

JULIANA IURA DE OLIVEIRA MELLO

Compostos de Reserva de Sementes e suas Relações com Diferentes Níveis de Sensibilidade à Dessecação e ao Congelamento

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2008

JULIANA IURA DE OLIVEIRA MELLO

Compostos de Reserva de Sementes e suas Relações com Diferentes Níveis de Sensibilidade à Dessecação e ao Congelamento

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Vasculares em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. RITA DE CÁSSIA LEONE FIGUEIREDO RIBEIRO

Dedico

As minhas famílias (de sangue e de coração), que sempre me apoiaram no caminho que resolvi seguir e me deram ferramentas para que eu superasse as barreiras e dificuldades encontradas.

Agradeco

Ao Instituto de Botânica por me receber e ter proporcionado o encontro com tantos profissionais e pessoas especiais, que muito contribuíram para o meu aprendizado.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, em especial a Dra Sonia Dietrich e a Marcinha.

À FAPESP pelo apoio financeiro ao Projeto Temático “Carboidratos como moduladores de processos ecofisiológicos e indicadores de estresses em plantas tropicais” - Processo 2005/04139-7 e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos funcionários da Reserva e Estação Experimental de Mogi-Guaçu pelo auxílio nas coletas.

À Dra Rita de Cássia L. Figueiredo Ribeiro, minha orientadora, que mesmo quando não me orientava oficialmente, me apoiou e acreditou em meu potencial, investindo seu tempo e paciência na minha formação. Espero um dia ser, pelo menos, 1/3 da profissional que a senhora é.

Ao eterno orientador e amigo, Claudio Barbedo, por ter feito com que eu me apaixonasse pelo mundo da pesquisa, da música instrumental e dos vinhos. Agradeço ainda a toda família Barbedo, Adeliana, Laís e Artur, além da vó Anita e do vô Alceu, por todos os momentos de alegria junto a vocês, seja nas pizzadas, peixadas, jogos da Copa, ou mesmo numa sala, sentados ao sofá conversando.

Aos meus pais, Alberto e Iyone, pela oportunidade de estudo e dedicação exclusiva aos meus projetos do laboratório, sem os quais essa dissertação não existiria.

À minha irmã, Luciana, que esteve ao meu lado nos momentos de nervosismo e mesmo sem entender o que eu fazia, me apoiou, pois sabia da importância do meu trabalho para mim.

Aos irmãos-amigos da Família Index, Juzinha, Carol, Denise, Simone, Lamarca, Carmen, Angélica, Kate, Marta, Nestor, Cris, João Paulo (Mô), Joãozinho, João Parisi, Thais, Jailma, pelas conversas, os cafés intelectuais, as comemorações, ajuda nos trabalhos, nas pesquisas, no apoio psicológico, nos ensinamentos de vida e principalmente pelo carinho que sempre tiveram por mim.

À Mary Monteiro, nova mãe que arranjei dentro do laboratório, sempre me auxiliando no desenvolver do trabalho, pelas conversas e risadas.

Ao Professor Salatino que me abriu as portas de seu laboratório para que eu pudesse realizar análises sob a sua supervisão e a Professora Deborah Yara por ter me auxiliado nas inúmeras análises cromatográficas, pela paciência demonstrada em meio as minhas dúvidas.

Aos alunos do laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica da USP, por cederem parte do seu tempo e disponibilizando equipamentos para que pudesse realizar minhas análises por lá, em especial a Mourisa, técnica do laboratório, que foi peça chave nessas análises e a aluna Mayumi.

Aos pesquisadores Marco Aurélio Tiné e Marília Gaspar, por sempre estarem dispostos a esclarecer minhas dúvidas e por cederem parte de seu tempo me ensinando e me acompanhando em diversas partes do meu trabalho.

Aos amigos e colegas de laboratório, Cynthia, Michelle, Anderson, Marcelino, Roberta, Vanessa Costa, Josi, Marlise, Nataly, Marina, Rodrigo, Denise, Fernanda M., Fernanda K. e Vanessa Oliveira, pelas inúmeras ajudas, conversas, almoços, risadas e, principalmente pela amizade de vocês.

À Paola, minha Pazinha querida, por me ceder, não só seu ombro, mas seu cotovelo nos momentos de irritação, pelo sorriso que sempre me trás e pelos abraços sinceros.

À Amanda Souza, pelas inúmeras ajudas com as cromatografias a gás, por disponibilizar parte de seu tempo no laboratório para me ajudar e, principalmente, pela amizade.

À Amanda Asega, por sempre ter sábias palavras para me confortar, pelas aulas de cromatografia no HPLC novo e por ser um exemplo de pessoa e profissional que quero seguir.

À Kelly, a menina que sabe tudo sobre todas as coisas do mundo, como eu gosto de brincar, pela paciência em me explicar inúmeros cálculos e me aturar nos meus dias de ataques.

À Ludmila, a mamãe da Sofia, pelo carinho, por ser um exemplo de força e determinação.

A uma irmã que a vida me deixou escolher, Tatiana, minha tortuguita, companheira de carona, laboratório, comemorações. Obrigada por sempre estar ao meu lado, por me puxar a orelha, me aconselhar e por me deixar aconselhá-la.

Ao amado amigo Paulo, pelos longos anos de amizade, por me ajudar em diversos momentos, de diversas formas. Por confiar em mim e acreditar no meu potencial.

Ao querido amigo Filipe, pelo carinho, atenção e apoio durante todo esse tempo de Botânico.

Aos amigos de trabalho pesado, sem dia ou hora, Igor, Moacir e Márcio, que serviram de exemplos de mestrandos para mim, por compartilharem comigo seus aprendizados e sementes.

À Liliana, pela valiosa amizade, por me deixar fazer parte de seu mestrado e de seu doutorado, e que, mesmo sem perceber, me fez crescer como profissional, além de todo carinho dentro e fora do laboratório.

Ao Mr. Oda, por ser meu professor mesmo sem que eu freqüentasse suas aulas, por sempre me alegrar e, *of course*, pela ajuda no abstract.

Aos inúmeros amigos que fiz durante todo o período de Botânico. Inútil e impossível seria tentar listar tantos nomes.

Por fim, a todas as pessoas do Instituto, que mesmo com um simples “Bom dia” tornaram esses longos meses mais agradáveis.

**Poema da Sabedoria
(Cecília Meireles)**

*Tinham-me ensinado que a vida
Era a alegria
De abrir os braços ao sol,
Despertando,
E curvar a fronte,
Saudando a noite
E adormecendo...
Tinham-me ensinado que a vida
Era o castigo remoto
Da dor dos risos que se riem
E das lágrimas
Que se deixam correr...
Tinham-me ensinado que a vida
Era o silêncio e o descanso...
E muitas,
E ainda outras coisas muitas...
Sofri a ascensão dolorosa
De quem vai,
Numa noite negra,
Por entre escarpas...
E, lá, no alo, era o exílio...*

*Sabedoria! Sabedoria!
Só te encontrei nos abismos,
Quando vim descendo
Da altura da solidão...
Depois do renunciamento...
Depois de tudo e de todos...
Depois de mim...
Sabedoria! Sabedoria!
Abençoa-me,
Porque sofri,
Buscando-te!
E, por encontrar-te e querer-te,
Faze-te meu Destino...
Deixa-me viver em Ti!...*

Sumário

Resumo	1
Abstract.....	3
1 Introdução	5
1.1 As sementes e sua conservação	5
1.2 Compostos de reserva de sementes.....	8
Proteínas.....	8
Carboidratos	9
Lipídios	12
1.3 Relação entre compostos de reserva e tolerância à dessecação e ao congelamento	15
1.4 Espécies estudadas	20
<i>Inga vera</i> Willd.	20
<i>Eugenia uniflora</i> L.....	22
<i>Caesalpinia echinata</i> Lam.	24
<i>Erythrina speciosa</i> Andr.	26
2 Justificativa	28
3 Objetivos	28
4 Material e Métodos	29
4.1 Obtenção do material biológico.....	29
4.2 Caracterização fisiológica inicial.....	30
4.3 Extração e análise de carboidratos solúveis	31
4.4 Quantificação de amido.....	32
4.5 Extração de lipídios e análise dos ácidos graxos.....	35
4.6 Dessecação das sementes	37
4.7 Tolerância ao congelamento e compostos de reserva após secagem e armazenamento.....	37

4.8	Delineamento experimental e análise estatística	39
5	Resultados	40
5.1	Caracterização inicial das sementes.....	40
5.2	Respostas fisiológicas à dessecação.....	45
5.3	Alterações na composição de ácidos graxos em resposta à dessecação	50
5.4	Respostas fisiológicas das sementes armazenadas a -18 °C	53
5.5	Compostos de reserva das sementes após dessecação e armazenamento	59
6	Discussão	76
6.1	Variações fisiológicas e bioquímicas nas sementes recém coletadas das espécies estudadas.....	76
6.2	Efeitos da dessecação e do congelamento sobre a fisiologia e os compostos de reserva das sementes.....	81
6.3	Conclusões.....	90
7	Referências bibliográficas.....	92
8	Anexos	107
8.1	Fórmulas utilizadas.....	107
8.2	Solução de diazometano.....	108
8.3	Figuras.....	109

Resumo

Os compostos de reserva das sementes, além de suprirem energia para o desenvolvimento embrionário, desempenham importantes funções relacionadas à proteção celular contra estresses bióticos e abióticos, incluindo secagem e congelamento. O armazenamento de sementes de muitas espécies é otimizado quando o teor de água e a baixa temperatura podem ser conciliados; para tanto são necessários conhecimentos a respeito da tolerância à dessecação das sementes, assim como de suas respostas a condições de baixa temperatura. Diferentes compostos e processos são essenciais para que uma semente seja tolerante à dessecação, como por exemplo, o acúmulo de reservas solúveis e insolúveis, compostos protetores como oligossacarídeos e açúcares álcoois, a manutenção da integridade das membranas, a desdiferenciação celular, a redução do metabolismo, a presença de um eficiente sistema antioxidante e de proteínas específicas e a presença e operação de um sistema de reparo durante a reidratação. Considerando a importância do teor de água para a conservação de sementes de espécies arbóreas nativas e para o armazenamento sob baixas temperaturas e o envolvimento dos carboidratos não estruturais e de lipídios nesses processos, foi realizada uma análise comparativa desses compostos em sementes de *Inga vera* (ingá), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) e *Erythrina speciosa* (eritrina) submetidas a diferentes níveis de secagem e ao congelamento. Estudos anteriores demonstraram que as sementes estudadas são consideradas recalcitrantes (ingá e pitanga) ou ortodoxas (pau-brasil e eritrina), havendo entre elas gradientes de tolerância à dessecação. Os maiores teores de açúcares solúveis e lipídios foram encontrados nas sementes ortodoxas, porém as alterações encontradas nos teores destes compostos durante a dessecação e o armazenamento, por si só não explicam o comportamento das sementes. Por outro lado, a presença em grande quantidade de oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) nas sementes de eritrina, assim como os elevados teores de ciclitóis nas sementes de pau-brasil estão relacionados à tolerância dessas sementes à dessecação. Ainda, nas sementes ortodoxas foram encontradas maiores proporções de ácidos graxos insaturados, que poderiam estar relacionados à maior fluidez das membranas, evitando a desestruturação destas durante a dessecação e o

congelamento, contribuindo para a manutenção da capacidade germinativa. As altas concentrações de OSR, ciclitóis e de ácidos graxos insaturados nas sementes ortodoxas das espécies estudadas sugerem que estes compostos estejam envolvidos na tolerância à dessecação e ao congelamento.

Abstract

The reserve compounds of seeds, besides supplying energy for the development of the embryo, play an important role related to the cellular protection against biotic and abiotic stresses, drying and freezing included. The storage of orthodox seeds is optimized when low water content and low temperatures can be associated. Therefore, the knowledge concerning the tolerance to both desiccation and low temperatures is quite important for seed conservation. Different compounds and processes are involved in desiccation tolerance, for instance, the accumulation of soluble and insoluble reserves, protecting compounds such as oligosaccharides and sugar alcohols, the maintenance of the integrity of the membranes, the cellular de-differentiation, the reduction of the metabolism, an efficient antioxidant system and the presence of both specific proteins and operation of a repair system during the rehydration. Considering the importance of the water content for the conservation of seeds of tropical tree species and for the storage under low temperatures, and the involvement of non-structural carbohydrates and lipids in such processes, a comparative analysis of those compounds was carried out among seeds of *Inga vera* (inga), *Eugenia uniflora* (brazilian cherry), *Caesalpinia echinata* (brazilwood) and *Erythrina speciosa* (eritrina) before and after different drought treatments and freezing. Based on previous information, such seeds could be classified as recalcitrant (inga and brazilian cherry) or orthodox (brazilwood and eritrina), with a gradient of desiccation tolerance among them. The largest contents of soluble sugars and lipids were found in the orthodox seeds, however, the changes in these compounds during desiccation and freezing storage do not explain the behavior of the seeds by itself. On the other hand, the presence of great amounts of oligosaccharides of the raffinose series (RFOs) in the eritrina seeds, as well as, the high content of cyclitols in the brazilwood seeds are related to the desiccation tolerance of such seeds. In addition, orthodox seeds presented larger proportions of unsaturated fatty acids, which could be related to a higher fluidity of the membranes, avoiding them to disrupt during desiccation and freezing, contributing to maintaining seed germinability. The low concentrations of RFOs, cyclitols and unsaturated fatty acids showed by the seeds of inga and brazilian cherry in comparison

with the higher concentrations in brazilwood and eritrina suggest that these compounds are related to the desiccation of these seeds and their freezing tolerance.

1 Introdução

1.1 As sementes e sua conservação

A conservação *ex situ* representa uma importante ferramenta de preservação da diversidade biológica, é uma fonte de material biológico para reintrodução em ambientes degradados e deve ser considerada como reforço à conservação *in situ* (Botanic Gardens Conservation International 2001 *apud* Rocha 2004). Dentre as formas de conservação *ex situ*, a formação de bancos de sementes figura entre as principais. As sementes representam, para a maioria das espécies, não apenas a estrutura básica de propagação, mas também um reservatório genético que pode ser preservado de maneira segura, econômica e por longos períodos. Contudo, há a necessidade do conhecimento de aspectos importantes relativos ao armazenamento e à germinação das sementes, tais como tolerância à dessecação e ao congelamento, temperaturas ideais e limítrofes para germinação, necessidade ou não de luz, substratos apropriados, etc.

Segundo Barbedo *et al.* (1999) o armazenamento se torna necessário quando não é viável economicamente a multiplicação anual do estoque de sementes. Além disso, é uma forma de garantir a multiplicação e pureza genética do lote, através da manutenção em bancos de germoplasma. Desta maneira, o armazenamento pode regularizar o fornecimento e o padrão de qualidade das sementes, além de atenuar a dificuldade de propagação da produção e manutenção do fluxo de escoamento (George 1985).

Para que se obtenha um bom resultado com o armazenamento das sementes, além do conhecimento quanto à tolerância à dessecação, deve-se selecionar material inicial de boa qualidade. Muitas vezes, a qualidade fisiológica das sementes está relacionada com o momento da coleta. Quando esta é antecipada em relação ao ponto de maturidade fisiológica pode acarretar em menor vigor e quanto mais atrasada estiver em relação a esse ponto, mais avançado será o processo de deterioração. Assim, o potencial de armazenamento das sementes é proporcionalmente reduzido,

ficando as mesmas vulneráveis a condições adversas do ambiente (Carvalho & Nakagawa 1983, Bewley & Black 1985).

A principal técnica para conservação de sementes durante o armazenamento é a redução do seu metabolismo, através da remoção de água por meios artificiais e da redução da temperatura. Contudo, nem todas as sementes toleram redução da temperatura e secagem. Roberts (1973), baseado em informações relativas aos diferentes níveis de sensibilidade das sementes à desidratação, classificou-as quanto ao comportamento de armazenamento em ortodoxas (tolerantes à dessecação e ao congelamento a -18 °C) e recalcitrantes (sensíveis à dessecação e a temperaturas baixas). Esses dois tipos de sementes diferem entre si principalmente em relação ao comportamento frente à água já no início de sua formação e durante o desenvolvimento. As sementes ortodoxas apresentam três etapas distintas durante o desenvolvimento: a fase de histodiferenciação, a de maturação e, finalmente, a fase de dessecação, seguida de redução do metabolismo, levando o embrião a um estado metabolicamente inativo ou quiescente (Kermode *et al.* 1989). As sementes recalcitrantes, por sua vez, não apresentam a fase de dessecação, sendo dispersas com alto nível de água (Farrant *et al.* 1988) podendo germinar ainda na planta-mãe (viviparidade) em algumas espécies (Fonseca & Freire 2003).

A viabilidade das sementes é drasticamente reduzida quando estas são armazenadas com elevado teor de água. Contudo, é possível ampliar a longevidade natural de sementes recalcitrantes com elevado teor de água através de seu acondicionamento em embalagens herméticas, sob temperaturas baixas (Barbedo & Marcos Filho 1998). Porém, deve ser ressaltado que o armazenamento de sementes úmidas ocasiona a aceleração do processo respiratório, bem como o crescimento de microrganismos, favorecido pela umidade, ampliando conseqüentemente, a velocidade de deterioração (Toledo & Marcos Filho 1977). A germinação durante o armazenamento pode representar perdas significativas na conservação de sementes recalcitrantes quando mantidas úmidas sob temperaturas inadequadas (King & Roberts 1979).

Protocolos internacionais para armazenamento a longo prazo de sementes ortodoxas recomendam armazená-las em média com 5% de água, sendo 4% o ideal para sementes oleaginosas e 6% para sementes amiláceas, em embalagens herméticas, a -18 °C ou temperaturas inferiores (Cromarty *et al.* 1990). Dados fornecidos por Fonseca & Freire (2003) indicam que 7% das espécies vegetais de importância econômica apresentam sementes sensíveis à dessecação e não toleram o armazenamento sob baixas temperaturas.

Segundo Hong & Ellis (1996), as sementes recalcitrantes, principalmente pelo fato de serem incapazes de suportar adequadamente a dessecação abaixo de teores críticos de água, não podem ser conservadas a temperaturas próximas de zero, sendo sujeitas a danos celulares como o rompimento das membranas por expansão do volume celular. Sementes de espécies tropicais já podem apresentar injúrias visíveis em temperaturas entre 10 °C e 15 °C. Esses aspectos fisiológicos limitam os ambientes para conservação a médio e longo prazo. Em decorrência disso, a conservação das sementes recalcitrantes não pode ser efetuada pelo processo convencional de armazenamento que, fundamentalmente, requer baixos graus de umidade ou de temperatura para a adequada manutenção de qualidade (Roberts 1973, King & Roberts 1979, Chin 1988).

Sementes de algumas espécies como mamão e dendê podem ser dessecadas até 8- 10% de água, perdendo o poder germinativo quando dessecadas abaixo desses valores e armazenadas sob temperaturas baixas próximas ou abaixo de zero. Essas sementes foram classificadas como intermediárias quanto ao comportamento de armazenamento, por estarem entre os limites das categorias de comportamento ortodoxo e recalcitrante (Ellis *et al.* 1991a, 1991b, 1990).

Assim, a eficácia do processo de armazenamento de sementes requer o conhecimento da tolerância destas à dessecação, uma vez que a estratégia de conservação utilizada irá depender do comportamento apresentado pela semente (Eira 1996). Embora a redução do teor de água e da temperatura favoreçam o armazenamento, algumas espécies não toleram tais condições e desenvolvem mecanismos de reparo ou de evitação do estresse causado por esses fatores para manter a integridade celular.

1.2 Compostos de reserva de sementes

As sementes podem retomar o desenvolvimento graças às suas próprias reservas nutritivas, armazenadas principalmente na forma de carboidratos, lipídios e proteínas. Tais reservas são consumidas durante a germinação e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula capacitada a se manter de forma autotrófica. Os carboidratos e os lipídios são utilizados como as principais fontes de energia e carbono, enquanto as proteínas são fonte de nitrogênio e enxofre, indispensáveis para a síntese de novas proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e compostos do metabolismo secundário para o desenvolvimento das plântulas (Buckeridge *et al.* 2004).

Proteínas

As proteínas podem atuar como catalisadores enzimáticos, no transporte e armazenamento, como as hemoglobinas, no movimento coordenado, através dos músculos, na proteção imunitária (anticorpos), na geração e propagação de impulsos nervosos, além do controle do crescimento e da diferenciação (Stryer 1996).

Os aminoácidos são as unidades estruturais básicas das proteínas, sendo constituídos de um grupamento amina, uma carboxila, um átomo de hidrogênio e um grupamento R diferenciado (cadeia lateral), todos estes ligados a um carbono central. Os aminoácidos se ligam por ligações peptídicas, através da carboxila de um aminoácido ao grupamento amina de outro.

As proteínas das sementes têm como função armazenar principalmente nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários na plântula em crescimento (Buckeridge *et al.* 2004).

A classificação das proteínas pode ser feita segundo sua solubilidade em diferentes solventes - albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas (Osborne 1924) ou de acordo com sua função – de reserva, estrutural-metabólica e de proteção (Bewley 2001). Em leguminosas, as globulinas representam a maior parcela das proteínas de reserva e são solúveis em soluções salinas (Derbyshire *et al.* 1976).

Dentre as proteínas de proteção encontramos um grupo de proteínas acumuladas tardiamente durante o desenvolvimento das sementes - são as *LEAs* (*Late Embriogenesis Abundant*). A expressão destas proteínas está relacionada à aquisição da tolerância à dessecação em sementes, porém muitas proteínas LEA são também induzidas pelo frio, pelo estresse osmótico ou por aplicações de ácido abscísico (Welin *et al.* 1994). Essas proteínas são capazes de inibir a denaturação de macromoléculas e estabilizar estruturas intracelulares sob condições de estresse, incluindo estresse hídrico severo (Blackman *et al.* 1995, Close 1997).

Outro grupo de proteínas, conhecidas como *heat-shock* (HSPs), atuam na proteção das plantas contra estresses, na re-estabilização da conformação das proteínas e na homeostase celular (Wang *et al.* 2004). O aumento na síntese de HSPs pode levar à aquisição de termotolerância quando da exposição à temperatura subletal e, também, a outras condições de estresse, como pH, metais pesados e salinidade (Feder & Hofmann 1999).

Carboidratos

Dentre os compostos armazenados pelas plantas, destacam-se os carboidratos, devido à sua abundância e onipresença, além da multiplicidade de usos pelo homem (como fonte de carbono e energia) e pelas plantas, como suprimento para desenvolvimento de embriões e gemas de brotação.

Os carboidratos são classificados em função do número de átomos de carbono que possuem, podendo ser apresentados sob a forma de mono, di, oligo ou polissacarídeos. A sacarose, um dissacarídeo, é o açúcar mais abundante e universal das plantas, devido à sua estabilidade estrutural e solubilidade em água, que o fazem ser o principal carboidrato translocável nas plantas (Dietrich *et al.* 1988).

Oligossacarídeos como a rafinose e estaquiose são encontrados em todas as partes das plantas, principalmente nos órgãos de reserva. Estes são sintetizados a partir da adição de moléculas de galactose à molécula de sacarose, podendo ser hidrolisados pela ação da α -galactosidases (figura

1). Estes açúcares, assim como a sacarose, atuam como compostos de reserva de rápida disponibilidade para a planta, como pode ser observado no processo de germinação, onde a rafinose é um dos primeiros compostos metabolizados (Bewley & Black 1985).

O amido apresenta grande importância nutricional e industrial. Encontra-se amplamente distribuído em diversas espécies vegetais, como carboidrato de reserva, sendo abundante em grãos de cereais, raízes e tubérculos. É a fonte mais importante de carboidratos na alimentação humana, representando 80-90% de todos os polissacarídeos da dieta, e o principal responsável pelas propriedades tecnológicas que caracterizam grande parte dos produtos processados (Walter *et al.* 2005).

Estruturalmente, o amido é um homopolissacarídeo composto por cadeias de amilose e amilopectina. A amilose é formada por unidades de glucose unidas por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, originando uma cadeia linear. Já a amilopectina é formada por unidades de glucose unidas em $\alpha(1\rightarrow4)$ e $\alpha(1\rightarrow6)$, formando uma estrutura ramificada. Embora a amilose seja definida como linear, atualmente se admite que algumas de suas moléculas possuem ramificações, semelhantes à amilopectina.

Além disso, a presença de estruturas intermediárias entre amilose e amilopectina foi proposta para alguns amidos, como o de aveia (Wang & White 1994, Eliasson 1996).

Alguns órgãos de reserva podem apresentar outros polissacarídeos, como é o caso dos frutanos. Nas dicotiledôneas os frutanos predominantes são do tipo inulina, composto de cerca de 35 unidades de frutose que termina por um resíduo de sacarose. Dentre as monocotiledôneas, os frutanos, junto com o amido e os glucomananos são os principais compostos de reserva em bulbos, tubérculos e rizomas de plantas da família das liliáceas e nas bases caulinares de gramíneas (Poaceae). Plantas perenes podem acumular frutanos durante o frio e sob estresse hídrico, razão pela qual têm sido considerados como protetores contra estresses abióticos (Hinch *et al.* 2007).

Segundo Spollen & Nelson (1994), os carboidratos mais eficientes na diminuição do potencial osmótico são as hexoses e a sacarose. Desta forma, a partir da hidrólise de frutanos

grandes quantidades de frutose e sacarose são disponibilizadas rapidamente, podendo assim atuar como reguladores osmóticos e garantir a sobrevivência e até mesmo o crescimento da planta sob deficiência hídrica.

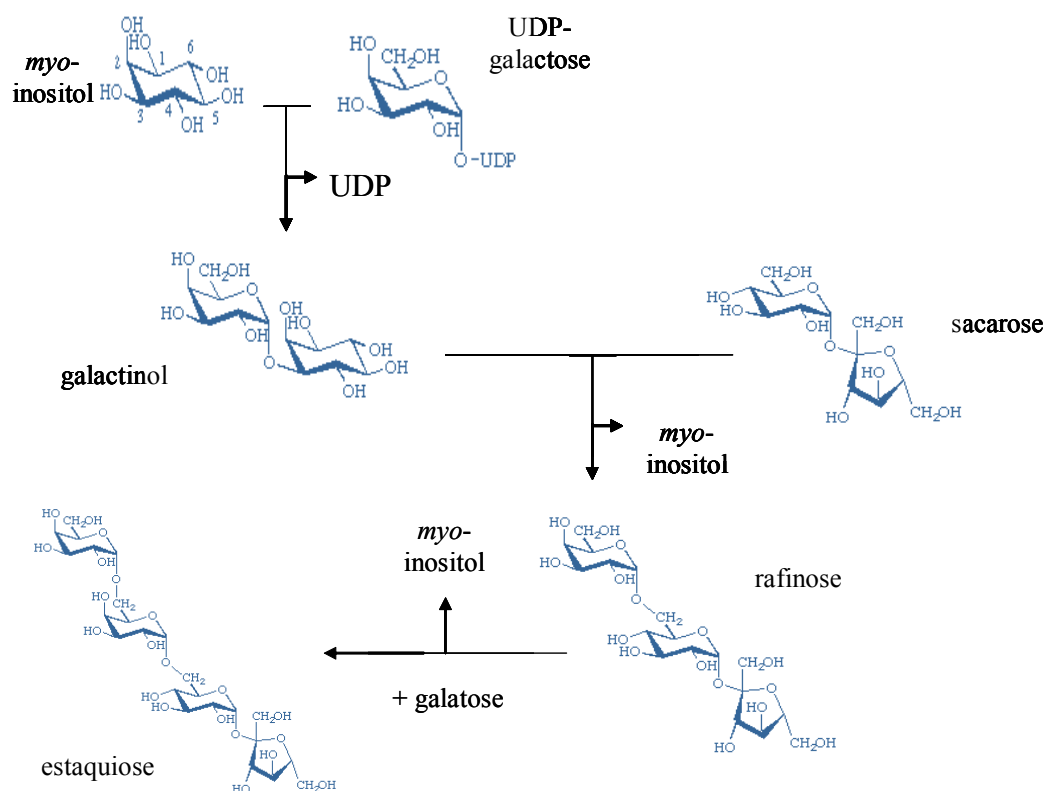


Figura 1. Esquema de formação de oligossacarídeos da série da rafinose. Baseado em Peterbauer & Richter (2001).

Outros açúcares também têm sido relacionados à proteção contra estresses ambientais, como os oligossacarídeos da série da rafinose (OSR), evitando a cristalização da sacarose, auxiliando na formação de um estado vítreo, importante processo na tolerância à dessecação em plantas (Caffrey *et al.* 1988). Os ciclitolis galactosilados são açúcares álcoois acumulados em algumas sementes, também foram relacionados à estabilidade de estruturas celulares, de membranas e na formação do estado vítreo (Peterbauer & Richter 2001).

Os carboidratos, além de suas funções estruturais, de reserva e proteção nas plantas são amplamente empregados pelo homem, como mencionado anteriormente. Cotilédones de algumas espécies de lupino (*Lupinus* sp. - Fabaceae) apresentam grande quantidade de galactanos, que são utilizados na produção de gomas industriais. Xilitol, obtido dos xilanos de madeira é utilizado como adoçante por diabéticos ou como inibidor da cárie dentária (Dietrich *et al.* 1988).

Além disso, as proporções de determinados açúcares podem ser utilizadas para agrupar classes taxonômicas. Buckeridge *et al.* (1995) relacionaram a razão entre manose e galactose nos galactomananos presentes nas sementes de leguminosas (Leguminosae) com a posição taxonômica entre 31 espécies, indicando que a subfamília Caesalpinioideae apresenta menor quantidade galactose em suas moléculas do que as subfamílias Mimosoideae e Faboideae.

Lipídios

Os lipídios são moléculas orgânicas, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, devido à sua estrutura polar, hidrofílica, ligada a uma região apolar, hidrofóbica de cadeia hidrocarbonada (figura 2A). Tal estrutura permite associações entre as moléculas lipídicas através de ligações covalentes, quando em meio aquoso, o que propicia a formação de micelas e bicamadas (figuras 2B e 2C, respectivamente), constituintes das membranas celulares (Rosseti 2001).

Os lipídios ocorrem nos vegetais, com mais frequência nas sementes, frutos, folhas e, em menor proporção, em raízes, caules e flores, além de serem uma importante forma de armazenar carbono em muitas sementes de angiospermas (Voelker & Kinney 2001).

A unidade básica dos lipídios é um ácido graxo formado por um grupo carboxila e uma cauda hidrocarbônica apolar, que confere à maioria dos lipídios a sua natureza oleosa e gordurosa. Os ácidos graxos diferem entre si pelo tamanho da cadeia (4 a 24 carbonos), presença, número e posição das insaturações (Simpson & Ogorzaly 1995). O grau de insaturação é determinado pelo número de duplas ligações. Os ácidos graxos constituídos de ligações simples são chamados

saturados, os que possuem uma só ligação dupla são os monoinsaturados, enquanto os com mais de duas ligações duplas são os poliinsaturados.

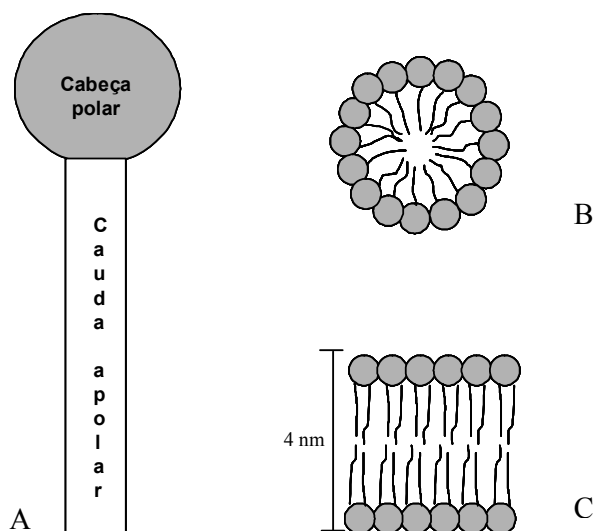


Figura 2. Esquema representativo de um lipídio (A), micela (B) e bicamada lipídica (C), baseado em Stryer (1996).

Os ácidos graxos formam triglicerídeos, comumente denominados de gorduras, constituídos de triésteres de ácido graxo mais um glicerol (figura 3), os quais representam a forma armazenável dos lipídios no citoplasma de células, podendo servir como fonte de energia mais eficiente energeticamente do que os carboidratos (Rosseti 2001).

A estrutura dos ácidos graxos determina as propriedades físicas dos lipídios. Quanto maior o comprimento da cadeia carbônica, maior o ponto de fusão e quanto maior o grau de insaturação, menor o ponto de fusão (Voelker & Kinney 2001).

Embora a composição de ácidos graxos varie de espécie para espécie, os ácidos láurico, palmítico, esteárico, oléico, linoléico e linolênico geralmente ocorrem em maior quantidade (Schery 1972), podendo compor até 60% da massa de algumas sementes oleaginosas (Buckeridge *et al.*

2004). Na tabela 1, encontram-se os ácidos graxos mais comuns, com seus respectivos códigos e nomenclatura.

Em procariontes, a fluidez das membranas é regulada pela variação do número de saturações e pelo comprimento das cadeias de ácidos graxos, sendo que o estado rígido é favorecido pela presença de radicais de ácidos graxos saturados, de forma que as cadeias hidrocarbonadas retas interagem favoravelmente umas com as outras (Stryer 1996).

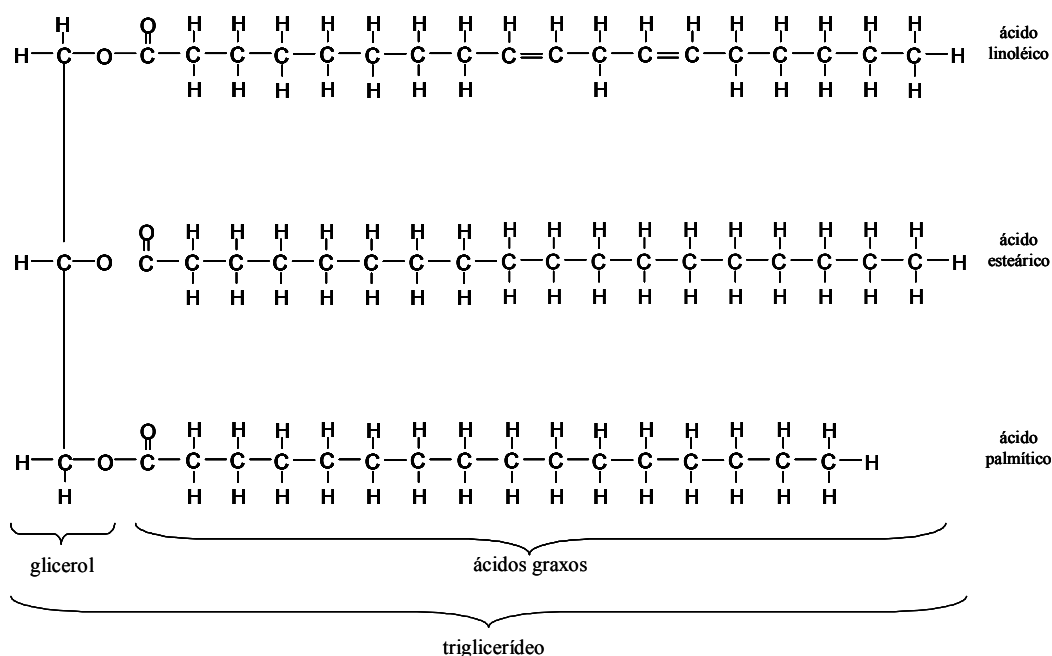


Figura 3. Triglicerídeo formado a partir da esterificação entre três moléculas de ácidos graxos e uma de glicerol, baseado em Stryer (1996).

Se por um lado a presença de ácidos graxos insaturados nas membranas aumenta sua fluidez e por conseqüência, sua proteção à seca, por outro lado, os ácidos graxos com muitas insaturações são mais susceptíveis à degradação e os produtos resultantes de sua peroxidação inativam proteínas ligadas à membrana, alterando-lhe a permeabilidade (Smith & Berjak 1995).

1.3 Relação entre compostos de reserva e tolerância à dessecação e ao congelamento

Diferentes processos e compostos são essenciais para que uma semente seja tolerante à dessecação, como por exemplo, 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 específicas e outros compostos protetores como oligossacarídeos, açúcares álcoois e presença e operação de um sistema de reparo durante a reidratação (Pammenter & Berjak 1999).

A retirada de água dos tecidos vegetais pode ocasionar o desarranjo das membranas, devido ao acúmulo de substâncias citoplasmáticas anfifílicas, promovendo o empacotamento das membranas (Caffrey *et al.* 1988). Por outro lado, a tolerância à dessecação é favorecida por meio da repressão controlada do metabolismo, prevenindo danos oxidativos, assim como pelo acúmulo de protetores moleculares, tais como os açúcares e proteínas, além da transição para o estado vítreo (Hoekstra *et al.* 2001).

Variações na composição lipídica das membranas são um dos primeiros sintomas das injúrias causadas por desidratação, dependendo, entre outros fatores, da intensidade e do tempo de desidratação (Navari-Izzo *et al.* 1989, 1995). Quartacci *et al.* (1997) observaram redução no teor de lipídios em folhas de plantas de *Sporobolus stapfianus* (Gramineae) após serem submetidas à desidratação, assim como ligeira redução do teor de ácidos graxos insaturados, passando de 80% dos ácidos graxos totais, nas folhas frescas, para 72% após serem secas a valores inferiores a 4% de água.

Durante a desidratação também pode ocorrer a formação de espécies reativas de oxigênio, que são potencialmente tóxicas. Porém, a presença de moléculas antioxidantes e sequestradoras de radicais livres, tais como ácido ascórbico e glutatona, contidas em altas concentrações em algumas

sementes, podem neutralizar essas substâncias evitando danos às membranas (Franzen & Haas 1991).

A desidratação lenta ainda pode promover o aumento na quantidade de carboidratos solúveis totais, em sementes imaturas de *Caesalpinia echinata* (Leduc 2007) e em folhas e raízes de *Solanum lycocarpum* (Chaves-Filho & Stacciarini-Seraphin 2001).

A presença de açúcares específicos, como sacarose e rafinose, em tecidos tolerantes à dessecação promove a hidratação das membranas fosfolipídicas, mantendo a conformação destas e, em situação de seca extrema, tais açúcares podem substituir a água nas membranas, mantendo a integridade e funcionalidade das mesmas. Nos tecidos intolerantes à dessecação com baixa concentração desses açúcares não há a proteção das membranas e estas acabam por se desestruturar e levar as sementes à perda da viabilidade (Hoekstra *et al.* 2001).

A presença de frutanos (polímeros de frutose) em plantas tem sido relacionada a estresses hídricos e térmicos, sendo observados aumentos expressivos nos seus teores e variações em sua composição em plantas transgênicas de tabaco e *Lolium* sp., em resposta ao congelamento (Hisano *et al.* 2004, Konstantinova *et al.* 2002) e à seca (Pilon-Smits *et al.* 1995). Em espécies do cerrado, os frutanos atuam possivelmente aumentando a tolerância à dessecação das plantas à baixa disponibilidade de água durante o inverno, contribuindo para sua sobrevivência nessas condições (Carvalho & Figueiredo-Ribeiro 2001, Dias-Tagliacozzo *et al.* 2004, Garcia 2006). Esses compostos atuam na regulação osmótica da célula, através da variação do grau de polimerização de suas moléculas (Pontis & Del Campillo 1985, Van den Ende *et al.* 2002) e também previnem danos à membrana, mantendo a integridade e o funcionamento celular (Demel *et al.* 1998, Vereyken *et al.* 2001).

Tabela 1. Principais ácidos graxos encontrados em plantas (Linscheer & Vergoesen 1994).

Nome comum	Código (*)	Nomenclatura
Ácidos graxos saturados de cadeia curta		
Butírico	C4:0	Butanóico
Ácidos graxos saturados de cadeia média		
Capróico	C6:0	Hexanóico
Caprílico	C8:0	Octanóico
Cáprico	C10:0	Decanóico
Láurico	C12:0	Dodecanóico
Ácidos graxos de cadeia longa		
Mirístico	C14:0	Tetradecanóico
Palmítico	C16:0	Hexadecanóico
Estearico	C18:0	Octadecanóico
Palmitoléico	C16:1, n-7 cis	9-hexadecaenóico
Oléico	C18:1, n-9 cis	9-octadecaenóico
Elaídico	C18:1, n-9 trans	9-octadecaenóico
Linoléico	C18:2, n-6, 9 cis	9,12-octadecadienóico
α -linolênico	C18:3, n-3, 6, 9 cis	9,12,15-octadecadienóico
γ -linolênico	C18:3, n-6, 9, 12 cis	6,9,12-octadecatrienóico
Columbínico	C18:3, n-6 cis, 9 cis, 13 trans	5,9,12-octadecatrienóico
Ácidos graxos de cadeia muito longa		
Araquídico	C20:0	Eixosanóico
Behênico	C22:0	Docosanóico
Eicosenóico	C20:1, n-9 cis	11-eicosenóico
Erúcico	C22:1, n-9 cis	13-docosaenóico
Brassídico	C22:1, n-9 trans	13-docosaenóico
Cetoléico	C22:1, n-11 cis	11-docosaenóico
Nervônico	C24:1, n-9 cis	15-tetracosanóico
Dihomo- γ -linolênico	C20:3, n-6, 9, 12 cis	8,11,14-eicosatrienóico
Araquidônico	C20:4, n-6, 9, 12, 15 cis	5,8,11,14-eicosatetraenóico
Timnodônico	C20:5, n-3, 6, 9, 12, 15 cis	5,8,11,14,17-eicosapentaenóico
Clupanodônico	C22:5, n-3, 6, 9, 12, 15 cis	7,10,13,16,19-docosapentaenóico
Docosahexaenóico	C22:6, n-3, 6, 9, 12, 15, 18 cis	4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico

(*) Os dois primeiros dígitos referem-se ao número de átomos de carbono; o último, ao número de insaturações.

Temperaturas baixas atuam na estabilidade e na atividade enzimática, favorecendo o metabolismo de carboidratos, em especial da sacarose e de outros oligossacarídeos supostamente envolvidos na manutenção da integridade das membranas celulares, como os açúcares da série da rafinose e os ciclitóis (Peterbauer & Richter 2001). Esses compostos podem preservar a viabilidade da semente em situações de estresse, como ultra-secagem e congelamento, impedindo a cristalização da sacarose, o que resultaria na desestruturação das membranas e conseqüente inviabilidade (Caffrey *et al.* 1988, Horbowicz *et al.* 1998). Além de atuar na proteção das membranas, esses carboidratos contribuem para a formação do estado vítreo das sementes durante a desidratação. Nesse estado de alta viscosidade, há redução acentuada, até quase paralisação das reações químicas, conservando assim intactas as estruturas celulares. A formação do estado vítreo é considerada como um processo importante para aquisição de tolerância à dessecação (Williams & Leopold 1989; Bruni & Leopold 1991). Segundo Koster (1991) a presença de oligossacarídeos em uma solução de sacarose intensifica a formação do estado vítreo e previne a cristalização.

Stushnoff *et al.* (1998) constataram um acúmulo de rafinose em plantas de *Viola wittrockiana* (Violaceae) durante aclimação ao frio e Klotke *et al.* (2004) encontraram maior teor de oligossacarídeos da série da rafinose (OSR) em mutantes de *Arabidopsis* tolerantes ao congelamento. Assim, os OSR além de seu envolvimento na dessecação, são eficientes crioprotetores *in vivo* (Carpenter & Crowe 1988, Pennycooke & Towill 2000), sendo os responsáveis pela aquisição da tolerância ao congelamento em algumas espécies (Bachmann *et al.* 1994, Taji *et al.* 2002).

Kuo *et al.* (1988) sugeriram que o aumento de açúcares totais durante o armazenamento em câmara fria é resultado da hidrólise de polissacarídeos de reserva, como o amido, devido à atividade metabólica, contribuindo para a conservação da viabilidade das sementes. Dionne *et al.* (2001), estudando diferentes ecotipos de *Poa annua* (Poaceae), também encontraram aumento de monossacarídeos após exposição das plantas ao congelamento.

Embora a presença de rafinose possa prevenir a cristalização da sacarose durante a secagem (Caffrey *et al.* 1988), as sementes de *C. echinata* contêm grande quantidade de sacarose, mas baixíssimas concentrações de rafinose e estaquiase, indicando que outros compostos com funções similares, tais como os ciclitóis galactosilados, possam estar presentes nessas sementes (Garcia *et al.* 2006), aumentando sua tolerância à dessecação.

Além dos carboidratos, a presença de reservas lipídicas em sementes também está envolvida com a sobrevivência destas após a exposição a temperaturas muito baixas (Dussert *et al.* 2001). Estudos realizados com espécies do gênero *Inga* indicaram baixo conteúdo de lipídios em sementes intolerantes ao congelamento e à dessecação (Pritchard *et al.* 1995). Por outro lado, Vertucci (1989) mostrou que sementes ortodoxas de soja, tolerantes à dessecação e ao congelamento (Hume & Jackson 1981), continham aproximadamente 20% de lipídeos.

Uemura *et al.* (2006) estudando várias espécies herbáceas e arbóreas encontraram incremento na proporção de fosfolipídios após a aclimação ao frio, como consequência do aumento na proporção de duas das maiores classes de fosfolipídios presentes nas membranas plasmáticas, as moléculas insaturadas de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, juntamente com o decréscimo na proporção de cerebrosídeos. Estudos de criopreservação de sementes de *Coffea* sp. (Dussert *et al.* 2001) e de *Citrus* sp. (Hor *et al.* 2005) indicaram uma relação negativa entre o teor de água não congelada e o teor de lipídios das sementes. Da mesma forma, Pritchard (1995) formulou uma equação em que foram relacionados o teor limite de água congelada e o teor de lipídios para 13 diferentes espécies, sendo esta equação similar à encontrada por Hor *et al.* (2005) para quatro espécies de *Citrus*.

A diminuição dos ácidos graxos também foi positivamente correlacionada à queda da germinabilidade (Harman & Mattick 1976). O aumento da permeabilidade das membranas celulares e a perda de ácidos graxos constituem indícios do processo de degradação peroxidativa que pode ser responsável pela perda da viabilidade das sementes (Flood & Sinclair 1981).

1.4 Espécies estudadas

Inga vera Willd.

Inga vera Willd (ingá) pertence à família Leguminosae, subfamília Mimosoideae, que apresenta cerca de 40 gêneros e 350-400 espécies distribuídas na América tropical e subtropical (Joly 1993).

Dentre as espécies que contêm sementes altamente recalcitrantes incluem-se várias espécies do gênero *Inga*, freqüentemente utilizadas em programas de recuperação de áreas degradadas e reflorestamento, controlando a erosão do solo. Essas espécies são comumente encontradas em margens inundadas de rios e nascentes e apresentam um sistema radicular pivotante, com numerosas raízes secundárias. São utilizadas também para sombreamento em cultivos de café e cacau, na fabricação de caixotaria e como lenha (Bilia & Barbedo 1997, Bilia *et al.* 1998). As sementes do gênero *Inga* apresentam curta longevidade, sendo dispersas com teor de água próximo a 60% (Castro & Krug 1951, Bacchi 1961).



Figura 4. Aspectos gerais de *Inga vera* (ingá). A – indivíduo adulto, B – flor, C – frutos maduros, D – fruto aberto, E – embriões.

No Brasil, *I. vera* ocorre desde o Rio Grande do Sul até Minas Gerais, principalmente na floresta pluvial atlântica (Lorenzi 1992, Figliolia & Kageyama 1994). É uma planta semidecídua, pioneira, característica de planícies aluviais e beira de rios, preferencialmente em solos úmidos e até brejosos ou terrenos periodicamente inundáveis. Quando adulta, pode atingir de 5 a 28 metros de altura, com tronco de 70 centímetros de diâmetro (Durigan *et al.* 1997).

Seu fruto é um legume tomentoso (recoberto de pêlos), comprido, reto ou curvo, de cor rubro-bronzeada, com margens espessadas características, de 10-20 cm de comprimento e 2,5-3 cm de largura (Carvalho 1994). As sementes aparecem em número de 2 a 13 por fruto (Sanchotene 1989) e são revestidas pela sarcotesta (Oliveira & Beltrati 1993), muitas vezes bastante adocicada (Bilia & Barbedo 1997). É apreciada por macacos, que colaboram para a dispersão das sementes, além da dispersão pela água. Em condições naturais, as sementes de ingá não ultrapassam 15 dias de armazenamento após a dispersão (Carvalho 1994, Bilia & Barbedo 1997). Contudo, apresentam elevada porcentagem de germinação, ocorrendo freqüentemente viviparidade em algumas delas (Oliveira & Beltrati 1992, Pritchard *et al.* 1995, Bilia & Barbedo 1997).

O armazenamento das sementes de *I. vera* é limitado, não suportando armazenamento a temperatura ambiente e, quando mantidas com 50% de água a 10 °C, permanecem viáveis por até 60 dias (Bilia *et al.* 1998). Devido ao fato dessas sementes não tolerarem a dessecação, foram realizados estudos empregando-se soluções de ácido abscísico (ABA), polietilenoglicol (PEG) e mesmo água pura, visando prolongar o período de armazenamento dessas sementes (Barbedo & Cícero 2000, Andréo *et al.* 2006, Bonjovani 2007). Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se soluções de PEG, numa concentração de -2,4 MPa a 10 °C, sendo obtidos 80% de germinação após 90 dias de armazenamento (Andréo *et al.* 2006). Porém, as sementes embebidas em PEG toleraram temperatura abaixo de zero (-2 °C), que embora não tenha acarretado melhoria significativa na capacidade de armazenamento, abre perspectivas de ampliação do tempo de armazenamento de sementes recalcitrantes (Bonjovani 2007).

***Eugenia uniflora* L.**

Eugenia uniflora L. (pitanga) pertence à família Myrtaceae, sendo esta composta por mais de 100 gêneros e 3600 espécies, na maioria arbustos e árvores, verdes durante todo o ano. A família é bem representada na Austrália, no Leste Asiático e nas Américas (Auricchio & Bacchi 2003).

A pitangueira é uma árvore frutífera, medindo de 6-12 m de altura, empregada no paisagismo ou cultivada em pomares domésticos. A madeira é empregada na confecção de cabos de ferramentas e outros instrumentos agrícolas. Floresce entre agosto e novembro e os frutos amadurecem entre outubro e janeiro (Lorenzi 1992).

A espécie apresenta frutos que são apreciados tanto pelo homem como pela fauna silvestre, sendo esses utilizados no preparo de geléias, doces, refrescos, sorvetes e licores. Seu plantio é recomendado para recomposição de áreas degradadas, uma vez que a dispersão de suas sementes ocorre por zoosporia (Budke *et al.* 2005), sendo os pássaros os visitantes mais frequentes (Pizo 2002) além de ser de fácil propagação por sementes (Scalon *et al.* 2001). Durante o processo de maturação a cor do fruto evolui de verde a alaranjado atingindo coloração vermelha intensa ou roxa ao apresentar-se completamente maduro (Bezerra *et al.* 2002).

Devido ao aumento do consumo dos frutos de pitanga para comercialização de sua polpa congelada com fins nutricionais e terapêuticos foram intensificados estudos sobre a composição química de frutos *in natura* e armazenados. Lima *et al.* (2002) destacaram o potencial da espécie como fonte de compostos antioxidantes pela presença de flavonóides, antocianinas e carotenóides. O conteúdo de vitamina C também é alto e Mélo *et al.* (2000) não encontraram alteração nos teores em frutos de pitanga congelados.



Figura 5. Aspectos gerais de *Eugenia uniflora* L. (pitanga). A – indivíduo adulto, B – tronco, C – flores, D- frutos em diferentes estádios de maturação, E – sementes maduras.

As sementes de *Eugenia* sp. são reportadas como de curta longevidade (Gentil & Ferreira 1999), porém Barbedo *et al.* (1998) e Maluf *et al.* (2003) mostraram que sementes de *E. involucrata* podem ser armazenadas por cerca de seis meses quando o teor de água é reduzido de 57% até valores próximos a 53%. Dados obtidos por Delgado (2006) indicam um gradiente de tolerância à dessecação entre as sementes de diferentes espécies de *Eugenia*, sendo que, para *E. uniflora* (pitanga), as sementes mantêm a capacidade germinativa até desidratação próxima a 20% de água.

Santana (2007) estudou a influência do grau de maturação e do teor de água sobre o armazenamento em câmara fria de sementes de *E. uniflora* e outras duas espécies de *Eugenia* e mostrou que as sementes de pitanga são melhor conservadas quando secas de forma leve ou moderada (40-42% de água), sendo as sementes maduras (de frutos avermelhados) mais tolerantes a dessecação.

***Caesalpinia echinata* Lam.**

Caesalpinia echinata Lam. (pau-brasil, Caesalpinioideae, Leguminosae) é a espécie que deu nome ao nosso país e foi explorada desde o início da colonização, para extração de corante de tom avermelhado a partir do cerne de sua madeira. Ainda nos dias atuais é utilizada para a confecção de arcos de instrumentos de corda e outros fins. Além de sua importância na área musical, as sementes da espécie vem sendo estudadas para fins medicinais, mostrando-se fonte promissora de produtos com ação pró-inflamatória em ratos (Alencar *et al.* 2002), auxiliando na redução de edemas em coelhos, etc. (Cruz-Silva *et al.* 2004).

A espécie tem ocorrência natural desde o Estado do Rio Grande do Norte até o Rio de Janeiro, numa extensa faixa de 3.000 km. 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 *et al.* 2006).

Devido ao uso intensivo no passado, a espécie encontra-se na lista daquelas em risco de extinção (Ibama 1992), sendo recentemente incluída na CITES (*Convention for the International Trade of Endangered Species*) que regulamenta sua comercialização, com fins de conservação. Rocha (2004) relata a identificação errônea de pau-brasil no litoral brasileiro, sendo confundida com outras espécies que apresentam acúleos, espinhos ou mesmo pela cor avermelhada do tronco, como é o caso de *Eugenia leitonii*. Este autor lista diversas unidades de conservação *in situ* e *ex situ* da espécie no Brasil, incluindo um grande número de bosques no Estado de São Paulo e salienta que a utilização da espécie em projetos de ornamentação é uma das formas mais simples e prática para conservação da espécie.



Figura 6. Aspectos gerais de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). A – indivíduos adultos, B – tronco com acúleos, C – inflorescência, D – frutos imaturos, E – sementes maduras.

A maturação de frutos e sementes de pau-brasil em bosques implantados no Estado de São Paulo foi estudada por Borges (2007), que determinou a qualidade fisiológica das sementes desta espécie, definindo a fase de maturidade entre 60-62 dias após antese.

Sementes de pau-brasil são consideradas ortodoxas, embora percam a capacidade germinativa em 30 dias quando armazenadas à temperatura ambiente. Porém, quando desidratadas a valores próximos a 10% de água e armazenadas a 8 °C, a viabilidade dessas sementes pode ser prolongada por até 18 meses (Barbedo *et al.* 2002). Essas sementes toleram congelamento e quando foram armazenadas com o mesmo teor de água em temperaturas sub-zero, mantiveram alta porcentagem de desenvolvimento de plântulas normais após 24 meses de armazenamento (Hellmann *et al.* 2006). Leduc (2007) conseguiu induzir a tolerância à dessecação em sementes imaturas de pau-brasil, o que possibilita a antecipação do período de colheita dessas sementes, assim como o total aproveitamento de uma safra, sendo possível o aproveitamento de sementes em diferentes fases de desenvolvimento, o que favorece a conservação da espécie.

***Erythrina speciosa* Andr.**

Erythrina speciosa Andrews também pertence à família Leguminosae (subfamília Faboideae) e ocorre na floresta pluvial atlântica, principalmente do Espírito Santo até Santa Catarina. A árvore, conhecida popularmente como mulungu-do-litoral e eritrina-candelabro, é bastante ornamental quando florida, sendo comumente usada em paisagismo. Muitos exemplares da espécie podem ser observados no *Jardim de Lineu*, no Jardim Botânico de São Paulo.



Figura 7. Aspectos gerais de *Erythrina speciosa* Andr. (eritrina). A – indivíduo adulto, B – inflorescência, C – frutos imaturos, D – frutos maduros, E – sementes maduras.

As flores de *Erythrina* são vistosas, de cor vermelha ou alaranjadas, o que as torna alvo da polinização por pássaros, mas não possuem odor (Raven 1974 *apud* Etcheverry 2005). As espécies do gênero *Erythrina* são utilizadas na medicina popular no tratamento de diversas enfermidades, tais como asma, dor estomacal e disenteria, na forma de folhas, cascas e raízes (Faria *et al.* 2007).

Suas sementes apresentam impermeabilidade à água, característica bastante comum entre as espécies da subfamília Fabaceae (Perez 2004). A germinação é epígea, a emissão da radícula ocorre próxima ao hilo e os cotilédones são clorofilados.

Analisando espécies de caatinga, Mayworm *et al.* (1998), encontraram 11% de lipídios em sementes de *Erythrina velutina* e grande proporção de ácidos graxos insaturados.

Nkang (2002) verificou que sementes de *Erythrina caffra* apresentam alta germinabilidade (100%) e possuem ao final da maturação, cerca de 8% de água e 5,3% de amido e 10,4% de carboidratos solúveis, sendo estas consideradas ortodoxas.

2 Justificativa

Uma vez que o armazenamento de sementes de faz necessário, seja por motivos econômicos, ecológicos ou genéticos, é imprescindível o conhecimento das condições ideais para a conservação destas, assim como os eventuais danos causados por técnicas usualmente empregadas para estes fins.

Para tanto, o conhecimento das principais alterações bioquímicas das sementes, sejam elas ocasionadas pela secagem, pela temperatura ou pelo tempo de armazenamento pode ser útil para a seleção de melhores lotes para o armazenamento, além de contribuir para o monitoramento das sementes durante os processos envolvidos em sua conservação.

Além disso, o estudo comparativo de espécies com diferentes níveis de tolerância à dessecação pode servir como base para o entendimento dos processos envolvidos na conservação de diversas espécies arbóreas, auxiliando na manutenção da biodiversidade vegetal.

3 Objetivos

- ✓ Analisar a tolerância à dessecação das sementes de *Inga vera* (ingá), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) e *Erythrina speciosa* (eritrina);
- ✓ Analisar os compostos majoritários dessas sementes antes e após a exposição a diferentes níveis de secagem, incluindo valores abaixo do teor de água letal, para as sementes consideradas recalcitrantes;
- ✓ Acompanhar as alterações nos principais compostos de reserva dessas sementes após o armazenamento em temperatura sub-zero, com vistas a contribuir para uma melhor compreensão da participação desses compostos nos processos de sensibilidade à dessecação e ao congelamento.

4 Material e Métodos

4.1 Obtenção do material biológico

Frutos de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) foram coletados diretamente das árvores e aguardou-se abertura destes para obtenção de sementes recém-dispersas. Os frutos foram coletados em dezembro/2006, de aproximadamente 20 árvores existentes em bosque implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (SP, 22°15-16'S – 47°8-12'W), sendo armazenadas em sacos de papel Kraft em câmara fria (2 °C) por dois dias, até início dos experimentos.

Frutos maduros de *Inga vera* Willd. (ingá) foram colhidos em janeiro/2005 e janeiro/2006 de cerca de 20 matrizes plantadas em área pertencente ao Centro de Exposições Imigrantes (23°38'S – 46°32'W) e levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica, onde foram beneficiados manualmente, através da retirada das sementes e remoção da sarcotesta que as revestia (Bilia & Barbedo 1997). O material foi armazenado em sacos plásticos perfurados, em câmara fria (2 °C) por seis dias, período este necessário para que todo o lote coletado fosse beneficiado.

Frutos maduros de *Eugenia uniflora* L. (pitanga) foram coletados em outubro/2005 e outubro/2006 em cerca de 5 exemplares existentes no Jardim Botânico de São Paulo (23°38'S – 46°37'W) e beneficiados no Laboratório de Sementes e Melhoramento Vegetal do Instituto de Botânica. Após a remoção das sementes, estas foram lavadas em água corrente, secas superficialmente com auxílio de papel filtro e armazenadas em sacos plásticos perfurados, em câmara fria (2 °C) por 21 dias, até o início dos experimentos.

Frutos maduros de *Erythrina speciosa* Andr. foram coletados de aproximadamente 10 árvores, no Instituto de Botânica de São Paulo em novembro/2004. Estes foram beneficiados manualmente e armazenados à temperatura ambiente de laboratório em sacos plásticos. Foram

também coletados frutos no Parque Central de Santo André (SP) (23°40'S – 46°31'W) em novembro/2007, sendo beneficiados e utilizados nos experimentos sem armazenamento prévio.

Exsicatas das plantas matrizes foram comparadas com exemplares existentes no Herbário “Maria Eneida P. K. Fidalgo” do Instituto de Botânica de São Paulo, sendo identificados inequivocamente.

Na figura 8 estão indicados os locais onde se encontram as plantas matrizes nas quais foram coletados os frutos e sementes das quatro espécies estudadas.

4.2 Caracterização fisiológica inicial

Uma amostra de sementes de cada espécie foi avaliada quanto à germinabilidade, sendo realizadas sementeiras em rolos de papel saturado com água (Wielewiczki *et al.* 2006, Mello & Barbedo 2007), com quatro repetições de 15 sementes. Os testes de germinação foram realizados em germinadores Marconi modelo MA400 com circulação interna de água (que mantém elevada umidade relativa do ar), a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas. As avaliações foram feitas semanalmente para *Eugenia uniflora* e a cada três dias para *Inga vera*, *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*, registrando-se os números de sementes que emitiram raiz primária (maior que 5 mm) e de plântulas com desenvolvimento normal da parte aérea e radicular. Foram calculados o índice de velocidade de germinação (Maguire 1962) e a variação do tempo médio de germinação (Labouriau 1983).

O teor de água das sementes foi determinado segundo procedimento recomendado pelas regras internacionais (ISTA 1985), em estufa com circulação interna de ar, por 17 horas a 103 °C. A matéria seca das sementes foi determinada utilizando-se os valores de peso seco das amostras usadas para determinação do teor de água. O potencial hídrico das sementes foi medido por equipamento Decagon WP4 (USA) com base na temperatura do ponto de orvalho (Decagon Devices 2001). Ambos os testes foram realizados com quatro repetições de cinco sementes cada.

4.3 Extração e análise de carboidratos solúveis

A extração dos carboidratos solúveis das sementes foi realizada segundo metodologia adaptada por Garcia *et al.* (2006), retirando-se manualmente o tegumento, sendo em seguida separados os cotilédones e o eixo embrionário, no caso das sementes de *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*. Devido a características próprias das sementes de cada espécie, as análises de *Eugenia uniflora* foram realizadas a partir de sementes inteiras, enquanto para *Inga vera*, utilizaram-se os apenas embriões, após remoção do endocarpo carnoso manualmente. A seguir todas as amostras foram pesadas em balança analítica para determinação da massa fresca.

Às amostras de eixo embrionário (3 repetições de 5) e cotilédones (3 repetições de 10) foram adicionados 1 e 10 mL de etanol 80%, respectivamente, e fervidas em banho-maria a 80°C por 5 min para inativação das enzimas.

Após este procedimento, o material foi macerado em almofariz, com auxílio de pistilo, até homogeneização completa e levado ao banho-maria (80°C) por 15 min. Em seguida as amostras foram centrifugadas (International Centrifuge - USA) a 2000 rpm, no caso dos cotilédones e a 8000 rpm (centrífuga MSE Micro Centaur – UK), no caso dos eixos embrionários, em temperatura ambiente por 10 min.

Ao término da centrifugação, retirou-se o sobrenadante, armazenando-o em frascos apropriados, devidamente identificados. Ao resíduo, foram adicionados 1 e 10 mL de etanol 80% nas amostras de eixo e cotilédone, respectivamente, repetindo-se os procedimentos mais duas vezes, para que fossem extraídos todos os açúcares solúveis (figura 9).

Os resíduos da extração etanólica dos cotilédones e dos eixos embrionários foram liofilizados por 48 horas, pesados e reservados para quantificação de amido.

Os sobrenadantes das amostras tiveram seu volume igualado e foram, então, utilizados para a quantificação dos açúcares através do método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), sendo utilizada uma solução de glucose ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) para a construção da curva padrão. A leitura da

absorbância foi realizada em espectrofotômetro, a 490 nm, faixa esta utilizada para a análise de hexoses. A quantificação de açúcares totais foi realizada utilizando-se a equação da reta obtida a partir da curva padrão construída.

Após a quantificação dos açúcares totais pelo método do fenol-sulfúrico, separaram-se amostras num volume calculado para obter 5 mg de açúcar de cada amostra e estas foram então deionizadas em colunas contendo resinas de troca catiônica e aniônica Dowex nas formas Cl^- e H^+ , sendo eluídas com 10 volumes de água deionizada. O material recolhido teve seu pH neutralizado, com o auxílio de hidróxido de amônio. Os eluatos foram concentrados até secagem completa e retomados em 2 mL de água deionizada, sendo novamente quantificados e um volume contendo 400 μg de açúcar, de cada repetição, foi analisado através de cromatografia líquida de alta resolução em cromatógrafo DIONEX, modelo ICS3000, em coluna CarboPac PA-1. O sistema de eluição foi o isocrático com 250 mM de hidróxido de sódio (eluente B) em água (eluente A), com fluxo de 0,2 mL min^{-1} , por meio da seguinte programação: 0-2 min, 7% eluente B; 2,1-25 min, 4% eluente B; 25,1-30 min, 80% eluente B; 30,1-35 min, 7% eluente B (Garcia *et al.* 2006).

Um fluxograma das extrações e análises de carboidratos solúveis está mostrado na figura 9.

4.4 Quantificação de amido

Após liofilização, foram pesados 10 mg do resíduo da extração de carboidratos solúveis, para quantificação de amido, por meio de método enzimático, realizando-se digestões com α -amilase e amiloglucosidase (Amaral *et al.* 2007). A quantificação dos produtos da hidrólise enzimática foi realizada utilizando-se as enzimas glucose-oxidase e peroxidase (GOD-POD) e os reagentes 4-aminoantipirina e fenol em microplaca de Elisa para a leitura a 490 nm. A curva padrão foi construída a partir de quantidades crescentes de glucose na concentração de 1 mg mL^{-1} .

Um fluxograma da quantificação de amido nas amostras está representado na figura 10.

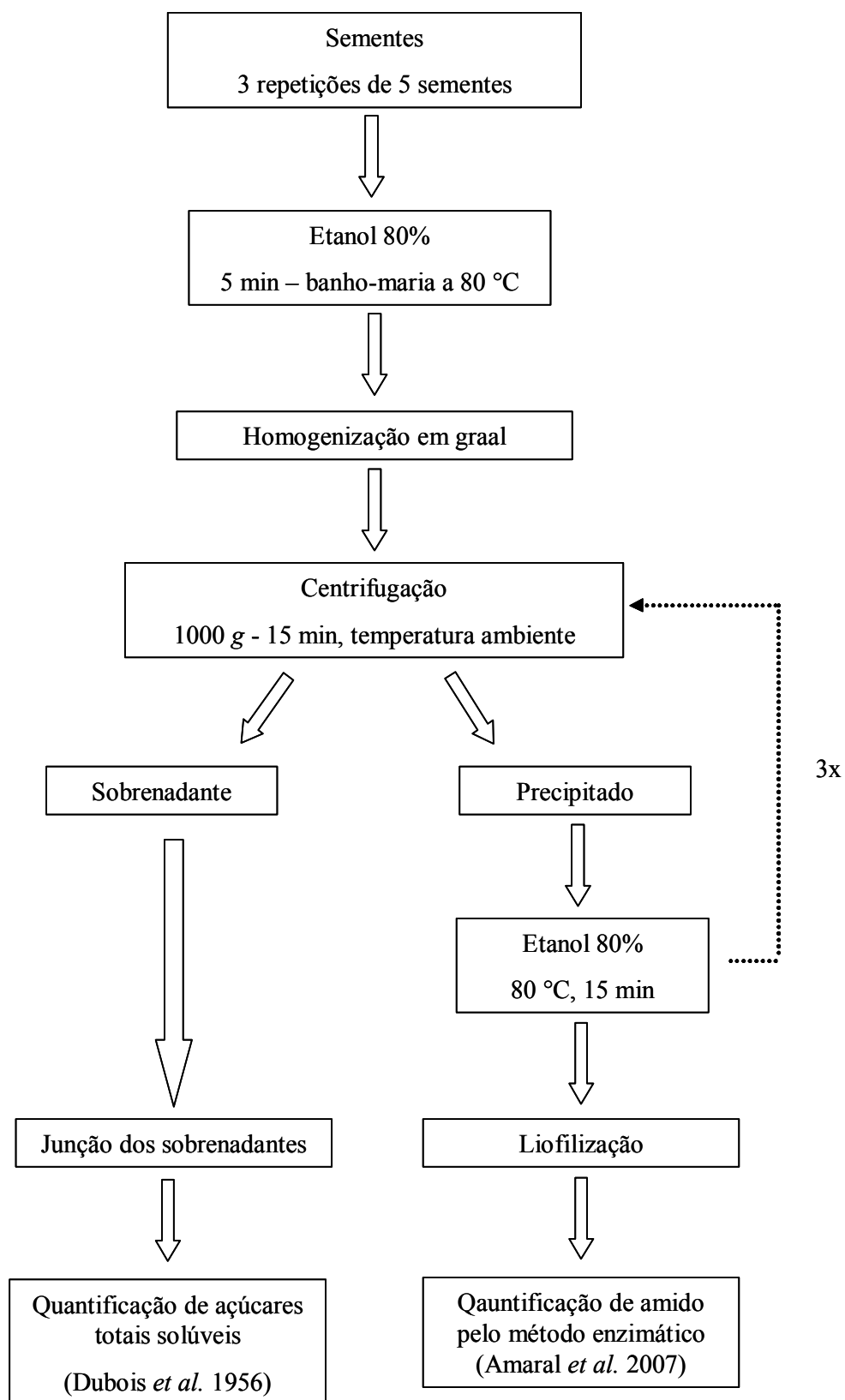


Figura 9. Fluxograma de extração de carboidratos solúveis de sementes de *Inga vera*, *Eugenia uniflora*, *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*.

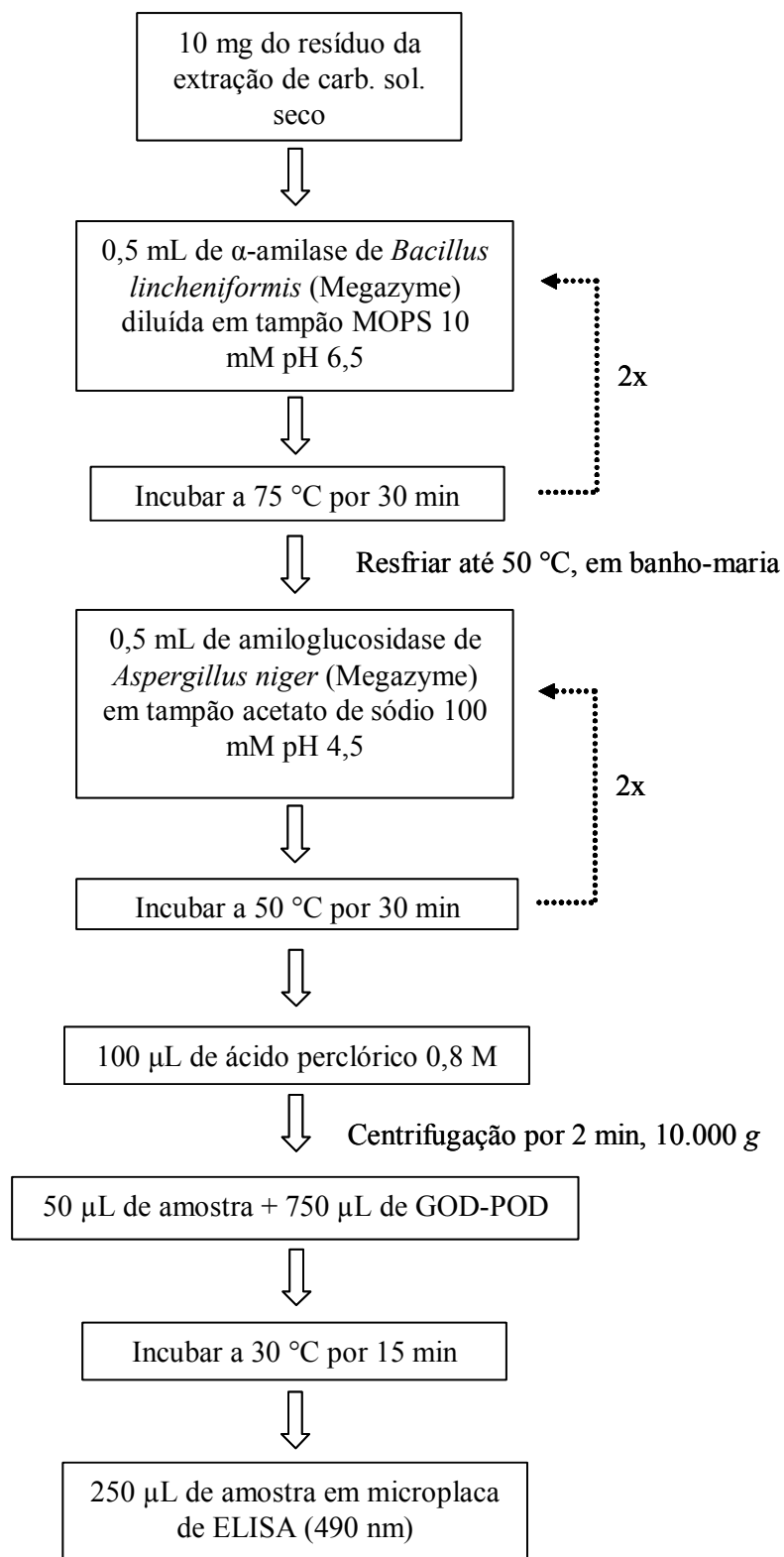


Figura 10. Fluxograma da quantificação de amido de sementes de *Caesalpinia echinata*, *Eugenia uniflora*, *Inga vera* e *Erythrina speciosa*.

4.5 Extração de lipídios e análise dos ácidos graxos

Sementes de cada tratamento foram submetidas à secagem forçada a 60 °C durante 30 min e depois mantidas em dessecador contendo sílica gel, até atingirem peso constante. A seguir foram pulverizadas em moinho de bola por, aproximadamente, cinco min.

Amostras de 2 g de sementes pulverizadas foram envoltas em papel de filtro, previamente lavado com clorofórmio, e tratadas com *n*-hexano em extrator Soxhlet por quatro horas. No caso das amostras de eixos embrionários de *C. echinata*, a quantidade de material utilizada para a extração variou conforme a disponibilidade.

O solvente foi eliminado em evaporador rotatório e o resíduo transferido para um frasco, lavando-se o balão com pequeno volume de *n*-hexano. As amostras foram secas sob fluxo contínuo de nitrogênio e mantidas em dessecador contendo sílica gel até peso constante, quando foram calculados os rendimentos das extrações. Um esquema da extração de lipídios das amostras está representado na figura 11.

As amostras foram então saponificadas com 5 mL de solução metanólica de KOH 10%, aquecidas em banho-maria a 90 °C durante 45 min e acidificadas com solução de HCl 10%. Adicionaram-se 5 mL de clorofórmio às amostras, para a extração dos ácidos graxos, agitando-se levemente com auxílio de um bastão de vidro. Com auxílio de uma pipeta Pasteur, a fração clorofórmica foi transferida para frascos âmbar, sendo então secas sob corrente de nitrogênio. As amostras foram ressuspensas em éter e um pequeno volume da amostra foi transferido para “vial”, onde adicionou-se solução de diazometano para metilação. Após uma pausa de 5 min, a amostra foi seca, novamente, sob corrente de nitrogênio.

Uma alíquota de 1 µL da amostra metilada ressuspensa em éter foi utilizada para a análise dos ésteres metílicos dos ácidos graxos em cromatógrafo a gás (Agilent 6890 series), acoplado a espectrômetro de massas Agilent 5973 Network. Utilizou-se impacto eletrônico a 70 eV, hélio como gás de arraste com fluxo constante de 1 cm³ min⁻¹, coluna capilar de sílica fundida HP5 (30 m

X 0,35 mm), temperatura inicial de 160 °C durante 3 min, elevando-se 5 °C min⁻¹ até 175 °C, seguido de elevação de 1,5 °C min⁻¹ até 195 °C e finalmente, elevação de 10 °C min⁻¹ até 300 °C, permanecendo por 5 min. A identificação dos ácidos graxos foi realizada por comparação dos espectros de massas obtidos com os da Biblioteca Wiley275-pc (HP).

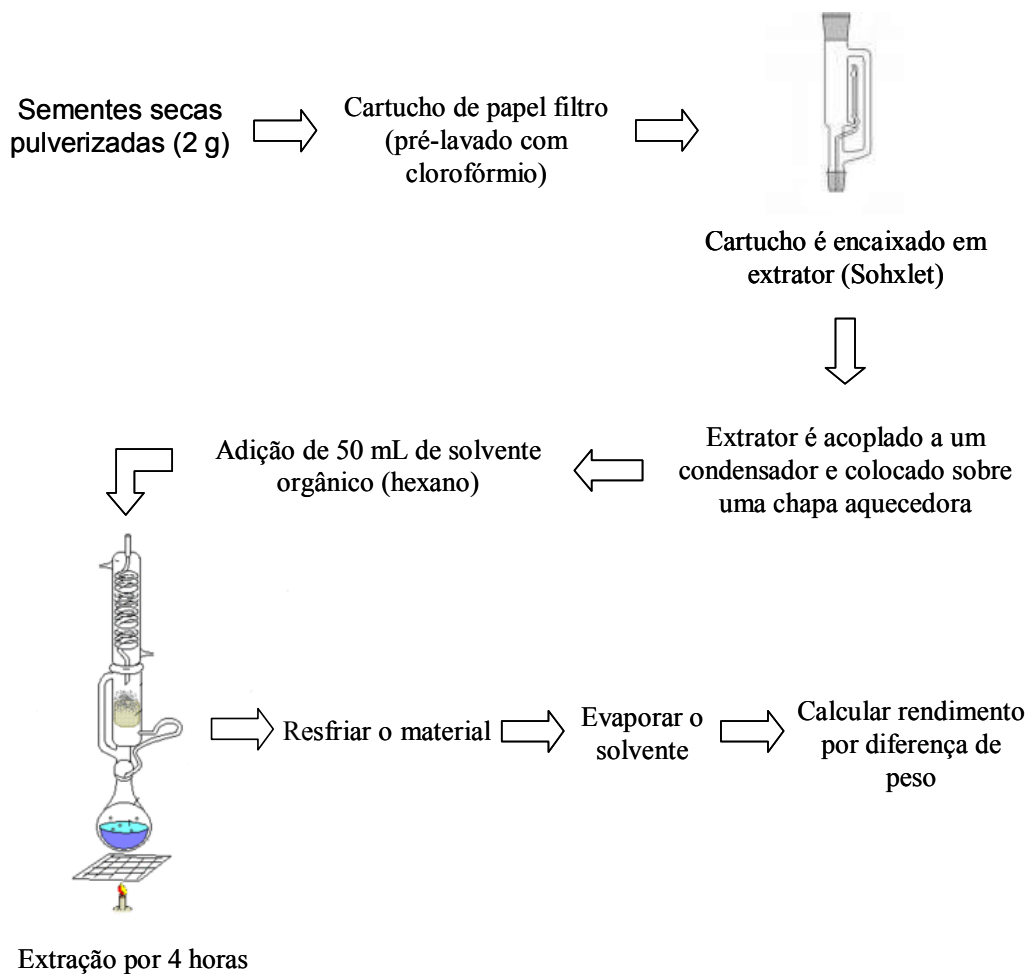


Figura 11. Esquema da extração de lipídios de sementes de *Inga vera*, *Eugenia uniflora*, *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*.

4.6 Dessecação das sementes

Sementes de *I. vera*, *E. uniflora* e *C. echinata* foram submetidas à secagem artificial em estufa (40 °C) com circulação forçada de ar, até atingirem diferentes níveis de hidratação. Foram escolhidos diferentes valores de teor de água na faixa de tolerância à dessecação para cada espécie, conforme previamente estabelecido (Bonjovani 2007, Delgado 2006, Barbedo *et al.* 2002, respectivamente).

De posse do teor de água inicial do lote de sementes e calculado o valor de matéria seca deste, por diferença de peso, monitorou-se a perda de peso de amostras, estimando o peso que estas deveriam atingir para se obter o teor de água desejado. Uma vez que a matéria seca não é alterada, a diferença de peso no decorrer da secagem é resultado da perda de água das amostras. O peso estimado para atingir determinado teor de água pode ser averiguado através da fórmula de Hong & Ellis (1996).

As sementes foram acondicionadas em sacos de papel lacrados para evitar a perda de sementes, o que resultaria na redução do peso da amostra, podendo indicar uma falsa secagem. Os sacos foram colocados em prateleiras para permitir a circulação do ar dentro da estufa, sendo realizada de hora em hora a homogeneização das sementes. Após atingirem os pesos calculados, foram realizados novos testes de germinação, teor de água, análise do potencial hídrico e análises bioquímicas.

4.7 Tolerância ao congelamento e compostos de reserva após secagem e armazenamento

Sementes recém coletadas e secas de *Inga vera*, *Eugenia uniflora* e *Caesalpinia echinata*, e sementes armazenadas em temperatura ambiente de *Erythrina speciosa* foram acondicionadas em



Figura 8. Mapa de localização dos locais de coleta. (A) Centro de Exposição Imigrantes e Instituto de Botânica de São Paulo; (B) Parque Central de Santo André (SP); (C) Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu (SP). As setas indicam os locais de coleta.

sacos de papel Kraft e armazenadas em câmaras reguladas para -18 °C. Após 30 dias foram realizados novamente os testes de germinação, teor de água, potencial hídrico e análises bioquímicas.

Antes de realizar a semeadura, as sementes foram deixadas à temperatura ambiente por três dias, para aclimação, conforme metodologia adotada por Hellmann *et al.* (2006).

4.8 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, sendo instaladas quatro repetições para os testes de germinação, índice de velocidade de germinação, variância do tempo médio, teor de água e potencial hídrico e três repetições para os testes bioquímicos (carboidratos solúveis, amido e lipídios). Os experimentos foram realizados em esquema fatorial 2X5 ou 2X4, sendo dois períodos de armazenamento e cinco ou quatro teores de água, dependendo da espécie. Os resultados foram submetidos à análise de variância empregando-se o teste F ao nível de 5%. Quando necessário, os dados foram transformados para $\sqrt{x+k}$, onde $k=0,5$.

5 Resultados

5.1 Caracterização inicial das sementes

A caracterização fisiológica inicial das sementes recém colhidas das quatro espécies estudadas encontra-se na tabela 2. Como se pode observar, a capacidade germinativa dessas sementes variou de 90 a 100%, indicando a excelente qualidade dos lotes. *C. echinata* foi a espécie que apresentou a menor porcentagem de germinação (90%). Também foram registradas as porcentagens de plântulas normais desenvolvidas e as sementes de *I. vera* foram as que apresentaram os maiores valores (98%), seguidas por *E. speciosa*, e *C. echinata* e *E. uniflora*, respectivamente com 90% e 85%. A tabela 2 mostra, ainda, que mais de 50% do peso fresco das sementes recém dispersas de *I. vera* e *E. uniflora* era constituído de água, enquanto que sementes de *C. echinata* e *E. speciosa* apresentaram valores bem menores, 16,2 e 12,5%, respectivamente.

Tabela 2. Germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%), teor de água (%), massa seca (g MS semente⁻¹) e potencial hídrico (-MPa) de sementes recém colhidas das espécies arbóreas *Inga vera*, *Eugenia uniflora*, *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*.

Parâmetros fisiológicos	Espécie estudada			
	<i>Inga vera</i>	<i>Eugenia uniflora</i>	<i>Caesalpinia echinata</i>	<i>Erythrina speciosa</i>
Germinação (%)	100	97	90	100
Desenvolvimento de plântulas (%)	98	85	85	90
Teor de água (%)	54,2	55,1	16,2	12,5
Massa seca (g MS semente ⁻¹)	0,30	0,18	0,24	0,27
Potencial hídrico (-MPa)	1,15	1,20	37,20	54,99

Sementes de *I. vera*, *C. echinata* e *E. speciosa* apresentaram maior teor de massa seca por semente (superior a 0,3 g MS semente⁻¹), quando comparado às sementes de *E. uniflora* (0,176 g MS semente⁻¹).

O potencial hídrico das sementes de *I. vera* e *E. uniflora* foi similar (valores próximos a -1,2 MPa), enquanto para as sementes de *C. echinata* e *E. speciosa* foram encontrados valores de 30 a 50 vezes menores (-37,2 e -54,99 MPa, respectivamente).

As análises dos principais compostos de reserva de sementes recém dispersas de cada espécie estudada estão apresentadas na tabela 3 e na figura 17 (anexos). Para melhor visualização e comparação dos resultados das diferentes espécies, os dados bioquímicos foram organizados em figuras, que são mostradas nos anexos.

Tabela 3. Teores (% MS) de carboidratos solúveis, amido e lipídios totais de sementes recém dispersas de *Inga vera*, *Eugenia uniflora*, *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*.

Compostos de reserva (%)	<i>Inga vera</i>	<i>Eugenia uniflora</i>	<i>C. echinata</i>		<i>E. speciosa</i>	
			Eixo	Cot	Eixo	Cot
Carboidratos solúveis	6,1	7,0	14,1	14,8	28,0	13,2
Amido	51,5	64,1	2,3	42,0	1,5	0,8
Lipídios	0,3	0,9	7,0	17,6	12,3	23,3

Cot = cotilédones

Os carboidratos solúveis das sementes de *I. vera* e *E. uniflora* representaram cerca de 6 e 7%, respectivamente, da matéria seca dessas sementes. As análises bioquímicas das sementes de *C. echinata* e *E. speciosa* foram realizadas em separado, uma vez que é possível isolar com precisão os eixos embrionários dos cotilédones. Observa-se na tabela 3 que nas sementes de *C. echinata* os dois tecidos analisados apresentaram valores próximos de carboidratos solúveis (cerca de 14% MS). O mesmo não ocorreu para as sementes de *E. speciosa*, uma vez que a quantidade de açúcares nos eixos embrionários (28%) foi o dobro da encontrada nos cotilédones (13,2%).

A análise enzimática de amido (tabela 3, figura 17) indicou que as sementes de *I. vera*, *E. uniflora* e os cotilédones de *C. echinata* contêm grande quantidade deste polissacarídeo, que representa de 42 a 64% do peso seco destas sementes. Já nos eixos embrionários, o amido representa menos de 2,3% do peso seco em *C. echinata* e em *E. speciosa*, nesta última com valores ainda mais baixos também nos cotilédones.

Os teores de lipídios totais (tabela 3, figura 17) obtidos para as sementes de *I. vera* e *E. uniflora* foram inferiores a 1% do peso seco das amostras, sendo que *I. vera* foi a espécie que apresentou menor rendimento (0,3%). As sementes de *C. echinata* e *E. speciosa*, por outro lado, apresentaram maior teor de lipídios, com rendimentos de 17,6 e 23,3%, respectivamente, nos cotilédones. Nos eixos embrionários também foram observadas maiores quantidades de lipídios totais nas amostras de *E. speciosa* (12,3%) e de *C. echinata* (7,0%).

Os cromatogramas dos açúcares individuais das amostras de carboidratos solúveis analisadas por HPAEC/PAD podem ser observados na figura 12. De maneira geral, as quatro espécies possuem os mesmos açúcares, mas variaram expressivamente quanto à concentração relativa nas diferentes espécies estudadas. Os principais compostos foram ciclitóis, glucose, frutose, sacarose e os oligossacarídeos rafinose e estaquiase, estes últimos presentes em quantidades apreciáveis nas amostras das sementes de *E. speciosa*.

Na tabela 4 estão expressas as porcentagens relativas de cada açúcar presente nas amostras analisadas.

Tabela 4. Porcentagem dos principais açúcares neutros presentes em sementes recém coletadas de *Inga vera*, *Eugenia uniflora*, *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*.

Açúcares (%)	<i>Inga vera</i>	<i>Eugenia uniflora</i>	<i>C. echinata</i>		<i>E. speciosa</i>	
			Eixo	Cot	Eixo	Cot
Ciclitóis	9,8	5,1	23,0	13,8	3,4	2,6
Glucose	2,2	8,5	1,7	1,4	0,2	0,2
Frutose	2,6	14,6	0,9	0,8	0,2	0,3
Sacarose	84,9	71,6	68,2	81,3	37,3	40,3
Rafinose	0,9	0,7	3,9	1,4	45,9	45,0
Estaquiase	0,0	0,2	2,8	1,2	13,0	11,7

Os dados obtidos por HPAEC/PAD são médias de três repetições contendo cada uma 400 µg de equivalente de glucose.

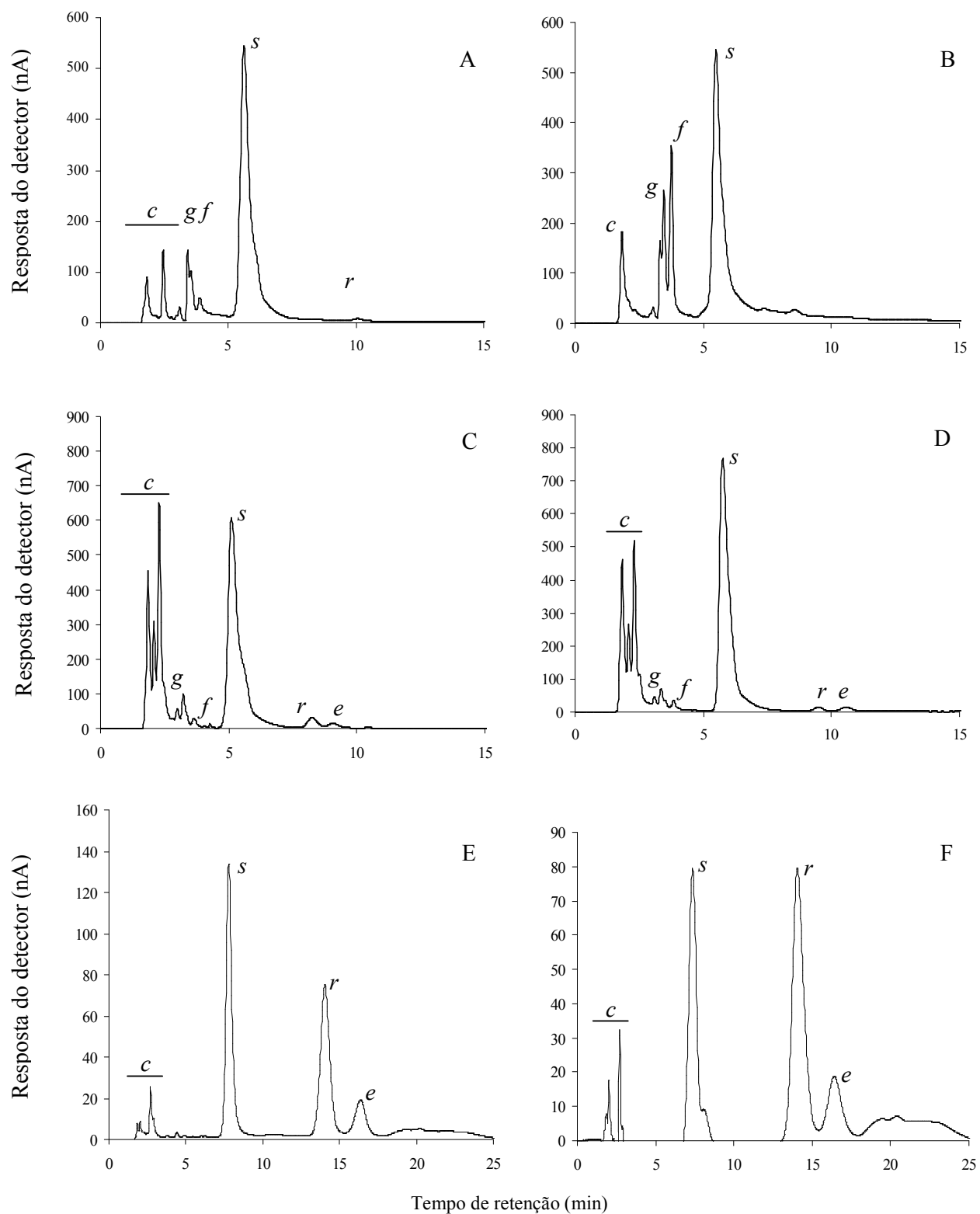


Figura 12. Análise por HPAEC/PAD dos carboidratos solúveis neutros de sementes recém coletadas de *Inga vera* (A), *Eugenia uniflora* (B), *Caesalpinia echinata* – eixo embrionário (C) e cotilédone (D) e *Erythrina speciosa* – eixo embrionário (E) e cotilédone (F), onde: *c* – ciclitóis, *g* – glucose, *f* – frutose, *s* – sacarose, *r* – rafinose e *e* – estaquiose.

Nas sementes de *I. vera*, *E. uniflora* e *C. echinata* (tanto nos eixos embrionários como nos cotilédones) o açúcar encontrado em maior quantidade foi a sacarose. Os monossacarídeos glucose e frutose estavam presentes em pequena porcentagem em todas as amostras, exceto nas sementes de pitanga (*E. uniflora*), representando mais de 23% dos seus açúcares solúveis.

As sementes de ingá e pitanga apresentaram as menores porcentagens de rafinose e estaquiose (de 0 a 0,9%), enquanto as sementes de pau-brasil apresentaram de 1 a cerca de 4% desses oligossacarídeos, tanto nos eixos embrionários quanto nos cotilédones, embora maiores as quantidades desses açúcares tenham sido observadas nos eixos embrionários.

Contudo, nas sementes de *E. speciosa*, a quantidade de sacarose encontrada foi relativamente bem menor, quando comparada à rafinose. Como pode ser observado na tabela 4 e na figura 23, este oligossacarídeo é o principal açúcar solúvel das sementes de *E. speciosa*, constituindo cerca de 45%, tanto nos eixos embrionários como nos cotilédones. A estaquiose, embora em menor quantidade do que a rafinose, também representa mais de 11% dos açúcares das sementes de eritrina, valores bem superiores aos encontrados para os monossacarídeos.

As análises dos ácidos graxos obtidos a partir dos lipídios totais extraídos das sementes de ingá, pitanga, pau-brasil (eixo embrionário e cotilédones) e de cotilédones de eritrina estão mostradas na tabela 5. As análises dos ácidos graxos dos eixos embrionários de *E. speciosa* não foram representadas, por não ter sido possível identificar os ésteres de ácidos graxos das amostras.

Os dados da tabela 5 e da figura 25 indicam pequena diversidade de ácidos graxos nas sementes de ingá, sendo observados nesta espécie somente ácidos graxos saturados (figura 24). Nas sementes de *I. vera* e *E. uniflora* foi encontrado em maior proporção o ácido palmítico, que representou mais de 50% dos ácidos graxos detectados nas amostras analisadas.

Os ácidos graxos majoritários de sementes de *C. echinata* e de *E. speciosa* foram o ácido linoléico (~45%) e o oléico (~52%), respectivamente.

Tabela 5. Composição de ácidos graxos (%) analisados por CG/MS de sementes recém coletadas de *Inga vera*, *Eugenia uniflora*, *Caesalpinia echinata* (eixo embrionário e cotilédone – cot) e *Erythrina speciosa* (cotilédone - cot).

Ácido graxo (%)	<i>Inga vera</i>	<i>Eugenia uniflora</i>	<i>C. echinata</i>		<i>E. speciosa</i>	
			Eixo	Cot	Eixo	Cot
Palmítico (C16:0)	66,6	57,4	21,5	13,0	*	19,0
Linoléico (C18:2)	0,0	2,2	41,7	45,4	*	18,6
Oléico (C18:1)	0,0	17,2	11,7	7,9	*	51,8
Esteárico (C18:0)	26,7	10,1	15,6	25,7	*	6,5
Araquídico (C20:0)	1,4	7,9	4,1	4,1	*	1,8
Eicosenóico (C20:1)	0,0	0,0	0,0	0,1	*	0,7
Behênico (C22:0)	1,0	2,9	4,0	3,4	*	1,5
Lignocérico (C24:0)	4,5	2,3	1,3	0,4	*	0,2

5.2 Respostas fisiológicas à dessecação

Na figura 13 está representado o teor de água (%) em função do tempo de secagem das sementes de *I. vera*, *E. uniflora* e *C. echinata*, podendo ser observado que as sementes de *I. vera* e *E. uniflora* demoraram, em média, 10 horas para reduzir 10% do teor de água inicial. A figura 13 mostra também que as sementes de *E. uniflora* apresentaram velocidade de secagem irregular, sendo esta mais rápida entre os teores de água de 48 e 26%, necessitando apenas cinco horas para reduzir o teor de água nesta faixa. Já para atingir cerca de 12% de água, foram necessárias mais 20 horas em estufa a 40 °C. Sementes de *Inga vera*, por outro lado, apresentaram velocidade de secagem mais regular, sendo o menor teor de água (20%) alcançado em 28 horas de secagem em estufa.

As sementes de pau-brasil permaneceram, no máximo, 11 horas em estufa, tempo necessário para reduzir 50% do seu teor de água.

Para as sementes de pitanga e ingá foram obtidos experimentalmente quatro diferentes níveis de teor de água em cada ano de coleta (2005 e 2006), sendo avaliadas as porcentagens de germinação e plântulas desenvolvidas, além dos cálculos de velocidade de germinação, teor de água e potencial hídrico. Os dados obtidos podem ser observados nas tabelas 6 e 7.

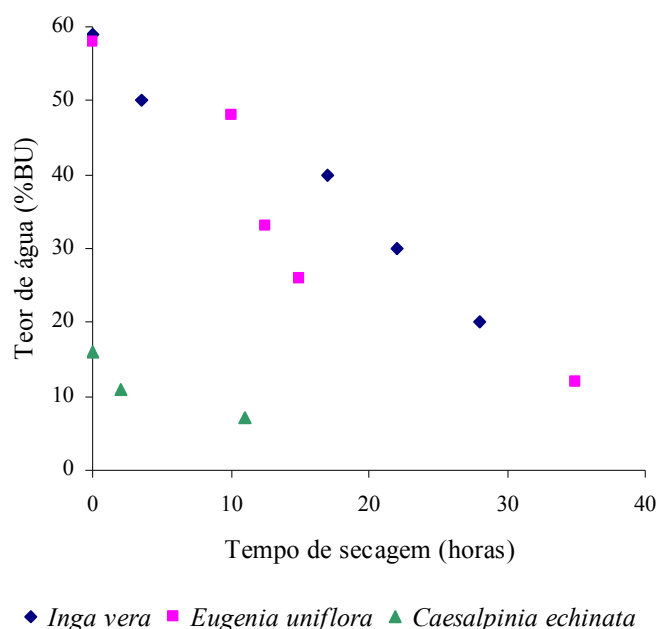


Figura 13. Teor de água (%) de sementes de *Caesalpinia echinata*, *Eugenia uniflora* e *Inga vera* em função do tempo de permanência em estufa (40 °C) com circulação forçada de ar.

Como pode ser observado na tabela 6, as sementes recém coletadas de ingá apresentaram diferença entre os teores de água nos dois anos de análise, sendo a diferença de 5% entre os lotes estatisticamente significativa. Porém, a germinação e o desenvolvimento de plântulas não foram diferentes, sendo cerca de 100% nos dois lotes.

Os teores de água de sementes de *I. vera* recém coletadas e das secas artificialmente variaram de 59 a 20% e o potencial hídrico de -1,15 a -40,82 MPa.

As sementes recém coletadas em 2006 (B) apesar de apresentarem menor teor de água do que as de 2005 (A), tiveram maior IVG. A variância do tempo médio de germinação zero,

apresentada pelas sementes de 2006 significa que, em média, todas as sementes utilizadas no teste de germinação iniciaram a germinação juntas.

A redução do teor de água interferiu no desenvolvimento das plântulas, sendo esta redução sutilmente observada a partir do teor de água de 50%. A germinação das sementes de *Inga vera* diminuiu gradualmente a partir de 40% de água, perdendo a capacidade germinativa quando o teor de água atingiu 20-21%.

Tabela 6. Porcentagem de germinação e desenvolvimento de plântulas, índice de velocidade de germinação (IVG), variância do tempo médio de germinação (S_2T_m), teor de água (%) e potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Inga vera* recém coletadas em 2005 (A) e 2006 (B) sem secagem e após serem submetidas a diferentes níveis de secagem em estufa (secagens 1-4).

Nível de secagem	Germinação (%)	Plântulas normais (%)	IVG	S_2T_m	Teor de água (%)	Ψ_{H_2O} (-MPa)
S/ secagem A	100 a	98 a	1,1 b	11,55 ab	59 a	2,09 de
S/ secagem B	100 a	100 a	2,14 a	0 b	54 b	1,15 e
Secagem A1	100 a	94 ab	0,88 c	18,55 ab	50 b	3,49 de
Secagem B1	97 a	93 b	0,92 c	24,13 ab	45 c	5,7 de
Secagem A2	58 b	45 c	0,44 e	4,9 ab	40 d	8,32 cde
Secagem B2	87 a	85 b	0,63 d	47,61 ab	38 d	9,42 bcd
Secagem A3	22 c	12 de	0,13 f	81,67 a	30 e	16,82 b
Secagem B3	23 c	20 d	0,12 f	33,08 ab	29 e	14,81 bc
Secagem A4	4 d	3,5 3e	0,02 f	0 b	21 f	40,82 a
Secagem B4	0 d	0 e	0 f	0 b	20 f	33,24 a
c.v. (%)	9,7	9,3	8,87	144,1	4,88	23,84

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas. (c.v. = coeficiente de variação).

Os resultados obtidos para sementes de *E. uniflora* coletadas em 2005 (A) e em 2006 (B) estão mostrados na tabela 7. Embora as sementes recém colhidas em 2006 tenham apresentado menor teor de água do que as de 2005, tanto a porcentagem de germinação (100 e 97%), quanto o desenvolvimento de plântulas (95 e 85%) não apresentaram diferenças significativas. Da mesma forma a variância do tempo de médio de germinação foi similar sendo que, as sementes recém

coletadas necessitaram de 15-20 dias para atingir a porcentagem máxima de germinação. Apenas o índice de velocidade de germinação (IVG) diferiu entre os anos de coleta, sendo que em 2005 houve, em média, maior número de sementes germinadas por tempo de semeadura.

À medida em que as sementes de pitanga foram secas, a capacidade germinativa e o desenvolvimento de plântulas foram afetados negativamente. A redução do teor de água destas sementes a partir de 45% ocasionou a diminuição do desenvolvimento de plântulas normais, enquanto a germinação foi reduzida apenas quando o teor de água das sementes foi cerca de 38%. Porém, se observarmos o comportamento das sementes com 45% de água (secagem B1), estas já demonstram redução de qualidade, o que é evidenciado pela redução do índice de velocidade de germinação e do aumento da variância do tempo médio de germinação.

Entre os teores de água de 28 e 26%, as sementes de *E. uniflora* apresentaram drástica redução da capacidade germinativa (14 e 28%, respectivamente) e do desenvolvimento de plântulas (12 e 23%, respectivamente), além das reduções do índice de velocidade de germinação e da variância do tempo médio de germinação.

Não houve germinação quando as sementes de pitanga tiveram o teor de água reduzido para 19,6 e 12,5%.

Para as sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) foram avaliados três níveis de dessecação, a partir de amostras coletadas em 2006 (tabela 8).

Como pode ser observado na tabela 8 as sementes recém dispersas de *C. echinata* apresentaram 16% de água e 100% de germinação. A secagem artificial reduziu o teor de água até 5,4%, porém, ao contrário dos resultados obtidos com a secagem de sementes de *I. vera* e *E. uniflora*, as sementes de pau-brasil, mesmo com o teor de água de 5,4% mantiveram elevada porcentagem de germinação (92%) e desenvolvimento de plântulas (84%) e IVG (5,4). Só a variância do tempo médio de germinação foi alterada com a redução do teor de água, porém, esta não diferiu estatisticamente, como pode ser observado mais adiante.

Tabela 7. Porcentagem de germinação e desenvolvimento de plântulas, índice de velocidade de germinação (IVG), variância do tempo médio de germinação (S₂Tm), teor de água (%) e potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Eugenia uniflora* recém coletadas em 2005 (A) e 2006 (B) sem secagem e após serem submetidas a diferentes níveis de secagem em estufa (secagens 1-4).

Nível de secagem	Germinação (%)	Plântulas normais (%)	IVG	S ₂ Tm	Teor de água (%)	ΨH ₂ O (-MPa)
S/ secagem A	97 a	85 a	1,83 a	14,96 b	58,1 a	1,62 d
S/ secagem B	100 a	95 a	0,98 b	20,65 b	55,1 ab	1,2 d
Secagem A1	100 a	93 a	1,47 a	24,38 b	48 bc	9,8 d
Secagem B1	87 a	70 ab	0,55 c	121,5 a	45,4 cd	8,2 d
Secagem A2	40 b	39 bc	0,63 bc	12,9 b	38,7 de	17 d
Secagem B2	82 a	76 a	0,24 cd	130,5 a	33,7 ef	42,7 c
Secagem A3	14 c	12 cd	0,08 d	10,21 b	28,4 f	40,2 c
Secagem B3	28 c	23 cd	0,06 d	11,67 b	25,7 fg	70,12 b
Secagem A4	0 c	0 d	0 d	0 b	19,6 gh	54,29 bc
Secagem B4	0 c	0 d	0 d	0 b	12,5 h	118,81 a
c.v. (%)	26,26	28,72	28,88	109,79	9,45	21,64

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas. (c.v. = coeficiente de variação).

Tabela 8. Porcentagem de germinação e desenvolvimento de plântulas, índice de velocidade de germinação (IVG), variância do tempo médio de germinação (S₂Tm), teor de água (%) e potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Caesalpinia echinata* recém coletadas em 2006 (sem secagem) e após serem submetidas a diferentes níveis de secagem em estufa (secagens 1-3).

Nível de secagem	Germinação (%)	Plântulas normais (%)	IVG	S ₂ Tm	Teor de água (%)	ΨH ₂ O (-MPa)
S/ secagem	90	85	5,1	0,32	16,2	37,20
Secagem 1	92	88	5,3	0,24	11,2	64,00
Secagem 2	67	56	3,8	0,37	8,4	134,16
Secagem 3	92	84	5,4	1,25	5,4	134,16

5.3 Alterações na composição de ácidos graxos em resposta à dessecação

Na tabela 9 e na figura 25 estão expressas as porcentagens de ácidos graxos obtidos a partir das análises de lipídios extraídos de sementes recém coletadas de *Inga vera* (sementes viáveis) ou submetidas à secagem até 20% de água (sementes inviáveis).

Tabela 9. Variação na composição de ácidos graxos de sementes de *Inga vera* (ingá) recém coletadas, com teor de água de 54% (viáveis) e com 20% de água (inviáveis).

Ácido graxo	Viável	Inviável
Palmítico (C16:0)	66,6	58,3
Linoléico (C18:2)	0,0	0,7
Oléico (C18:1)	0,0	1,6
Esteárico (C18:0)	26,7	30,9
Araquídico (C20:0)	1,4	3,1
Eicosenóico (C20:1)	0,0	0,0
Behênico (C22:0)	1,0	2,1
Lignocérico (C24:0)	4,5	3,2

Como previamente mostrado, nas sementes de ingá com 100% de germinação foram detectados cinco ácidos graxos, todos saturados, sendo a maior proporção de ácido palmítico (C16:0). Ao serem secas até 20% de água, essas sementes perderam a capacidade germinativa e apresentaram alterações na composição lipídica, sendo detectados sete ácidos graxos, incluindo os ácidos linoléico e oléico, antes não observados. Contudo, os ácidos graxos majoritários das sementes de ingá (tanto viáveis como inviáveis) foram o palmítico (58,4%) e esteárico (30,9%).

Nas sementes de pitanga (tabela 10 e figura 25) a perda de viabilidade das sementes (com 19% de água) não interferiu na proporção de ácido palmítico, seu componente majoritário; contudo a proporção de ácidos graxos insaturados nas sementes de pitanga reduziu de 19,4% nas sementes recém coletadas para 6,7% nas sementes secas até o teor de água letal (19%).

A tabela 10 mostra, ainda, que a secagem das sementes de *E. uniflora* reduziu o teor de ácido oléico em 70% e em 30% o ácido linoléico. Por outro lado, observaram-se aumentos de ácido esteárico (26%), araquídico (72%), behênico (80%) e lignocérico (42,6%).

As variações na composição de ácidos graxos de sementes de pau-brasil estão mostradas na tabela 11. Como se pode observar as sementes de *C. echinata* que mantiveram a capacidade germinativa após a redução do teor de água até 5,4% (secagem 3) também apresentaram alterações nas proporções de ácidos graxos. Nas sementes recém coletadas, com 16% de água e 90% de germinação, os ácidos graxos insaturados corresponderam a 53,4% dos ácidos graxos totais (figura 24) e com a secagem em estufa até 5,4% de água, estes passaram a representar apenas 6,7% (tabela 11, figura 25), embora tenha sido mantida alta porcentagem de germinação.

Tabela 10. Variação na composição de ácidos graxos de sementes de *Eugenia uniflora* (pitanga) recém coletadas, com teor de água de 55% (viáveis) e com 19% de água (inviáveis).

Ácido graxo	Viável	Inviável
Palmítico (C16:0)	57,4	58,5
Linoléico (C18:2)	2,2	1,5
Oléico (C18:1)	17,2	5,2
Esteárico (C18:0)	10,1	12,7
Araquídico (C20:0)	7,9	13,6
Eicosenóico (C20:1)	0,0	0,0
Behênico (C22:0)	2,9	5,2
Lignocérico (C24:0)	2,3	3,3

O ácido linoléico, que antes representava mais de 45% dos ácidos graxos e era o ácido graxo mais abundante nas sementes recém coletadas, não foi detectado no mesmo lote de sementes após a secagem. A secagem das sementes de pau-brasil acarretou, ainda, aumento exclusivo na proporção dos ácidos graxos saturados. O ácido graxo que apresentou maior incremento foi o

araquídico (C20:0), passando de 4,1% para 13,5%, embora também tenham apresentado aumentos expressivos os ácidos palmítico, esteárico, behênico e lignocérico.

Como o menor teor de água obtido artificialmente não ocasionou a inviabilidade das sementes de *C. echinata*, analisou-se ainda um lote de sementes dessa espécie coletadas em 1999 e armazenadas à temperatura ambiente (25 °C) até o início dos experimentos. Nessas condições as sementes dessa espécie perderam a capacidade germinativa em 100% (dados não mostrados). Como mostra a tabela 11, não foi observada alteração na proporção do ácido oléico entre as sementes de pau-brasil recém coletadas e as que perderam a capacidade germinativa. Nas recém coletadas o ácido eicosenóico constituía cerca de 0,1% dos ácidos graxos totais e não foi detectado nas sementes secas e nas sementes mortas. O ácido linoléico que era o componente majoritário das sementes recém colhidas (45%) estava presente nas sementes mortas, constituindo cerca de 16% dos ácidos graxos.

Tabela 11. Variação na composição de ácidos graxos (%) em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) recém coletadas (16% de água), secas (5,4% de água) e armazenadas a 25 °C desde 1999.

Ácido graxo	Sementes		
	Recém colhidas (16% de água)	Secas (5,4% de água)	Armazenadas a 25 °C (7% de água)
Palmítico (C16:0)	13,0	20,5	19,2
Linoléico (C18:2)	45,4	0,0	16,3
Oléico (C18:1)	7,9	6,7	7,9
Esteárico (C18:0)	25,7	49,1	41,5
Araquídico (C20:0)	4,1	13,5	7,9
Eicosenóico (C20:1)	0,1	0,0	0,0
Behênico (C22:0)	3,4	8,5	6,2
Lignocérico (C24:0)	0,4	1,8	1,0

As sementes armazenadas a 25 °C apresentaram aumento nos ácidos graxos araquídico, behênico, lignocérico e esteárico. Este último foi o principal ácido graxo encontrado tanto nas sementes secas, quanto nas sementes mortas de pau-brasil, armazenadas à temperatura ambiente (25 °C).

5.4 Respostas fisiológicas das sementes armazenadas a -18 °C

Amostras de sementes de *Inga vera*, *Eugenia uniflora* e de *Caesalpinia echinata* coletadas em 2006, com o teor de água original, e após secagem a diferentes níveis de água foram armazenadas a -18 °C por 30 dias. Amostras de sementes de *Erythrina speciosa* coletadas em 2004 foram armazenadas por 3 anos à temperatura ambiente, antes do armazenamento a -18 °C por 30 dias. Os resultados obtidos estão mostrados nas tabelas 12, 13 e 14 e na figura 14. Como se pode observar, depois de 30 dias a -18 °C o teor de água das sementes de *I. vera* foi significativamente reduzido (tabela 12), como comprovado pelo teste de Tukey, a 5%, com exceção das sementes do 4º nível de secagem, que embora tenham diminuído de 20,6 para 14,3% de água, não diferiram estatisticamente das demais não armazenadas. Comportamento semelhante foi observado nas análises de potencial hídrico, porém o tratamento que não apresentou diferença significativa após o armazenamento foi o 1º nível de secagem, onde -5,7 e -9,7 MPa não diferiram pela análise estatística realizada (tabela 12).

Após o armazenamento, as sementes de *I. vera* apresentaram duas faixas de potencial hídrico, uma englobando as sementes sem secagem e com as secagens 1 e 2, apresentando potencial hídrico de -9,7 a -24,2 MPa e outra faixa abrangendo as sementes submetidas as secagens 3 e 4 (-54,4 e 59,9 MPa, respectivamente). Porém apenas as sementes da secagem 1 não apresentaram diferença estatística entre os tempos de armazenamento.

A tabela 13 mostra os dados de teor de água e potencial hídrico das sementes de *Eugenia uniflora* armazenadas a -18 °C antes e após a secagem. Como pode ser observado, após 30 dias de

armazenamento a -18 °C, as sementes de *E. uniflora* apresentaram, em média, redução de 3,9% do teor de água. Embora as sementes submetidas aos diferentes níveis de secagem tenham reduzido ainda mais seu teor de água com o armazenamento, estas continuaram diferindo estatisticamente nos diferentes tratamentos (tabela 13).

Tabela 12. Teor de água (%) e potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Inga vera* recém coletadas e após armazenamento por 30 dias a -18 °C, após serem submetidas a diferentes níveis de secagem em estufa (40 °C).

Armazenamento (dias)	Nível de secagem				
	0	1	2	3	4
Teor de água (%)					
0	54 aA	45,1 aAB	38,3 aB	28,7 aC	20,6 aC
30	26,8 bA	31,1 bA	21,7 bBC	15,4 bC	14,3 aC
c.v. (%)	15,42				
Potencial hídrico (-MPa)					
0	1,15 bB	5,7 aB	9,41 bB	14,8 bB	40,8 bA
30	21,9 aB	9,7 aB	24,2 aB	54,4 aA	59,9 aA
c.v. (%)	32,48				

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

Contudo, embora o teor de água das sementes de pitanga antes e após o armazenamento tenha diferido, a média do potencial hídrico entre os períodos de armazenamento não foi alterada. Os potenciais hídricos também não tiveram alteração significativa nos diferentes níveis de secagem em consequência do armazenamento, porém, diferentemente do teor de água, os potenciais hídricos entre as sementes sem secagem e com a 1ª secagem não apresentaram diferença, assim como as secagens 2 e 3 e as secagens 3 e 4 (tabela 13).

O teor de água das sementes de *C. echinata* apresentou diferença estatística apenas na amostra armazenada com o teor de água inicial, na qual houve redução do conteúdo de água das sementes, mas não diferiu entre as amostras de sementes submetidas à secagem e a seguir ao armazenamento a -18 °C (tabela 14).

Tabela 13. Teor de água (%) e potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Eugenia uniflora* recém coletadas e após armazenamento por 30 dias a -18 °C, após serem submetidas a diferentes níveis de secagem em estufa (40 °C).

Armazenamento (dias)	Nível de secagem					Média
	0	1	2	3	4	
<i>Teor de água (%)</i>						
0	55,1	45,4	38,7	28,4	19,6	37,4 a
30	51,2	41	33,5	24,8	17,2	33,5 b
Média	53,2 A	43,2 B	36,1 C	26,6 D	18,4 E	
c.v. (%)	12,2					
<i>Potencial hídrico (-MPa)</i>						
0	1,2	8,2	17	40,2	54,3	24,2 a
30	5,09	5,74	13,7	25,4	46	19,2 a
Média	3,14 C	6,97 C	15,4 BC	32,8 AB	50,1 A	
c.v. (%)	66,5					

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

Tabela 14. Teor de água (%) e potencial hídrico (-MPa) de sementes de *Caesalpinia echinata* recém coletadas e após armazenamento por 30 dias a -18 °C, após serem submetidas a diferentes níveis de secagem em estufa (40 °C).

Armazenamento (dias)	nível de secagem			
	0	1	2	3
<i>Teor de água (%)</i>				
0	16,2 aA	11,2 aA	8,4 aA	5,42 aA
30	11,5 bA	10,1 aA	7,2 aA	7,1 aA
c.v. (%)	14,76			
<i>Potencial hídrico (-MPa)</i>				
0	37,2 bC	64 bB	134,2 aA	134,2 aA
30	68,96 aC	73 aC	103,1 bB	134,2 aA
c.v. (%)	4,42			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

Os teores de água das sementes armazenadas a -18 °C apresentaram tendência ao equilíbrio, permanecendo entre 10 e 7%. Isto pode ser resultado da baixa umidade do ar na câmara fria utilizada, por ser livre de gelo (tipo *frost-free*).

Embora os teores de água das sementes de pau-brasil não armazenadas não tenham apresentado diferença estatística, o potencial hídrico entre os lotes diferiu significativamente, variando de -37,2 MPa nas sementes não submetidas à secagem, até -134,16 MPa nas sementes que apresentaram o menor teor de água (tabela 14). Da mesma forma o potencial hídrico das sementes de *C. echinata* armazenadas com o teor de água inicial, também apresentou alteração com o armazenamento.

De maneira geral, as sementes de pau-brasil de todos os tratamentos apresentaram redução do potencial hídrico, com exceção do lote mais seco. Com o armazenamento, o potencial hídrico das sementes de pau-brasil variou de -68,96 MPa a -134,16 MPa.

Na figura 14 estão representados os teores de água e o potencial hídrico de sementes de *Erythrina speciosa* antes e após o armazenamento a -18 °C. Como essas sementes já apresentavam teor de água inferior a 10%, optou-se por armazená-las com o teor de água inicial. Mesmo assim, como nas demais espécies estudadas, houve redução do teor de água durante o armazenamento das sementes por 30 dias a -18 °C, sendo acompanhado por aumento proporcional no potencial hídrico dessas sementes (figura 14).

Independentemente do teor de água com o qual as sementes de *I. vera* e *E. uniflora* foram armazenadas, nenhuma semente sobreviveu ao armazenamento por 30 dias a -18 °C.

Na tabela 15 são apresentados os resultados de germinação, desenvolvimento de plântulas normais, índice de velocidade de germinação e variância do tempo médio de germinação de sementes de *C. echinata* recém coletadas, submetidas à secagem artificial e armazenadas a -18 °C por 30 dias. Os dados evidenciam que a germinação das sementes de pau-brasil após o armazenamento não diferiu estatisticamente da germinação apresentada pelas sementes não

armazenadas, independentemente do teor de água com o qual foram congeladas. O desenvolvimento de plântulas também não foi alterado com a secagem e com o armazenamento (tabela 15).

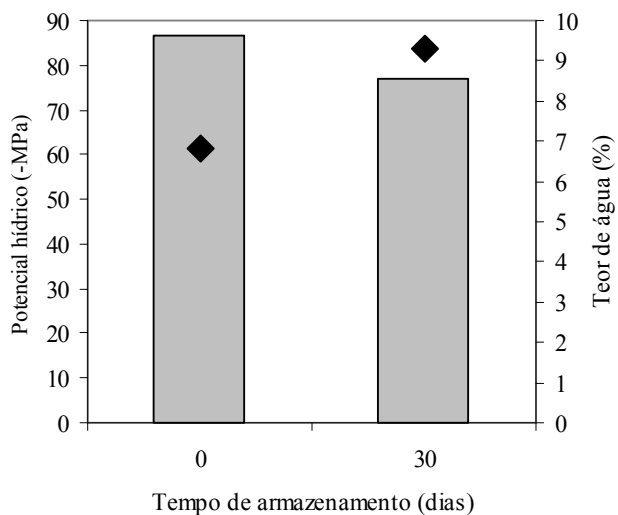


Figura 14. Teor de água (■) e potencial hídrico (◆) de sementes de *Erythrina speciosa* antes e após armazenamento a -18 °C por 30 dias.

Os parâmetros de velocidade de germinação analisados (IVG e variância do tempo médio de germinação) também não foram alterados após o armazenamento das sementes a -18 °C por 30 dias.

A figura 15 refere-se à germinação e ao desenvolvimento de plântulas normais de sementes de *E. speciosa* recém coletadas em 2007, coletadas em 2004 e armazenadas à temperatura ambiente até o início dos experimentos e armazenamento por 30 dias a -18 °C.

Embora as sementes coletadas em 2004 apresentem ligeira redução na capacidade germinativa e no desenvolvimento de plântulas, o armazenamento por 3 anos em temperatura ambiente não afetou essas sementes. O armazenamento a -18 °C reduziu levemente a germinação das sementes de eritrina, porém ainda apresentaram 90% de germinação e 75% de produção de plântulas normais (figura 15).

Tabela 15. Germinação (%), desenvolvimento de plântulas normais (%), índice de velocidade de germinação (IVG), variância do tempo médio de germinação (S_2Tm , dias²) de sementes de *Caesalpinia echinata* recém coletadas, após secagem em estufa (40 °C) e após 30 dias de armazenamento (-18 °C).

Armazenamento (dias)	Nível de secagem				
	0	1	2	3	Média
Germinação (%)					
0	90	92	67	92	85 a
30	90	83	86	88	87 a
média	90 A	90 A	88 A	76 A	
c.v. (%)	13,76				
Desenvolvimento de plântulas normais (%)					
0	85	88	56	84	78 a
30	83	75	77	73	77 a
média	84 A	81 A	78 A	67 A	
c.v. (%)	19,93				
Índice de velocidade de germinação (IVG)					
0	5,1	5,3	3,8	5,4	4,9 a
30	4,4	4,9	4,6	4,6	4,6 a
média	4,74 A	5,09 A	4,19 A	4,99 A	
c.v. (%)	15,12				
S ₂ Tm (dias ²)					
0	0,3	0,2	0,4	1,3	0,5 a
30	0,5	0,2	0,7	3,8	1,3 a
média	0,41 A	0,22 A	0,51 A	2,54 A	
c.v. (%)	249,25				

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

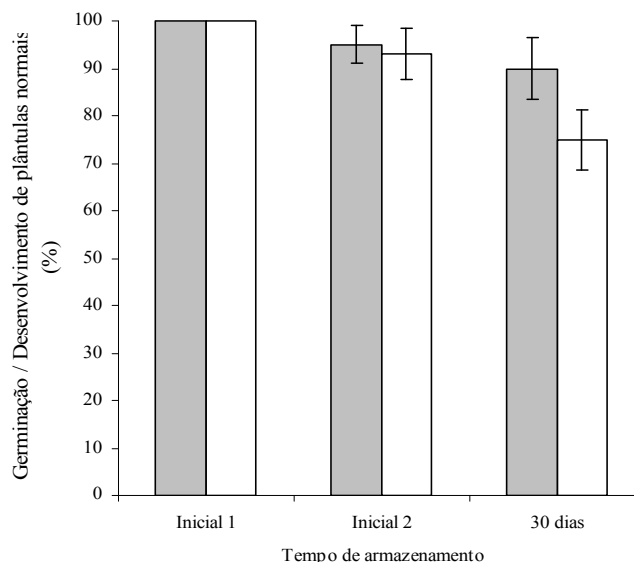


Figura 15. Germinação (■) e desenvolvimento de plântulas (□) de sementes de *Erythrina speciosa* coletadas em 2007 (Inicial 1), em 2004 (Inicial 2) e após armazenamento a -18 °C por 30 dias (lote 2004).

5.5 Compostos de reserva das sementes após dessecação e armazenamento

Os teores de carboidratos solúveis das sementes de *I. vera*, *E. uniflora* e *C. echinata* submetidas a diferentes níveis de secagem e ao congelamento podem ser observados na tabela 16 e na figura 18.

À medida em que as sementes de ingá e pitanga foram secas ocorreu aumento no teor dos carboidratos solúveis, especialmente nas sementes de ingá submetidas à secagens 3 (29% de água e 22% germinação) e 4 (20% de água e 4% de germinação). Quando as sementes de *I. vera* foram congeladas com teor de água inicial também houve aumento nos açúcares solúveis totais. A tabela 16 mostra, ainda, que entre as sementes de ingá congeladas houve redução dos carboidratos solúveis

à medida em que o teor de água das sementes foi reduzido, voltando a aumentar no menor nível de hidratação destas.

Tabela 16. Teor de carboidratos solúveis (mg g⁻¹ MS) de sementes de *Inga vera*, *Eugenia uniflora* e *Caesalpinia echinata* submetidas a diferentes níveis de secagem e armazenadas por 30 dias a -18 °C.

Armazenamento (dias)	Nível de secagem				
	0	1	2	3	4
<i>Inga vera</i> (ingá)					
0	60,9 bC	58,4 aC	63,3 aC	81,3 aB	135,8 aA
30	79,1 aA	50,4 aB	58,5 aB	55,5 bB	91,6 bA
c.v. (%)	9,72				
<i>Eugenia uniflora</i> (pitanga)					
0	70,1 aC	250,0 aB	292,8 aAB	314,8 aA	327,0 bA
30	101,7 aD	195,6 bC	230,7 bC	302,5 aB	374,6 aA
c.v. (%)	8,57				
<i>Caesalpinia echinata</i> - eixo (pau-brasil)					
0	140,6 bA	100,9 aA	139,2 aA	116,4 aA	-
30	321,1 aA	131,9 aBC	217,5 aAB	86,7 aC	-
c.v. (%)	34,75				
<i>Caesalpinia echinata</i> - cotilédone (pau-brasil)					
0	148,4 bA	136,3 aA	193,3 aA	147,4 aA	-
30	243,1 aA	152,6 aB	142,4 bB	141,4 aB	-
c.v. (%)	16,33				

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

Quanto a *E. uniflora* as sementes também apresentaram aumento dos carboidratos solúveis em função da redução do teor de água, tanto nas recém colhidas como quanto nas sementes congeladas, porém dependendo do teor de água que a semente apresentava ao ser armazenada, observou-se uma variação na quantidade de carboidratos solúveis encontrada (tabela 16). Assim, as sementes armazenadas com teor de água inicial (55%) não apresentaram alteração nos açúcares totais após o congelamento, da mesma forma como nas sementes da secagem 3, originalmente armazenadas com 28% de água. Por outro lado, sementes com 45 ou 39% (secagens 1 e 2, respectivamente) apresentaram redução significativa destes compostos. No menor nível de

hidratação das sementes (19%) o armazenamento também ocasionou aumento dos carboidratos solúveis.

Os eixos embrionários de *C. echinata* não apresentaram alteração dos carboidratos solúveis em função da redução do teor de água nas sementes não armazenadas. Por outro lado, quando armazenadas a -18 °C os açúcares solúveis foram reduzidos de 321 mg g⁻¹ MS (nas sementes que não foram submetidas à secagem) a 86,7 mg g⁻¹ MS nas congeladas com menor teor de água (5,4%). Contudo, quando as sementes foram congeladas com o teor de água original observou-se aumento de mais de duas vezes nos teores de carboidratos solúveis.

A quantidade de carboidratos solúveis nos cotilédones de *C. echinata* foi similar àquela encontrada nos eixos embrionários da espécie (tabela 16). A redução do teor de água nas sementes não armazenadas não afetou a quantidade de açúcares solúveis, ao passo que após o congelamento, observou-se redução desses compostos. Assim como no eixo embrionário, após 30 dias de congelamento, os cotilédones das sementes armazenadas sem secagem apresentaram aumento dos açúcares solúveis, enquanto na secagem 2 houve redução dos carboidratos solúveis em decorrência do armazenamento, porém esta não fez com que a quantidade de açúcares solúveis fosse diferente estatisticamente das sementes congeladas com teores de água de 11 e 5,4% (secagens 1 e 3, respectivamente).

Na tabela 17 e figura 19 encontram-se os dados de amido quantificados enzimaticamente nas sementes de ingá, pitanga e pau-brasil, antes e após a secagem e armazenamento a -18 °C por 30 dias.

Com a secagem das sementes, observou-se leve redução de amido nas sementes de ingá sem armazenamento, enquanto que nas sementes armazenadas houve redução drástica, especialmente naquelas secas até 38 e 29% de água (secagens 2 e 3). Portanto, com o congelamento, houve redução nas sementes com três níveis de hidratação (sem secagem e secagens 2 e 3).

Nas sementes de *E. uniflora* a redução na quantidade de amido foi mais consistente nas sementes que não foram submetidas à secagem. Nestas, o amido representava cerca de 64% da matéria seca das sementes e ao serem desidratadas até 19% de água, o teor de amido reduziu cerca de três vezes.

Ao compararmos as sementes antes e após o armazenamento, é possível observar a redução à metade do teor de amido das sementes sem armazenamento, nos diferentes níveis de hidratação, exceto no menor teor de água (19%), onde houve aumento desse polissacarídeo.

Nos eixos embrionários de sementes de pau-brasil, a redução do teor de água causou aumento do teor de amido, porém no teor de água mais baixo (5,4%), esse valor voltou à quantidade original. O congelamento de sementes com teores de água inicial e de 5,4% não produziu alteração nos teores de amido, enquanto que nas sementes com teores de água intermediários houve redução do polissacarídeo. Na secagem 2 (8% de água) a quantidade de amido foi muito inferior à das sementes congeladas com 11% de água.

Já nos cotilédones observou-se redução no teor de amido apenas nas sementes submetidas à secagem 3 (tabela 17). Após de 30 dias de armazenamento a -18 °C observou-se que as sementes com menores teores de água foram as que apresentaram maior quantidade de amido. Portanto, o congelamento acarretou a diminuição do teor de amido apenas nas sementes armazenadas sem a prévia secagem, ou seja, com teor de água original (16%).

Em relação aos lipídios totais das sementes das espécies estudadas, os valores médios dos rendimentos obtidos das extrações podem ser observados na tabela 18 e figura 20.

Assim, sementes de *I. vera* apresentaram aumento na porcentagem desse composto com a dessecação, passando de 0,27% (valor inicial) para 0,57% nas sementes secas até 20% de água (secagem 4).

O armazenamento a -18 °C aumentou a quantidade de lipídios nas sementes secas até 38 e 29% (secagens 2 e 3), enquanto que nas sementes secas até 20% (secagem 4) o teor de lipídios foi reduzido em função do congelamento.

Tabela 17. Teor de amido (mg g⁻¹ MS) de sementes de *Inga vera*, *Eugenia uniflora* e *Caesalpinia echinata* submetidas a diferentes níveis de secagem e armazenadas por 30 dias a -18 °C.

Armazenamento (dias)	Nível de secagem				
	0	1	2	3	4
<i>Inga vera</i> (ingá)					
0	514,6 aAB	543,8 aA	393,9 aB	447,3 aAB	464,7 aAB
30	398,1 bA	459,9 aA	163,3 bB	255,1 bB	421,9 aA
c.v. (%)	14,37				
<i>Eugenia uniflora</i> (pitanga)					
0	641,1 aA	373,1 aB	457,4 aB	424,5 aB	204,7 bC
30	360,6 bAB	257,8 bC	281,1 bBC	276,9 bBC	388,7 aA
c.v. (%)	10,55				
<i>Caesalpinia echinata</i> - eixo (pau-brasil)					
0	22,8 aB	62,5 aA	56,4 aA	24,8 aB	-
30	21,1 aB	40,9 bA	14,8 bB	17,2 aB	-
c.v. (%)	24,96				
<i>Caesalpinia echinata</i> - cotilédone (pau-brasil)					
0	420,3 aAB	478,6 aA	437,6 aAB	378,7 aB	-
30	116,8 bB	449,4 aA	365,2 bA	375,2 aA	-
c.v. (%)	10,79				

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

Com relação a *E. uniflora* não foi observada qualquer alteração do teor de lipídios das sementes, nem em função da secagem, nem do armazenamento a -18 °C, não havendo interação entre os tratamentos aplicados (secagem X armazenamento), como mostra a tabela 18.

Da mesma forma, os cotilédones de sementes de *C. echinata* não apresentaram alteração no teor de lipídios após serem submetidas à secagem e ao congelamento, mantendo-se elevado o teor de lipídios em todos os tratamentos (tabela 18).

Por outro lado, a secagem modificou a quantidade de lipídios nos eixos embrionários de sementes de *C. echinata*, havendo aumento naquelas submetidas à secagem e nas congeladas sem a prévia secagem. Nas sementes com teores de água de 11 e 8%, os eixos embrionários apresentaram

redução no rendimento das extrações de lipídios, de cerca de 13% para 9% e de 12,9% para 7,8%, respectivamente.

As quantificações dos açúcares individuais das sementes das espécies estudadas após análise por HPAEC/PAD encontram-se nas tabelas 19 a 22 e figuras 22 e 23.

Tabela 18. Rendimento de lipídios totais (%) de sementes de *Inga vera*, *Eugenia uniflora* e *Caesalpinia echinata* submetidas a diferentes níveis de secagem e armazenadas por 30 dias a -18 °C.

Armazenamento (dias)	Nível de secagem					Média
	0	1	2	3	4	
<i>Inga vera</i> (ingá)						
0	0,27 aB	0,36 aB	0,29 bB	0,25 bB	0,57 aA	-
30	0,27 aB	0,31 aAB	0,47 aA	0,41 aAB	0,34 bAB	-
c.v. (%)	20,79					
<i>Eugenia uniflora</i> (pitanga)						
0	0,85	0,68	0,82	0,65	0,81	0,76 a
30	0,62	0,89	0,57	0,56	0,82	0,69 a
Média	0,74 A	0,78 A	0,69 A	0,6 A	0,81 A	
c.v. (%)	21,34					
<i>Caesalpinia echinata</i> - eixo (pau-brasil)						
0	7,0 bB	13,3 aA	12,9 aA	10,0 aAB	-	-
30	9,9 aA	9,0 bA	7,8 bA	11,2 aA	-	-
c.v. (%)	14,44					
<i>Caesalpinia echinata</i> - cotilédone (pau-brasil)						
0	17,57	17,64	16,11	16,39	-	16,9 a
30	13,37	17,56	17,56	17,54	-	17,5 a
Média	17,47 A	17,6 A	16,83 A	16,96 A		
c.v. (%)	5,05					

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

Os dados obtidos para as sementes de *I. vera* (tabela 19) evidenciam que houve interação dos fatores teor de água das sementes e armazenamento quanto à quantificação dos ciclitóis. Sementes com teores de água de 54 e 20% (sem secagem e secagem 4) e sem armazenamento mostraram valores mais altos e não diferiram em si, assim como não houve diferença nos teores de

ciclitóis nas sementes com secagens 1, 2 e 3 (teores de água de 45, 38 e 29%), cujos valores foram cerca de três vezes inferiores.

O armazenamento a -18 °C ocasionou a redução desses açúcares álcoois nas sementes sem secagem e com teor de água de 20%, enquanto nos teores de água intermediários (secagens 1, 2 e 3) não foram detectadas alterações nos teores de ciclitóis em função do armazenamento.

A redução do teor de água a 20% causou um aumento no teor de glucose nas sementes não armazenadas (tabela 19). Nas sementes armazenadas a -18 °C, somente naquelas com maior teor de água (54 e 45%) foram detectadas alterações na proporção de glucose em função do armazenamento.

Tabela 19. Variações na composição de carboidratos solúveis (mg g⁻¹ MS) de sementes de *Inga vera* (ingá) recém coletadas e após o armazenamento por 30 dias a -18 °C, após serem submetidas a diferentes níveis de secagem.

Armazenamento (dias)	Nível de secagem					Média
	0	1	2	3	4	
<i>Ciclitóis (mg g⁻¹ MS)</i>						
0	5,9 aA	1,1 aB	1,5 aB	1,7 aB	6,6 aA	-
30	3,1 bA	1,4 aA	1,2 aA	1,0 aA	1,7 bA	-
c.v. (%)	51,64					
<i>Glucose (mg g⁻¹ MS)</i>						
0	1,3 bB	1,1 bB	3,3 aB	2,4 aB	8,4 aA	-
30	9,4 aA	3,5 aB	2,2 aB	1,2 aB	7,7 aA	-
c.v. (%)	28,89					
<i>Frutose (mg g⁻¹ MS)</i>						
0	1,6 bB	1,1 aB	1,4 aB	1,1 aB	6,1 aA	-
30	16,2 aA	0,4 aB	0,8 aB	0,4 aB	2,5 bB	-
c.v. (%)	45,6					
<i>Sacarose (mg g⁻¹ MS)</i>						
0	51,7 aD	55,1 aCD	57,2 aC	76,2 aB	114,7 aA	-
30	50,4 aC	45,2 bD	54,3 bB	52,8 bBC	79,7 bA	-
c.v. (%)	2,36					
<i>Rafinose (mg g⁻¹ MS)</i>						
0	0,5 aA	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	0,0 aB	-
30	0,0 bA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	0,0 aA	-
c.v. (%)	56,15					

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

A quantidade de frutose foi modificada em função do armazenamento e do teor de água, havendo interação entre esses fatores. Assim como o observado para glucose, nas sementes não armazenadas houve aumento de frutose no menor teor de água (20%, secagem 4). Com o armazenamento, as sementes com elevado teor de água (não submetidas à secagem) apresentaram incremento desse monossacarídeo, passando de 1,6 mg g⁻¹ MS para 16,2 mg g⁻¹ MS após serem armazenadas por 30 dias a -18 °C. Por outro lado, as sementes armazenadas com teor de água de 20% apresentaram redução de cerca de 2,4 vezes na quantidade de frutose se comparadas com as sementes com mesmo teor de água, porém sem armazenamento.

A sacarose, principal açúcar solúvel encontrado nas sementes de *I. vera*, apresentou aumento gradual com a secagem, variando de 51,7 mg g⁻¹ MS (sementes sem secagem) até cerca de 115 mg g⁻¹ MS nas sementes com teor de água de 20% (secagem 4).

Da mesma forma, nas sementes congeladas a quantidade de sacarose foi inversamente proporcional a quantidade de água nas sementes, variando de cerca de 50 a 80 mg g⁻¹ MS (tabela 19).

Dentre os oligossacarídeos só foi detectada a presença de rafinose nas sementes de ingá recém coletadas, porém em proporção muito pequena (0,52 mg g⁻¹ MS).

A tabela 20 refere-se a *E. uniflora*, podendo ser observado que os teores de ciclitóis nas sementes variaram de acordo com o teor de água, sendo menor nas sementes recém coletadas. A tabela 20 mostra, ainda, que a quantidade de açúcares álcoois das sementes de pitanga praticamente dobrou quando as sementes passaram de 45% de água para 39% de água (secagens 1 e 2). As sementes não armazenadas secas até 28% de água foram as que apresentaram o maior teor de ciclitóis (16,45 mg g⁻¹ MS). Com o armazenamento manteve-se a tendência ao acúmulo desses açúcares nas sementes secas, exceto na secagem 2 (com 45% de água).

Com relação à glucose, não houve interação dos fatores teor de água das sementes e armazenamento para as sementes de pitanga. Indiferentemente ao teor de água, as sementes não armazenadas de *E. uniflora* apresentaram 32,6 mg g⁻¹ MS de glucose, valor este superior às 28 mg

g⁻¹ MS ao obtido para nas sementes armazenadas com diferentes teores de água. Por outro lado, as sementes de pitanga que não foram submetidas à secagem apresentaram os menores valores de glucose, independentemente do armazenamento.

Tabela 20. Variações na composição de carboidratos solúveis (mg g⁻¹ MS) de sementes de *Eugenia uniflora* (pitanga) recém coletadas e após o armazenamento por 30 dias a -18 °C, após serem submetidas a diferentes níveis de secagem.

Armazenamento (dias)	Nível de secagem					
	0	1	2	3	4	Média
<i>Ciclitóis</i> (mg g ⁻¹ MS)						
0	3,5 aC	6,0 bBC	11,3 aAB	16,5 aA	10,3 aAB	-
30	7,0 aC	11,2 aABC	7,9 aBC	14,7 aA	13,9 aAB	-
c.v. (%)	26,39					
<i>Glucose</i> (mg g ⁻¹ MS)						
0	6,0	24,4	32,7	44,8	54,9	32,6 a
30	10,7	20,2	23,4	33,6	52,1	28,0 b
média	8,3 D	22,3 C	28,0 C	39,2 B	53,5 A	
c.v. (%)	16,41					
<i>Frutose</i> (mg g ⁻¹ MS)						
0	10,3	30,3	36,8	40,2	46,1	32,7 a
30	5,2	19,2	22,7	25,8	52,7	25,1 b
média	7,7 C	24,7 B	29,8 B	33,0 B	49,4 A	
c.v. (%)	27,61					
<i>Sacarose</i> (mg g ⁻¹ MS)						
0	50,2 bB	189,3 aA	212,1 aA	213,4 aA	215,7 bA	-
30	78,9 aC	144,7 bB	176,8 bB	228,4 aA	241,6 aA	-
c.v. (%)	8,37					
<i>Rafinose</i> (mg g ⁻¹ MS)						
0	1,0	0,7	0,7	0,7	0,7	0,8 a
30	0,7	0,9	0,7	0,7	2,8	1,2 a
média	0,9 A	0,8 A	0,7 A	0,7 aA	1,8 A	
c.v. (%)	107,1					
<i>Estaquiose</i> (mg g ⁻¹ MS)						
0	0,8 aA	0,7 aB	0,7 aB	0,7 aB	0,7 aB	-
30	0,7 bA	0,7 aA	0,7 aA	0,7 aA	0,7 aA	-
c.v. (%)	0,59					

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

Embora as sementes de *E. uniflora* com secagens 1 e 2 tenham apresentado grande diferença na quantificação de ciclitóis, os teores de glucose entre esses dois tratamentos não diferiram, sendo observados valores entre 22-28 mg g⁻¹ MS. Nas sementes de pitanga com 19% de água (secagem 4) foram encontrados, em média 53,52 mg g⁻¹ MS de glucose.

Também não foi observada interação significativa entre os tratamentos para a quantificação de frutose e da mesma forma que obtido para glucose, as sementes não armazenadas de pitanga apresentaram, em média, valores superiores aos encontrados nas sementes armazenadas.

Não houve diferença entre os teores de frutose nas sementes com teores de água de 45, 39 e 28%, variando estes de 24 a 33 mg g⁻¹ MS. As sementes com 19% de água apresentaram cerca de 49,4 mg g⁻¹ MS, ao passo que as sementes secas apresentaram 7,7 mg g⁻¹ MS.

As análises de quantificação de sacarose apresentaram interação entre os tratamentos de secagem e armazenamento (tabela 20). As sementes de *E. uniflora* recém coletadas apresentaram o menor teor de sacarose (50,2 mg g⁻¹ MS), enquanto as sementes submetidas a qualquer nível de secagem tiveram incremento substancial de sacarose, variando entre 189,3 e 215,7 mg g⁻¹ MS. Tal variação não foi estatisticamente significativa entre os diferentes níveis de secagem.

Com o armazenamento a -18 °C houve aumento de sacarose de 50,2 mg g⁻¹ MS para 78,9 mg g⁻¹ MS nas sementes sem secagem, enquanto nas sementes com secagens 1 e 2 (teores de água de 45 e 39%) observou-se redução na quantidade total de sacarose. Já nas sementes armazenadas com 28% de água não foram detectadas modificações nos teores de sacarose. Nas sementes armazenadas houve uma tendência a reduzir o teor de sacarose com o aumento do teor de água das mesmas.

Para a análise estatística da quantificação de rafinose e estaquiose nas sementes de pitanga, os dados na tabela 20 foram transformados para $\sqrt{x+k}$ (k=0,5), devido ao grande número de parcelas nulas. Desta forma, constatou-se que não houve interação entre os tratamentos quanto à rafinose. Embora as sementes recém coletadas e as armazenadas com o menor teor de água tenham

apresentado os maiores valores desse açúcar, estes não diferiram dos demais tratamentos, independentemente do nível de secagem e do armazenamento.

A análise de estaquiase nas sementes de *E. uniflora* indicou que as sementes recém coletadas apresentaram os maiores valores deste oligossacarídeo, embora em pequena quantidade.

Os valores dos açúcares solúveis individuais dos cotilédones de *C. echinata* estão apresentados na tabela 21 e evidenciam que a quantificação dos ciclitóis galactosilados apresentou interação entre os tratamentos de secagem e armazenamento. Nas sementes sem armazenamento não houve alteração na quantidade desses açúcares em função da redução do teor de água, porém com o congelamento, houve um aumento de 20,5 mg g⁻¹ MS para 46,2 mg g⁻¹ MS nas sementes armazenadas com o teor de água inicial (16%). As quantidades de ciclitóis nas sementes armazenadas após serem submetidas à dessecação não apresentaram diferença estatística, com valores variando de 18,8 a 21 mg g⁻¹ MS. Nas sementes de pau-brasil com secagem 2 (8% de água) observou-se redução dos açúcares álcoois com o armazenamento.

A tabela 21 mostra, ainda, que a quantidade de glucose aumentou nos cotilédones de sementes *C. echinata* quando foram submetidas à secagem até 8% de água. Nos demais teores de água, os valores mantiveram-se baixos e não diferiram entre si (de 0,4 a 2,0 mg g⁻¹ MS). Com o congelamento das sementes com 8% de água os cotilédones apresentaram redução da quantidade de glucose e não diferiram estatisticamente dos valores obtidos para os cotilédones de sementes com 12% de água (secagem 1).

Embora as sementes sem secagem e as secas até 5,4% de água não tenham apresentado diferença estatística sem o armazenamento, após o congelamento, estas diferiram sendo que as sementes sem secagem apresentaram maior quantidade de glucose (2,4 mg g⁻¹ MS) do que as sementes com secagem 3 (0,5 mg g⁻¹ MS).

A tabela 21 mostra, ainda, que quando os cotilédones de pau-brasil foram submetidos à secagem até 12 e 5,4% de água, apresentaram as menores quantidades de frutose (0,4 e 1,0 mg g⁻¹ MS, respectivamente); por outro lado, com 8% de água obteve-se a maior quantidade desse

monossacarídeo, nas sementes não armazenadas. Com o congelamento a quantidade de frutose entre as sementes com diferentes teores de água não diferiu entre eles, variando os valores de 0,2 a 0,8 mg g⁻¹ MS, indicando que este açúcar é minoritário nos cotilédones de sementes de pau-brasil.

Tabela 21. Variações na composição de carboidratos solúveis (mg g⁻¹ MS) de cotilédones de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) recém coletadas e após o armazenamento por 30 dias a -18 °C, após serem submetidas a diferentes níveis de secagem.

Armazenamento (dias)	Nível de secagem				
	0	1	2	3	Média
<i>Ciclitóis galactosilados</i> (mg g ⁻¹ MS)					
0	20,5 bA	15,8 aA	31,3 aA	17,3 aA	-
30	46,2 aA	21,0 aB	18,8 bB	19,0 aB	-
c.v. (%)	29,75				
<i>Glucose</i> (mg g ⁻¹ MS)					
0	2,0 aB	0,9 aB	4,7 aA	0,4 aB	-
30	2,4 aA	1,0 aAB	1,3 bAB	0,5 aB	-
c.v. (%)	47,20				
<i>Frutose</i> (mg g ⁻¹ MS)					
0	1,3 aAB	0,4 aB	2,8 aA	1,0 aB	-
30	0,6 aA	0,2 aA	0,2 bA	0,8 aA	-
c.v. (%)	82,32				
<i>Sacarose</i> (mg g ⁻¹ MS)					
0	120,6 bB	116,7 aB	151,7 aA	126,8 aB	-
30	193,9 aA	127,1 aB	119,7 bB	119,8 aB	-
c.v. (%)	6,56				
<i>Rafinose</i> (mg g ⁻¹ MS)					
0	1,6	1,4	1,9	1,5	1,6 a
30	0,7	1,5	1,3	1,3	1,2 a
média	1,2 A	1,4 A	1,6 A	1,4 A	
c.v. (%)	53,69				
<i>Estaquiose</i> (mg g ⁻¹ MS)					
0	1,5 aA	1,3 aA	0,7 bB	0,7 aB	-
30	0,7 bB	1,5 aA	1,1 aA	0,7 aB	-
c.v. (%)	17,42				

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

A quantidade de sacarose (que é o açúcar majoritário de pau-brasil) foi influenciada pelo teor de água e pelo armazenamento das sementes. Assim como observado para glucose e frutose, as sementes secas até 8% de água foram as que apresentaram maior quantidade de açúcar entre os tratamentos de secagem. Com o congelamento, houve uma inversão das quantidades de sacarose nas amostras de 16% e 8% de água, aumentando de 120,6 para 193,9 mg g⁻¹ MS nas primeiras, enquanto que nas submetidas à secagem 2 (8%) houve diminuição de 151,7 para 119,7 mg g⁻¹ MS. Com as secagens 1 e 3 não foram detectadas alterações nas quantidades de sacarose com o armazenamento a -18 °C.

Da mesma forma que realizado para as sementes de *E. uniflora*, os dados de rafinose e estaquiose de cotilédones de *C. echinata* foram transformados para $\sqrt{x+k}$ ($k=0,5$) e mostram que as diferenças nas quantidades de rafinose nas sementes secas e/ou armazenadas não diferiram estatisticamente (tabela 21). Contudo, antes do armazenamento, as sementes recém coletadas e as submetidas à secagem 1 (16% de água) apresentaram os maiores valores de estaquiose (1,5 a 1,3 mg g⁻¹ MS), havendo redução na quantidade deste açúcar em teores de água mais baixos. Após o armazenamento, as sementes que não foram secas apresentaram redução deste oligossacarídeo, enquanto que nas secas até 12% de água não houve modificação nos teores de estaquiose. Por outro lado, nos cotilédones de sementes de pau-brasil com 8% de água, que apresentavam baixa quantidade de estaquiose antes do armazenamento, o congelamento causou um aumento significativo deste açúcar. Contudo, com 5,4% de água não houve alteração na quantidade de estaquiose dos cotilédones, permanecendo igual às sementes não armazenadas.

As análises dos ciclitóis galactosilados realizadas nos eixos embrionários de *C. echinata* (tabela 22) indicaram uma flutuação irregular na quantidade destes açúcares em função do teor de água das sementes sem o armazenamento, sendo detectados, respectivamente nos teores de água de 16 e 8% as maiores quantidades (32,3 e 39,0 mg g⁻¹ MS). Com o congelamento, observou-se uma tendência na redução dos açúcares álcoois à medida que as sementes foram secas. Além disso, o congelamento ocasionou aumento de 2,5 vezes nesses açúcares nas sementes com teor de água

original (16%). Nos eixos embrionários de sementes com 12% de água houve aumento de 1,5 vezes nos ciclitóis galactosilados após o armazenamento a -18 °C. Com 8% de água, o armazenamento não modificou a quantidade desses açúcares nos eixos embrionários de pau-brasil, ao passo que sementes com 5,4% de água o conteúdo desses açúcares foi reduzido de 22,9 para 15,9 mg g⁻¹ MS.

Os monossacarídeos glucose e frutose foram encontrados proporcionalmente em pequenas quantidades nos eixos embrionários de *C. echinata*, sendo as maiores proporções de glucose (2,3 e 4,4 mg g⁻¹ MS) e frutose (1,2 e 3,4 mg g⁻¹ MS) presentes nas sementes não armazenadas com 16 e 8% de água.

O congelamento reduziu a quantidade de glucose nos eixos de sementes armazenadas com 8% de água (0,39 mg g⁻¹ MS), porém este valor não diferiu dos obtidos para os eixos de sementes com 12 e 5,4% de água após o armazenamento. Após o congelamento, os eixos de sementes armazenadas sem secagem prévia continuaram apresentando os maiores valores (3,46 mg g⁻¹ MS de glucose).

Sem o armazenamento, a maior quantidade de frutose foi encontrada nos eixos embrionários de sementes secas até 8% de água (3,37 mg g⁻¹ MS); nos demais teores de água os valores observados variaram de 0,49-1,58 mg g⁻¹ MS, não diferindo entre eles.

Por outro lado, com a secagem não houve alteração das quantidades de frutose, flutuando entre 0,49 e 3,37 mg g⁻¹ MS. Contudo, observou-se redução deste monossacarídeo nos eixos de sementes congeladas com 8% e 5,4 % de água.

A secagem das sementes acarretou na diminuição de 20% do teor de sacarose dos eixos embrionários, apenas no primeiro nível de secagem (tabela 22). Contudo, comparando-se os eixos embrionários em cada teor de água, antes e após o congelamento, observou-se que os eixos embrionários de sementes de pau-brasil com teores de água entre 16 e 8% apresentaram aumentos expressivos nos teores de sacarose.

Dentro do tratamento de armazenamento por 30 dias, constatou-se que as sementes de pau-brasil apresentaram diferença na proporção de sacarose em função do teor de água, sendo que

as sementes mais hidratadas tenderam a acumular mais sacarose nos eixos embrionários que aquelas com menor teor de água.

Tabela 22. Variações na composição de carboidratos solúveis (mg g⁻¹ MS) de eixos embrionários de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) recém coletadas e após o armazenamento por 30 dias a -18 °C, após serem submetidas a diferentes níveis de secagem.

Armazenamento (dias)	Nível de secagem			
	0	1	2	3
<i>Ciclítóis galactosilados</i> (mg g ⁻¹ MS)				
0	32,27 bA	17,26 bB	39,02 aA	22,92 aB
30	81,71 aA	25,95 aC	37,66 aB	15,9 bD
c.v. (%)	10,41			
<i>Glucose</i> (mg g ⁻¹ MS)				
0	2,32 aAB	0,46 aB	4,39 aA	1,00 aB
30	3,46 aA	0,38 aB	0,39 bB	0,49 aB
c.v. (%)	60,61			
<i>Frutose</i> (mg g ⁻¹ MS)				
0	1,21 aB	0,49 aB	3,37 aA	1,58 aB
30	1,04 aA	1,16 aA	0,84 bA	0,49 bA
c.v. (%)	43,71			
<i>Sacarose</i> (mg g ⁻¹ MS)				
0	95,9 bA	77,12 bB	92,45 bA	87,62 aA
30	234,38 aA	98,11 aC	165,01 aB	66,01 bD
c.v. (%)	3,66			
<i>Rafinose</i> (mg g ⁻¹ MS)				
0	5,46 aA	3,26 aAB	0 bB	3,28 aAB
30	0,52 bB	3,19 aAB	8,18 aA	2,44 aB
c.v. (%)	65,69			
<i>Estaquiose</i> (mg g ⁻¹ MS)				
0	3,9 aA	2,27 aAB	0 bB	0 aB
30	0 bB	3,07 aAB	5,37 aA	1,39 aB
c.v. (%)	80,29			

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5%; minúsculas comparam colunas, maiúsculas as linhas. (c.v. = coeficiente de variação).

Quanto aos oligossacarídeos, rafinose e estaquiose apresentaram variação similar nos tratamentos de secagem, sendo obtidos maiores valores nos eixos das sementes mais hidratadas (5,46-3,26 mg g⁻¹ MS para rafinose e 3,9-2,27 mg g⁻¹ MS para estaquiose). Tais oligossacarídeos não foram detectados nas sementes com 8% de água sem armazenamento (tabela 22).

Observou-se redução de cerca de 10 vezes nos teores de rafinose e estaquiose nos eixos embrionários de sementes recém colhidas pau-brasil após o armazenamento a -18 °C. De maneira oposta, nos eixos de sementes com 8% de água, o congelamento elevou significativamente os teores desses açúcares (8,2 mg g⁻¹ MS de rafinose e 5,4 mg g⁻¹ MS estaquiose). Nos demais teores de água, não foram observadas alterações nas quantidades desses açúcares.

Inicialmente, a estaquiose só foi detectada nos eixos embrionários de sementes recém coletadas e nas secas até 12% de água. Contudo, o congelamento ocasionou o acúmulo de estaquiose nos eixos embrionários de sementes secas até 8 e 5,4% de água, sendo este aumento maior nas amostras armazenadas com 8% de água, assim com o observado para rafinose.

Também foram quantificados os açúcares solúveis individuais em sementes de *Erythrina speciosa* recém colhidas e armazenadas à temperatura ambiente e a -18 °C, sendo realizadas análises separadas para os eixos embrionários e cotilédones (figura 16).

De maneira geral, observa-se que as sementes de *Erythrina* apresentam sacarose (116-164 mg g⁻¹ MS) e rafinose (129-143 mg g⁻¹ MS) como os carboidratos solúveis majoritários dos eixos embrionários (figura 16A). Foram encontradas, também, grandes quantidades de estaquiose (41-54 mg g⁻¹ MS), enquanto os ciclitóis representaram apenas 1-3% dos açúcares encontrados nesses tecidos. Por outro lado, glucose e frutose apareceram em concentrações inferiores a 1 mg g⁻¹ MS (cada), portanto, como traços. Comparando-se os açúcares dos eixos embrionários das sementes recém colhidas de eritrina com aquelas armazenadas por três anos em temperatura ambiente observa-se um aumento nas quantidades de ciclitóis, sacarose e estaquiose. A quantidade de rafinose variou muito entre os tratamentos, tendendo a reduzir com o armazenamento em temperatura ambiente. O armazenamento a -18 °C também ocasionou aumento de ciclitóis e,

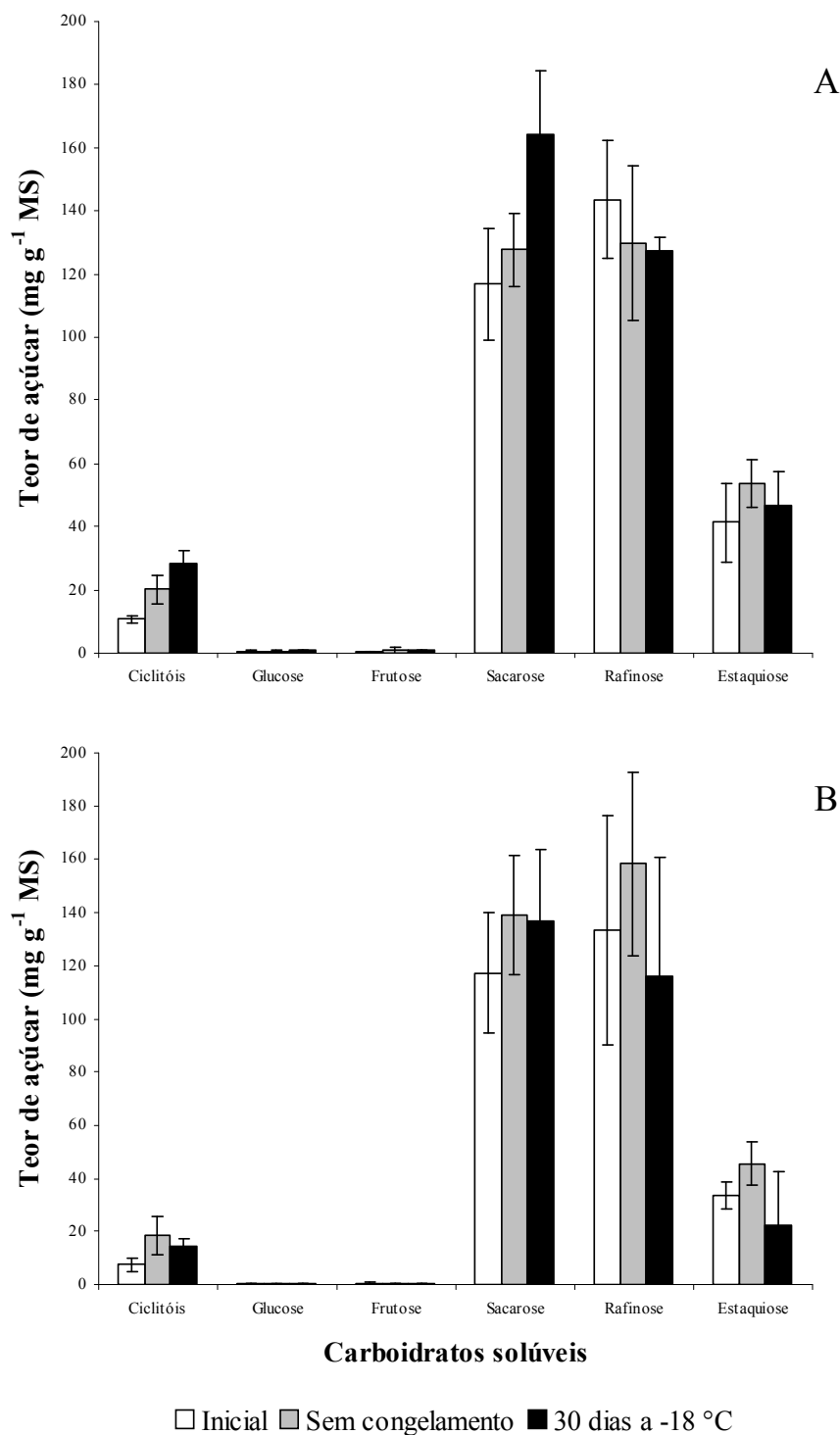


Figura 16. Carboidratos solúveis (mg g⁻¹ MS) de eixos embrionários (A) e de cotilédones (B) de sementes de *Erythrina speciosa* recém coletadas (lote 2007), coletadas em 2004 (sem congelamento) e armazenadas por 30 dias a -18 °C (lote 2004).

principalmente sacarose. Embora em pequena quantidade, a glucose também aumentou nas sementes congeladas, enquanto houve redução no teor de rafinose e de estaquiose, sendo esta redução mais discreta na rafinose.

6 Discussão

6.1 *Variações fisiológicas e bioquímicas nas sementes recém coletadas das espécies estudadas*

As sementes recém colhidas de *Inga vera* (ingá) e *Eugenia uniflora* (pitanga) apresentaram teor de água superior a 54%, valor considerado elevado se comparado aos obtidos para *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) e *Erythrina speciosa* (eritrina) com 16 e 12% de água, respectivamente. Estes dados estão de acordo com informações da literatura que dão conta de que sementes de várias espécies de *Inga* (Farrant *et al.* 1988) e de *Eugenia* (Delgado & Barbedo 2007) estão entre aquelas que não apresentam redução do teor de água ao final do processo de maturação, sendo dispersas com elevado conteúdo de água, diferentemente das sementes consideradas ortodoxas, como as de pau-brasil (Barbedo *et al.* 2002) e de eritrina (Nkang 2002).

As sementes de ingá estudadas apresentaram teor de água inicial inferior ao obtido (67%) por Andréo *et al.* (2006) e Bonjovani (2007), mas este fato não afetou a alta capacidade germinativa dessas sementes, sendo confirmada no presente trabalho.

Por outro lado, os teores de água das sementes recém colhidas de pitanga nos dois anos de coleta (2005 e 2006) foram superiores aos encontrados por Delgado & Barbedo (2007) e Santana (2007), embora a germinação (superior a 95%) também não tenha apresentado alteração em função da diferença do teor de água. Esse alto poder germinativo tem sido considerado um dos motivos da grande utilização de sementes de *E. uniflora* como principal meio de propagação da espécie (Gentil & Minamo 2005).

As sementes de *C. echinata* apresentaram teor de água ligeiramente superior ao obtido por Hellmann (2006), o que pode ser explicado pelo tipo de coleta adotado, uma vez que o autor utilizou sementes após a dispersão natural e no presente trabalho as sementes foram obtidas de frutos coletados nas plantas-mãe. A diferença no método de coleta pode ser evidenciada, ainda, na porcentagem de germinação, que foi superior (90%) quando os frutos foram coletados imediatamente antes da dispersão natural das sementes, evitando intempéries, predação e outros fatores que poderiam resultar na redução da qualidade das sementes.

As sementes de *E. speciosa*, consideradas ortodoxas e com alta capacidade germinativa (Koszo 2006), apresentaram teor de água inferior às sementes de pau-brasil, o que poderia ser explicado pela presença do tegumento impermeável que as reveste, impedindo a aquisição de umidade do ar. Por outro lado, o tegumento das sementes de pau-brasil possui numerosos estômatos (Teixeira *et al.* 2004), o que poderia explicar a rápida absorção de água por essas sementes.

Quanto mais negativo é o potencial hídrico de um sistema, menor é a disponibilidade de água (Castro & Hilhorst 2004). Desta forma, é de se esperar que sementes com menor teor de água apresentem maior potencial hídrico, inversamente ao que ocorre com sementes com maior teor de água que devem apresentar potencial hídrico menos negativo, uma vez que convenciou-se que o potencial hídrico da água pura (toda água está disponível) é zero. De maneira geral, as sementes recém coletadas de *I. vera* e *E. uniflora* apresentaram potencial hídrico por volta de -1,5 MPa, o que segundo Vertucci & Farrant (1995), corresponde à água do tipo 5, que é considerada água totalmente livre, não ligada a macromoléculas.

Os valores iniciais de teor de água e de potencial hídrico das sementes de *C. echinata* e *E. speciosa* são correspondentes ao potencial da água do tipo 2, não congelável (Vertucci & Farrant 1995). Esses teores são considerados valores de água "seguros" para o congelamento das sementes, o que de fato pode ser confirmado no presente trabalho pela elevada porcentagem de germinação das sementes após o armazenamento a - 18 °C.

A quantificação de açúcares solúveis das sementes das quatro espécies analisadas também permitiu enquadrá-las em duas categorias, uma incluindo sementes que apresentam maior quantidade de carboidratos solúveis e outra com sementes que apresentam menor quantidade desses compostos. No primeiro grupo enquadram-se as sementes de *C. echinata* e *E. speciosa*, ambas ortodoxas e no outro grupo as sementes de *I. vera* e *E. uniflora*, que apresentam sensibilidade à dessecação. Segundo Pritchard *et al.* (1995) a intolerância à dessecação das sementes recalcitrantes poderia estar relacionada com os baixos níveis de açúcares solúveis presentes nas sementes dessas espécies.

Dentre os açúcares solúveis das sementes das quatro espécies analisadas a maior quantidade foi de sacarose (37-84,9%), com variações particulares para cada espécie. Nas sementes intolerantes à dessecação, a sacarose representou mais de 70% dos açúcares totais, seguida por frutose (14,6% dos carboidratos solúveis) em *E. uniflora* e ciclitóis (9,8%) em *I. vera*.

Quanto às sementes de *C. echinata*, que apresentam tolerância à dessecação, mas que não suportam armazenamento em temperatura ambiente (Barbedo *et al.* 2002), também foi encontrada grande quantidade de sacarose nos eixos embrionários e nos cotilédones (68-81%, respectivamente), além de ciclitóis galactosilados (23-13,8%, respectivamente), confirmando trabalhos anteriores (Borges *et al.* 2006 e referências contidas) que sugeriram que a tolerância à dessecação e ao congelamento dessas sementes poderia estar relacionada às altas concentrações de sacarose, em adição aos ciclitóis. As sementes de *E. speciosa*, tolerantes à dessecação e ao congelamento, além de sobreviverem ao armazenamento em temperatura ambiente por muitos anos, também apresentaram alta proporção de sacarose, mas ainda, grande quantidade de oligossacarídeos da série da rafinose (OSR), principalmente rafinose e estaquiose.

Klotke *et al.* (2004) indicaram um possível papel indireto da sacarose na aclimação ao frio em plantas transgênicas de *Arabidopsis thaliana*, atuando como substrato metabólico para a síntese de compostos crioprotetores em vez de, ou além de, um efeito crioprotetor direto desse dissacarídeo. Segundo Peterbauer & Richter (2001) sementes de algumas espécies de Leguminosae

acumulam ciclitóis galactosilados que 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 para a tolerância das sementes à dessecação (Obendorf 1997), o que geralmente vem sendo atribuído aos OSR (Hincha *et al.* 2007 e referências contidas). Estes OSR foram encontrados em quantidades mínimas ou ausentes nas sementes de ingá, pitanga e pau-brasil, porém os ciclitóis galactosilados das sementes de *C. echinata* poderiam ter papel similar ao destes açúcares na tolerância à dessecação dessas sementes (Borges *et al.* 2007), como já comentado. A presença de altas quantidades de OSR nas sementes de *E. speciosa* sugere que esses compostos façam parte dos mecanismos de proteção das membranas celulares e promotores da elevada resistência dessas sementes à dessecação, como proposto por Hincha *et al.* (2006) para os frutanos de gramíneas de regiões temperadas, usando como modelo experimental lipossomos isolados.

Sementes de ingá, pitanga e cotilédones de pau-brasil apresentaram grande proporção de amido (42-63%), enquanto que os eixos de *C. echinata* e eixos e cotilédones de eritrina apresentaram menos de 10% desse polissacarídeo. Essa baixa quantidade de amido poderia ser compensada pela alta proporção de açúcares solúveis. Com a embebição e conseqüente início da germinação, os tecidos embrionários necessitam de energia de rápida mobilização, o que poderia explicar o acúmulo de açúcares mais facilmente metabolizáveis, como mono ou dissacarídeos, mais eficientes para o desenvolvimento inicial das plântulas.

A mesma associação feita entre a presença em menor ou maior quantidade de carboidratos solúveis para separar sementes tolerantes ou não à dessecação não pode ser empregada com relação ao amido, uma vez que foi detectada grande quantidade deste polissacarídeo nos cotilédones de *C. echinata* (tolerantes) e nas sementes de *I. vera* e *E. uniflora* (intolerantes).

Por outro lado, torna-se possível também agrupar as sementes estudadas em duas categorias quando se analisa a porcentagem de lipídios. Eixos embrionários e cotilédones de eritrina e de pau-brasil apresentaram rendimento de lipídios muito superior às sementes recalcitrantes

estudadas (*I. vera* e *E. uniflora*), dando indícios de que a maior quantidade de lipídios poderia estar associada a mecanismos de proteção contra estresses hídricos.

Pritchard *et al.* (1995) analisando a porcentagem de lipídios extraídos de sementes de outras espécies de *Inga*, também intolerantes à dessecação, constataram a baixa quantidade desse composto (3,8-0,6%), entretanto em sementes de *Citrus* (tolerantes a dessecação) foram encontradas altas quantidades (37-52%) de lipídios. Em espécies da caatinga e do cerrado, como *Caesalpinia pyramidalis*, *Erythrina velutina* e *Dalbergia miscolobium*, que naturalmente estão expostas ao estresse hídrico em alguma época do ano, foram encontrados elevados teores de lipídios (23%, 11,2% e 33%, respectivamente) (Mayworm *et al.* 1998, Silva *et al.* 1998).

A maioria dos ácidos graxos presentes nas sementes das quatro espécies foram aqueles compostos por cadeias com 16-20 carbonos, sendo o ácido palmítico o mais freqüente e abundante nas sementes das espécies analisadas (13-66,6%).

Não foram observados ácidos graxos com mais de duas insaturações nas amostras analisadas, embora não seja descartada a presença destes nas espécies em estudo.

Se a presença de ácidos graxos insaturados nas membranas aumenta sua fluidez e por consequência, sua estabilidade e proteção à seca, a maior proporção de ácidos insaturados nas sementes de *C. echinata* e *E. speciosa* poderia estar relacionada à tolerância destas sementes à dessecação. Seguindo o mesmo raciocínio, as sementes de *I. vera*, que não apresentaram tais ácidos graxos, e as sementes de *E. uniflora*, que apresentaram pequena quantidade destes, seriam mais susceptíveis aos danos causados pela seca, uma vez que suas membranas seriam mais enrijecidas, devido à pequena proporção ou ausência de ácidos graxos insaturados (Stryer 1996).

As sementes de *C. echinata* e *E. speciosa* apresentaram menor proporção de ácido palmítico (13-21%) em relação às sementes de *I. vera* e *E. uniflora*. Valores similares aos obtidos para as sementes ortodoxas estudadas foram observados nas sementes de *D. miscolobium*, *E. velutina* e *C. pyramidalis*, assim como altas proporções de ácido oléico e linoléico, ambos ácidos graxos insaturados (Silva *et al.* 1998, Mayworm *et al.* 1998).

As sementes de *Erythrina speciosa* estudadas apresentaram teor de ácido oléico similar aos encontrados nas sementes de *Erythrina velutina* (51,8 e 51,0%, respectivamente). Da mesma forma, nas sementes de *C. echinata* (presente trabalho) e nas de *C. pyramidalis*, o ácido linoléico foi encontrado em teores superiores a 40% nas duas espécies (Mayworm *et al.* 1998).

Numa revisão realizada por Liu *et al.* (2006), os autores observaram que sementes com comportamento ortodoxo apresentavam maior proporção de ácido linoléico (C18:2), enquanto aquelas com comportamento recalcitrante apresentavam maior proporção de ácido linolênico (C18:3). Embora esses dois ácidos graxos apresentem insaturações e poderiam aumentar a fluidez das membranas, Smith & Berjak (1995) afirmam que os ácidos graxos poliinsaturados são mais susceptíveis à peroxidação lipídica, são inativadoras de proteínas de membrana e conseqüentemente alteram a permeabilidade das membranas. Desta forma a maior proporção de ácidos graxos com três insaturações nas sementes intolerantes à dessecação poderia ser um dos fatores responsáveis pela sensibilidade destas a baixos teores de água.

6.2 Efeitos da dessecação e do congelamento sobre a fisiologia e os compostos de reserva das sementes

A velocidade de secagem é considerada fundamental para a avaliação do limite de tolerância à dessecação das sementes. Berjak & Pammenter (2000) consideraram que quanto mais rápida for a secagem, maior o grau de desidratação suportado pela semente. Por outro lado, Rosa *et al.* (2005) observaram que os melhores resultados para sementes de *Coffea canephora* foram obtidos com secagem com velocidades intermediárias (0,5% por hora), em comparação com as secagens rápidas (1,25% por hora) ou lentas (0,15% por hora). Para as sementes *Inga vera*, Faria (2006) observou que a velocidade de secagem não influenciava a porcentagem de germinação.

Nas espécies estudadas, as sementes de *C. echinata* apresentaram redução do teor de água de aproximadamente 0,7% por hora, enquanto que as sementes de ingá e pitanga apresentaram

velocidade de secagem de 0,9 e 1,3% por hora, respectivamente. Se compararmos as duas espécies sensíveis à dessecação, as sementes de *E. uniflora* foram as que apresentaram a maior velocidade de secagem, além de terem apresentado menores reduções na qualidade fisiológica, em comparação com as sementes de *I. vera*.

As sementes de *C. echinata*, por apresentarem menor teor de água inicial, atingiram baixos teores de água em menor tempo que as sementes recalcitrantes estudadas.

A redução do teor de água das sementes de *I. vera* foi acompanhada por redução nas porcentagens de germinação e de desenvolvimento de plântulas normais. O primeiro indício da perda de qualidade das sementes foi observado pela redução do índice de velocidade de germinação, já no primeiro nível de secagem, seguido pela redução do desenvolvimento de plântulas e por último pela redução da porcentagem de germinação.

A germinação foi reduzida drasticamente (42% a menos) quando o teor de água das sementes de ingá atingiu 40%. Bonjovani (2007) observou comportamento similar quando reduziu o teor de água das sementes de *I. vera* até 42%, porém conseguiu ainda 84% de germinação. Teor de água próximo a 30% parece ser letal para as sementes de *I. vera*, pois abaixo desse valor há perda total da viabilidade das sementes (Hong & Ellis 1992, Bilia *et al.* 1998). Da mesma forma que o observado no presente trabalho, Faria (2006) não registrou germinação em sementes de *I. vera* submetidas à dessecação até 28% de água e considerou o teor de água crítico para a espécie entre 43-50% de água, valores estes similares aos obtidos por Pritchard *et al.* (1995) para sementes do gênero *Inga*.

As sementes de *E. uniflora* apresentaram redução da capacidade germinativa após serem submetidas à dessecação a partir de 38% de água, porém com cerca de 34% estas ainda apresentavam alta germinação e só após atingirem 28,4% de água ou menos é que foi detectada a redução da capacidade germinativa destas sementes.

Segundo Delgado & Barbedo (2007) as sementes de *E. uniflora* são consideradas intermediárias, iniciando a perda de viabilidade com teor de água de 45-50%, valores estes superiores aos encontrados no presente trabalho.

Segundo Marcos Filho (2005), grande parte das sementes recalcitrantes é melhor armazenada quando apresenta água do tipo 4 que, de acordo com a classificação de Vertucci & Farrant (1995), baseada no modelo de ligação da água com macromoléculas, corresponde ao teor de água entre 33 e 41% e potencial hídrico de -4 a -1,5 MPa. As sementes de ingá secas até este nível apresentaram início da redução da capacidade germinativa, mas a secagem foi letal quando as sementes atingiram cerca de -11 MPa, água do tipo 2, que corresponde ao teor de água entre 20 e 7,5%.

Por outro lado, as sementes de *C. echinata* apresentaram teor de água inicial inferior a 20% (água do tipo 2). Com a secagem artificial, foi possível atingir valores de potencial hídrico inferiores a -130 MPa para as sementes de pau-brasil, sendo a água presente nessas sementes a do tipo 1, que representa a água estrutural, fortemente associada a macromoléculas, onde a atividade metabólica é bastante restrita.

Mesmo atingindo teor de água inferior a 10%, as sementes de pau-brasil mantiveram alta porcentagem de germinação, tal qual foi observado para as sementes recém coletadas. Neste teor de água (água do tipo 1), as sementes sobreviveram em um estado extremamente seco, o que é uma característica marcante das sementes ortodoxas (Alpert 2005, Berjak 2006).

Baixos teores de água favorecem o armazenamento de sementes ortodoxas sob temperaturas muito baixas porque suportam a presença de água do tipo 1 ou 2, que são não congeláveis em temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água pura (Villela & Marcos Filho 1998), em razão da formação do estado vítreo, o que auxilia na manutenção da integridade das membranas.

Além disso, a presença de mecanismos antioxidativos e de desdiferenciação de organelas, entre outros mecanismos, são importantes na aquisição da tolerância à dessecação (Castro &

Hilhorst 2004, Faria *et al.* 2005) das sementes, sendo que o conhecimento da composição química das sementes assume papel fundamental no armazenamento dessas.

O armazenamento por 30 dias a -18 °C foi letal para as sementes de *I. vera* e *E. uniflora*, independente do teor de água no qual foram armazenadas. No entanto, as sementes de *C. echinata* e *E. speciosa* suportaram baixos teores de água e o congelamento. Segundo o conceito de sementes ortodoxas, estas têm de tolerar a redução do teor de água para suportarem o armazenamento a -18 °C e serem capazes de voltar à normalidade quando re-hidratadas (Roberts 1973, Alpert 2005, Berjak 2006). Desta forma, ratifica-se a idéia de que sementes de ingá e pitanga são recalcitrantes e as sementes de pau-brasil e eritrina são ortodoxas. Porém, comparando-se as respostas de *I. vera* e *E. uniflora* à dessecação, observa-se que as sementes de ingá são mais sensíveis à perda de água do que as de pitanga, confirmando a proposta de Ellis *et al.* (1990) de que existe um gradiente de tolerância à dessecação, formando um grupo das sementes intermediárias, no qual as sementes de *E. uniflora* podem ser enquadradas (Delgado & Barbedo 2007).

A dessecação das sementes ocasionou o aumento dos carboidratos totais nas sementes de *I. vera*, de *E. uniflora* e de *E. speciosa* (eixos embrionários). Segundo Leduc (2007) houve aumento dos carboidratos solúveis nos eixos e cotilédones de sementes imaturas de *C. echinata* em função da secagem lenta, porém este comportamento não se repetiu no presente estudo com sementes maduras e submetidas à secagem rápida. Aumento de carboidratos solúveis após exposição das plantas ao estresse hídrico foi relatado também para folhas e raízes de *Solanum lycocarpum* (Chaves Filho & Stacciarini-Seraphin 2001) e para calos de *Dendrobium candidum* (Bian *et al.* 2002).

Nas sementes de *I. vera*, o congelamento ocasionou diferentes modificações nas quantidades de carboidratos solúveis dependendo do teor de água com o qual as sementes foram armazenadas. Assim, em resposta ao congelamento, as sementes de ingá armazenadas com teor de água de 54% apresentaram aumento de 30% dos açúcares totais, assim como foi observado por Renaut *et al.* (2005) ao submeterem plântulas de *Populus tremula* a 4 °C.

Por outro lado, o congelamento ocasionou aumento nos teores de carboidratos solúveis apenas nas sementes de *E. uniflora* com menor teor de água, com o qual estas já não apresentavam germinação. Nos teores de água de 45 e 39%, as sementes de pitanga iniciaram a redução da capacidade germinativa e quando foram congeladas com estes teores de água apresentaram redução dos açúcares totais e não germinaram. Nas sementes submetidas à secagem e que apresentavam 100% de germinação, e nas secas até 28%, com baixíssima germinação, não houve alteração no teor de carboidratos solúveis com o congelamento.

Quanto às sementes de *C. echinata*, tanto os eixos embrionários quanto os cotilédones com teor de água inicial, apresentaram aumento na quantidade de carboidratos solúveis após o congelamento, assim como observado para sementes de *I. vera*, porém lembrando que as sementes congeladas de pau-brasil mantiveram alta capacidade germinativa, enquanto que as de ingá perderam completamente a viabilidade após o armazenamento a -18 °C.

Hellmann *et al.* (2008) também encontraram aumento dos carboidratos solúveis nos eixos embrionários de sementes secas (12% de água) de *C. echinata* após o armazenamento por 90 dias a -18 °C, mantendo-se estável nos cotilédones.

Embora as sementes de pau-brasil apresentem diferenças na quantidade de carboidratos solúveis durante o congelamento com diferentes teores de água, a germinação destas não foi alterada.

O aumento de açúcares solúveis é geralmente associado a mecanismos de proteção a estresses ambientais, como a seca e o frio. Plantas de *Populus tremula* aclimatadas a 4 °C apresentaram incremento na quantidade de carboidratos solúveis, enquanto que as mantidas a de 23 °C não apresentaram modificação na quantidade inicial desses açúcares (Renaut *et al.* 2005).

A secagem e o congelamento também modificaram a composição dos carboidratos solúveis neutros das espécies estudadas. Assim, os ciclitóis de sementes de *I. vera* recém coletadas ou secas até 20% de água foram maiores e não diferiram estatisticamente, embora nestes teores de água as sementes apresentem comportamentos germinativos opostos (100% e 0% de germinação,

respectivamente). Com o congelamento, esses teores foram reduzidos a quantidades mínimas. As sementes de ingá congeladas com qualquer teor de água não sobreviveram ao armazenamento sob baixas temperaturas.

As sementes de *E. uniflora* apresentaram maior teor de ciclitóis do que as sementes de *I. vera*. Nas sementes germináveis dessa espécie (de 55% a 28% de água) houve um aumento regular de ciclitóis à medida que o teor de água das sementes foi reduzindo, exceto no menor nível de hidratação (19%), no qual houve 100% de morte das sementes. Com o congelamento das sementes de pitanga, os teores de ciclitóis estabilizaram ou diminuíram em todos os tratamentos e a germinação foi nula.

As maiores quantidades de ciclitóis foram encontradas nos eixos embrionários e nos cotilédones de sementes de *C. echinata*. Nos eixos embrionários, o início da redução do teor de água (16% para 11%) ocasionou redução de mais de 45% no teor desses açúcares, porém ao atingirem 8% de água os valores voltaram a aumentar. Nas sementes congeladas o maior teor de ciclitóis foi observado nos eixos de sementes sem secagem, apresentando flutuações nos diferentes tratamentos, sem comprometer a qualidade fisiológica dessas sementes.

Embora também tenham sido observadas pequenas flutuações nos teores de ciclitóis nos cotilédones de sementes de pau-brasil, praticamente mantiveram-se em níveis altos e constantes, assim como foi observado para a germinação dessas sementes. O congelamento ocasionou aumento no teor de ciclitóis dos cotilédones apenas nas sementes não submetidas a secagem.

Nas sementes de *Erythrina speciosa*, o armazenamento (à temperatura ambiente e a -18 °C) propiciou o aumento de ciclitóis apenas nos eixos embrionários, sugerindo que esses tecidos são mais susceptíveis a variações da temperatura.

Os teores de glucose e de frutose foram muito baixos nas sementes de ingá, pau-brasil e eritrina quando comparados aos valores encontrados nas sementes de pitanga e apresentaram flutuações pouco significativas nos diferentes tratamentos de secagem e congelamento. As variações nos níveis dessas hexoses nessas sementes aparentemente não estão relacionadas com a

capacidade germinativa delas. Por outro lado, as sementes de *E. uniflora* foram as que apresentaram os maiores teores de glucose e de frutose, aumentando à medida que o teor de água das sementes foi diminuindo, independentemente da viabilidade das sementes, secas ou armazenadas.

Dentre as sementes de *E. uniflora* as recém coletadas foram as que apresentaram os menores teores de hexoses, atingindo valores máximos nas sementes com o teor de água letal (19%). O armazenamento a -18 °C reduziu a quantidade desses açúcares em todos os tratamentos, exceto no teor de água letal.

A sacarose foi o açúcar mais abundante nas sementes de *I. vera* e se manteve constante com a redução do teor de água e da capacidade germinativa, não se alterando com o armazenamento a -18 °C. Por outro lado, nas sementes de pitanga houve um aumento expressivo de sacarose logo no primeiro nível de secagem mantendo-se relativamente estável nos demais teores de água, enquanto o congelamento ocasionou aumento gradual de sacarose em função do teor de água das sementes. Independentemente da viabilidade, os teores de sacarose encontrados nas sementes de pitanga foram sempre altas.

Nas sementes ortodoxas de *C. echinata* e de *E. speciosa* os teores de sacarose nos eixos e nos cotilédones também foram altos e mantiveram relativa estabilidade. O congelamento destas sementes ocasionou aumento de sacarose na maioria dos tratamentos, sem, contudo modificar a resposta germinativa das sementes de pau-brasil e eritrina, que se mantiveram sempre altos.

A rafinose e a estaquiose foram praticamente ausentes nas sementes de *I. vera* e de *E. uniflora*, sendo encontradas como traços nas sementes não armazenadas e não submetidas à secagem e que apresentavam 100% de germinação.

Esses dois oligossacarídeos foram encontrados em quantidades superiores nas sementes de *C. echinata* se comparadas com as sementes de ingá e pitanga, porém tais quantidades foram reduzidas com a dessecação e o congelamento. Ao contrário, nos eixos embrionários e nos cotilédones de *E. speciosa* esses oligossacarídeos foram os açúcares predominantes, sendo equivalentes à proporção de sacarose encontrada nessas sementes. Com o armazenamento a -18 °C

houve pequena redução nos OSR, mas mantiveram-se ainda superiores aos valores obtidos para as demais espécies.

A partir da conjugação de *myo*-inositol com UDP-D-galactose forma-se o galactinol, doador de galactosila para a biossíntese de rafinose (Obendorf 1997), evidenciando o possível envolvimento do *myo*-inositol no processo de crioproteção das sementes. A partir da análise dos açúcares individuais nas sementes das quatro espécies estudadas, foi possível relacionar a presença dos OSR e dos ciclitóis, como o *myo*-inositol, no processo de aquisição de tolerância à dessecação das sementes de eritrina (apresentando os OSR como crioprotetores) e de pau-brasil (ciclitóis como possíveis crioprotetores) além, é claro, da participação da sacarose juntamente com esses açúcares. Utilizando lipossomas como modelo experimental, Hinch *et al.* (2006) verificaram que os fruto-oligossacarídeos e os OSR apresentam maior eficiência na proteção das membranas durante a dessecação do que os malto ou mano-oligossacarídeos.

A formação do estado vítreo é um dos mecanismos desenvolvidos pelos organismos vivos para sobreviver à desidratação, porém tanto sementes tolerantes à dessecação quanto as intolerantes são capazes de formar este estado vítreo durante o processo de secagem, embora somente as sementes tolerantes sobrevivam após a formação do estado vítreo (Horbowick & Obendorf 1994).

A quantidade de amido alterou pouco com a dessecação das sementes de *I. vera*, tendendo a reduzir com o congelamento. O mesmo ocorreu com as sementes de *E. uniflora* e tais reduções estão coerentes com o aumento de açúcares totais, possivelmente resultantes da hidrólise do amido.

A redução deste polissacarídeo nas sementes de *C. echinata* com o menor teor de água não ocorreu somente devido à conversão em monossacarídeos, uma vez que não houve aumento destes com a secagem, mas, possivelmente, também devido à mobilização e utilização deste como substrato respiratório, pois as sementes apresentavam-se vivas e metabolicamente ativas.

Com a redução de água, as sementes de *I. vera* secas até 20% de água (portanto inviáveis), apresentaram cerca de duas vezes mais lipídios do que as sementes com teores de água variando de

54 a 29% (viáveis). Com o congelamento, os teores de lipídios apresentaram pequenas flutuações, embora sem qualquer relação com a resposta germinativa.

Apesar de as sementes de *E. uniflora* serem menos sensíveis à dessecação do que as sementes de ingá e apresentarem maior quantidade de lipídio também não houve alteração desse composto durante os tratamentos de secagem e congelamento e nem relação com a capacidade germinativa.

Por outro lado, os eixos embrionários de sementes de *C. echinata* apresentaram aumento no teor de lipídios em função da secagem, porém, independentemente dos teores de lipídios e de água, as sementes de pau-brasil mantiveram-se sempre viáveis em todos os tratamentos.

Pelo fato dos óleos e gorduras atuarem como isolantes térmicos, acredita-se que quanto maior for a quantidade de lipídios, maior será a proteção, tanto em tecidos animais quanto em vegetais (Bar-Or 1988). Os dados obtidos no presente trabalho, para as diferentes espécies estudadas, indicaram maiores teores de lipídios nas sementes tolerantes à dessecação e ao frio, o que está de acordo com a suposição acima.

Estudos dos óleos obtidos de carpa (*Cyprinus carpio*), espécie de peixe comum de águas frias, indicam que os lipídios representam em sua musculatura cerca de 10% do peso seco, sendo que mais de 66% dos ácidos graxos são insaturados (Druzian *et al.* 2007). Assim, não apenas o teor de lipídios deve ser considerado, mas também o perfil dos ácidos graxos constituintes.

A maior proporção de ácidos graxos insaturados nas sementes ortodoxas (*E. speciosa* e *C. echinata*) reforça a suposição de que a presença de duplas ligações entre os átomos de carbono nas moléculas de ácido graxo, confere maior proteção contra estresses hídrico e térmico. Não é possível afirmar, no entanto, que sejam as únicas responsáveis pela tolerância à dessecação e a baixas temperaturas. Contudo, juntamente com outros mecanismos de proteção, como a presença de OSR, sacarose, ciclitóis, além das proteínas LEA, a presença de duplas ligações nos ácidos graxos poderia minimizar os danos causados pela retirada de água dos organismos e pela exposição a temperaturas extremas, permitindo a sobrevivência.

6.3 Conclusões

- As sementes de *I. vera* e *E. uniflora* não toleraram o congelamento em qualquer nível de secagem;
- Os polissacarídeos foram a principal reserva das sementes estudadas (mais de 40%) e suas variações aparentemente não foram relacionadas com a tolerância à secagem e ao congelamento;
- O teor de carboidratos solúveis nas sementes ortodoxas foi superior ao das sementes recalcitrantes e poderia estar relacionado com a proteção à dessecação e ao congelamento;
- A sacarose, principal açúcar das sementes das espécies estudadas, variou com a secagem de forma semelhante à variação dos carboidratos solúveis totais;
- Os ciclitóis corresponderam à metade do valor de sacarose em *C. echinata* e mantiveram níveis altos com a secagem e com o congelamento das sementes;
- A proporção de OSR foi equivalente à de sacarose em *E. speciosa* e se manteve em níveis altos após o congelamento das sementes;
- O teor de lipídios foi inferior a 1% nas sementes que não toleraram a dessecação e foi superior a 10% nas sementes tolerantes à dessecação;
- A maior proporção de ácidos graxos insaturados nas sementes de *C. echinata* e *E. speciosa* reforçou a possível relação entre esses compostos e a tolerância à dessecação das sementes;
- A diversidade de ácidos graxos foi maior nas sementes ortodoxas e variou com a dessecação, enquanto nas sementes recalcitrantes o ácido palmítico (saturado) foi o componente majoritário (>70%) e não variou com a dessecação;
- O alto teor de lipídios, a presença de ácidos graxos monoinsaturados e de grandes proporções de OSR nas sementes de *E. speciosa* indicaram que esses compostos possivelmente estejam relacionados com a maior longevidade dessas sementes durante o armazenamento à temperatura ambiente, evitando danos por desidratação e oxidação;

- Não pode ser descartada a participação de outros compostos como proteínas e substâncias antioxidantes, que têm papel vital nos processos de desidratação, e também a interação destes compostos com os carboidratos e os lipídios no comportamento das sementes das espécies estudadas.

7 Referências bibliográficas

- Alencar, V.B.M., Melo, S.C., Albuquerque, K.F., Figueiredo, I.S.T., Tupiinambá, D.D., Freitas, B.T., Alencar, N.M.N., Sampaio, A.H., Ribeiro, R.A. & Cavada, B.S.** 2002. Pro-inflammatory effect of galactose binding lectin isolated from *Caesalpinia echinata* Lam. Seeds. In: T.C. Boo-Hansen (ed.). Lectins, Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry 16. Lemchesvej (DK): Textop Publisher.
- Alpert, P.** 2005. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. Integr. Comp. Biol. 45: 685-695.
- Amaral, L.I.V., Costa, P.M.F., Aida, 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 para publicação).
- Andréo, Y., Nakagawa, J. & Barbedo, C.J.** 2006. Mobilização de água e conservação da viabilidade de embriões de sementes recalcitrantes de ingá (*Inga vera* Will. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington). Revista Brasileira de Botânica 29: 309-318.
- Auricchio, M.T. & Bacchi, E.M.** 2003. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. Revista Instituto Adolfo Lutz 62(1): 55-61.
- Bacchi, O.** 1961. Estudos sobre a conservação de sementes IX – Ingá. Bragantia 20(35): 805-814.
- Bachmann, M., Matile, P. & Keller, F.** 1994. Metabolism of the raffinose family oligosaccharides in leaves of *Ajuga reptans*: cold acclimation, translocation and sink to source transition: discovery of chain elongation enzyme. Plant Physiology 105: 1335-1345.
- Barbedo, C.J. & Cicero, S.M.** 1998. Utilização do teste de condutividade elétrica para previsão do potencial germinativo de sementes de ingá. Scientia Agrícola 55: 249-259.
- Barbedo, C.J. & Marcos Filho, J.** 1998. Tolerância à dessecação em sementes. Acta Botânica Brasília 12: 145-164.

- Barbedo, C.J., Barbedo, A.S.C., Nakagawa, J., Sato, O.** 1999. Efeito da idade e do repouso pós-colheita de frutos de pepino na semente armazenada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34(5): 839-847.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (paubrasil). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 431-439.
- Barbedo, C.J., Kohama, S., Maluf, A.M. & Bilia, D.A.C.** 1998. Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (*Eugenia involucrata* DC. - Myrtaceae) em função do teor de água. *Revista Brasileira de Sementes* 20(10): 184-188.
- Bar-Or, O.** 1998. Respostas do organismo de crianças à prática de exercício em climas frios: implicações na saúde. *Nutrição no esporte* 18: 1-5.
- Berjak, P. & Pammenter, N.** 2000. What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12: 22-55.
- Berjak, P.** 2006. Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms. *Seed Science Research* 16: 1–15.
- Bewley, C.A.** 2001. Solution structure of a cyanovirin-N:Man1-2Man6 complex: structural basis for high-affinity carbohydrate-mediated binding to gp120. *Structure* 9: 931-940.
- Bewley, J.D. & Black, M.** 1985. *Seeds: Physiology of development and germination*. New York. Plenum Press.
- Bezerra, J.C.B., Silva, I.A., Ferreira, H.D., Ferri, P.H. & Santos, S.C.** 2002. Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of the Brazilian Cerrado medicinal plants. *Fitoterapia* 73(5): 428-430.
- Bian, H.-W., Wang, J.-H., Lin, W.-Q., Han, N. & Zhu, M.-Y.** 2002. Accumulation of soluble sugars, heat-stable proteins and dehydrins in cryopreservation of protocorm-like bodies of *Dendrobium candidum* by the air-drying method. *Journal of Plant Physiology* 159(10): 1139-1145.

- Bilia, D.A.C & Barbedo, C.J.** 1997. Estudos de germinação e armazenamento de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Científica 25(2): 379-391.
- Bilia, D.A.C., Marcos-Filho J. & Novembre A.D.L.C.** 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. Revista Brasileira de Sementes 20(1): 48-54.
- Blackman, S.A., Obendorf, R.L. & Leopold, A.C.** 1995. Desiccation tolerance in developing soybean seeds: the role of stress proteins. Physiologia Plantarum 93: 630–638.
- Bonjovani, M.R.** 2007. Armazenamento de embriões de *Inga vera* ssp. *Affinis* (DC.) T.D. Pennington (Leguminosae) sob baixa temperatura. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Borges, I.F.** 2007. Maturação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) em bosques plantados no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Borges, I.F., Barbedo, C.J., Richter, A.A. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2006. Variations 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.
- Bruni, F. & Leopold A.C.** 1991. Glass transitions in soybean seed, relevance to anhydrous biology. Plant Physiology 96: 660-663.
- Buckeridge, M.D., Aidar, M.P.M., Santos, H.P. & Tiné, M.A.S.** 2004. Acúmulo de reservas. In: A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, pp. 31-50.
- Buckeridge, M.S., Panegassi, V.R., Rocha, D.C. & Dietrich, S.M.** 1995. Seed galactomannan in the classification and evolution of the Leguminosae. Phytochemistry 38(4): 871-875.
- Buckeridge, M.S., Santos, H.P., Tiné, M.A.S. & Aidar, M.P.M.** 2004a. Mobilização de reservas. In: A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, pp.164-185.

- Budke, J.C., Athayde, E.A., Giehl, E.L.H., Záchia, R.Q. & Eisinger, S.M.** 2005. Composição florística e estratégias de dispersão de espécies lenhosas em uma floresta ribeirinha, arroio Passo das Tropas, Santa Maria, RS, Brasil. *Iheringia* 60(1): 17-24.
- Caffrey, M., Fonseca, V. & Leopold, A.C.** 1988. Lipid-sugar interactions. *Plant Physiology* 86: 754-758.
- Carpenter, J.F. & Crowe, J.H.** 1988. The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25(3): 244-255.
- Carvalho, M.A.M. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2001. Variation in fructan content in the underground organs of *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby at different phenological phases. *New Phytologist* 123: 735-740.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 1983. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 2ª ed. rev., Fundação Cargill, Campinas.
- Carvalho, P.E.R.** 1994. Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Embrapa/CNPQ, Brasília.
- Castro, R.D. & Hilhorst, H.W.M.** 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.). Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre, Artmed, pp.51-67.
- Castro, Y.G.P. & Krug, H.P.** 1951. Experiências sobre germinação e conservação de sementes de *Inga edulis* espécie usada em sombreamento em cafeeiros. *Ciência e Cultura* 3(4): 263-264.
- Chaves-Filho, J.T. & Stacciarini-Seraphin, E.** 2001. Alteração no potencial osmótico e teor de carboidratos solúveis em plantas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St.Hil.) em resposta ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Botânica* 24: 199-204.
- Chin, H.F.** 1988. Recalcitrant Seeds - A Status Report. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Close, T.J.** 1997. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100: 291-296.

- Cromarty, A.S., Ellis, R.M. & Roberts, E.H.** 1990. The design of seed storage facilities for genetic conservation. International Board for Plant Genetic Resources, Rome.
- Cruz-Silva, I., Gozzo, A.J. Nunes, V.A., Neuhof, C., Neuhof, H. & Araújo, M.S.** 2004. Effect of inhibitors from *Caesalpinia echinata* on pulmonary edema. Proc. Braz. Soc. Biochem. Mol. Biol. 33: 1.
- Decagon Devices, Inc.** 2001. WP4 Dewpoint PotentaMeter Operator's Manual, Pullman, WA, Decagon Devices, Inc.
- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42(2): 265-272.
- Delgado, L.F.** 2006. Tolerância à dessecação em sementes de espécies brasileiras de *Eugenia*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Demel, R.A., Dorrepall, E., Ebskamp, M.J.M., Smeekens, J.C.M. & De Kruijff, B.** 1998. Fructans interact strongly with model membranes. Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes 1375: 36-42.
- Derbyshire, E., Wright, D. J. & Boulter, D.** 1976. Legumin and vicilin, storage proteins of legume seeds. Phytochemistry 15: 3-24.
- Dias-Tagliacozzo, G.M., Itaya, N.M., Carvalho, M.A.M, Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Dietrich, S.M.C.** 2004. Fructans and water suppression on intact and fragmented rhizophores of *Vernonia herbacea*. Brazilian Archives of Biology and Technology 47: 363-373.
- Dietrich, S.M., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L., Chu, E.P., Buckeridge, M.S.** 1988. O açúcar das plantas. Ciência Hoje 7(39): 42-48.
- Dionne, J., Castonguay, Y., Nadeau, P. & Desjardins, Y.** 2001. Freezing tolerance and carbohydrate changes during cold acclimation of green-type annual bluegrass (*Poa annua* L.) ecotypes. Crop Science 41: 443-451.

- Druzian, J.I, Marchesi, C.M. & Scamparini, A.R.** 2007. Perfil de ácidos graxos e composição centesimal de carpas (*Cyprinus carpio*) alimentadas com ração e com dejetos suínos. *Ciência Rural* 37(2): 539-544.
- Dubois, M., Gilles, A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method of determination of sugars and related substances. *Analitical Chemistry* 28: 350-355.
- Durigan, G., Figliolia, M.B., Kawabata, M., Garrido, M.A. O. & Baitello, J.B.** 1997. Sementes e mudas de árvores tropicais. Páginas & Letras, São Paulo.
- Dussert, S., Chabrillange, N., Rocquelin, G., Engelmann, F., Lopez, M. & Hamon, S.** 2001. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultralow temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition and cooling procedure. *PhysiologiaPlantarum* 112: 495–504.
- Eira, M.T.S.** 1996. Classificação de sementes em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias. *In* Curso Sobre Consevação De Germoplasma Vegetal, Brasília. IICA-PROCISUR, Montevideo, p.119-22. (IICA-PROCISUR, Diálogo, 45).
- Eliasson, A.C.** 1996. Carbohydrates in food. New York : Marcel Dekker.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H.** 1990. An intermediate category of seed sorage behaviour? *Journal of Experimental Botany* 41: 1167-1174.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H.** 1991a. Effect of temperature and moisture content on the germination of papaya seeds. *Seed Science Research* 1: 69-72.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. Roberts, E.H. & Soetisma, U.** 1991b. Seed storage behaviour in *Elaeis guineensis*. *Seed Science Research* 1: 99-104.
- Etcheverry, A.V. & Alemán, C.E.T.** 2005. Reproductive Biology of *Erythrina falcata* (Fabaceae: Papilionoideae). *Biotropica* 37(1): 54-63.
- Faria, J. M.R.** 2006. Desiccation tolerance and sensitivity in *Medicago truncatula* and *Inga vera* seeds. Tese de doutorado, Wageningen University, Wageningen.

- Faria, T.J., Cafêu, M.C., Akiyoshi, G., Ferreira, D.T., Galão, O.F. & Andrei, C.C.** 2007. Alcalóides de flores e folhas de *Erythrina speciosa*. Andrews. Química Nova 30(3): 525-527.
- Farrant, J.M., Pammenter, N.M. & Berjak, P.** 1988. Recalcitrance - a current assessment. Seed Science and Technology 16: 155-66.
- Feder, M.E., Hofmann, G.E.** 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology 61: 243–282.
- Figliolia, M.B. & Kageyama, P.Y.** 1994. Maturação de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. em floresta ripária do rio Moji-Guaçu, Município de Moji-Guaçu. Revista do Instituto Florestal 6: 13-52.
- Flood, R.G. & Sinclair, A.** 1981. Fatty acid analysis of aged permeable and impermeable seed of *Trifolium subterraneum*. Seed Science and Technology 9(2): 475-477.
- Fonseca, S.C.L. & Freire, H.B.** 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. Bragantia 62(2): 297-303.
- 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 Brazilian Atlantic Forest. Brazilian Journal of Biology 66(2B): 739-745.
- Garcia, P.M.** 2006. Efeito do déficit hídrico no metabolismo de frutanos em *Vernonia herbacea* (Vell.) Rusby (Asteraceae). Monografia. Universidade Presbiteriana Mackenzie, São Paulo.
- Gentil, D.F.O. & Ferreira, S.A.N.** 1999. Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (*Eugenia stipitata* ssp. *sororia*). Acta Amazonica 29(1): 21-31.
- Gentil, D.F.O. & Minami, K.** 2005. Uvaieira, pitangueira e jabuticabeira: cultivo e utilização. FEAL, Piracicaba.

- George, R.A.T.** 1985. Vegetable seed production. London, Longman.
- Harman, G.E. & Mattick, L.R.** 1976. Association of lipid oxidation with seed ageing and death. *Nature* 260(5549): 323-324.
- Hellmann, M.E.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Barbedo, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2008. Dinâmica dos carboidratos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) durante o armazenamento sob diferentes temperaturas. (submetido à publicação).
- Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo C.J.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água. *Revista Brasileira de Botânica* 29(1): 93-101.
- Hincha, D.K., Popova, A.V. & Cacela, C.** 2006. Effects of sugars on the stability of lipids membranes during drying, in: Leitmannova Liu (Ed.), *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes* 3: 189-217.
- Hincha, D.K., Livingston III, D.P., Premakumar, R., Zuther, E., Obel, N., Cacela, C. & Heyer A.G.** 2007. Fructans from oat and rye: Composition and effects on membrane stability during drying. *Biochimica et Biophysica Acta* 1768: 1611-1619.
- Hisano, H., Kanazawa, A., Kawakami, A., Yoshida, M., Shimamoto, Y. & Yamada, T.** 2004. Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyl-transferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Science* 167: 861-868.
- Hoekstra, F.A., Golovina, E.A. & Buitink, J.** 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 431-438.
- Hong, T.D. & Ellis, R.H.** 1992. Optimum air-dry seed storage environments for arabica coffee. *Seed Science and Technology* 20: 547-560.

- Hong, T.D. & Ellis, R.H.** 1996. A protocol to determine seed storage behaviour. Rome: International Plant Genetic Resources Institute. 55p. (IPGRI Technical Bulletin, 1).
- Hor, Y.L., Kim, Y. J., Ugap, A., Chabrillange, N., Sinniah, U.R., Engelmann, F., Dussert, S.** 2005. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: *Citrus* as a case study. *Annals of Botany* 95: 1153-1161.
- Horbowicz, M. & Obendorf, R.L.** 1994. Seed desiccation tolerance and storability: dependence on flatulence-producing oligosaccharides and cyclitols – review and survey. *Seed Science Research* 4: 385-405.
- Horbowicz, M., Brenac, P., Obendorf, R.L.** 1998. Fagopyritol B1, *O*- α -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-D-*chiro*-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta* 205: 1-11.
- Hume, D.J. & Jackson, A.K.H.** 1981. Frost tolerance in soybean. *Crop Science* 21: 689-692.
- IBAMA. 1992. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (Brasil). Portaria 37NN, de 3 de abril de 1992. <http://www.ibama.gov.br> (acesso em 28.11.2007).
- Ista.** 1985. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 13: 356-513.
- Joly, A.B.** 1993. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 11.ed. Ed. Nacional, São Paulo.
- Kermode, A.R., Pramanik, S.K. & Bewley, J.D.** 1989. The role of maturation drying in the transition from seed development to germination. VI. Desiccation-induced changes in messenger RNA populations within the endosperm of *Ricinus communis* L. seeds. *Journal of Experimental Botany* 40: 33-37.
- King, M.W. & Roberts, E.H.** 1979. The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches. Rome: IBPGR.
- Klotke, J., Kopka, J., Gatzke, N. & Heyer, A. G.** 2004. Impact of soluble sugar concentrations on the acquisition of freezing tolerance in accessions of *Arabidopsis thaliana* with contrasting cold adaptation – evidence for a role of raffinose in cold acclimation. *Plant, Cell and Environment* 27: 1395-1404.

- Konstantinova, T., Parvanova, D., Atanasov, A. & Djilianov, D.** 2002. Freezing tolerant tobacco, transformed to accumulate osmoprotectant. *Plant Science* 163: 157-164.
- Koster, K.L. & Leopold, A.C.** 1988. Sugars and desiccation tolerance in seeds. *Plant Physiology* 88: 829-832.
- Koszo, C.R.** 2006. Germinação de sementes de *Erythrina speciosa* Andr. e *Eugenia brasiliensis* Lam. em meio ácido. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Kuo, T.M., Van Middlesworth, J.F. & Wolf, W.J.** 1988. Content of raffinose oligosaccharides and sucrose in various plant seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 36: 32-36.
- Laboriau, L.G.** 1983. A germinação das sementes. OEA, Washington.
- Leduc, S.N.M.** 2007. Indução de tolerância à dessecação e variação de carboidratos solúveis em sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) durante a maturação. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Lima, V.L.A.G., Mélo, E.A. & Lima, D.E.S.** 2002. Fenólicos e carotenóides totais em pitanga. *Scientia Agrícola* 59(3): 447-450.
- Linscheer, W.G. & Vergroesen, A.J.** 1994. Lipids. *In*: M.E. Shils, A. Olson & M. Shike (eds.). Modern nutrition in health and disease. 8th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, pp. 47-88.
- Liu, M.-S., Chang, C.-Y. & Lin, T.-P.** 2006. Comparison of phospholipids and their fatty acids in recalcitrant and orthodox seeds. *Seed Science & Technology* 34: 443-452.
- Lorenzi, H.** 1992. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum.
- Maguire, J.D.** 1962. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence vigor. *Crop Science* 2(2): 176-177.
- Maluf, A.M., Bilal, D.A.C & Barbedo, C.J.** 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* DC. seeds. *Scientia Agrícola* 60(3): 471-475.
- Marcos Filho, J.** 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. FEALQ, Piracicaba.

- Mayworm, M.A.S., Nascimento, A.S. & Salatino, A.** 1998. Seeds of species from the “caatinga”: proteins, oils and fatty acid contents. *Revista Brasileira de Botânica* 21(3) ISSN 0100-8404.
- Mello, J.I.O. & Barbedo, C.J.** 2007. Temperatura, luz e substrato para a germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae – Caesalpinioideae). *Revista Árvore* 31(4): 645-655.
- Mélo, E.A., Lima, V.L.A.G. & Nascimento, P.P.** 2000. Temperatura no armazenamento de pitanga. *Scientia Agrícola* 57(4): 629-634.
- Morais, S.M., Craveiro, A.A., Machado, M.I.L., Alencar, J.W. & Matos, J.A.** 1996. Volatiles constituents of *Eugenia uniflora* leaf oil from northeastern Brazil. *Journal Essential Oil Research* 8: 449-451.
- Navari-Izzo, F., Quartacci, M.F. & Izzo, R.** 1989. Lipid changes in maize seedlings in response to field water deficits. *Journal of Experimental Botany* 40: 675-680.
- Navari-Izzo, F., Ricci, F., Vazzana, C. & Quartacci, M.F.** 1995. Unusual composition of thylakoid membranes of the resurrection plant *Boea hygroskopica*: Changes in lipid upon dehydration and rehydration. *Physiologia Plantarum* 94(1): 135-142.
- Nkang, A.** 2002. Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *Journal of Plant Physiology* 159: 473-483.
- Obendorf, R.L.** 1997. Oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seed desiccation tolerance. *Seed Science Research* 7: 63-74.
- Oliveira, D.M.T. & Beltrati, C.M.** 1992. Morfologia e desenvolvimento das plântulas de *Inga agifolia* e *I. uruguensis*. *Turrialba* 42: 306-313.
- Oliveira, D.M.T. & Beltrati, C.M.** 1993. Aspectos anatômicos dos frutos e sementes em desenvolvimento de *Inga fagifolia* (Fabaceae: Mimosoideae). *Revista Brasileira de Biologia* 53: 625-636.
- Osborne, T.B.** 1924. *The Vegetable Protein*. Longmans Green and Co, New York, USA.

- Pammenter, N.W. & Berjak, P.** 1999. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research* 9: 13-37.
- Pennycooke, J.C. & Towill, L.E.** 2000. Cryopreservation of shoot tips from *in vitro* plants of sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.) by vitrification. *Plant Cell Reports* 19: 733-739.
- Perez, S. C. J. G. A.** 2004. Dormência embrionária. *In*: A.G. Ferreira & Borghetti (eds.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre Artmed, pp. 125-135.
- Peterbauer, T. & Richter, A.** 2001. Biochemistry and physiology of raffinose family oligosaccharides and galactosyl cyclitols in seeds. *Seed Science Research* 11: 185-197.
- Pilon-Smits, E.A.H., Ebskamp, M.J.M., Paul, M.J., Jeuken, M.J.W., Weisbeek, P.J. & Smeekens, S.C.M.** 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* 107: 125-130.
- Pontis, H.G. & Del Campillo, E.** 1985. Fructans. *In*: P.M. Dey & R.A. Dixon (eds.). *Biochemistry of storage carbohydrates in green plants*, Academic Press, New York.
- Pritchard, H.W.** 1995. Cryopreservation of seeds. *In*: Day, J. G. & Mc Lellan, M. R. (eds.). *Methods in molecular biology*, v. 38: Cryopreservation and freeze-drying protocols. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 133-144.
- Pritchard, H.W., Haye, A.J., Wright, W.J. & Steadman, K.J.** 1995. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. *Seed Science and Technology* 23: 85-100.
- Quartacci, M.F., Forli, M., Rascio, N., Dalla-Vecchia, F., Bochicchio, A. & Navari-Izzo, F.** 1997. Desiccation-tolerant *Sporobolus stapianus*: lipid composition and cellular ultrastructure during dehydration and rehydration. *Journal of Experimental Botany* 48: 1269-1279.
- Renaut, J. Hoffmann, L. & Hausman, J-F.** 2005. Biochemical and physiological mechanisms related to cold acclimation and enhanced freezing in poplar plantlets. *Physiologia Plantarum* 125: 82-94.
- 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. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Rocha, Y.T., Alves, E.S., Barbedo, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2006. Pau-brasil: conhecer para conservar. *Ciência Hoje* 38(226): 22-29.
- Rosa, S.D.V.F., Brandão Júnior, D.S., Von Pinho, E.V.R., Veiga, A.D. & Silva, L.H.C.** 2005. Effects of different drying rates on the physiological quality of *Coffea canephora* Pierre seeds. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 17: 199-205.
- Rosseti, M.L.R.** 2001. Células e seus constituintes moleculares. *In*:. (A. Zaha, ed.). *Biologia molecular básica*. Porto Alegre: Mercado Aberto, pp. 13-35.
- Sanchotene, M.C.C.** 1989. Frutíferas nativas úteis à fauna na arborização urbana. FEPLAN, Porto Alegre.
- Santana, P.J.A.** 2007. Maturação, secagem e armazenamento de sementes de espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica, São Paulo.
- Scalon, S.P.Q., Scalon Filho H., Rigoni, M.R. & Veraldo, F.** 2001. Germinação e crescimento de mudas de pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) sob condições de sombreamento. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23(3): 652-655.
- Schery, R.W.** 1972. *Plants for man*. Prentice – Hall Englewood Cliffs, New Jersey, pp. 657.
- Silva, T.R.G., Cortelazzo, A.L. & Dietrich, S.M.C.** 1998. Variations in storage compounds during germination and early plantlet growth of *Dalbergia miscolobium*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 10(2): 119-124.
- Simpson, B.B. & Ogorzaly, M.C.** 1995. *Economic botany: plants in our world*. Mc Graw-Hill, New York.
- Smith, M.T. & Berjak, P.** 1995. Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccations of seed associated Mycoflora During storage. *In*: K. Jaime & G. Galili (eds.). *Seed development and germination*. New York-Basel: Hang Yong, pp.701-746.

- Spollen, W.G. & Nelson, C.J.** 1994. Response of fructan to water deficit in growing leaves of tall fescue. *Plant Physiology* 106: 329-336.
- Stryer, L.** 1996. Bioquímica. Ed. Guanabara Koogan.
- Stushnoff, C., Seufferheld, M.J. & Creegan, T.** 1998. Oligosaccharides as endogenous cryoprotectants in woody plants. *In*: P.H. Li & T.H.H. Chen (eds.). *Plant Cold Hardiness: Molecular Biology, Biochemistry and Physiology*. Plenum Press, New York, pp. 302-309.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S. Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K.** 2002. Important roles of drought and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 29: 417-426.
- Teixeira, S.P., Carmello-Guerreiro, S.M. & Machado, S.R.** 2004. Fruit and seed ontogeny related to the seeds behaviour of two tropical species of *Caesalpinia* (Leguminosae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 146: 57-70.
- Toledo, F.F. & Marcos Filho, J.** 1977. Manual das sementes - tecnologia da produção. São Paulo: Ceres.
- Uemura, M., Tominaga, Y., Nakagawara, C., Shigematsu, S., Minami, A. & Kawamura, Y.** 2006. Responses of the plasma membrane to low temperatures. *Physiologia Plantarum* 126: 81-89.
- Van den Ende, W., Michiels, A., De Roover, J. & Van Laere, A.** 2002. Fructan biosynthetic and breakdown enzymes in dicots evolved from different invertases. Expression of fructan genes throughout chicory development. *The Scientific World Journal* 2: 1273-1287.
- Vereyken, I.J., Chupin, V., Demel, R.A., Smeekens, S.C.M. & De Kruijff, B.** 2001. Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes* 1510: 307-320.
- Vertucci C.W.** 1989. Relationship between thermal transitions and freezing injury in pea and soybean seeds. *Plant Physiology* 90: 1121-1128.

- Vertucci, C.W. & Farrant, J.M.** 1995. Aquisition and loss of desiccation tolerance. *In*: J. Kigel & G. Galili. (eds.). Seed development and germination. New York, pp. 237-271.
- Villela, F.A. & Marcos Filho, J.** 1998. Estados energéticos e tipos de água na semente. *Revista Brasileira de Sementes* 20: 317-321.
- Voelker, T. & Kinney, A.J.** 2001. Variations in the biosynthesis of seed-storage lipids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 52: 335-361.
- Walter, M., Silva, L.P. & Emanuelli, T.** 2005. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. *Ciência rural* 35(4): 219-226.
- Wang, L.Z. & White, P.J.** 1994. Structure and properties of amylose, amylopectin, and intermediate materials of oat starches. *Cereal Chemistry* 71(3): 263-268.
- Wang, Y., Satoh, A., Warren, G., Meyer, H.H.** 2004. VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97–p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments. *Journal of Cellular Biology* 164: 973–978.
- Welin, B.V., Olson, A., Nylander, M. & Palva, E.T.** 1994. Characterization and differential expression of *dhn/lea/rab*-like genes during cold acclimation and drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 26: 131–144.
- Wielewicki, A.P., Leonhardt, C., Schlindwein, G. & Medeiros, A.C.S.** 2006. Proposta de padrões de germinação e teor de água para sementes de algumas espécies florestais presentes na região sul do Brasil. *Revista Brasileira de Sementes* 28(3): 191-197.
- Williams, R.J. & Leopold, A.C.** 1989. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiology* 89: 977-981.

8 Anexos

8.1 Fórmulas utilizadas

a. *Fórmula de Hong & Ellis (1996)*

$$\text{Peso (g) correspondente ao U\% desejado} = \frac{(100 - \text{U\% inicial})}{(100 - \text{U\% desejado})} \times \text{Peso (g) inicial}$$

b. *Fórmula de Maguire (1962)*

$$\text{IVG} = G_1/N_1 + G_2/N_2 + \dots G_n/N_n$$

Onde:

- IVG = Índice de velocidade de germinação;
- $G_1, G_2, \dots G_n$ = número de sementes germinadas;
- $N_1, N_2, \dots N_n$ = número de dias após a semeadura.

c. *Fórmulas de Labouriau (1983)*

$$t_m = \text{somatória } n_i t_i / \text{somatória } n_i$$

$$S^2 = \frac{\sum n_i (t_i - t_m)^2}{-1 + \sum n_i}$$

Onde:

- n_i = número de sementes germinadas no intervalo de tempo $t_i - t_{i-1}$

8.2 Solução de diazometano

Solução 1

Dissolver 500 mg de KOH em 10 mL de etanol 96%.

Solução 2

Dissolver 2,2 g de N-metil-N-nitroso-*p*-toluil-sulfonamida em 30 mL de éter gelado.

As soluções 1 e 2 devem ser misturadas, cuidadosamente, em capela. Se houver a formação de precipitado, adicionar etanol suficiente até que este se desfaça.

8.3 Figuras

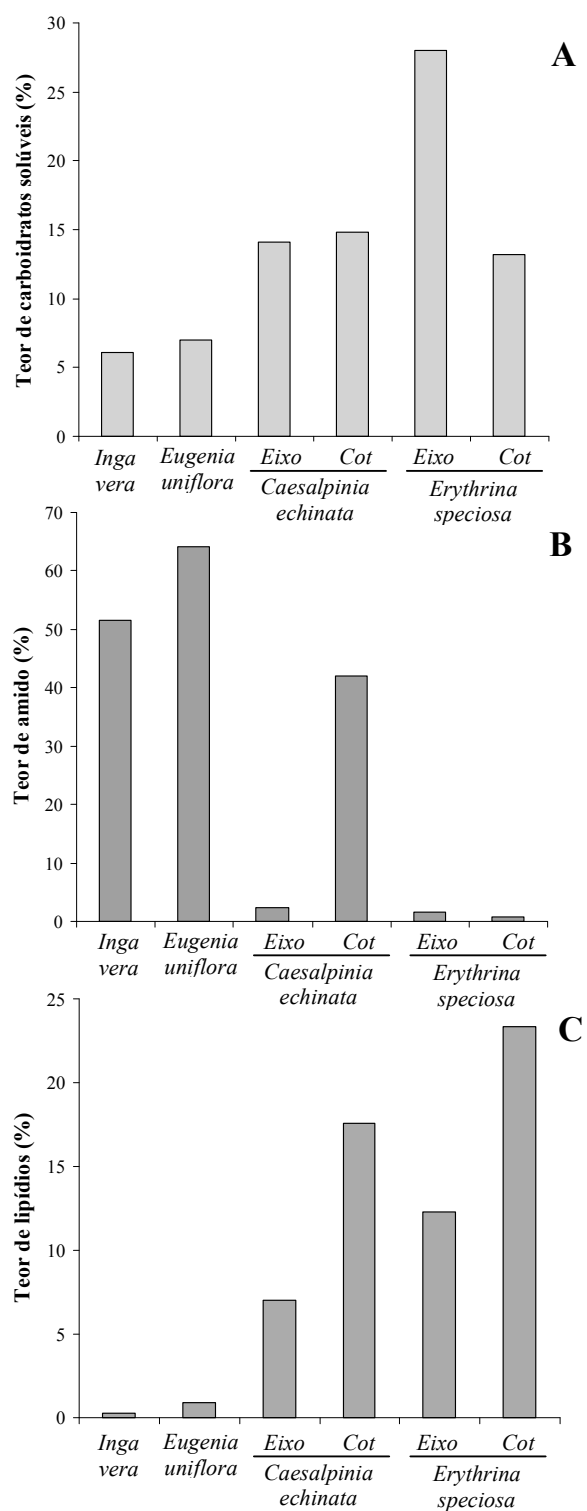


Figura 17. Teores (%MS) de carboidratos solúveis (A), amido (B) e lipídios totais (C) de sementes recém dispersas de *Inga vera*, *Eugenia uniflora*, *Caesalpinia echinata* e *Erythrina speciosa*. Cot. - cotilédone.

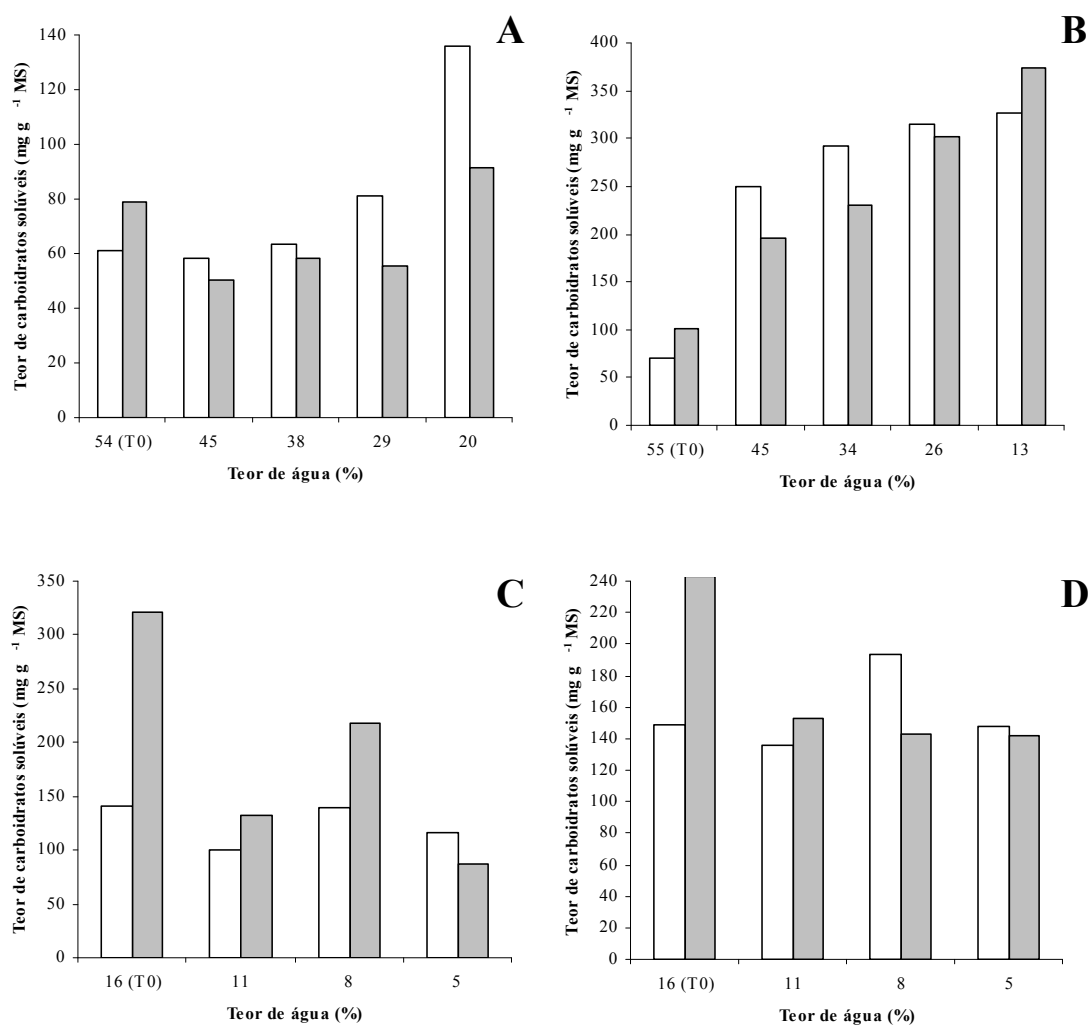


Figura 18. Teor de carboidratos solúveis (mg g⁻¹ MS) de sementes de *Inga vera* (A), *Eugenia uniflora* (B) e *Caesalpinia echinata* – eixo embrionário (C) e cotilédones (D) submetidas a diferentes níveis de secagem (□) e armazenadas por 30 dias a -18 °C (■).

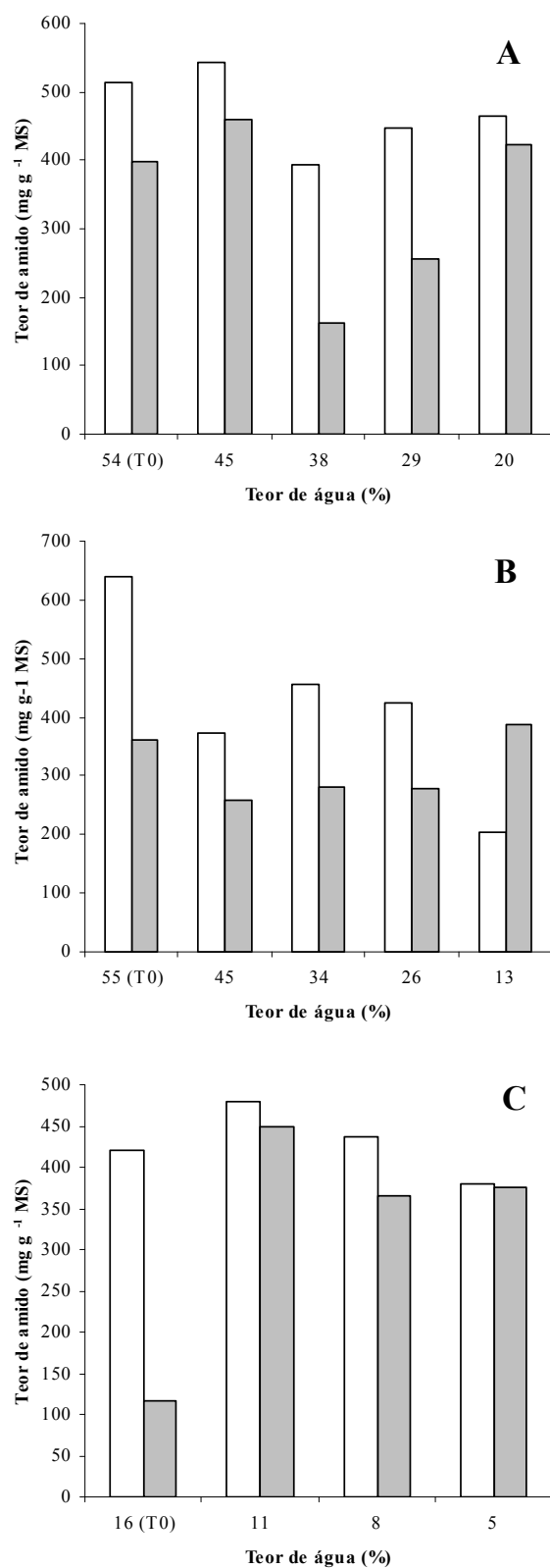


Figura 19. Teor de amido (mg g⁻¹ MS) de sementes de *Inga vera* (A), *Eugenia uniflora* (B) e em cotilédones de *Caesalpinia echinata* (C) submetidas a diferentes níveis de secagem (□) e armazenadas por 30 dias a -18 °C (■).

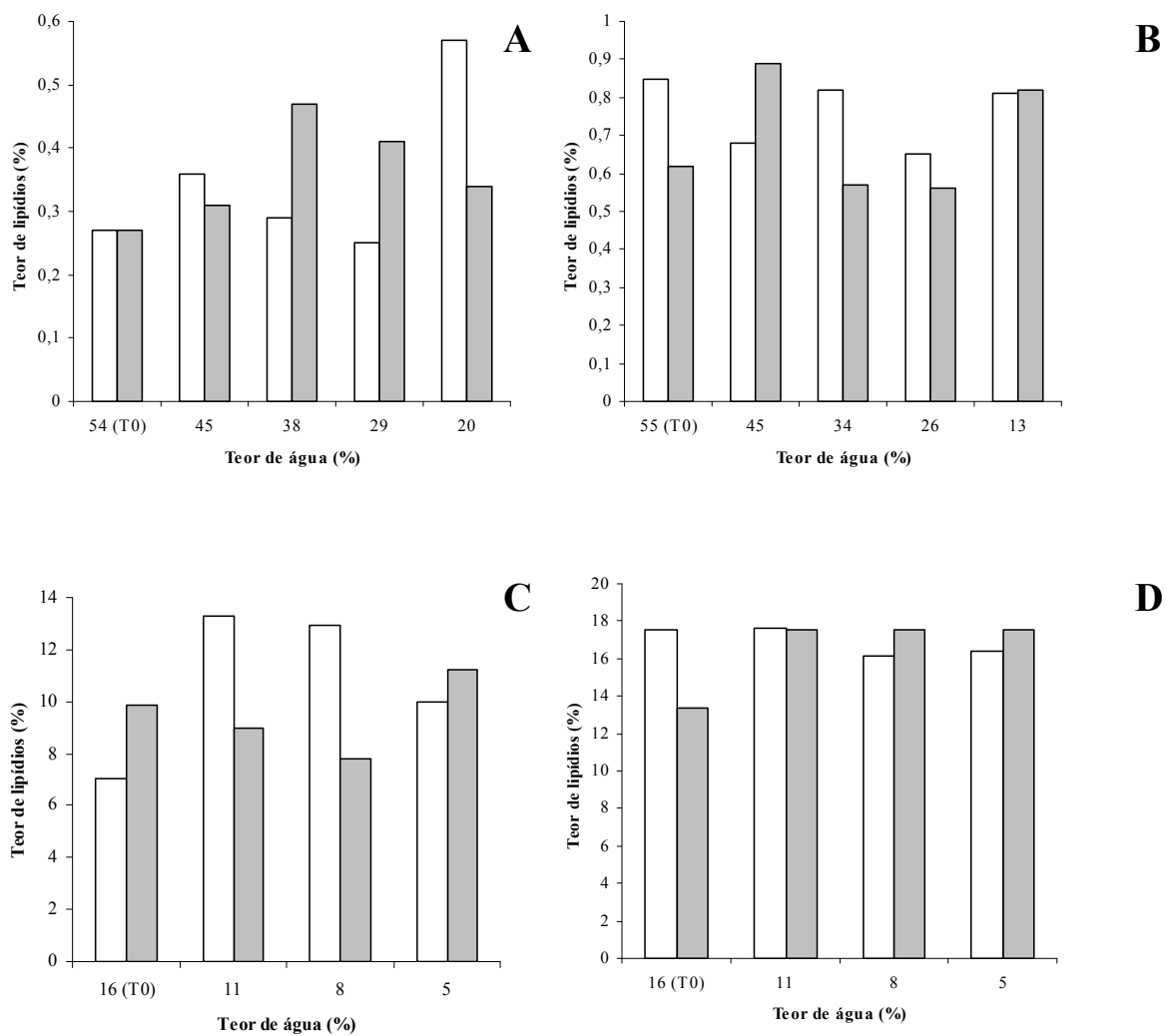


Figura 20. Teor de lipídios (%) de sementes de *Inga vera* (A), *Eugenia uniflora* (B) e *Caesalpinia echinata* – eixo embrionário (C) e cotilédones (D) submetidas a diferentes níveis de secagem (□) e armazenadas por 30 dias a -18 °C (■).

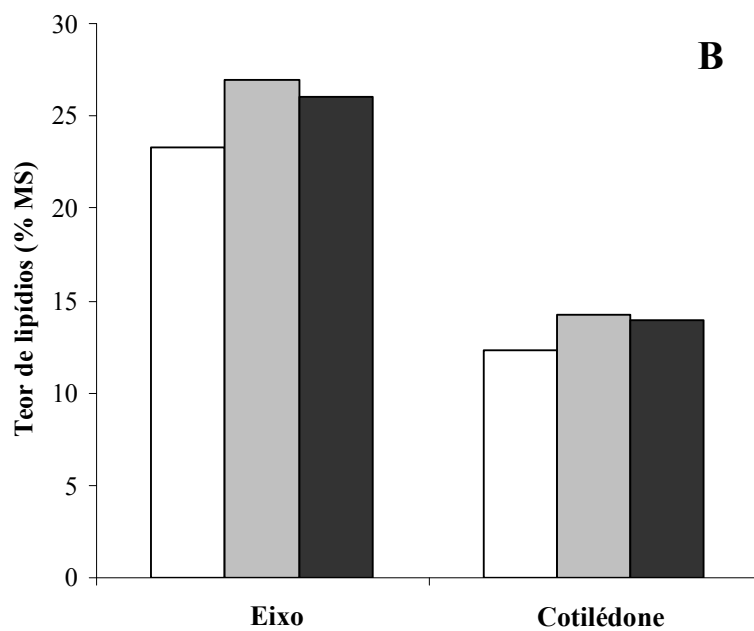
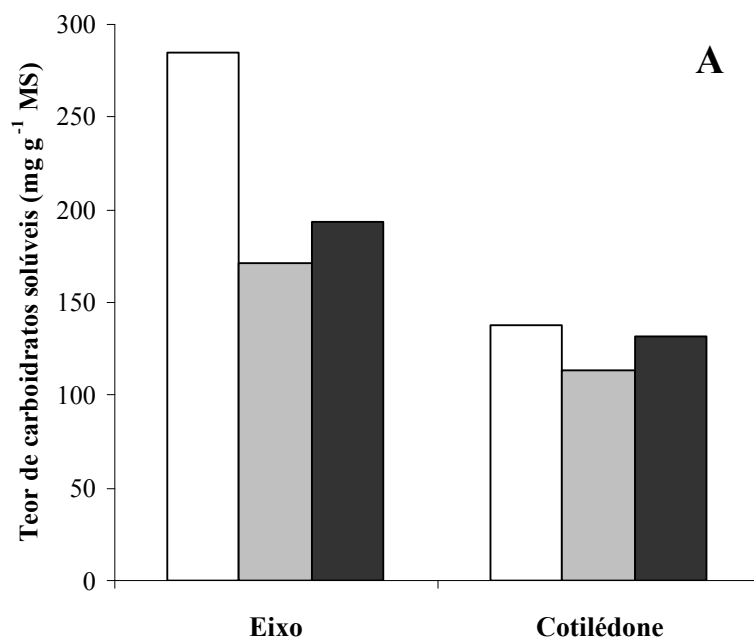


Figura 21. Teores de carboidratos (mg g⁻¹ MS - **A**) e lipídios (% - **B**) em sementes de *Erythrina speciosa* recém coletadas (□), armazenadas por 3 anos em temperatura ambiente (▒) e armazenadas por 3 anos em temperatura ambiente + 30 dias congeladas (■).

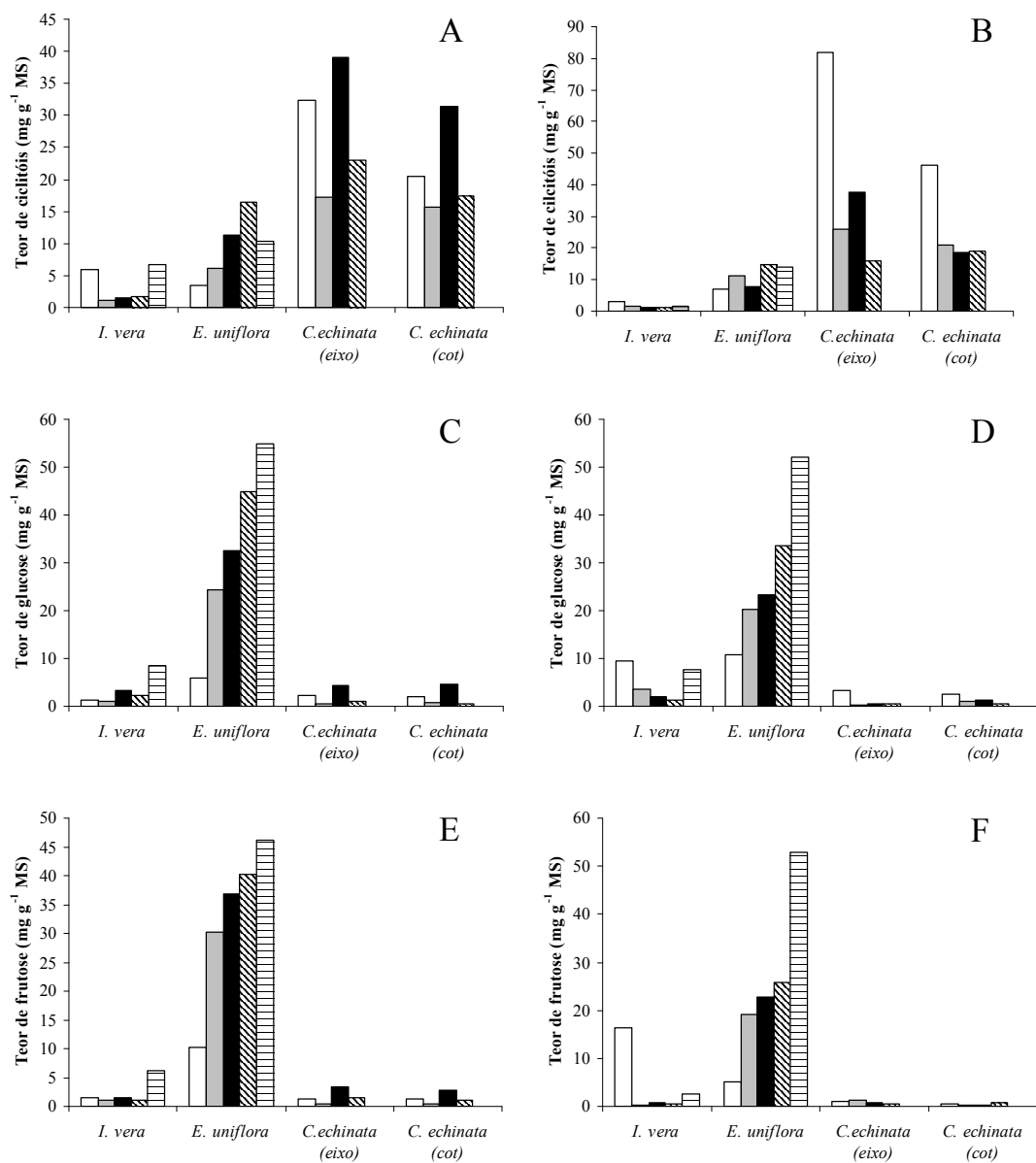


Figura 22. Variações nos teores dos ciclitóis (A e B), glucose (C e D) e frutose (E e F) nas sementes de *Inga vera* (ingá), *Eugenia uniflora* (pitanga) e nos eixos embrionários e cotilédones (cot) de *Caesalpinia echinata*, submetidas a diferentes níveis de secagem (sem secagem □, secagem 1 ■, secagem 2 ■, secagem 3 ▨ e secagem 4 ▩) antes (A, C e E) e após o armazenamento por 30 dias a -18 °C (B, D e F).

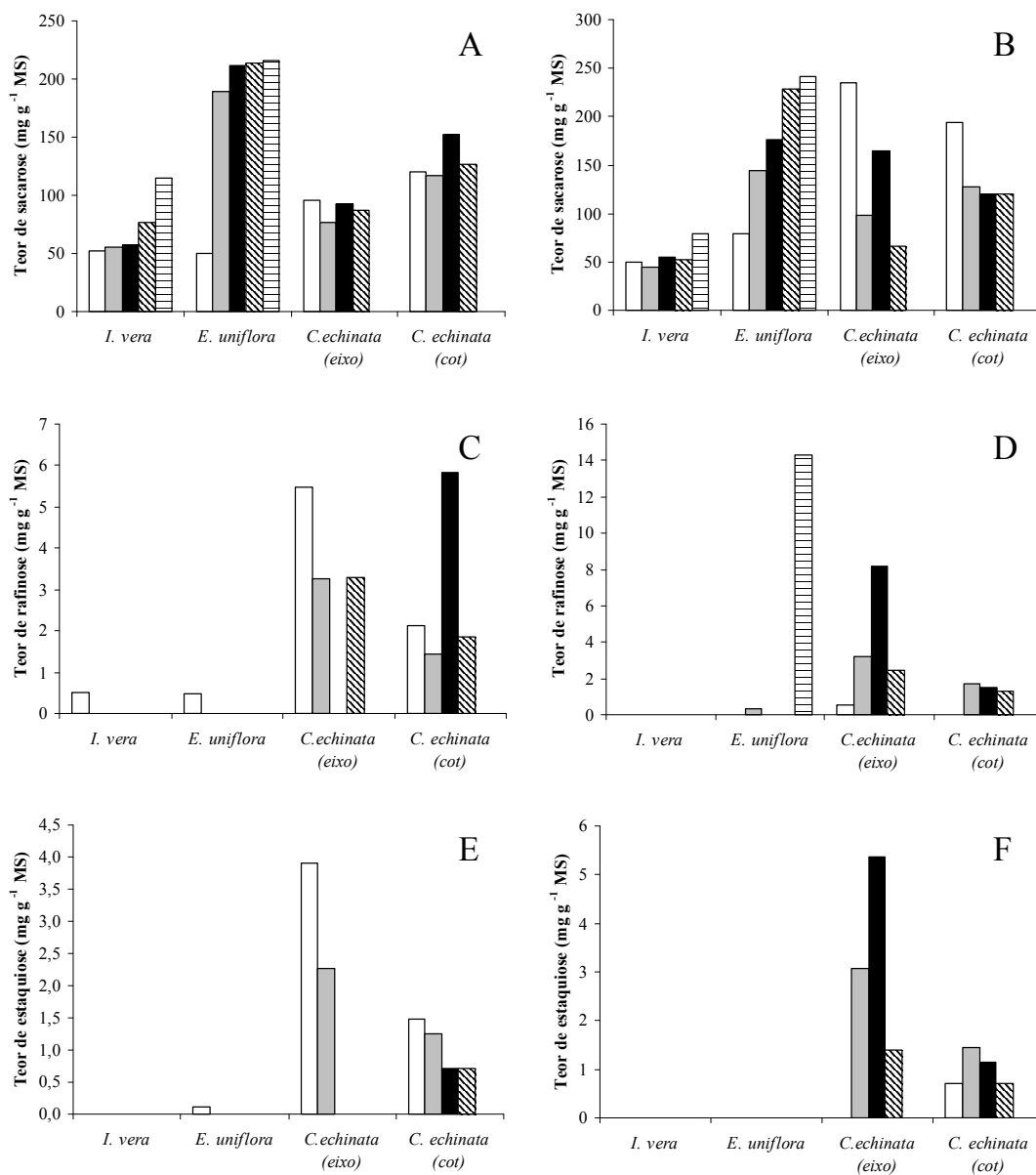


Figura 23. Variações nos teores dos sacarose (A e B), rafinose (C e D) e estaquiose (E e F) nas sementes de *Inga vera* (ingá), *Eugenia uniflora* (pitanga) e nos eixos embrionários e cotilédones (cot) de *Caesalpinia echinata*, submetidas a diferentes níveis de secagem (sem secagem □, secagem 1 ■, secagem 2 ■, secagem 3 ▨ e secagem 4 ▩), antes (A, C e E) e após o armazenamento por 30 dias a -18 °C (B, D e F).

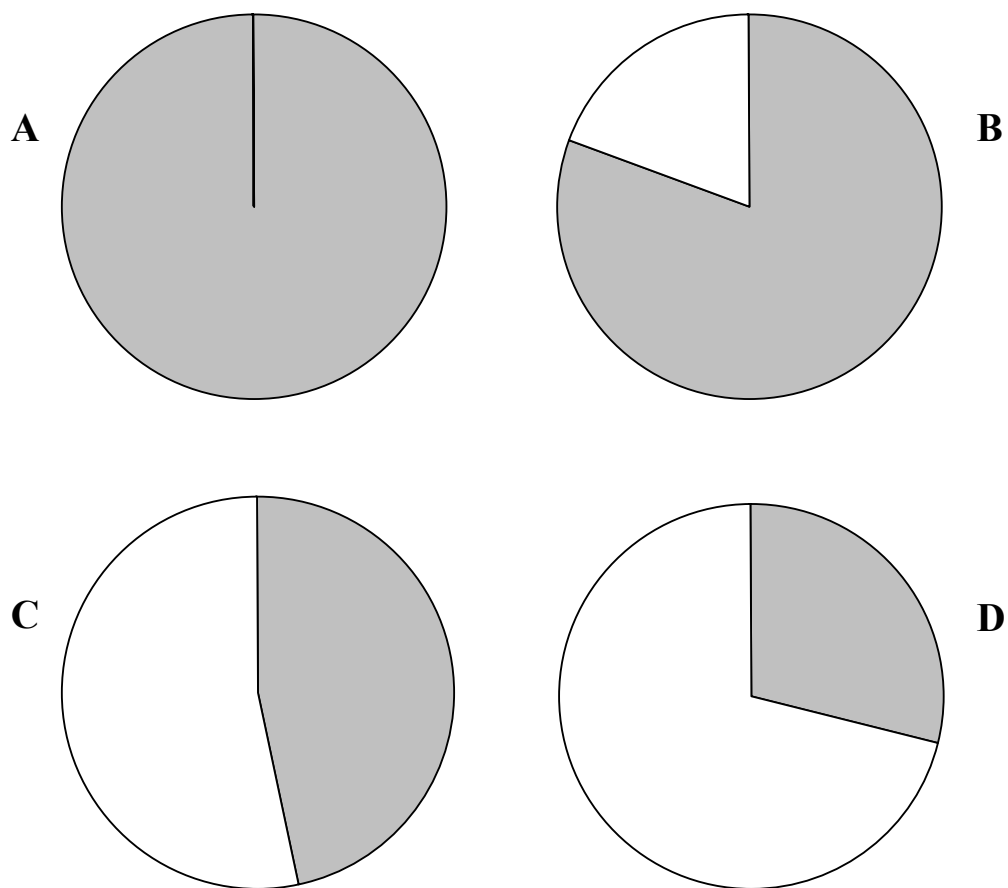


Figura 24. Proporção de ácidos graxos saturados (█) e insaturados (□) de sementes de *Inga vera* (A), *Eugenia uniflora* (B), *Caesalpinia echinata* (C) e *Erythrina speciosa* (D)

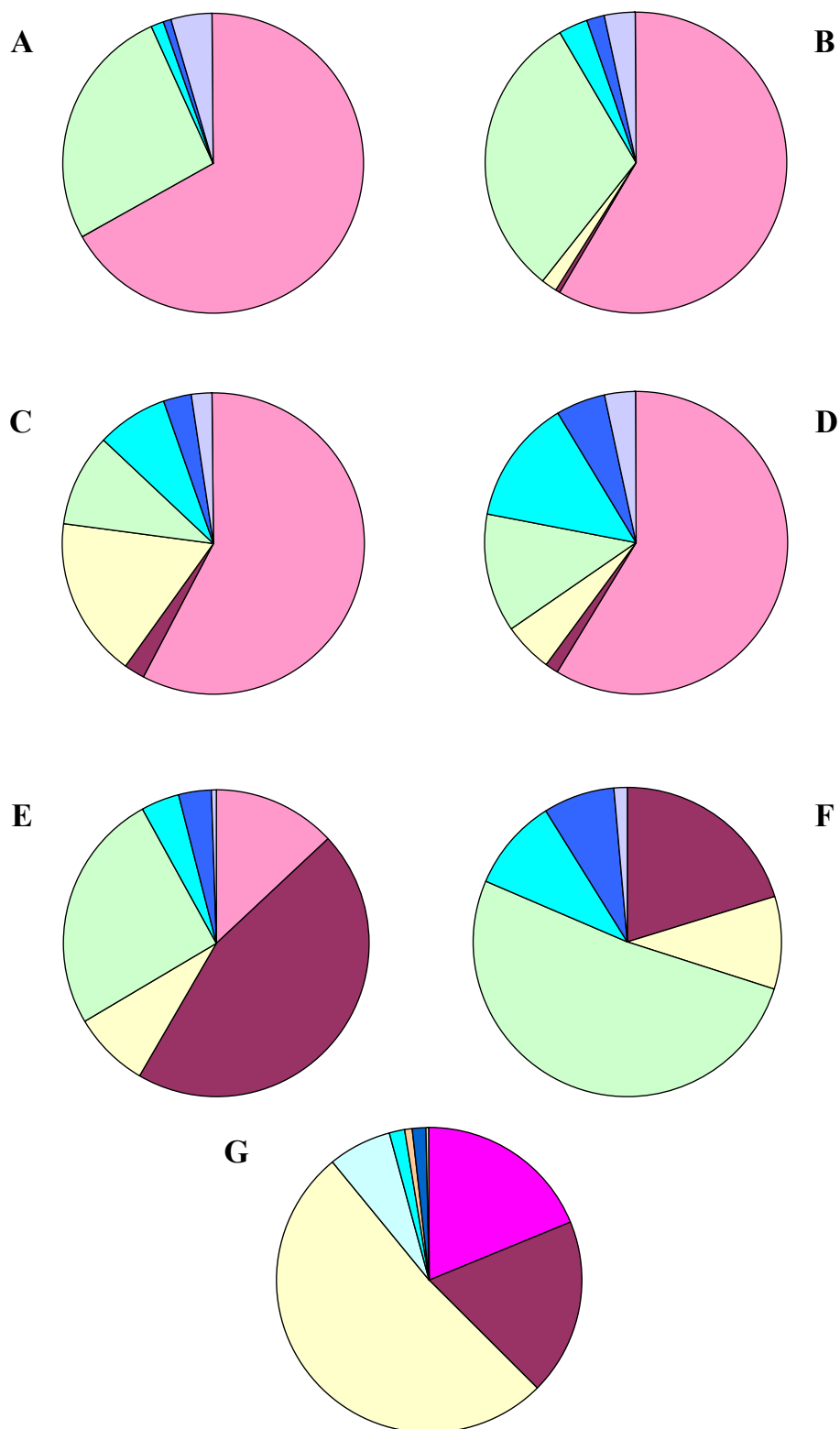


Figura 25. Proporção de ácidos graxos de sementes de *Inga vera* (A e B), *Eugenia uniflora* (C e D), *Caesalpinia echinata* (E e F) e *Erythrina speciosa* (G) recém coletadas (A, C, E e G) e inviáveis (B, D e F). Ácidos palmítico (■), linoléico (■), oléico (■), esteárico (■), araquídico (■), eicosenóico (■), behênico (■) e lignocérico (■).