca e açúcares solúveis no eixo e nos cotilédones dessas sementes.

Como já mencionado anteriormente, durante o condicionamento osmótico a semente hidrata-se lentamente, o que permite maior tempo para a reorganização das membranas plasmáticas, possibilitando a formação dos tecidos de maneira mais ordenada e reduzindo riscos de danos ao eixo embrionário. Essas alterações provocadas pelo PEG durante a hidratação lenta podem também ter ocorrido durante a desidratação lenta das sementes de pau-brasil, aumentando a tolerância do embrião à dessecação e o desenvolvimento das plântulas originadas de sementes imaturas (45 DAA), como foi observado no presente trabalho.

Ainda, Bradford (1990) verificou que a hidratação lenta por meio de PEG permitia a ativação de processos metabólicos nas fases iniciais da germinação e, paralelamente, evitava o alongamento celular e conseqüente emergência da radícula (fase III), referente ao padrão trifásico proposto por Bewley & Black (1994). Esses

mesmos eventos podem ter acontecido durante a desidratação lenta provocada pelo osmocondicionamento em soluções com potenciais hídricos inferiores ao da semente de pau-brasil, porém, alongando a fase II de desenvolvimento da semente, regulando lentamente a saída da água e proporcionando maior tempo para o acúmulo de matéria seca e para outros eventos que propiciaram a aquisição da tolerância à dessecação.

Verificou-se, no presente trabalho, que para os estádios de maturação nos quais as sementes apresentavam potenciais hídricos menos negativos que o da solução de PEG -3,0 MPa, utilizada para o osmocondicionamento, houve êxito nos propósitos, provocando a desidratação lenta dessas sementes. As sementes coletadas aos 45 DAA apresentavam teor de água médio de 57,98% e potencial hídrico médio de -1,92 MPa e após a incubação na solução de PEG 6000 a -3,0 MPa por 24 horas, estes valores foram reduzidos para 49,14% de teor de água e -3,26 MPa, confirmando, portanto, que a solução provocou a saída de água da célula para a solução de PEG, tendendo a manter o equilíbrio hídrico das sementes com a solução osmocondicionadora.

Sementes com 55 DAA toleraram a secagem rápida até 12% de água. Com este tratamento, houve aumento significativo no conteúdo de açúcares solúveis no eixo embrionário, acompanhado de redução no teor de amido, principal carboidrato de reserva das sementes de pau-brasil (Garcia *et al.* 2006). Esses resultados sugerem que a secagem rápida provoca hidrólise do amido armazenado nessas sementes. A secagem lenta não aumentou significativamente o conteúdo de matéria seca dessas sementes (que já estava próximo ao valor máximo), como observado para sementes com 45 DAA.

Com relação ao desenvolvimento de plântulas, as maiores porcentagens foram obtidas para sementes com 45 e 55 DAA osmocondicionadas com PEG 6000.

Em sementes com 65 DAA não ocorreu desidratação lenta após tratamento com PEG, provavelmente porque estas sementes estavam com potencial hídrico mais negativo (-14,86 MPa) que o da solução osmocondicionadora (-3,0 MPa). Os resultados obtidos com estas sementes mostraram que não houve alterações na germinação, desenvolvimento de plântulas e nem nos teores de açúcares nos cotilédones e eixo embrionário, não havendo diferenças significativas nesses parâmetros nos diferentes tratamentos de secagem.

Não foi observada relação dos carboidratos com a germinação nos diferentes tratamentos de secagem para os estádios de 55 e 65 DAA nos quais as sementes toleraram a secagem em estufa até níveis médios de 12% de água, não sendo necessário para estas o pré-tratamento com PEG.

## 5.2 Variações nos principais carboidratos solúveis

As análises dos principais carboidratos solúveis demonstraram que houve relação de suas variações com as alterações hídricas provocadas pela secagem rápida, osmocondicionamento ou secagem lenta.

O tipo, a quantidade e/ou a proporção dos açúcares solúveis têm sido relacionados com a tolerância à dessecação e com viabilidade de sementes de várias espécies durante o armazenamento. Hoekstra *et al.* (2001), por exemplo, sugeriram a participação de açúcares, principalmente sacarose e os oligossacarídeos da série da rafinose, na manutenção da integridade das membranas durante o processo de dessecação. Buitink *et al.* (2003), trabalhando com sementes de *Medicago truncatula* observaram que o aumento de sacarose começava com a indução da tolerância à dessecação, contudo esse aumento por si só não era suficiente para conferir a resistência à dessecação.

O aumento no conteúdo de sacarose em sementes de pau-brasil incubadas com PEG, coincidindo com a perda de água, sugere que o fator responsável pelo estresse osmótico causou o incremento particularmente rápido desse açúcar. Conforme sugerido por Buitink *et al.* (2003), existe a possibilidade de que a sacarose seja produzida nos cotilédones após acelerada quebra de reservas, possivelmente hidrólise de amido. Esta sugestão foi feita com base na redução do conteúdo desse polissacarídeo nos cotilédones, observada durante os tratamentos de secagem e no transporte de sacarose para os ápices radiculares durante a embebição em PEG. Esses autores aventaram a hipótese de que o osmocondicionamento induzia trocas no fluxo de carbono, através de diferentes rotas metabólicas. Esta possibilidade foi sugerida através de pesquisas em que a fonte de carbono endógeno, normalmente alocado para a divisão e expansão celular, era desviada da síntese das paredes celulares, produzindo o acúmulo de sacarose. As sementes não germinadas de *M. truncatula* continham grande quantidade de oligossacarídeos (Buitink, observações e dados não publicados), que também poderiam ter acumulado durante o restabelecimento de tolerância à dessecação (Buitink *et al.* 2003).

No presente trabalho foram observados aumentos de oligossacarídeos (rafinose e estaquiose) em sementes de pau-brasil que não toleraram a dessecação (principalmente

com 35 DAA) ou que tiveram resultado de germinação das amostras iniciais comprometidos com outros fatores prejudiciais.

Acúmulos de sacarose e dehidrinas ocorrem durante o desenvolvimento de sementes e no re-estabelecimento da tolerância à dessecação em sementes germinadas. Contudo, nem todos os mecanismos que são induzidos durante a incubação em PEG são necessariamente relacionados com a tolerância à dessecação, podendo também ser uma resposta dos tecidos ao estresse osmótico (Buitink *et al.* 2003).

A quantificação dos principais açúcares solúveis foi realizada em sementes de todos os tratamentos, com a finalidade de avaliar quais deles poderiam estar envolvidos com a aquisição da tolerância à dessecação durante o desenvolvimento de sementes de *C. echinata*. Alternativamente, procurou-se averiguar se esses açúcares poderiam sinalizar a tolerância à dessecação, caso eles não estivessem envolvidos diretamente no processo.

Dentre os compostos celulares, os carboidratos solúveis estão envolvidos com a tolerância à dessecação durante o desenvolvimento e maturação de sementes de várias espécies (Obendorf 1997, Hoesktra *et al.* 2001).

Barbedo *et al.* (2002) sugeriram que a perda da capacidade germinativa de sementes de *C. echinata* durante o armazenamento poderia estar associada à proporção baixa de glicose e frutose em relação à sacarose, encontrada em sementes armazenadas sob condições ambientais de temperatura.

Análises por cromatografia a gás, acoplada a espectrometria de massas, revelaram a presença de substanciais concentrações de ciclitóis, como pinitol, ciceritol e galacto-pinitol A e B em sementes de *C. echinata*, que poderiam ter funções similares às dos oligossacarídeos da série da rafinose (RFO), conforme sugerido por Garcia *et al.* (2006).

Os acúmulos de sacarose e RFO durante o desenvolvimento de sementes vêm sendo considerados como um fator chave na estabilização de membranas (Caffrey *et al.* 1988). Estes compostos acumulados durante a maturação e secagem podem estar envolvidos com a estabilização das membranas celulares, outros sistemas sensíveis e com a substituição da água durante os processos de secagem (Peterbauer & Richter 2001).

O potencial de interação entre os ciclitóis e RFO durante a maturação de sementes e armazenamento tem sido proposto para algumas espécies de leguminosas (Obendorf 1997, Peterbauer & Richter 2001).

Ciclitóis galactosilados são freqüentemente encontrados em quantidades similares e às vezes superiores aos RFO em sementes de muitas leguminosas, como lentilha, soja e grão-de-bico (Peterbauer & Richter 2001). Esses compostos dividem funções em comuns, incluindo participação na tolerância à dessecação (Peterbauer & Richter 2001 e referências contidas). Ciclitóis livres e galactosilados também são propostos para contribuir na estabilidade estrutural de organelas, membranas, enzimas e outras macromoléculas, além da manutenção das sementes no estado gel.

Sementes de *C. echinata* possuem baixos níveis de RFO em suas sementes (Garcia *et al.* 2006), no entanto, esses níveis aumentaram (embora em pequena proporção) durante os processos de secagem de sementes de 45 DAA, que adquiriram tolerância à dessecação, como observado no presente trabalho. Além dos traços de RFO, foram encontradas nas análises realizadas quantidades consideráveis de ciclitóis galactosilados, juntamente com sacarose. Talvez a razão de as sementes de *C. echinata* tolerarem a dessecação esteja relacionada com a presença desses elevados teores de ciclitóis galactosilados e de sacarose. Contudo, novas análises deverão ser realizadas, utilizando técnicas mais apropriadas para a quantificação desses compostos, como GC/MS.

Apesar disso, a análise comparada dos resultados obtidos por HPLC dos principais carboidratos solúveis entre os tratamentos de secagem de sementes imaturas (45 DAA) e de sementes maduras com 55 e 65 DAA, permitiu avaliar que as modificações ocorridas estão relacionadas com os processos de secagem e que as alterações nos carboidratos solúveis são sinalizadoras desse processo. Entretanto, ainda não é possível afirmar se essas alterações foram causa ou consequência da aquisição de tolerância à dessecação em sementes com 45 DAA submetidas secagem lenta. Assim, as alterações encontradas nos carboidratos solúveis das sementes que toleraram a secagem quando previamente osmocondicionadas (secagem lenta), em comparação com as que não toleraram a secagem rápida, permitiu avaliar o possível envolvimento desses compostos nos processos de secagem.

## 6 CONCLUSÕES

- As sementes imaturas de *C. echinata* com 35 dias após a antese (DAA), recém-colhidas, germinaram, mas não desenvolveram plântulas, o que inviabiliza sua colheita para fins de multiplicação da espécie.
- Sementes imaturas com 45 DAA, recém-colhidas, germinaram e desenvolveram plântulas em até 75% das germinadas. Tal observação justifica a colheita de sementes nesse estágio de desenvolvimento, ampliando o período de colheita.
- Sementes de *C. echinata* com 45 DAA só toleraram a secagem mantendo a germinação e desenvolvimento de plântulas quando submetidas ao prévio tratamento com polietilenoglicol (PEG).
- PEG induziu o acréscimo de açúcares solúveis, tanto no eixo quanto nos cotilédones de sementes imaturas com 45 DAA, possivelmente por promover a hidrólise do amido.
- Os principais açúcares solúveis presentes em sementes com 45 DAA, após serem submetidas à secagem lenta, tiveram seus teores aumentados a níveis próximos aos de sementes com 55 DAA que toleraram secagem rápida em estufa até níveis de 12%. As variações nos açúcares individuais de sementes com 45 DAA, após os processos de secagem, comparadas com os teores de açúcares aos 55 DAA, sugerem que estes compostos podem sinalizar a aquisição de tolerância à dessecação, ou indicar que tal processo produz modificações no metabolismo dos carboidratos.
- O osmocondicionamento com PEG, seguido de secagem até níveis pré-estabelecidos para sementes em fase de maturidade fisiológica, induziu tolerância à dessecação de sementes imaturas de pau-brasil. Assim, a tolerância à dessecação de sementes previamente osmocondicionadas e secas até 12% de teor de água pode ter sido adquirida através da manipulação das relações hídricas.
- Aos 55 e 65 DAA não foram observadas diferenças significativas nos açúcares solúveis entre os tratamentos de secagem e idade. Sementes de ambas idades toleraram a secagem até níveis de 12% de água, sem prévio osmocondicionamento em PEG, sugerindo que os açúcares estão envolvidos com a tolerância à dessecação adquirida naturalmente por sementes a partir de 55 DAA.

## 7 COMENTÁRIOS FINAIS

Conforme constava no plano inicial foi realizada uma análise dos efeitos de alterações hídricas sobre a tolerância à dessecação de sementes imaturas de pau-brasil e sobre a composição dos carboidratos solúveis em quatro estádios de maturação, ou seja, aos 35, 45, 55 e 65 dias após a antese (DAA).

O objetivo principal a ser alcançado seria induzir a tolerância à dessecação até níveis de teor de água de 12% para sementes imaturas, pois este valor permite que sementes de *C. echinata* sejam armazenadas em câmara fria (8 °C) por 18 meses (Barbedo *et al.* 2002) ou congeladas a -18 °C por 24 meses (Hellmann *et al.* 2006).

Sementes imaturas com 45 DAA toleraram a desidratação quando osmocondicionadas com posterior secagem até níveis de 12% de teor de água (secagem lenta). Nos demais estádios, o osmocondicionamento não produziu alterações significativas a este mesmo teor de água.

Os dados encontrados quanto às variações dos principais carboidratos solúveis sugerem que esses compostos estão relacionados com a tolerância à dessecação de sementes de pau-brasil. Contudo, ainda não podemos afirmar se as alterações encontradas nas sementes imaturas induzidas seriam consequência da aquisição de tolerância à dessecação ou causa do processo. Análises mais precisas, com métodos mais apropriados para esses compostos de carbono, especialmente para os ciclitóis, além da investigação de outros componentes celulares vitais, deverão ser realizadas para um melhor conhecimento do processo de tolerância à redução do teor de água dessas sementes.

O presente estudo forneceu subsídios para aplicações de novas técnicas de armazenamento para sementes imaturas de *Caesalpinia echinata*, possibilitando, assim, a ampliação do período de colheita e a conservação das sementes de uma espécie arbórea nativa do Brasil e incluída na lista de espécies em risco de extinção.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.A., FJERSTAD, M. C. RINNE, R.W. 1983. Characteristics of soybean seed maturation: Necessity for slow dehydration. *Crop Science* 23:265-267.
- ADAMS, C.A. 2000. Mata Atlântica *In*: Caiçaras na Mata Atlântica: Pesquisa científica *versus* planejamento e gestão ambiental. São Paulo: Annablume, FAPESP, p. 336.
- AGUIAR, F.F.A. & BARBOSA, J.M. 1985. Estudo de conservação e longevidade de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Ecosystema* 10:145-150.
- AGUIAR, F.F.A. 2000. Crescimento do Pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) em diferentes espaçamentos. *Ecosystema* 25:105-107.
- AMARAL, L.I.V., COSTA, P.M.F., AIDAR, M.P.M., GASPAR, M. & BUCKERIDGE, M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. *Hoehnea* (aceito).
- ARAUJO, E.F., ARAUJO, F. R., SOFIATTI, V., SILVA, R. F. 2006. Maturação de sementes de milho-doce-grupo super doce. *Revista Brasileira de Sementes* 28:69-76.
- BAILLY, C., AUDIGIER, C., LADONNE, F., WAGNER, M. H., COSTE F., CORBINEAU, F. & CÔME, D. 2001. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *Journal of Experimental Botany* 52:701-708.
- BANSAL, R.P., BHATI, P.R. & SEN, D.N. 1980. Differential specificity in water inhibition of Indian arid zone. *Biologia Plantarum* 22:327-331.
- BARBEDO, A.S.C., BIACHI, C.G., KELLER L.R., ORTEGA, M.G. & ORTEGA, S.E.H. 2005. Manual técnico de arborização urbana. Secretaria Municipal do Verde e do Meio Ambiente p. 45.
- BARBEDO, C.J. & CICERO, S.M. 1998. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. *Scientia Agricola* 55:249-259.
- BARBEDO, C.J. & MARCOS-FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação de sementes. *Acta Botanica Brasilica* 12:145-164.
- BARBEDO, C.J., BILIA, D.A.C. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 431-439

- BARBEDO, C.J. & BILIA, D.A.C. 1998. Evolution of research on recalcitrant seeds. *Sciencia Agricola* 55 (Número especial):121-125
- BARBEDO, C.J., MARCOS-FILHO, J. & NOVENBRE, A.D.L.C. 1997. Condicionamento osmótico e armazenamento de sementes de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). *Revista Brasileira de Sementes* 19: 355-361.
- BARRUETO CID, L.P., OLIVA, M.A., CARDOSO, A.A. 1981. Efeito do potencial hídrico sobre a embebição, a respiração e a germinação da leguminosa *Cratylia floribunda*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 16: 883-890.
- BARTELS, D., SINGH, M. & SALAMINE, F. 1988. Onset of desiccation tolerance during development of the barley embryo. *Planta, Berlin* 175(3):485-492.
- BELTRATI, C.M. & PAOLI, A.A.S. 2003. SEMENTE. *IN* APPEZZATO DA GLÓRIA, B. & CARMELLO-GUERREIRO, S. M. Anatomia vegetal. Editora Universidade Federal de Viçosa. pp. 399-424.
- BERJAK, P., VERTUCCI, C.W. & PAMMENTER, N.W. 1993. Effects of developmental status and dehydration rate on characteristics of water and desiccation sensitivity in recalcitrant seeds of *Camellia sinensis*. *Seed Science Research* 3: 155-166
- BEWLEY, J.D. & BLACK, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2ª ed. Plenum Press, New York. p. 445.
- BLACK, M., CORBINEAU, F., GEE, H. & CÔME, D. 1999. Water content, raffinose and dehydrins in the induction of desiccation tolerance in immature wheat embryos. *Plant Physiology* 120:463-471.
- BLACKMAN, S.A., WETTLAUFER, S.H., OBENDORF, R.L., & LEOPOLD, A.C. 1991. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. *Plant Physiology* 96:868-874.
- BLACKMAN, S.A., OBENDORF, R.L., & LEOPOLD, A.C. 1992. Maturation proteins and sugars in desiccation tolerance of developing seeds. *Plant Physiology* 100: 225-230.
- BOCHICCHIO, A., VAZZANA, C., RASCHI, A., BARTELS, D. & SALAMINI, F. 1988. Effect of desiccation on isolated embryos of maize. Onset of desiccation tolerance during development. *Agronomie* 8: 29-36.
- BORGES, E.E.L., VASCONCELOS, P.C.S., CARVALHO, D.V. & BORGES, R.C.G. 1991. Estudos preliminares sobre o efeito do estresse hídrico na germinação de sementes

- de jacarandá-da-Bahia (*Dalbergia nigra*) e cedro-rosa (*Cedrela fissilis*). Revista Brasileira de Sementes 13:115-118.
- BORGES, E. E. L., PEREZ, S. C. J.G.A., BORGES, R. C.G. , REZENDE, S.T. E GARCIA, S.R. 2002. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *platymiscium pubescens* micheli (tamboril-da-mata) R. Árvore, Viçosa-MG, v.26, n.5, p.603-613.
- BORGES, I.F., GIUDICE, J.D., BILIA, D.A.C., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & BARBEDO, C.J. 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Archives of Biology and Technology 48: 851-861.
- BORGES, I.F., BARBEDO, C.J. RICHETER, A. A. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2006. Variation in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) Brazilian Journal of Plant Physiology 18(4): 475-482.
- BRACCINI, A.L., DIAS, D.C.F.S., REIS, M.S. 1996. Tratamentos pré-germinativos e sua importância nos estudos de tecnologia de sementes. Informativo ABRATES 6: 51-56.
- BRADFORD, K.J. 1990. A water relation analysis of seed germination rates. Plant Physiology 94: 840-849.
- BRASIL. 1992. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: SNAD/DNDV/CLAV, 365p.
- BUCKERIDGE, M. S., TINÉ, M. A. S., LIMA, D U, SANTOS H. P. 2000. Mobilisation of storage cell wall polysaccharides in seeds. Plant Physiology and Biochemistry 38: 141-156.
- BUCKERIDGE, M.S., SANTOS, H.P., TINÉ, M.A.S. & AIDAR, M.P.M. 2004a. Mobilização de reservas. In Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre pp.164-185.
- BUCKERIDGE, M.S., AIDAR, M.P.M., SANTOS, H.P. & TINÉ, M.A.S. 2004b. Acúmulo de reservas. In Germinação: do básico ao aplicado (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre. pp.31-50.

- BUITINK, J., HEMMINGA M.A. & HOEKSTRA, F.A. 2000. Is there a role for oligosaccharides in seed longevity? An assessment of the intracellular glass stability. *Plant Physiology* 122:1217-1224.
- BUITINK, J., BENIT, L., VU, SATOUR, P. & LEPRINCE O. 2003. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaerte seeds. *Seed Science Research* 13:273-286.
- BULBOVAS, P. 2005. Defesas antioxidativas em plantas jovens de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) como indicadoras de resistência da espécie à poluição atmosférica na cidade de São Paulo, SP. Tese de Doutorado, Curso de Pós-Graduação em Ecologia, Instituto de Biociências, USP, São Paulo. p.108.
- CAFFREY, M., FONSECA, V. & LEOPOLD, A.C. 1988. Lipid-sugar interactions. Relevance to anhydrous biology. *Plant Physiology* 86:754-758.
- CAMPOS, I.S. & ASSUNÇÃO, M.V. 1990. Estresse salino e hídrico na germinação e vigor do arroz. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília 25: 857-862.
- CARVALHO, P. E. R. 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidade e uso da madeira. Brasília: s.n.
- CARVALHO, N.M. & NAKAGAWA, J. 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4 Ed. Funep, Jaboticabal, p. 424.
- CARVALHO, L.F., MEDEIROS-FILHO, S., ROSSETTI, A.G. & TEÓFILO, E.M. 2000. Condicionamento osmótico em sementes de sorgo. *Revista Brasileira de Sementes* 22: 185-192
- CASTILLO, E.M., LUMEN, B.O., REYES, P.S. & LUMEN, H.Z. 1990. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 38: 351-355.
- CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J., HILHORST, H.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In Germinação: do básico ao aplicado* (A.G. Ferreira & F. Borghetti, Orgs.). Artmed, Porto Alegre, pp.51-67.
- CORBINEAU, F., PICARD, M.A., FOUGEREUX, J.A., LADONNE, F. & CÔME, D. 2000. Effects of dehydration conditions on desiccation tolerance of developing pea seeds as related to oligosaccharide content and cell membrane properties. *Seed Science Research* 10: 329-339
- CROWE, J.H., HOEKSTRA, F.A. & CROWE, L.M. 1992. Anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 54:579-599.

- CUNHA, M.W. & LIMA, H.C. 1992. Viagem à terra do Pau-brasil. Agência Brasileira de Cultura, Rio de Janeiro.
- DELGADO, L. F. 2006. Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. Dissertação do Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica de São Paulo (SP) p.106.
- DEMIR, I. & ELLIS, R. H. 1992a. Changes in seed quality during seed development and maturation in tomato. *Seed Science Research* 2: 81-87
- DEMIR, I. & ELLIS, R. H. 1992b. Development of pepper seed quality. *Annals of Applied Biology* 12: 358-399.
- DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. & SMITH, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356.
- DURE, L.H., CROUCH, M., HARADA, J., MUNDY, H.J., QUATRANO, R., THOMAS, T. & SUNG, Z.R. 1989. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology* 12: 475-486.
- EGLI, D.B. 1998. Seed biology and the yield of grain crops. New York, CABI International. 178p.
- ELLIS, R.H., HONG, T.D. & ROBERTS, E.H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour? Coffee. *Journal of Experimental Botany* 41:1167-1174.
- ELLIS, R.H. & PIETRA FILHO, C. 1992. Seed development and cereal seed longevity. *Seed Science Research* 2: 9-15.
- ESAU, K. 1974. Anatomia das plantas com sementes. Tradução: MORRETES, B.L. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo. 293p.
- FARIA, J.M.R. 2006. Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. 145p.
- FARIA, J.M.R., BUITINK, J., VAN LAMMEREN, A.A.M. & HILHORST, H.W.M. 2005. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. *Journal of Experimental Botany* 56: 2119-2130.
- FARRANT, J.M., PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. 1989. Germination associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds - a study on three unrelated species. *Planta* 178: 189-198.

- Farrant, J.M., Berjak, P. & Pammenter, N.W. 1992. Proteins in development and germination of desiccation-sensitive (recalcitrant) seed species. *Plant Growth Regulation* 11: 257-265.
- FESSEL, S.A., VIEIRA, R.D., RODRIGUES, T.J.D. & FAGIOLI, M. 2002. Germinação de sementes de alface submetidas a condicionamento osmótico durante o armazenamento. *Scientia Agrícola* 59(1): pp.
- FRANZEN, J.J. & HAAS, M.M. 1991. Vitamin E content during development of some seedling. *Phytochemistry* 30: 2911-2913.
- GARCIA, I.S., SOUZA, A., BARBEDO, C.J., DIETRICH, S.M.C. & FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology* 66: 739-745.
- GOMES, F. P. 1973. Curso de estatística experimental. 5ª ed. Nobel, São Paulo.
- HADAS, A. 1976. Water uptake and germination of leguminous seeds under changing external water potential in osmotic solutions. *Journal of Experimental Botany* 27: 480-489.
- HARDEGREE, S.P. & EMMERICH, W.E. 1994. Seed germination response to polyethylene glycol solution depth. *Seed Science and Technology* 22:1-7.
- HASEGAWA, P.M., BRESSAN, R.A., HANDA, S. & HANDA, A.K. 1984. Cellular mechanisms of tolerance to water stress. *HortScience* 19: 371-377.
- HEBLING, S.A. 1997. Aspectos ecofisiológicos da germinação de sementes de *E. contortisiliquum* (Vellozo) Morong. 143. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- HELLMANN, M.E. 2006. Tolerância ao congelamento e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Dissertação do Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente. Instituto de Botânica de São Paulo, SP.
- HEYDECKER, W., GIBBINS, B. M. & TURNER, Y.J. 1975. Invigoration of seeds? *Seed Science and Technology* 3:881-888.
- HSIAO, T.C. 1973. Plant responses to water stress. *Annual Review of Plant Physiology* 24: 519-570.
- HOEKSTRA, F.A., GOLOVINA, E.A. & BUITINK, J. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6:431-438.

- INPE. 2003. INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. Anais XI SBSR, Belo Horizonte, Brasil, p. 475-478.
- ISTA. 1996. International Seed Testing Association. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 24: 1-335.
- ITAYA, N.M., FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. & BUCKERIDGE, M.S. 1999. *In vivo* and *in vitro* synthesis of fructan polymers by fructosyltransferase from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32:435-442.
- KERMODE, A.R. 1990. Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9: 155-195.
- KOSTER, K.L. & LEOPOLD, C. 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology* 51:914-916.
- KRAMER, P.J. 1974. Fifty years of progress in water relations research. *Plant Physiology* 54: 463-471.
- KRAMER, P.J., BOYER, J.S. 1995. *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego, USA, 495 p.
- KUO, T.M., VANMIDDLESWORTH, J.F. & WOLF, W.J. 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 36:32-36.
- LANE, B.G. 1991. Cellular desiccation and hydration: developmentally regulated proteins, and the maturation and germination of seed embryos. *FASEB Journal* 5: 2893-2901.
- LARCHER, W. 2000. *Ecofisiologia Vegetal*. Ed. Rima, São Carlos, p. 531.
- Leopold, A.C. & Vertucci, C.W. 1989. Moisture as a regulator of physiological reaction in seeds. *In Seed Moisture* (P.C. Stanwood & M.B. McDonald, Eds.). Madison, Crop Science Society of America, pp.51-67.
- LEOPOLD, A. C., SUN, W. Q. & BERNAL-LUGO, I. 1994. The glassy state in seeds; analysis and function. *Seed Science Research* 4:267-274.
- LEPRINCE, O., DELTOUR, R., THORPE, P.C., ATHERTON, N.M. & HENDRY, G.A.F. 1990. The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (*Zea mays* L.). *New Phytologist* 116: 573-580.

- LEPRINCE, O., VAN DER WERF, A., DELTOUR, R. & LAMBERS, H. 1992. Respiratory pathways in germinating maize radicles correlated with desiccation tolerance and soluble sugars. *Physiologia Plantarum* 84: 581-588.
- LEPRINCE, O., HENDRY, G.A.F. & MCKERSIE, B.D. 1993. The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research* 3: 231-246.
- LIN, T. & HUANG, N. 1994. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. *Journal of Experimental Botany* 278: 1289-1294.
- LONGUI, E.L. 2005. Pau-brasil e outras espécies nativas empregadas na fabricação de arcos para instrumentos de corda: um estudo comparativo. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Biodiversidade e Meio Ambiente, Instituto de Botânica, São Paulo.
- LORENZI, H. 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 368p.
- MANTOVANI, W. 2000. A região litorânea paulista. *In: Anais do Workshop sobre recuperação de áreas degradadas da Serra do Mar e formações florestais litorâneas* (Barbosa, L.M., coord.). São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente, p. 24-31.
- MARCOS FILHO, J. 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Fealq, Piracicaba, 495p.
- MAYER, A.M. & POLJAKOFF-MAYBER, A. 1989. The germination of seeds. Oxford: Pergamon Press, 270p.
- MEDEIROS, A.C.S. & CAVALLARI, D.A.N. 1992. Conservação de germoplasma de aroeira (*Astronium urundeuva* Fr. All.) Engl. I. Germinação de sementes após imersão em nitrogênio líquido (-196 °C). *Revista Brasileira de Sementes* 14:73-75.
- MELLO, J. I. O. 2004. Efeito da temperatura na germinação e no armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Monografia de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas. Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo, p.34.
- MELLO, J.I.O. MASSUDA, K. & BARBEDO, C.J. 2004. Temperatura, umidade e substrato para germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *IN: Anais do XV Congresso da Sociedade Botânica de São Paulo. SBSP/UNITAU, Ubatuba CD-ROM.*

- MIAN, M.A.R. & NAFZIGER, E.D. 1994. Seed size and water potential effects on germination and seedling growth of winter wheat. *Crop Science*, Madison 34:169-171,
- MICHEL, B.E. & KAUFMANN, M.R. 1973. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. *Plant Physiology* 51: 914-916.
- MYERS, N., MITTERMELER, R.A., MITTERMELER, C.G., FONSECA, G.A.B. & KENT, J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- OBENDORF, R.L. 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7:63-74.
- PAMMENTER, N.W. & BERJAK, P. 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-37.
- PETERBAUER, T. & RICHTER, A. 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197.
- PRITCHARD, H.W. & PRENDERGARST, F.G. 1986. Effects of desiccation and cryopreservation on the *in vitro* viability of embryos of the recalcitrant seed species *Araucaria hunsteinii* K. Schum. *Journal of Experimental Botany* 37: 1388-1397.
- PUNTARULO, S., GALLEANO, M., SANCHEZ, R.A. & BOVERIS, A. 1991. Superoxide anion and hydrogen peroxide metabolism in soybean embryonic axes during germination. *Biochimica et Biophysica Acta* 1074: 277-283.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F. & EICHHORN, S.E. 2001. *Biologia Vegetal*. Pp.75-80
- ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology* 1:499-514.
- ROCHA, Y.T. 2004. Ibirapitanga: História, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. São Paulo, Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, 396p.
- SÁ, M. E. 1987. Relações entre qualidade fisiológica, disponibilidade hídrica e desempenho de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). Piracicaba: ESALQ, Tese de Doutorado, 147p.
- SALOMÃO, A. N. 2002. Tropical seed species responses to liquid nitrogen exposure. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14:133-138.

- SANHEWE, A. J. & ELLIS, R. H. 1996. Seed development and maturation in *Phaseolus vulgaris*. 2. Post-harvest longevity in air-dry storage. *Journal of Experimental Botany* 47: 959-965.
- SKRIVER, K. & MUNDY, J. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2: 503-512.
- STEADMAN, K.J, PRITCHARD, H.W. & DEY, P.M. 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany* 77: 667-674.
- TILDEN, R.L. & WEST, S.H. 1985. Reversal of the effects of aging in soybean seeds. *Plant Physiology* 77: 584-586.
- VAZQUEZ, G.H. 1995. Condicionamento fisiológico de sementes de soja: efeitos sobre germinação, vigor e potencial de armazenamento. Dissertação de Mestrado USP/ESALQ, 138p.
- VERTUCCI, C.W. & FARRANT, J.M. 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. In: *Seed development and germination* (Kiegel, J., Galili, G.). Marcel Dekker Inc. New York. pp. 237- 271.
- VILLELA, F.A. 1998. Water relations in seed biology. *Scientia Agricola* 55: 98-101.
- VILLELA, F.A., DONI-FILHO, L. & SERQUEIRA, E.L. 1991. Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietileno glicol 6000 e da temperatura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 26: 1957-1968
- VILLELA, F. A. & MARCOS FILHO, J. 1998. Estados energéticos e tipos de água na semente. *Revista Brasileira de Sementes* 20: 317-321
- VERTUCCI, C.W. & ROOS, E.E. 1990. Theoretical basis of protocols for seed storage. *Plant Physiology* 94: 1019-1023.
- WALTERS, C. 2000. Levels of recalcitrance in seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 7-21.
- WALTERS, C.T., TOUCHELL, D.H., POWER, P., WESLEY, S.J., Antolin, M.F. 2002. A cryopreservation protocol for embryos of the endangered species *Zizania texana* *Cryoletters* 23:291-298.
- WENKERT, W., LEMON, E.R. & SINCLAIR, T.R. 1978. Leaf elongation and turgor pressure in field grown soybean. *Agronomy Journal* 70:761-764.

## 9 RESUMO

### **Indução de Tolerância à Dessecação e Variações de Carboidratos Solúveis em Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil) durante a Maturação**

*Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) apresenta um curto período para a colheita de sementes viáveis durante seu ciclo fenológico anual. Com maturidade fisiológica entre 60 - 65 dias após antese (DAA), a qual ocorre imediatamente antes da dispersão, as sementes toleram a secagem controlada e mantêm a viabilidade quando armazenadas por dois anos a - 20 °C, com cerca de 12% de água. Diante desses fatos, a possibilidade de coletar frutos antes da maturidade fisiológica das sementes, poderia ampliar o período de colheita, aumentando a disponibilidade de sementes, e evitando perdas das mesmas.

Os carboidratos solúveis totais de sementes de *Caesalpinia echinata*, os quais correspondem a cerca de 10-15% de sua matéria seca, bem como o acúmulo de reservas solúveis de carbono estão relacionados com o grau de maturação. Sacarose e ciclitóis são os principais compostos da fração solúvel, enquanto glicose e frutose ocorrem em menores proporções durante o processo de desenvolvimento das sementes. Traços de rafinose e estaquiose foram detectados principalmente em sementes imaturas. Dentre outros mecanismos, a presença desses açúcares na semente poderia estar relacionada à aquisição e manutenção da tolerância à dessecação. O osmocondicionamento de sementes imaturas promove a secagem lenta, provavelmente através da ativação de processos metabólicos e conseqüente formação de compostos essenciais para manutenção da viabilidade.

No presente trabalho, com o objetivo de ampliar o período de colheita e antecipar artificialmente a maturação de sementes de *Caesalpinia echinata*, foram investigadas modificações fisiológicas em sementes imaturas bem como as variações na composição dos carboidratos não estruturais que pudessem estar envolvidas nos processos de secagem.

Inicialmente foi investigada a melhor concentração da solução osmótica a fim de estimular a desidratação e a maturação artificial em laboratório. Sementes *Caesalpinia echinata* com 45, 55 e 65 DAA foram submetidas à incubação em soluções

de polietilenoglicol (PEG) e sacarose, ambas a -2,4 MPa e -12,4 MPa, por 10 dias e posterior secagem até cerca de 10% de teor de água. Verificou-se que PEG a -2,4 MPa promoveu a secagem lenta das sementes, porém, a temperatura do ensaio (25 °C) propiciou o desenvolvimento de microorganismos e conseqüente deterioração das sementes. Durante o período de incubação não houve sinais de germinação.

Visando estabelecer a melhor condição para osmocondicionamento, num segundo experimento, sementes imaturas, semi-maduras e maduras foram incubadas, ou não, em PEG a -0,8, -1,6 e -2,4 MPa, por 8, 16 e 24 h, seguidas de secagem a 40 °C/4 h. Na avaliação da germinação das sementes o melhor resultado foi obtido com PEG - 2,4 MPa, por 24 horas. Com o objetivo de avaliar até qual conteúdo de água as sementes imaturas toleravam a dessecação, em um terceiro experimento, sementes com 45, 55 e 65 DAA foram incubadas, ou não, em PEG -3,0 MPa, a 8 °C/20 h e 25 °C/4 h, seguido de secagem a 40 °C, até atingirem 30%, 20%, 12% e 7% de teor de água. Resultados do teste de germinação mostraram que sementes imaturas (45 DAA) toleraram a dessecação até 12% de teor de água, quando previamente osmocondicionadas em PEG (secagem lenta) e perderam a viabilidade quando foram somente secas sem o prévio osmocondicionamento (secagem rápida). Sementes com 55 DAA toleraram a secagem diretamente em estufa até 12%, evidenciando que essas sementes já estavam em fase de maturidade fisiológica.

Finalmente, para avaliar o envolvimento dos carboidratos solúveis no processo de tolerância à dessecação, foi conduzido um quarto experimento com sementes de 35, 45, 55 e 65 DAA submetidas aos tratamentos de secagem lenta e rápida e osmocondicionamento em PEG -3,0 MPa/24 h. Também foi avaliada a manutenção da tolerância à dessecação após armazenamento das sementes com 45 e 55 DAA a -20° C/40dias. Neste caso, sementes com 45 DAA submetidas ao osmocondicionamento seguido de secagem e sementes com 55 DAA submetidas à secagem sem osmocondicionamento apresentaram tolerância ao congelamento, sem comprometimento da germinação. Em sementes imaturas (45 DAA), as análises dos principais carboidratos solúveis demonstraram relação direta entre os teores destes açúcares e os processos de secagem. Nos eixos embrionários, os teores de ciclitóis diminuíram nas sementes submetidas à secagem rápida, enquanto que a secagem lenta favoreceu o aumento expressivo desses compostos. O teores de glicose e frutose, aumentaram significativamente durante a secagem lenta. Já a sacarose aumentou durante a secagem rápida, enquanto que na secagem lenta ocorreu diminuição no seu

teor. Isso indica que o fator responsável pelo estresse osmótico, o PEG, também afeta os níveis desse açúcar, com tendência de promover a manutenção de valores similares aos encontrados nas análises iniciais das sementes com 55 DAA recém-colhidas. Os teores de rafinose e estaquiose também aumentaram expressivamente quando as sementes foram submetidas à secagem lenta. Em sementes imaturas com 35 DAA que não toleraram a dessecação ou que tiveram a germinação prejudicada por outros fatores, também foram observados elevados teores de rafinose, estaquiose e mais expressivamente de sacarose.

Análise comparada dos resultados obtidos por HPLC dos principais carboidratos solúveis entre os tratamentos de secagem de sementes imaturas (45 DAA) e de sementes maduras com 55 e 65 DAA indicou que as alterações ocorridas em ciclitóis galactosilados, frutose, sacarose e rafinose estão relacionadas com os processos de secagem e podem interferir no processo de germinação.

Palavras-chave: sementes imaturas, osmocondicionamento, carboidratos não estruturais, tolerância à dessecação, pau-brasil, potencial hídrico, amido.

## 10 ABSTRACT

### **Induction of desiccation tolerance and variations of soluble sugars in seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood) during maturation**

Seeds of *Caesalpinia echinata* present a short harvest period during the annual phenological cycle. With physiological maturity between 60-65 days after anthesis (DAA), which occurs immediately before shedding, these seeds tolerate controlled drying and maintain viability when stored for 2 years at -20 °C and *ca* 12 % of water content. Therefore, the possibility of collecting fruits before shedding, would avoid losses of viable seeds in the field, broadening the harvest period.

Soluble sugars makes up 10-15% of the seed dry mass and accumulation of soluble carbon reserves are related to seed maturation. Sucrose and cyclitols are the main sugars of the soluble fraction, while glucose and fructose occur in lower proportions during seed development. Traces of raffinose and stachyose were detected mainly in immature seeds. Among other mechanisms, the presence of these compounds in the seeds could be related to the acquisition and maintenance of desiccation tolerance. The osmopriming of immature seeds has promoted slow drying probably through the activation of metabolic processes and consequent formation of essential compounds to maintain seed viability.

The objective of this research was to investigate the physiological modifications, as well as variations in the composition of non-structural carbohydrates that could be involved in the drying processes, aiming to extend the harvest period and artificially anticipate the maturation of immature seeds of *C. echinata*.

Initially it was evaluated the best concentration of the osmotic solution aiming to stimulate dehydration and artificially obtain seed maturation at laboratory. Seeds of *C. echinata* with 45, 55 and 65 DAA were submitted to incubation in PEG (osmopriming) and sucrose solution, both at -2.4 and -12.0 MPa for 10 days and later drying until 10% of the water content. Results showed that PEG at -2.4 MPa promoted slow drying of the seeds, but the temperature (25 °C) enabled the development of microorganisms and consequent seed deterioration. During the incubation period no seedling emergence was identified. To establish the best osmopriming condition, in a second trial, immature, semi-mature and mature seeds were incubated or not in PEG at -0.8, -1.6 and -2.4

MPa, for 8, 16 and 24 hours followed by drying at 40 °C/4h. Seed germination was evaluated and the best results were obtained with PEG at -2.4 MPa/24 h. Aiming to verify at which water content the immature seeds tolerate desiccation, in a third trial seeds of *Caesalpinia echinata* at 45, 55 and 65 DAA were incubated or not with PEG - 3,0 MPa at 8 °C/24 h, followed by drying at 40 °C until decreasing water contents to 30 %, 20 %, 12 % and 7 %. Seedling emergence after each treatment was evaluated and results indicated that immature seeds (45 DAA) tolerated drying until 12% water content, when previously dehydrated with PEG (slow drying), but lost viability when dried without osmopriming. Seeds with 55 DAA, tolerated drying without previous incubation in PEG (fast drying) until 12% water content, indicating that these seeds have already reached the physiological maturity phase.

Finally, aiming to evaluate the involvement of soluble sugars in the desiccation tolerance process and the maintenance of this tolerance after storage at -20 °C/40 days, another trial with seeds at 35, 45, 55 and 65 DAA was conducted. As results, dried seeds with 55 DAA, and seeds with 45 DAA incubated in PEG, both dried at 12 %, presented storage tolerance. Analysis of the main soluble carbohydrates showed direct relationship between the content of those sugars and the drying processes in immature seeds (45 DAA). In the embryonic axis, the content of cyclitols decreased when the seeds were dried without PEG, while when dried after incubation in PEG these compounds showed a marked increase in their proportions. Concerning glucose and fructose, the osmopriming, with or without drying, increased their contents strongly. Sucrose also increased after incubation with PEG in seeds without drying, while, when dried, it was observed a decrease in sucrose, indicating that the responsible factor for the osmotic stress, PEG, also affects this sugar and maintained levels similar to those found in 55 DAA recently harvested seeds (T0). The same result as for sucrose was observed for raffinose. In immature seeds with 35 DAA that did not tolerate desiccation, or had its germination affected by other factors, it was observed an increase of raffinose, stachyose and considerable amounts of sucrose.

Comparison of the main soluble sugars, analyzed by HPLC, between immature seeds (45 DAA) and mature ones (55 and 65 DAA) indicated that the modifications observed are related to the drying process and that the soluble carbohydrates alterations are indicators of this process and may influence the germination process.

Key words: immature seeds, non-structural carbohydrates, osmopriming in PEG, desiccation tolerance, brazilwood, hydric potential.

## **11 ANEXOS**

## Informações adicionais

### Armazenamento à baixa temperatura de sementes imaturas de *Caesalpinia echinata* após osmocondicionamento seguido de secagem

Considerando que há estudos não completamente esclarecidos no que se refere à manutenção dos efeitos de tratamentos osmóticos durante o armazenamento de sementes pré-condicionadas (Posse *et al.* 2004) objetivou-se, com este experimento, avaliar se as sementes viáveis de pau-brasil com 45 DAA osmocondicionadas em PEG, seguido de secagem, tolerariam o armazenamento sob baixa temperatura, conservando a capacidade germinativa.

Neste presente trabalho, tomou-se sementes com 45 DAA e 55 DAA, osmocondicionadas em PEG seguidas de secagem em estufa e as mesmas, porém somente secas em estufa. Foram, então, armazenadas por um período de 40 dias à temperatura de -20 °C em embalagem permeável (saco de papel kraft), como já recomendado para a espécie (Mello *et al.* 2004, Hellmann *et al.* 2006).

Sementes de 45 e 55 DAA submetidas ou não ao tratamento de osmocondicionamento em PEG, seguido de secagem em estufa a 40 °C até *ca.* de 12% de água, foram acondicionadas em embalagens permeáveis (sacos de papel kraft) e armazenadas a -20 °C por 40 dias. Para o teste de germinação foram utilizadas 20 sementes por repetição e 3 repetições. Foram consideradas germinadas as sementes com radículas com mais de 3mm de comprimento e plântulas desenvolvidas, aquelas com raiz primária e o primeiro par de folhas completamente desenvolvidas. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado e os efeitos da temperatura de armazenamento sobre as sementes germinadas e desenvolvimento de plântulas estão apresentados na **Tabela A3**.

A **Tabela A3** mostra que não houve variação no comportamento das sementes de *C. echinata* com 55 DAA osmocondicionadas em PEG, seguido de secagem até 12% de água e de sementes secas, sem o prévio osmocondicionamento quando ambas amostras foram armazenadas a -20 °C. Já as sementes com 45 DAA osmocondicionadas em PEG seguido de secagem, tiveram a viabilidade preservada, porém com redução de *ca.* de 10% para germinação em relação aos valores iniciais, e de *ca.* de 30% de redução

para desenvolvimento de plântulas. Como já informado, as sementes sem o osmocondicionamento perderam totalmente a viabilidade.

Os benefícios proporcionados à conservação das sementes de pau-brasil pelo armazenamento sob baixa temperatura de sementes com 45 DAA osmocondicionadas e secas, apesar de os valores obtidos terem sido inferiores ao controle antes do armazenamento a -20 °C por 40 dias, mostraram-se eficazes quando este procedimento se faz necessário.

**Tabela A1.** Comportamento de sementes imaturas de pau-brasil, com 45 e 55 dias após a antese (DAA), osmocondicionadas em PEG ou não seguido de secagem e armazenamento a -20 °C, por 40 dias.

<b>45 DAA</b>					
Tratamento	G(%)	DP(%)	U(%)	MS(mg g <sup>-1</sup> )	Ψ <sub>H2O</sub> (MPa)
secagem rápida					
T0	98	70	59	286	-2,27
12%	28	5	13	221	-74,67
armaz-20°C	0	0	12	188	-111,07
secagem lenta (PEG)					
T0-24h	95	85	48	226	-4,6
12%	55	45	12	220	-84,40
armaz-20°C	45	28	12	235	-91,07
<b>55 DAA</b>					
Tratamento	G(%)	DP(%)	U(%)	MS(mg g <sup>-1</sup> )	Ψ <sub>H2O</sub> (MPa)
secagem rápida					
T0	100	77,50	50	310	-4,5
12%	78	50	12	257	-71,48
armaz-20°C	70	55	11	273	-101,12
secagem lenta (PEG)					
T0-24h	95	73	45	310	-3,79
12%	65	45	12	254	-79,03
armaz-20°C	60	40	11	264	-98,81