

MÁRCIA REGINA OLIVEIRA SANTOS

**Taxas de deterioração de sementes de pau-brasil
(*Caesalpinia echinata* Lam.) e sua influência na
estimativa de sua longevidade**

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

2016

MÁRCIA REGINA OLIVEIRA SANTOS

**Taxas de deterioração de sementes de pau-brasil
(*Caesalpinia echinata* Lam.) e sua influência na
estimativa de sua longevidade**

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.

ORIENTADOR: DR. CLAUDIO JOSÉ BARBEDO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Santos, Márcia Regina Oliveira

S237t Taxas de deterioração de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) e sua influência na estimativa de sua longevidade / Márcia Regina Oliveira Santos -- São Paulo, 2016.
60p. il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2016.

Bibliografia.

1. Conservação de sementes. 2. Espécie tropical. 3. Equação de viabilidade.
4. Armazenamento de sementes. 5. Banco de germoplasma.

I. Título.

CDU: 631.53.01

Às minhas amadas filhas Paloma, Nayara e Amanda,
dedico.

*“A semeadura é facultativa,
a colheita é obrigatória.”*

Agradecimentos

Acima de tudo, a Deus, pela vida e por tudo que me proporciona.

Ao meu orientador Claudio José Barbedo, pela orientação, amizade, compreensão, paciência, auxílio e apoio incondicionais.

À Dra. Luce Maria Brandão Torres, pela supervisão nas determinações bioquímicas, auxílio, incentivo e amizade.

Ao Instituto Florestal, pela liberação para realização deste trabalho.

Ao Instituto de Botânica, minha segunda casa, pelo acolhimento.

Às minhas amigas-irmãs Lilian Maria Asperti, Tanni Werneck de Souza, Maria de Fátima Scaf, Marina Crestana Guardia pela amizade mais que fraterna, pelo apoio e carinho constantes, pela ajuda em diversas partes deste trabalho e na vida.

À minha querida amiga Mônica Valéria Cachenco, pela acolhida na Seção de Sementes quando aqui cheguei pela primeira vez, pela amizade, pela ajuda e apoio no laboratório e pelo auxílio na coleta das sementes do P.E.F.I.

Ao Dr. José Marcos Barbosa, pela iniciação na pesquisa com sementes, pela parceria, incentivo e amizade.

Aos funcionários do Instituto de Botânica, especialmente do Núcleo de Pesquisa em Sementes e do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica, pelo auxílio nas diversas fases experimentais deste trabalho.

Aos funcionários da Reserva Biológica de Mogi Guaçu e do Centro de Pesquisa do Jardim Botânico, Instituto de Botânica, pelo auxílio nas coletas das sementes em 2014.

À Roseli Betoni Bragante, pela amizade e pelo auxílio com as coletas de Mogi Guaçu em 2013 e em Paulínia em 2014.

À Dra. Adriana de Oliveira Fidalgo, pelo apoio e pelo transporte das sementes de Mogi Guaçu.

Aos colegas de pós-graduação, especialmente do Núcleo de Sementes, pela amizade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente pela realização do presente estudo. Às funcionárias Márcia e Shirley e à equipe de Coordenação, pelo apoio, atenção e carinho, em especial às Dras. Edenise Segala Alves e Célia Leite Sant'Anna.

À minha filha Amanda, pela paciência e compreensão nas horas de estresse, pela colaboração em diversas tarefas durante os experimentos e pela companhia no Laboratório, especialmente nas suas férias e aos fins de semana.

A todos que acreditaram em mim, não raro até mais do que eu.

A todos os que direta ou indiretamente me apoiaram na realização deste trabalho.

Resumo

(Taxas de deterioração de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) e sua influência na estimativa de sua longevidade)

Durante a maturação da semente, a capacidade de germinar desenvolve-se cedo no embrião, contudo, a capacidade de manter a viabilidade surge somente no final da maturação. A longevidade das sementes é geneticamente determinada, varia conforme a espécie, mas é influenciada por condições ambientais e de armazenamento. A previsão da perda da viabilidade de sementes armazenadas é essencial para o gerenciamento de bancos de germoplasma, especialmente de espécies tropicais. *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) é importante espécie arbórea nativa do Brasil, de valor histórico, econômico, cultural e paisagístico, em risco de extinção, portanto, há urgente necessidade de incluí-la em bancos de germoplasma. Tem-se estudado a perda de viabilidade e modelos de previsão de longevidade têm sido desenvolvidos para diversas espécies com sementes ortodoxas, porém há relativa escassez para sementes de espécies tropicais. As sementes de *C. echinata* deterioram-se em menos de três meses em temperatura ambiente, embora possam permanecer viáveis por até cinco anos sob congelamento. Neste trabalho, estudou-se a deterioração das sementes de pau-brasil, submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade, bem como sua relação com os processos respiratórios e atividade antioxidante de substâncias presentes no tegumento das sementes. A aplicabilidade de modelos matemáticos para previsão da perda de viabilidade para sementes de *C. echinata* foi avaliada através da determinação de constantes da espécie e equações de previsibilidade. Os resultados permitiram concluir que a metodologia adotada não foi adequada para a determinação de equações de viabilidade de sementes de pau-brasil. Provavelmente isto se deveu à utilização de temperaturas excessivamente elevadas que modificaram o comportamento respiratório e oxidativo das sementes.

Palavras chave conservação de sementes, espécie tropical, equação de viabilidade, armazenamento de sementes, banco de germoplasma.

Abstract

(Rates of deterioration of Brazil Wood seeds (*Caesalpinia echinata* Lam.) and its influence on their longevity estimative)

Along seed maturation, the ability to germinate is early acquired in embryo. However, the maximum storability arises only at the end of the maturation period, being the latest among vigor components. The seed longevity is genetically determined; however, it is strongly influenced by the conditions of both environment and storage. The prevision of viability loss during storage is essential for managing seed gene banks, especially considering tropical species like *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood). This is one of the most important native tree species in Brazil, with historical, economic, cultural and landscape value, but it is included in the list of species at risk of extinction. Therefore, there is an urgent need to include it in seed banks. The prediction of viability loss of orthodox seeds, as well as its relationship with temperature and humidity, has been studied since the middle of last century and predictability models have been developed for several species, but there is relative scarcity for tropical species seeds. The seeds of *C. echinata* deteriorate in less than three months at ambient temperature, although they can remain viable for up to five years when kept under freezing temperatures. In this work, we studied the deterioration of brazil wood seeds when subjected to different conditions of temperature and humidity, as well as its relationship with respiratory processes and antioxidant activity of seed coat substances. The applicability of mathematical models for predicting loss of viability for *C. echinata* seeds was evaluated by determining the constants of the species that allow the application of predictability equations. The results showed that the current models, which do not include breathing and oxidation rates, might be not reliable for brazil wood seed conservation predictability. This is probably due to the use of excessively high temperatures that have modified the respiratory and oxidative behavior of seeds.

Key words: seed conservation, tropical species, viability equation, seed storage, germoplasm bank.

SUMÁRIO

	Resumo.....	v
	Abstract.....	vi
1.	Introdução.....	01
2.	Objetivos.....	10
3.	Material e Métodos.....	11
3.1.	Caracterização dos lotes.....	11
3.2.	Estudos da deterioração das sementes.....	14
3.3.	Aplicação das equações de previsibilidade.....	15
3.4.	Análise das taxas de respiração oxidativa sobre a deterioração das sementes.....	18
3.5.	Avaliação do potencial antioxidante.....	20
4.	Resultados e Discussão.....	21
4.1.	Caracterização inicial dos lotes.....	21
4.2.	Estudos da deterioração das sementes.....	24
4.3.	Aplicação das equações de previsibilidade.....	36
4.4.	Análise das taxas de respiração oxidativa sobre a deterioração das sementes.....	46
4.5.	Avaliação do potencial antioxidante.....	49
5.	Considerações finais.....	53
6.	Referências Bibliográficas.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Plântulas normais e anormais de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.	23
Figura 2.	Valores médios e desvios-padrão de germinação após deterioração de sementes de <i>C. echinata</i> (Mogi Guaçu 2013)	25
Figura 3.	Valores médios e desvios-padrão de plântulas normais após deterioração de sementes de <i>C. echinata</i> (Mogi Guaçu 2013)	26
Figura 4.	Valores médios e desvios-padrão de germinação após deterioração de sementes de <i>C. echinata</i> (Mogi Guaçu 2014)	27
Figura 5	Valores médios e desvios-padrão de plântulas normais após deterioração de sementes de <i>C. echinata</i> (Mogi Guaçu 2014)	28
Figura 6.	Valores médios e desvios-padrão de germinação após deterioração de sementes de <i>C. echinata</i> (Paulínia)	30
Figura 7	Valores médios e desvios-padrão de plântulas normais após deterioração de sementes de <i>C. echinata</i> (Paulínia)	31
Figura 8	Valores médios e desvios-padrão de germinação após deterioração de sementes de <i>C. echinata</i> (São Paulo)	32
Figura 9	Valores médios e desvios-padrão de plântulas normais após deterioração de sementes de <i>C. echinata</i> (São Paulo)	33
Figura 10	Diferenças de vigor no desenvolvimento de plântulas normais de <i>C. echinata</i> Lam..	34
Figura 11	Teste de tetrazólio - sementes inviáveis de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.	35
Figura 12	Curvas de sobrevivência de sementes de <i>C. echinata</i> (Mogi Guaçu 2013)	37
Figura 13	Curvas de sobrevivência de sementes de <i>C. echinata</i> (Mogi Guaçu 2014)	38
Figura 14	Curvas de sobrevivência de sementes de <i>C. echinata</i> coletadas em Mogi Guaçu (2013) em função da temperatura.....	39
Figura 15	Curvas de sobrevivência de sementes de <i>C. echinata</i> coletadas em Mogi Guaçu (2013) em função do teor de água.....	40
Figura 16	Relação logarítmica entre teor de água e sigma (σ) para sementes de <i>C. echinata</i> coletadas em Mogi Guaçu (2013) e incubadas a 40°C e 50°C	44
Figura 17	Taxas respiratórias de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.	47
Figura 18	Compostos fenólicos totais (CFT) do tegumento de sementes de <i>C. echinata</i> coletadas em Mogi Guaçu (2013), (7% e 11%) após incubação a 50°C	50
Figura 19	Sementes de <i>C. echinata</i> provenientes de Mogi Guaçu, incubadas a 50°C por 48 h e por 60 h, com teor de água de 15%	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Procedências das sementes de <i>Caesalpinia echinata</i> Lam.	13
Tabela 2.	Tratamentos de deterioração de sementes de <i>Caesalpinia echinata</i>	16
Tabela 3.	Combinações de tratamentos para equações de viabilidade	17
Tabela 4	Caracterização inicial de sementes de <i>C. echinata</i>	21
Tabela 5	Germinação inicial de sementes de <i>C. echinata</i>	22
Tabela 6.	Viabilidade inicial (K_i), taxa de deterioração ($-\text{tg}\beta$) e sigma (σ) para sementes de Mogi Guaçu (2013)	41
Tabela 7.	Constantes de previsibilidade para sementes de <i>C. echinata</i>	43
Tabela 8.	Equações de previsibilidade para sementes de <i>C. echinata</i>	43
Tabela 9.	Constantes de previsibilidade C_w , K e K_E , para sementes de <i>C. echinata</i>	45

1. Introdução

A semente é a unidade de reprodução sexuada da espécie, que possibilita a distribuição espacial dos descendentes, através da dispersão, e a reposição dos novos indivíduos ao longo do tempo, por meio de estratégias, tais como maturação diferenciada dos frutos ou dormência das sementes (Carvalho & Nakagawa 1980). A capacidade germinativa, ou germinabilidade, é, portanto, sua finalidade biológica, e seu principal atributo (Marcos Filho 2015).

Durante a maturação da semente, a habilidade de germinar desenvolve-se cedo no embrião, mesmo antes do acúmulo máximo de matéria seca. Em seguida, é adquirida a tolerância à dessecação, enquanto o vigor da semente continua a aumentar. O último componente da qualidade da semente a ser desenvolvido é a longevidade, ou seja, a capacidade de manter a viabilidade prolongada em estado seco (Castro *et al.* 2004).

A longevidade das sementes, fator que determina o potencial de armazenamento, é extremamente variável conforme a espécie e geneticamente determinada. Contudo, fatores ambientais e condições de armazenamento exercem grande influência nessa longevidade (Malavasi 1988). O armazenamento adequado permite a conservação dos recursos genéticos das populações naturais através de sementes. No entanto, a preservação da viabilidade depende do conhecimento do comportamento das sementes em relação às condições de armazenamento a que são submetidas (Chaves & Usberti 2003).

Conforme apontado, sementes de cada espécie têm diferentes períodos de longevidade e comportam-se diferentemente durante armazenamento, mesmo quando submetidas a idênticas condições, tais como temperatura e umidade. Ainda dentro de uma espécie ocorrem diferenças no período de viabilidade de suas sementes, estando diretamente relacionados ao vigor das mesmas. Lotes de sementes com germinação semelhante podem apresentar grandes diferenças na emergência

em campo, assim como na capacidade de armazenagem, devido a diferenças de vigor (Carvalho & Nakagawa 1980). Os fatores que mais influem nas diferenças de vigor das sementes são genéticos.

As condições ambientais durante a formação das sementes, desde alterações climáticas, afetando florescimento e fertilização, até o completo crescimento e maturação fisiológica das sementes, podem ter consequências no acúmulo de reservas de nutrientes, influenciando num maior ou menor vigor das mesmas, resultando em maior ou menor potencial de sobrevivência da plântula (Carvalho & Nakagawa 1980). Além disso, as diferenças no vigor, assim como as condições de armazenamento, podem condicionar a velocidade de deterioração das sementes (Marcos Filho 2015).

A deterioração de sementes envolve várias alterações fisiológicas, bioquímicas e citológicas, que afetam seu vigor, acarretando a perda da capacidade germinativa, ou seja, a completa perda de viabilidade. É um processo progressivo e irreversível, mediado por alterações fisiológicas, bioquímicas e citológicas, as quais reduzem o vigor e a viabilidade das sementes, até sua completa perda (Delouche 2002, Marcos Filho 2015).

Durante esse processo, ocorrem deficiências metabólicas que afetam a respiração, a integridade das membranas e a síntese de proteínas e ácidos nucleicos. A queda na respiração retarda a mobilização de reservas, afetando assim a germinação. Sua principal causa está relacionada à síntese mitocondrial defeituosa durante a embebição, síntese de enzimas hidrofílicas e oxidação de metabólitos (Marcos Filho 2015).

Nos processos de deterioração, ocorre a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, causando danos à integridade das membranas, oxidação de aminoácidos e degradação de DNA e proteínas (Carvalho 1994).

A previsão da perda da viabilidade de sementes armazenadas é importante tanto para a manutenção de bancos de germoplasma como para o gerenciamento do armazenamento de sementes

(Sinício *et al.* 2009). Estudos vêm sendo desenvolvidos para previsão da perda de viabilidade, desde a metade do século passado, com curvas de sobrevivência e relações entre temperatura, umidade e viabilidade (Roberts, 1973; Ellis & Roberts, 1980a, b; Roberts & Ellis, 1989, Ellis *et al.* 1990, 1992, Dickie *et al.*, 1995, Pritchard & Dickie 2003). Os modelos desenvolvidos por Roberts (1973) são ainda utilizados para estimar a longevidade de sementes armazenadas, principalmente de espécies cultivadas. Este autor propôs um modelo composto por três equações, a que chamou de equações básicas de viabilidade, que permitem prever com razoável precisão a porcentagem de viabilidade de poucos dias a vários anos, embora com reservas à sua aplicação.

Evidentemente não se pode estimar a vida útil de uma determinada semente. Contudo, conforme descrito por Roberts (1973), de forma semelhante ao que acontece com diversos outros sistemas populacionais, é possível estimar a vida útil das sementes quando estas fazem parte de uma população, como é o caso dos lotes de sementes armazenados.

A distribuição de períodos de viabilidade individuais de uma população de sementes seguiria, dessa forma, o modelo:

$$y = [\sigma (2\pi)^{1/2}]^{-1} \cdot e^{-(p - \bar{p})^2 / (2\sigma^2)} \quad (1)$$

onde y = frequência relativa de mortes no tempo p ;

$\bar{p}$ é o período médio de vida e σ é o desvio padrão da distribuição. Este desvio é dado pela equação:

$$\sigma = K_{\sigma} p, \quad (2)$$

onde K_{σ} é uma constante.

A relação entre temperatura do ambiente de armazenamento, teor de água das sementes e período de viabilidade do lote, é descrita pela equação:

$$\log p = K_v - C_1 m - C_2 t, \quad (3)$$

onde m é o teor de água percentual (base úmida), t é a temperatura em °C e K_v , C_1 e C_2 são constantes.

Estas constantes podem ser calculadas por meio de quatro testes de germinação para sementes armazenadas em três diferentes condições de armazenamento, incluindo dois graus de umidade e duas temperaturas (Roberts 1973). É interessante notar que, nesta equação de previsibilidade, embora eficiente para as poucas espécies até então testadas, não levava em conta a qualidade inicial das sementes, ou do lote de sementes. Conforme descrito anteriormente, são vários os fatores que alteram a longevidade de um lote de sementes, e não apenas a temperatura de armazenamento e a umidade das sementes. Nestas equações, Roberts (1973) mencionava, ainda, que o oxigênio poderia ser considerado, também, fator de interferência no potencial de armazenamento, mas que, como as condições desse gás são normalmente constantes, não havia necessidade de incluí-lo entre os fatores.

A necessidade de monitoramento da qualidade das sementes armazenadas é diminuída na medida em que são desenvolvidos modelos matemáticos mais precisos para prever a perda de viabilidade. Modelo aperfeiçoado por Ellis & Roberts (1980), com equações de previsibilidade melhoradas, permite determinar coeficientes para cada espécie, a partir dos quais se pode estabelecer a longevidade de sementes em condições de armazenamento (Sinício *et al.* 2009).

Segundo Ellis & Roberts (1980), “a principal desvantagem dessas equações é que, embora possam ser aplicadas com confiança para qualquer lote de sementes em particular, elas não levam em conta variações na longevidade potencial entre lotes de sementes, resultantes de diferenças em genótipo ou na qualidade das sementes devido aos diversos fatores ambientais que afetam sementes antes do armazenamento”. No modelo desses autores, a curva de sobrevivência das sementes pode ser descrita pela seguinte equação de viabilidade (Sinício *et al.* 2009):

$$v = K_i - p/10^{(K_E - C_W \log m - C_H t - C_Q t^2)}, \text{ onde:}$$

v = viabilidade das sementes;

K_i = viabilidade inicial das sementes;

p = período em dias;

m = teor de água das sementes (% base úmida);

t = temperatura de armazenamento ($^{\circ}\text{C}$);

KE , CW , CH e CQ = coeficientes específicos para cada espécie.

Note-se que neste modelo já foi considerada a qualidade inicial, pela inserção de K_i . Estes modelos têm sido amplamente empregados para previsão de armazenamento de sementes de espécies de interesse econômico, as cultivadas, de prolongados períodos de viabilidade (ortodoxas).

Em levantamento de trabalhos sobre as constantes de viabilidade, Pritchard & Dickie (2003) compilaram 66 espécies de 28 famílias, para as quais foram determinadas constantes de viabilidade até aquele ano. A perda da germinação de sementes armazenadas tem sido prevista, com sucesso para muitas espécies ortodoxas, utilizando-se o modelo de Ellis & Roberts de 1980 (Sinício *et al.* 2013). Na última década, diversos trabalhos foram realizados para determinação das constantes para espécies cultivadas, a maioria para espécies de Poaceae de interesse comercial (Andreoli 2004, Usberti *et al.* 2006, Ellis & Hong 2006 e 2007, Marcondes *et al.* 2007, Pozitano & Usberti, 2009, Sinício *et al.* 2009, Nagel & Börner 2010 e Hay *et al.* 2013, entre outros).

Estudos desta natureza para espécies florestais nativas ainda não são numerosos. Pesquisas sobre armazenamento a temperatura sub-zero (-20°C), em que se aplicaram estas equações, foram desenvolvidos para *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. (Medeiros 1996) e para *Dimorphandra mollis* Benth. (Chaves & Usberti 2003), estimando períodos de viabilidade superiores a 1.167 anos e 316 anos, respectivamente. Entre outras espécies arbóreas para as quais foram realizados estudos de previsão de longevidade incluem-se *Dalbergia nigra* (Vell.) All. ex Benth. (jacarandá-da-bahia) e *Balfourodendron riedelianum* (Engler) Engler (pau-marfim) (Chaves 2001, Ignácio 2013).

Espécies florestais amazônicas – *Cedrela odorata* L., *Ceiba pentandra* (L.) Gaertn. (sumaúma), *Dalbergia spruceana* Benth. e *Handroanthus albus* (Cham.) Mattos (como *Tabebuia alba* (Cham.) Sandwith) (ipê-branco) – foram estudadas por Lima & Ellis (2005) e Lima *et al.* (2005), visando à sua conservação. Ainda entre espécies florestais, estudou-se a longevidade de espécies de interesse econômico – a exótica *Eucalyptus grandis* W. Hill ex. Maiden e as nativas *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg. (jaboticabeira) e *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh (camu-camu) (Fantinatti & Usberti 2007; Sinício *et al.* 2013; Sinício 2015).

Contudo, embora os modelos sejam aplicáveis e tenham sua utilidade imediata para bancos e planejamento de uso de sementes armazenadas, pouco se sabe sobre os fatores que alteram as constantes das equações. Conforme descrito anteriormente, vários são os fatores que contribuem para maior ou menor velocidade de deterioração das sementes em armazenamento, mas poucos são efetivamente estudados cientificamente. Roberts (1973) recomenda que sejam desenvolvidos trabalhos com diferentes genótipos da mesma espécie para definir efeitos genotípicos em termos de sua influência sobre as constantes das equações básicas de viabilidade. Também destaca a importância de se tentar elucidar as relações entre parâmetros ambientais e período de viabilidade em espécies recalcitrantes. Desta forma, indiretamente sugere que sejam analisados os fatores causadores de mudanças nos coeficientes das equações de previsibilidade. Assim, seria possível a estimativa não apenas do período de manutenção de viabilidade de lotes de sementes em armazenamento, mas também a estimativa dos próprios coeficientes, caso sejam oferecidas as condições iniciais das sementes, tais como composição química, grau de maturidade, anatomia de tegumento, entre diversas outras.

Tem-se estudado a perda de viabilidade e modelos de previsão de longevidade têm sido desenvolvidos para diversas espécies com sementes ortodoxas, porém há relativa escassez para sementes de espécies tropicais.

Caesalpinia echinata Lam. (pau-brasil) é importante espécie arbórea endêmica do Brasil, de valor histórico, econômico, cultural e paisagístico. A super-exploração por séculos, com extração da madeira para obtenção do corante brasileína e, posteriormente, para a manufatura de arcos de instrumentos de corda resultou na erradicação da espécie na maior parte de sua área de ocorrência original na Mata Atlântica, do Rio de Janeiro ao Rio Grande do Norte. Foi incluída na lista de espécies vegetais em perigo de extinção, elaborada pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e de Recursos Naturais (IBAMA) em 1992 (Rocha 2004) e na lista das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção do Ministério do Meio Ambiente (Brasil, 2008). A exploração para confecção de arcos para instrumentos musicais ainda hoje é feita de forma ilegal. Iniciativas para a preservação da espécie têm sido realizadas: *in situ* - em 19 Unidades de Conservação nos estados de ocorrência natural e *ex situ* - em bosques plantados, como os da Reserva Experimental de Mogi Guaçu (Rocha *et al.* 2006) e do Jardim Botânico de São Paulo e, mais recente, o Bosque dos 500 anos, plantio comemorativo ao descobrimento do Brasil, localizado em Paulínia, todos no estado de São Paulo.

Contudo, há urgente necessidade de incluí-la em bancos de germoplasma. Para tal, é necessário que se conheça o comportamento de suas sementes em armazenamento em diferentes condições de temperatura e umidade, a perda de viabilidade das mesmas e aspectos da sua deterioração.

Os primeiros estudos com armazenamento destas sementes demonstraram que, em temperatura próxima à encontrada nos locais de ocorrência da espécie, as sementes deterioram-se em menos de três meses, mas podem permanecer viáveis por até dois anos quando armazenadas em temperaturas de refrigeração (6 e 10°C), além de tolerarem dessecação (Barbedo *et al.*, 2002).

Aspectos da maturação das sementes e variações nos carboidratos presentes durante o desenvolvimento da semente e seu armazenamento foram investigados (Borges *et al.* 2005 e 2006, Garcia *et al.* 2006, Borges 2007, Hellmann *et al.* 2008, Mello *et al.* 2010 e 2011, Leduc *et al.* 2012).

O vigor das sementes de pau-brasil tem sido estudado para proposição de metodologias para sua avaliação (Lamarca *et al.* 2009, Martini Neto *et al.*, 2014)

Foi verificada a tolerância das sementes ao congelamento (Hellmann *et al.* 2006) e, em trabalho recente, Mello *et al.* (2013) constataram que essas sementes podem ser armazenadas por até cinco anos a temperaturas sub-zero (-18°C). Aparentemente, a grande diferença na capacidade de conservação da viabilidade dessas sementes nas diferentes temperaturas reside em processos oxidativos, conforme demonstrado por Lamarca & Barbedo (2012). Estes autores verificaram que a deterioração das sementes de *C. echinata* está relacionada com elevado consumo de O₂, embora a liberação de CO₂ não apresente valores compatíveis com respiração. Provavelmente, então, essas sementes passam por processos oxidativos que decorrem em sua rápida deterioração. Portanto, a influência do oxigênio na conservação das sementes durante seu armazenamento pode ser ainda maior que aquela apontada por Roberts (1973).

A ocorrência de metabólitos secundários nas plantas, geralmente se relaciona a funções protetivas e defensivas. Dentre estes, os compostos fenólicos comumente apresentam alta ação antioxidante. Entre os fenólicos comumente encontrados em plantas, citam-se as antocianinas, os flavonóides e taninos. A presença de compostos fenólicos e sua atividade antioxidante têm sido constatadas em frutos de espécies de Leguminosae. Estudos para determinação de metabólitos secundários em extratos de sementes de *Hymenaea courbaril* L. (como *Hymenaea courbaril* var. *stilbocarpa* (Hayne) Y.T. Lee & Langenh.) revelaram grandes quantidades de diterpenos e flavonóides (Nogueira *et al.* 2001). A presença desses metabólitos secundários no tegumento das sementes pode indicar a função de proteção contra danos devidos à oxidação, como a formação de radicais livres.

O escurecimento do tegumento de sementes de *C. echinata* armazenadas, relatado por Hellmann *et al.* (2006), sugere que pode estar ocorrendo a oxidação de substâncias fenólicas presentes no tegumento.

Neste trabalho buscou-se analisar a relação entre as condições do armazenamento das sementes de *Caesalpinia echinata*, particularmente a temperatura do ambiente e o teor de água das sementes, sua capacidade de conservação da viabilidade, sua relação com processos respiratórios e oxidativos, bem como verificar a aplicabilidade das equações de previsibilidade da longevidade, visando fornecer subsídios para a conservação da espécie em bancos de germoplasma.

2. Objetivos

- Estudar a viabilidade de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) a partir de análises comparativas de sementes com diferentes qualidades iniciais e diferentes procedências;
- Estudar a deterioração dessas sementes quando submetidas a diferentes condições de temperatura e umidade;
- Verificar a aplicabilidade de modelos matemáticos para previsão da perda de viabilidade para as sementes dessa espécie;
- Analisar o grau de influência da ação oxidativa sobre a deterioração dessas sementes.

3. Material e Métodos

3.1. Obtenção e caracterização do material vegetal

As sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae) foram coletadas em diferentes locais, de modo a constituir lotes com sementes formadas sob condições edafo-climáticas diversas (Tabela 1). Cada lote foi constituído por sementes obtidas de frutos maduros coletados de 15 a 25 matrizes de uma dada procedência, além de sementes recém dispersas (no mesmo dia da coleta), de forma a se conseguir número de sementes suficiente para os tratamentos. Os frutos maduros foram expostos ao sol em bandejas cobertas com tela de sombrite, para sua abertura espontânea.

As sementes foram inicialmente caracterizadas pelo seu teor de água, potencial hídrico, conteúdo de massa seca, sua capacidade germinativa e vigor (capacidade de produzir plântulas normais). A determinação do teor de água das sementes foi efetuada por secagem em estufa a $103\pm 2^{\circ}\text{C}/17\text{h}$, segundo metodologia recomendada pela ISTA – International Seed Testing Association (2005), e os resultados calculados em base úmida (Brasil 2009). O potencial hídrico foi medido por meio do potenciômetro WP4 (Decagon), baseando-se na temperatura do ponto de orvalho, conforme descrito em Delgado & Barbedo (2012). Para estas determinações, foram utilizadas três repetições de 5 sementes por lote.

Os testes de germinação foram realizados em rolos de papel *germitest*, a 25°C e luz contínua, de acordo com as características da germinação dessa espécie, descritas por Mello & Barbedo (2007), com quatro repetições de 10 sementes. Os rolos de papel foram acondicionados em sacos de polietileno perfurados e colocados dentro de germinadores tipo Mangelsdorff. As sementes foram submetidas a pré-tratamento antifúngico, constituído por imersão em solução 0,2% de fungicida sistêmico a base de *Benomyl* durante 10 segundos, secagem superficial com papel absorvente e pulverização com fungicida não sistêmico a base de captana (0,005g/ 10 sementes) (Lisbôa-Padulla *et al.* 2009).

A partir dos testes de germinação, foram obtidas taxas de viabilidade, dadas pela porcentagem de sementes germinadas e, para avaliação do vigor das sementes foram analisadas as taxas de plântulas normais (Barbedo *et al.* 2002), anormais e de sementes mortas, de acordo com os critérios estabelecidos em Kryzanowski *et al.* (1999) e nas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Considerou-se como germinadas as sementes que emitiram a raiz primária, conforme critério botânico, adotado por Dickie & Smith (1995), ou a emergência de outras partes seminais, como por exemplo, os cotilédones, constituindo assim germinação anormal.

Os resultados foram submetidos a análise de variância e à comparação das médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Após a extração manual, as sementes permaneceram nas bandejas sobre a bancada do laboratório, para secagem em temperatura ambiente, por cerca de 10 dias. Então foram embaladas em sacos de papel e armazenadas em freezer, à temperatura de -18°C, por aproximadamente um ano para as sementes colhidas em 2014 (Paulínia, São Paulo e Mogi 2) e dois anos para as sementes colhidas em 2013 (Mogi 1).

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Núcleo de Pesquisa em Sementes e do Núcleo de Pesquisa em Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Botânica, em São Paulo, SP.

Tabela 1. Identificação das procedências, locais e datas de coleta dos lotes de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam..

Lot e	Códi go	Procedência (cidades)	Latitude S	Longitude W	Altitude (m)	Local	Data coleta	Nº de matrizes
1	PA	Paulínia	22° 45' 39"	47° 09' 14"	620	Bosque dos 500 anos	Nov/2014	20
2	M1	Mogi Guaçu	22° 13'	46° 33'	640	Bosque do Pau- Brasil	Dez/2013	15
3	M2	Mogi Guaçu	22° 13'	46° 33'	640	Bosque do Pau- Brasil	Dez/2014	15
4	PE	São Paulo	23° 38' 08"	46° 38' 00"	860	Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI)	Dez/2014	15

3.2. Estudos de deterioração das sementes

As sementes permaneceram armazenadas em temperatura sub-zero (-18°C), em freezer, em sacos de papel, durante aproximadamente (um ano para as sementes coletadas em Assis, Paulínia, São Paulo (PEFI) e Mogi Guaçu em 2014 e durante aproximadamente dois anos para as sementes coletadas em Mogi Guaçu em 2013).

As sementes de cada lote foram divididas em três sub-lotes, a fim de se obter tratamentos com três níveis de teor de água das sementes.

Um terço das sementes de cada lote permaneceu com seus valores iniciais de T.A. (10 - 11%). Outra terça parte das sementes foi submetida a secagem em saco de náilon colocado dentro de dessecador com sílica-gel, até a dedução do T.A. para cerca de 7%. A última terça parte de cada lote foi submetida a hidratação (através de umidificação em saco de náilon sobre lâmina de água em dessecador) até cerca de 15% de teor de água (metodologia adaptada de Valentini 1992 e Chaves & Usberti 2003). Após terem sido secas ou hidratadas, as sementes permaneceram em câmara fria (5°C) em embalagens de polietileno seladas, por 3 a 5 dias, para homogeneização da umidade. Após esses períodos, foram determinados o potencial hídrico e o teor de água das sementes.

As sementes de cada nível de T.A. de cada lote foram divididas em frascos de vidro com fechamento hermético (70 sementes por frasco), e incubadas às temperaturas de 40°C e 50°C , para a obtenção de curvas completas de deterioração, com base na metodologia recomendada por Ellis & Roberts (1980) e utilizada por Chaves & Usberti (2003).

Os tratamentos foram constituídos por períodos crescentes (de 6h até 30 dias) de incubação, de frascos com sementes em cada um dos três níveis de teor de água (ca. de 7%, 10% e 15%), em câmaras incubadoras às temperaturas de 40°C e 50°C , até que se obtivesse a completa perda da viabilidade, para cada um dos lotes, conforme Tabela 2.

Ao final de cada período de incubação, um frasco era retirado e a deterioração das sementes avaliada através de teste de germinação (4 repetições x 10 sementes), conforme descrito anteriormente e através do teste de tetrazólio (3 repetições x 10 sementes), conforme metodologia descrita para a espécie por Lamarca *et al.* (2009). Neste teste, a deterioração das sementes foi avaliada pela análise da proporção de tecidos seminais vivos, deteriorados e mortos.

Para facilitar a remoção do tegumento, as sementes foram imersas em água destilada por 10 segundos. Os embriões foram imersos em solução 0,05% de 2,3,5-trifenilcloreto de tetrazólio por duas horas a 35°C em ausência de luz, após acondicionamento entre folhas de papel mata-borrão umedecido, a 25°C por uma hora.

Os resultados dos testes de germinação foram expressos em valores médios de porcentagem e desvios-padrão.

3.3. Aplicação das equações de previsão da viabilidade

Os valores percentuais obtidos para germinação e plântulas normais, das sementes de M1 e M2 foram transformados em *probit*, utilizando-se a tabela de transformação de valores de porcentagem proposta por Finey (1952) *apud* Ignácio (2013), para verificar as relações lineares entre viabilidade e os períodos de incubação, conforme metodologia proposta por Roberts (1973) e Ellis & Roberts (1980). Para a obtenção das equações de viabilidade, segundo a metodologia proposta por Roberts (1973), selecionaram-se 12 grupos de três tratamentos, combinando duas temperaturas e dois teores de água. Os grupos compostos são apresentados na Tabela 3:

Tabela 2. Tratamentos de deterioração combinando teor de água (T. A. %), temperatura e períodos de incubação (h) de sementes de (*Caesalpinia echinata* Lam.) coletadas em Mogi Guaçu, Paulínia e São Paulo.

Procedência	Lote	T.A. (%)	40°C							50°C					
			t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆
Mogi Guaçu (2013)	M1	7	0	12	72	120	240	480	600	12	72	96	120	240	-
		11	0	12	72	240	480	720	-	12	24	36	48	72	120
		15	0	6	12	24	36	48	-	6	12	24	36	48	60
Mogi Guaçu (2014)	M2	7	0	12	72	120	240	480	600	12	72	96	120	240	-
		11	0	24	72	240	480	720	-	24	36	48	60	72	-
		15	0	-	12	24	48	72	-	6	12	18	24	48	-
Paulínia (2014)	PA	7	0	24	240	-	-	-	-	24	72	-	-	-	-
		11	0	24	72	240	480	-	-	24	48	72	96	120	-
		15	0	24	72	-	-	-	-	24	48	-	-	-	-
São Paulo (2014)	SP	7	0	24	72	-	-	-	-	24	72	-	-	-	-
		11	0	24	72	240	480	-	-	24	72	120	240	-	-
		15	0	24	72	-	-	-	-	24	72	-	-	-	-

Tabela 3. Combinações de tratamentos de deterioração envolvendo duas temperaturas de incubação (°C) e três níveis de teor de água (T.A. %) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.

T.A. %	7		11		15	
T °C	40	50	40	50	40	50
Tratamentos	a	b	c	d	e	f
Combinações						
1	x	x	x			
2	x	x		x		
3	x	x			x	
4	x	x				x
5	x		x	x		
6		x	x	x		
7			x	x	x	
8			x	x		
9	x				x	x
10		x			x	x
11			x		x	x
12				x	x	x

Através das equações das retas resultantes de regressão linear (programa Excel), obtêm-se os valores de K_i (viabilidade inicial estimada) e de sigma (desvio padrão da distribuição de frequência de mortes das sementes). Sigma (σ) é calculado pelo inverso do coeficiente angular da reta ($- \text{tg}\beta$), e é expresso em dias. Seu significado prático é que se refere ao período que determinado lote de sementes leva para que a germinação caia de um *probit* (de 50% para 15,9%, por exemplo). Constitui assim uma estimativa da taxa de perda da viabilidade.

K_L e sigma não devem variar com diferenças entre lotes de sementes, sendo constantes para a espécie. σ é proporcional ao período médio de longevidade (Ellis & Roberts 1980).

σ : p_{50} é constante para cada lote, sendo $\sigma / p_{50} = K_{\sigma}$, que varia em função do vigor do lote; e, quando $p_{50} = 0$, tem-se $K_i = 1 / K_{\sigma}$, obtendo-se assim o valor dessa constante.

$$y = K_L - C_w \cdot \log m$$

Têm-se ainda que $K_L = \log K_{\sigma} + K_v$ e

$\log \sigma = K_L - C_1 \cdot m - C_2 \cdot t$, a partir de que, utilizando-se t e m (T, A, %, b.u.) dos testes de germinação realizados com 3 combinações de 2 temperatura e 2 níveis de T.A., obtêm-se as constantes K_L , C_1 e C_2 (Roberts 1973).

Para empregar a equação melhorada proposta por Ellis & Roberts (1980),

$$v = K_i - p/10^{(K_E - C_W \log m - C_H t - C_Q t^2)},$$

realizou-se a regressão linear (através do programa Excel), da relação logarítmica entre σ e o teor de água (m), obtendo-se, da equação resultante, as constantes K e C_w (relativa à variação de umidade).

A partir do valor obtido para K , pode-se calcular K_E :

$$K_E = K + C_H t + C_Q t^2$$

3.4. Análise do grau de influência das taxas de respiração e da ação oxidativa sobre a deterioração das sementes

Visando identificar a influência de processos oxidativos sobre a velocidade de deterioração das sementes, amostras foram analisadas quanto às taxas respiratórias, ou seja, o consumo de oxigênio (O_2) e a produção de dióxido de carbono (CO_2), por meio de analisador modelo ILL6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsburg, EUA). A porcentagem de O_2 e CO_2 no ar do recipiente de incubação das sementes foi obtida por sensores à base de óxido de zircônio (ZrO_2) para o O_2 e infravermelho para o CO_2 . As amostras de sementes de cada lote, após armazenamento por um ano (lotes PA, PE e M2) e por dois anos (lote M1), com teor de água inicial (10-11%) e após secagem (ca. 7%) e hidratação (ca 15%), foram acondicionadas em respirômetros, constituídos por frascos de vidro, hermeticamente fechados, com orifícios recobertos por septo de borracha, onde foram

inseridos os eletrodos do equipamento para a tomada da amostra de ar dos frascos, conforme metodologia descrita por Lamarca & Barbedo (2012).

Antes da incubação foram determinados a massa fresca (g) e o teor de água, bem como o volume dos frascos para cálculo do volume de ar no interior dos frascos (descontado o volume ocupado pelas sementes).

O fechamento dos frascos ao início dos experimentos, corresponde à atmosfera normal (20,9% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono). O consumo de O_2 e a produção de CO_2 pelas sementes foram estimados pela diferença entre os valores medidos e os da atmosfera normal. Considerando-se a pressão atmosférica local em atmosferas (atm), os valores obtidos em porcentagem de O_2 ou de CO_2 foram convertidos para pressão parcial do gás e, baseando-se no volume de ar nos frascos e na temperatura registrada em cada avaliação, os valores foram convertidos para micromols (μmols) de O_2 e de CO_2 .

Os valores obtidos nas avaliações foram divididos pela massa seca total da amostra e pelo período de incubação, obtendo-se os valores de O_2 e CO_2 expressos em micromols por grama de massa seca por dia ($\mu\text{mol/gMS/ dia}$). O quociente respiratório (QR) foi calculado dividindo-se o valor obtido para produção de CO_2 pelo obtido para consumo de O_2 ($QR=CO_2/O_2$), segundo descrito por Kader & Saltveit (2002).

Pelo QR pode-se inferir o substrato da respiração, pois $QR = 1$ quando ocorre oxidação completa de um carboidrato e $QR > 1$ quando ocorre a oxidação de ácidos graxos (Lamarca, 2009). Ainda, quando $QR \leq 1$, é indicativo de respiração aeróbica e, quando $QR > 1$, indica que está ocorrendo respiração anaeróbica (Labouriau 1983 *apud* Lamarca & Barbedo 2012).

Para cada uma das subamostras com diferentes teores de água de cada lote de sementes (Tabela 2), foi avaliada a taxa respiratória após 30 dias de incubação à temperatura de 22°C, em ausência de luz. Para cada tratamento (teor de água/ temperatura/ período de incubação), com três repetições de 10 sementes, a taxa respiratória foi avaliada após 24h de incubação à temperatura do tratamento (40°C ou 50°C).

3.5. Avaliação do potencial antioxidante

Para avaliação do potencial antioxidante, foram obtidos extratos hidroalcóolicos do tegumento de subamostras de 30 sementes de *C. echinata* de cada tratamento. Os tegumentos foram extraídos após imersão em água destilada por 10 segundos, ou após embebição entre folhas de papel mata-borrão umedecidas com água destilada, por duas horas, a 25°C. Foram secos sobre sílica-gel, em dessecador, por períodos de 7 a 10 dias, após o quê foram triturados em almofariz até a obtenção de um pó fino, sendo armazenados sob congelamento (-18°C). Os extratos alcóolicos foram obtidos pelo método de extração exaustiva, utilizando pó dos tegumentos das sementes, com etanol comercial 70%. Os extratos hidroalcóolicos foram pesados para a determinação de rendimento de extração e armazenado em freezer a -18°C.

Foram utilizadas diluições aquosas (2,5 mg .L⁻¹) dos extratos brutos para avaliação do potencial da atividade antioxidante, através da quantificação de compostos fenólicos presentes nos tegumentos das sementes de *C. echinata* procedentes de Mogi Guaçu (M1) submetidas à incubação a 50°C, com dois níveis de teor de água (7% e 11%).

A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada através do método de Folin-Ciocateau, adaptada para microplaca, com leitura em ELISA, seguindo metodologia adaptada de Marinova *et al.* 2005. Foi utilizado como padrão ácido gálico (140 µg. ml⁻¹).

As amostras foram analisadas em triplicata. As respectivas absorbâncias foram medidas a 760 nm. O conteúdo de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico (µg. g⁻¹ de tegumento).

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização inicial

As informações relativas à composição dos lotes, como datas de coleta, quantidades de sementes dispersas e maduras pré-dispersão (colhidas nos frutos) em cada lote e dados de caracterização inicial pós coleta e pós armazenamento são apresentados nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Caracterização inicial de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. coletadas em Mogi Guaçu (M1 e M2), Paulínia (PA) e São Paulo (SP). sementes dispersas (d) e maduras pré-dispersão (m); valores médios de teor de água (T.A.), potencial hídrico (Ψ MPa), matéria seca (MS), taxas de germinação (G), de plântulas normais (N) e anormais (A) e de sementes mortas (M). (m-e: sementes maduras pré-dispersão, secas em estufa)

Lote		data	composição do lote	sementes (g)	T. A. %	Ψ (MPa)	MS (g/sem)	G%	N%	A%	M%
M1	PC	03-04/12/13	m	1090	15,7	-33,38	0,338	93	93	0	7
	PA	15/10/15			11,0	-81,81	0,280	83	70	13	18
M2	PC	10/12/14	d	445		-56,02		67	47	20	33
		18/12/14	d	310	12,7	-82,06	0,219	77	63	14	23
			média			-69,04		72	55	17	28
	PA	26/10/15			11,3		0,248	85	70	15	15
PA	PC	07/11/14	d	155	14,3	-46,17	0,315	100	87	13	0
		07/11/14	m	520	16,9	-30,02	0,248	100	82	18	0
		07/11/14	m-e	240							
	PA	02/12/15	d		9,7	-56,82	0,204	100	73	27	0
		02/12/15	m		9,3	-58,88	0,272	100	77	23	0
		02/12/15	m-e		8,9	-62,86	0,226	60	0	60	40
			média			-59,520	0,234	87	50	37	13
	PC	29-31/12/14	d	540	14,8	-38,40	0,268	80	40	40	20
		29-31/12/14	m	195			0,305	94	58	36	6
		02-10/01/15	d+m	170			0,316	81	59	22	19
			média				0,296	85	52	33	15
	PA	05/12/15			10,8	-58,76	0,267	93	80	13	8

Analisando-se a viabilidade inicial para os lotes de sementes das diferentes procedências, verificou-se que a germinação pós coleta não diferiu entre as procedências, com exceção do lote colhido em Mogi Guaçu em 2014 (M2), o qual apresentou germinação mais baixa (tabela 5), embora as taxas de plântulas normais não tenham diferido significativamente.

Tabela 5. Germinação inicial de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. coletadas em Mogi Guaçu (M1 e M2), Paulínia (PA) e São Paulo (SP). Valores médios obtidos em testes de germinação pós coleta (PC) e pós armazenamento (PA) por cerca de um ano (M2, PA e SP) e cerca de dois anos (M1). Médias seguidas pela mesma letra (minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas) não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Lotes	M1			M2			PA			SP		
Sementes Germinadas (%)												
PC	93	a	AB	77	a	B	100	a	A	83	a	AB
PA	83	a	A	85	a	A	87	a	A	93	a	A
Sementes Mortas (%)												
PC	7	a	AB	23	a	A	0	a	A	17	a	AB
PA	18	a	A	15	a	A	13	a	A	8	a	A
Plântulas Normais (%)												
PC	83	a	A	64	a	A	88	a	A	57	a	A
PA	70	a	A	70	a	A	50	b	A	80	a	A
Plântulas Anormais (%)												
PC	10	a	A	13	a	A	13	a	A	27	a	A
PA	13	a	A	15	a	A	37	b	B	13	a	A

As diferenças observadas provavelmente devem-se mais à qualidade das sementes dispersas utilizadas na composição dos lotes, uma vez que são colhidas no chão e, mesmo tendo-se o cuidado de selecionar as recém dispersas, que não tenham sido expostas à umidade do solo (tegumento liso), geralmente as obtidas dos frutos maduros, colhidos antes da dispersão, apresentam melhor qualidade. Pode-se constatar na tabela 4 essa diferença de qualidade entre sementes dispersas e pré-dispersas, colhidas em Mogi Guaçu e em São Paulo.

Com relação ao lote de Paulínia, foi composto em parte por sementes maduras que foram secas em estufa. Este sub-lote apresentou germinação mais baixa e plântulas anormais (figura 1), o que influenciou nos resultados do lote composto para que se atingisse o número suficiente de sementes para os testes propostos (tabela 4).



Figura 1. A e E. Plântulas normais de *Caesalpinia echinata* Lam. B, C e D. Plântulas anormais: B. Parte aérea ausente; C. Raiz ausente; D. Plântula atrofiada.

4.2. Estudo da deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata*

Quando se comparam os resultados de germinação obtidos para sementes após os diferentes períodos de incubação, com os três níveis de teores de água (fig. 2 a 9), pode-se observar que, quando estes foram mais elevados, houve uma queda mais acentuada nas taxas de germinação e plântulas normais, para todos os lotes. Este fato se deve à grande influência da água dentro das sementes nos processos de deterioração das mesmas (Marcos Filho 2015).

Contudo, pode-se observar que o aumento do teor de água, bem como da temperatura de incubação, não alterou de forma exatamente igual a progressão da deterioração das sementes dos lotes avaliados. Isso decorre em função dos diferentes níveis de vigor, inerentes a cada lote de sementes, e que, segundo Malavasi (1988), é afetado por fatores genotípicos, climáticos e referentes aos processos durante a coleta, beneficiamento e transporte, bem como de armazenamento das sementes.

Por exemplo, sementes de M1 incubadas com 7% a 50 °C (figura 2) mantiveram germinação acima de 50% após 20 dias, enquanto as de M2 (mesma população, anos diferentes) já não germinavam (figura 4), provavelmente indicado maior grau de maturidade das primeiras ou melhor qualidade inicial das sementes (tabela 4), conforme já discutido acima sobre a composição dos lotes. Isso também pode ser verificado na incubação das sementes mais úmidas, com 11%, a 40 °C, com deterioração mais rápida de M2 em relação a M1 (figuras 4 e 5).

Porém, essas diferenças não se repetem quando se comparam as curvas obtidas a partir das taxas de plântulas normais para os mesmos lotes, tendo apresentado resultados bastante semelhantes (figuras 3 e 5).

Quando se comparam diferentes procedências, percebe-se ainda que as sementes colhidas em Paulínia (PA) e São Paulo (SP) apresentaram maior longevidade que as de Mogi Guaçu, pois com 11% de umidade, após 20 dias de incubação a 40°C, apresentaram germinação de 20% (PA, figura 6) e 30% (SP, figura 8), enquanto as de M1 apresentaram valores inferiores a 10% (figura 2) e as de M2 não germinavam mais (figura 4).

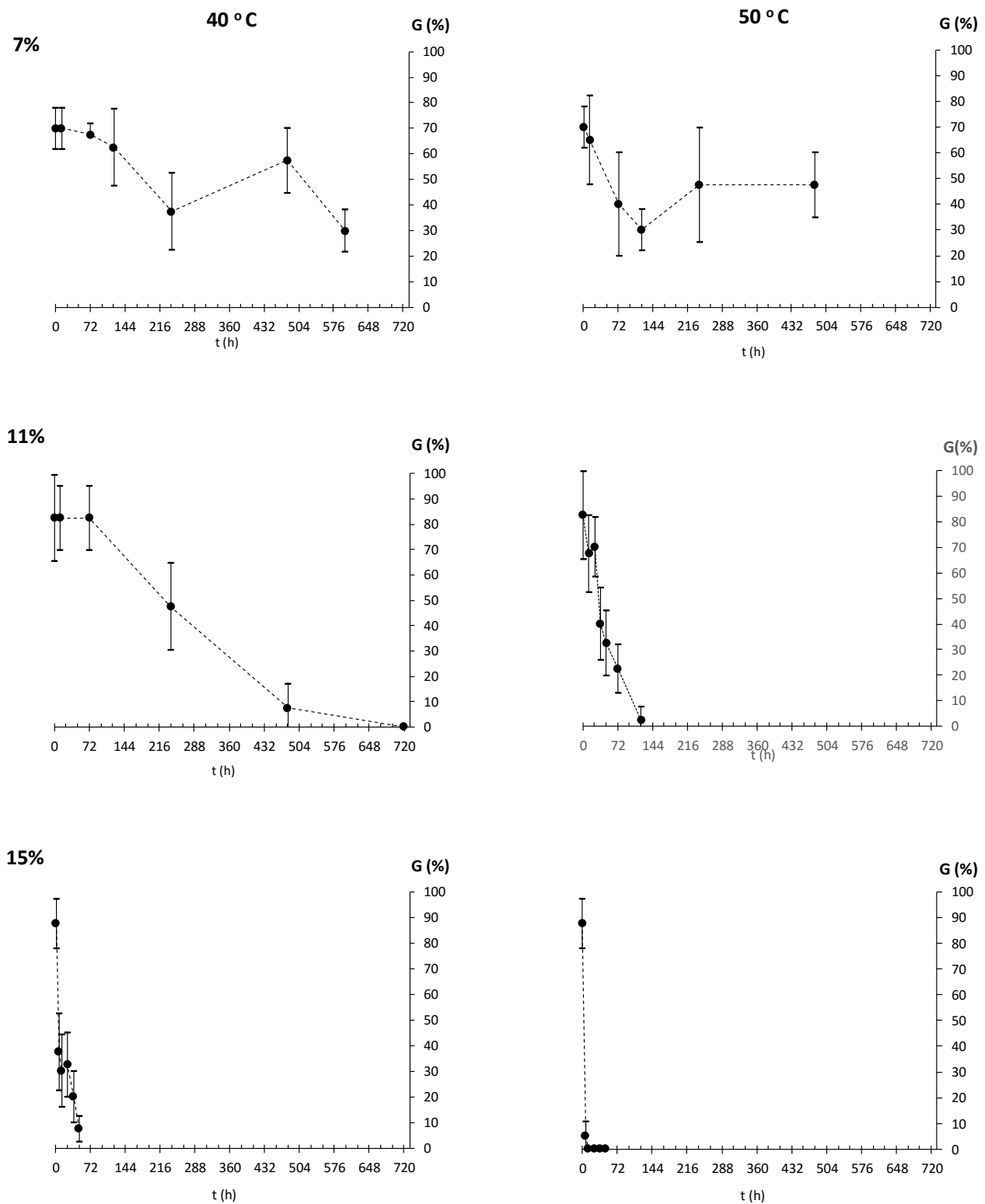


Figura 2. Valores médios e desvios obtidos para germinação (G) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água (7%, 11% e 15%), procedentes de Mogi Guaçu (2013), após tratamentos de deterioração através de incubação por diferentes períodos (t) a 40°C e a 50°C.

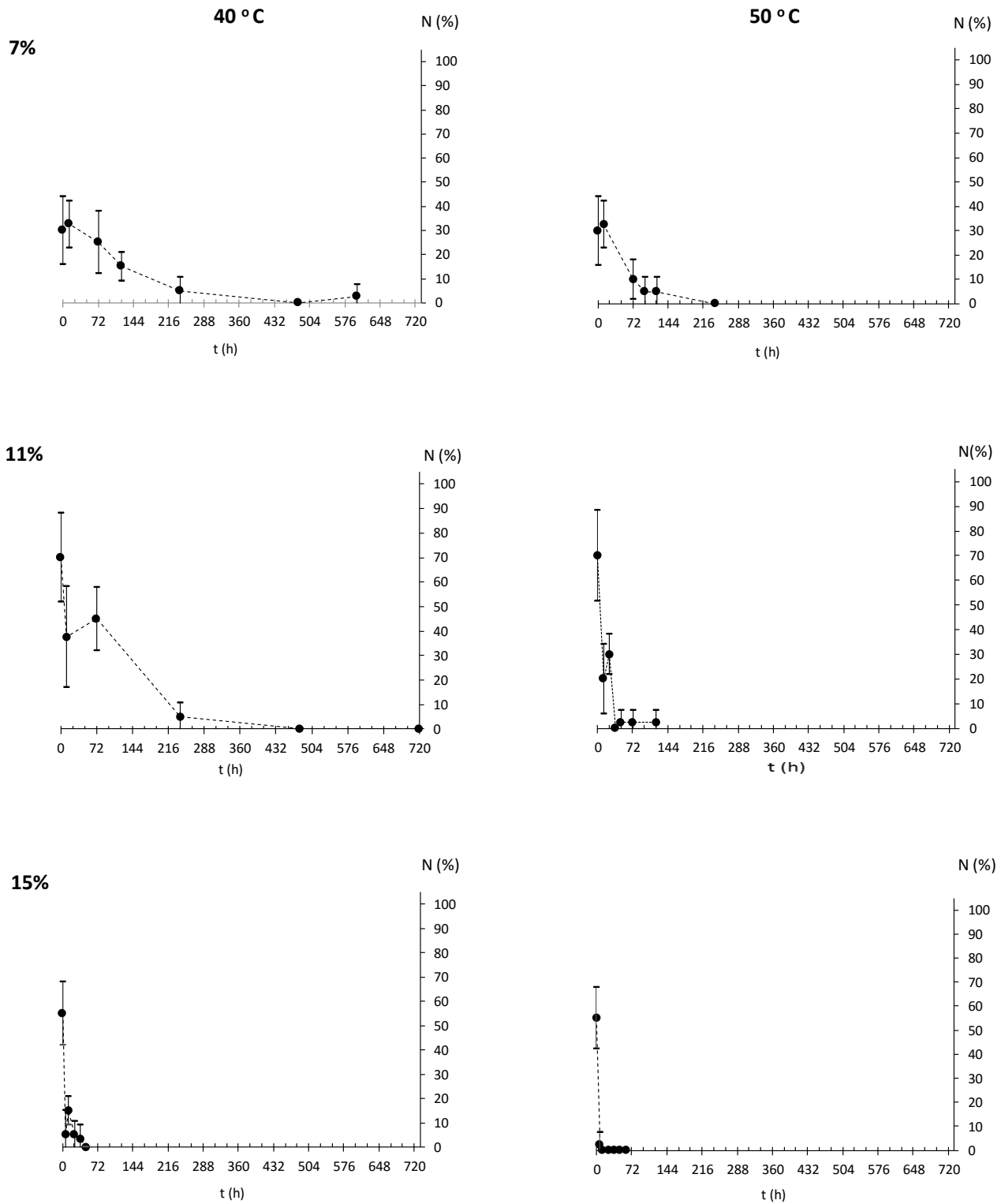


Figura 3. Valores médios e desvios obtidos para plântulas normais (N) nos testes de germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água (7%, 11% e 15%), procedentes de Mogi Guaçu (2013), após tratamentos de deterioração através de incubação por diferentes períodos (t) a 40°C e a 50°C.

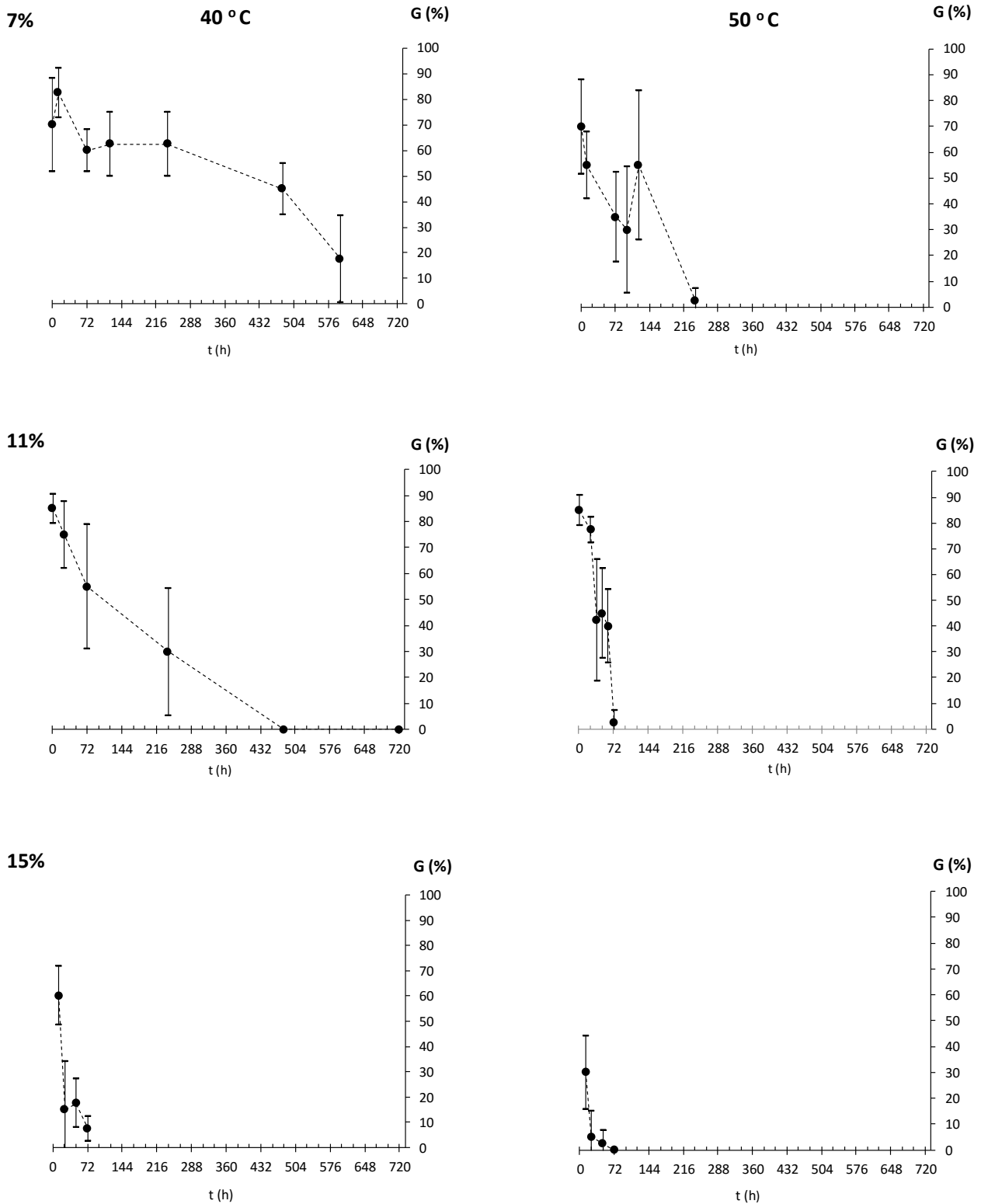


Figura 4. Valores médios e desvios obtidos para germinação (G) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água (7%, 11% e 15%), procedentes de Mogi Guaçu (2014), após tratamentos de deterioração através de incubação por diferentes períodos (t) a 40°C e a 50°C.

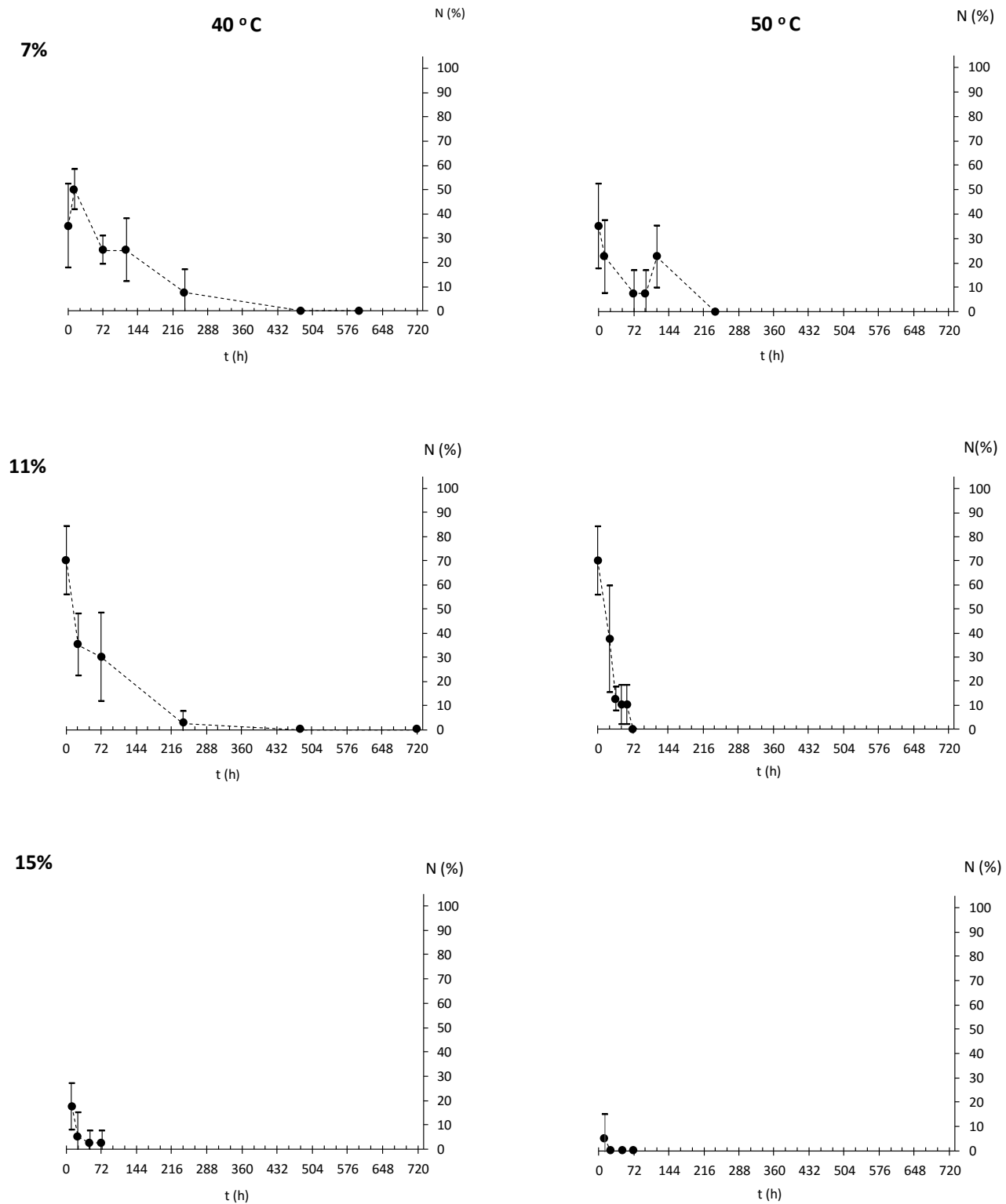


Figura 5. Valores médios e desvios obtidos para plântulas normais (N) nos testes de germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água (7%, 11% e 15%), procedentes de Mogi Guaçu (2014), após tratamentos de deterioração através de incubação por diferentes períodos (t) a 40°C e a 50°C.

Com relação às taxas de plântulas normais, de um modo geral, após períodos de, no máximo 10 dias de incubação a 40°C, os valores foram inferiores a 10% (figuras 3, 5, 7 e 9).

Outro aspecto interessante foi a rápida deterioração das sementes de todas as origens em ambas as temperaturas de incubação quando o teor de água das sementes foi 15%, com germinação praticamente nula após três dias. Mesmo as sementes de SP, que ainda apresentavam 30% de germinação (figura 8), não conseguiram produzir plântulas normais (figura 9). Note-se, ainda, que a progressão da queda na germinação destas sementes aponta para a nulidade antes do quarto dia (figura 9).

Contudo, antes que as sementes se deterioresem a ponto de produzir anormalidades nas plântulas (figura 1), outras características detectáveis são afetadas, como por exemplo a produção de plântulas normais menos ou mais vigorosas (figura 10).

Outro teste de vigor utilizado para analisar a deterioração das sementes de pau-brasil foi o teste de tetrazólio. Através deste, é possível avaliar o grau de deterioração das sementes, analisando-se os tecidos seminais corados pela reação com o sal de tetrazólio (figura 11) e quantificar as sementes germináveis, viáveis, inviáveis e mortas, segundo a classificação proposta para a espécie por Lamarca *et al.* 2009.

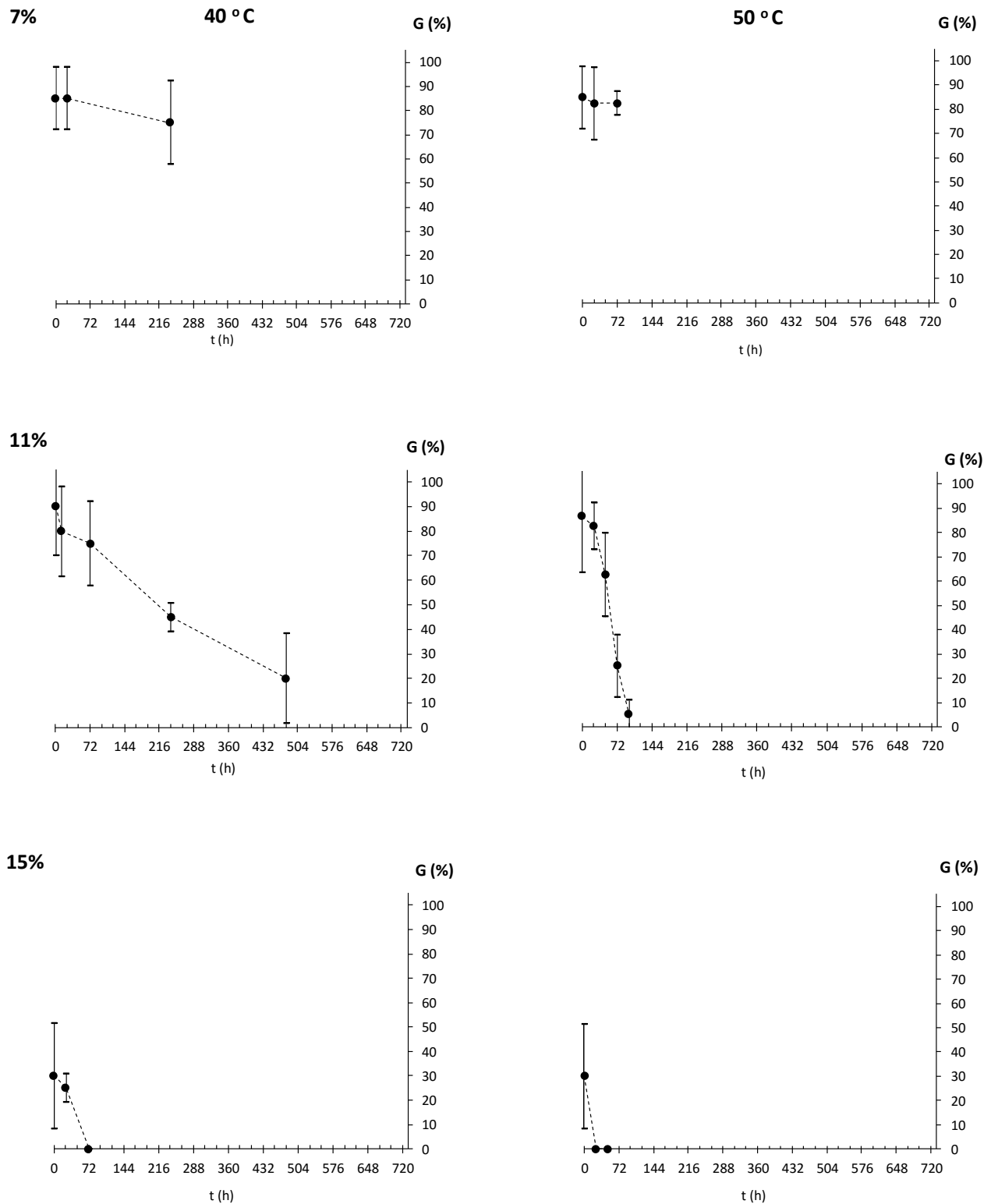


Figura 6. Valores médios e desvios obtidos para germinação (G) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água (7%, 11% e 15%), procedentes de Paulínia (2014), após tratamentos de deterioração através de incubação por diferentes períodos (t) a 40°C e a 50°C.

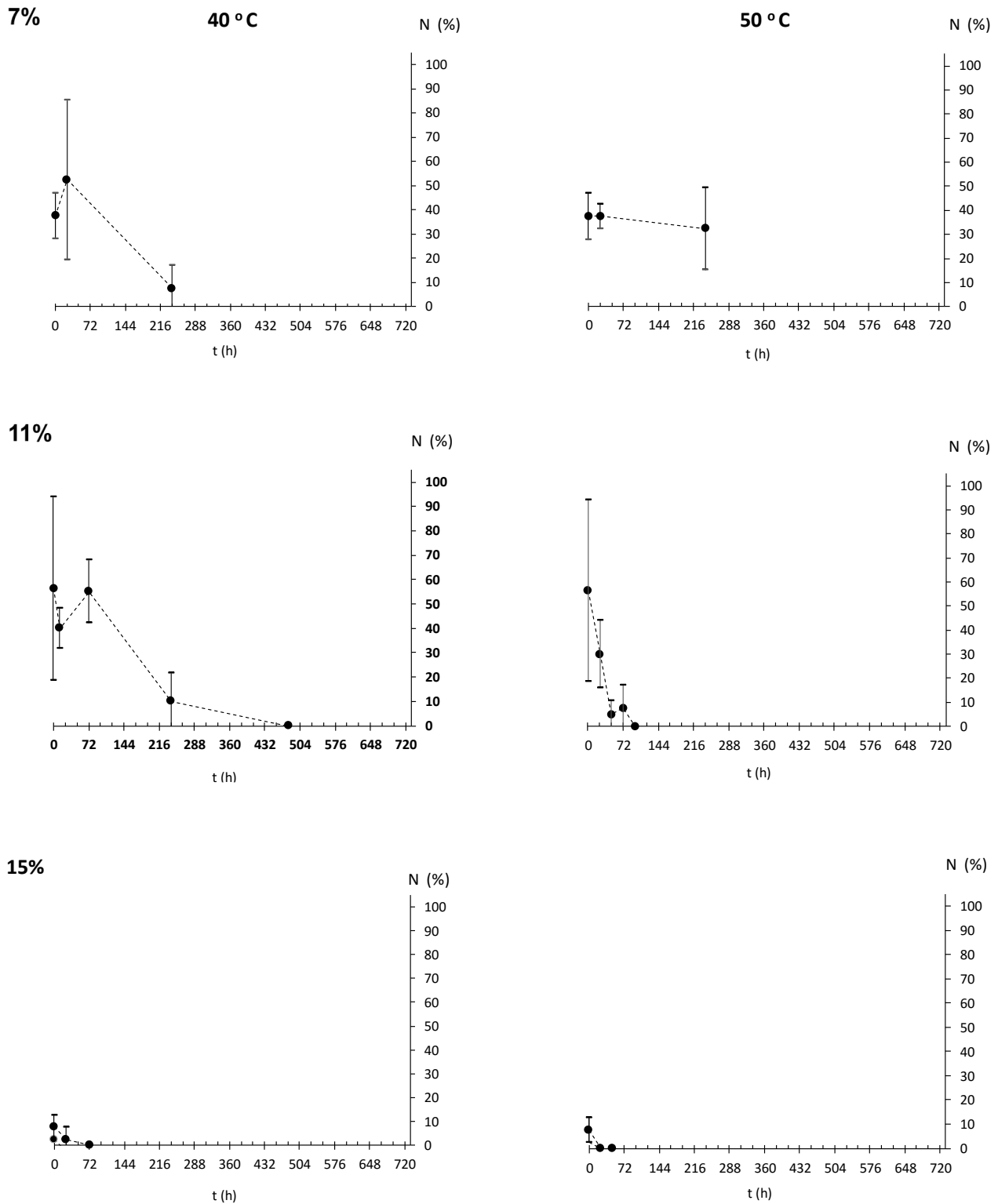


Figura 7. Valores médios e desvios obtidos para plântulas normais (N) nos testes de germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água (7%, 11% e 15%), procedentes de Paulínia (2014), após tratamentos de deterioração através de incubação por diferentes períodos (t) a 40°C e a 50°C.

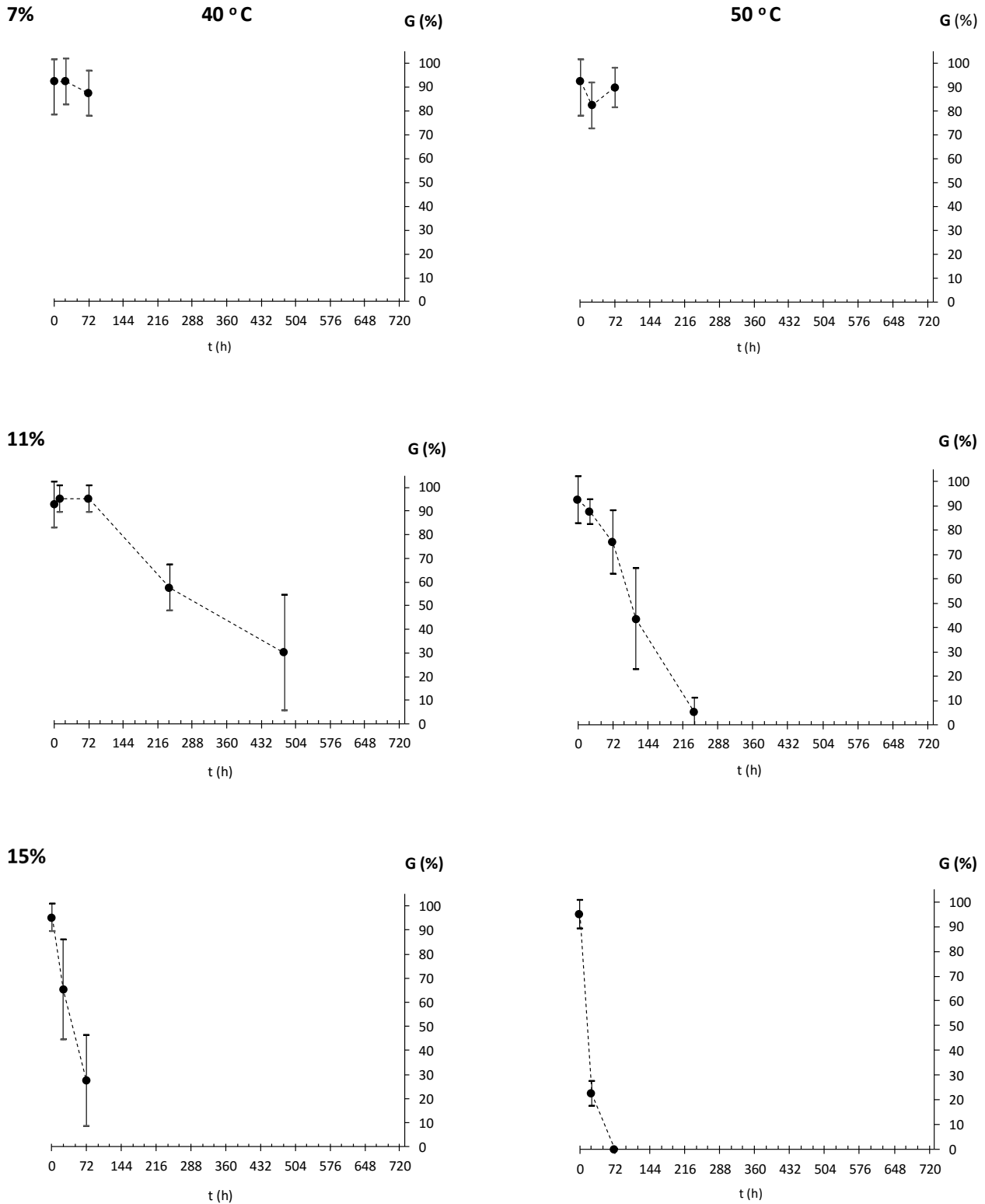


Figura 8. Valores médios e desvios obtidos para germinação (G) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água (7%, 11% e 15%), procedentes de São Paulo (2014), após tratamentos de deterioração através de incubação por diferentes períodos (t) a 40°C e a 50°C.

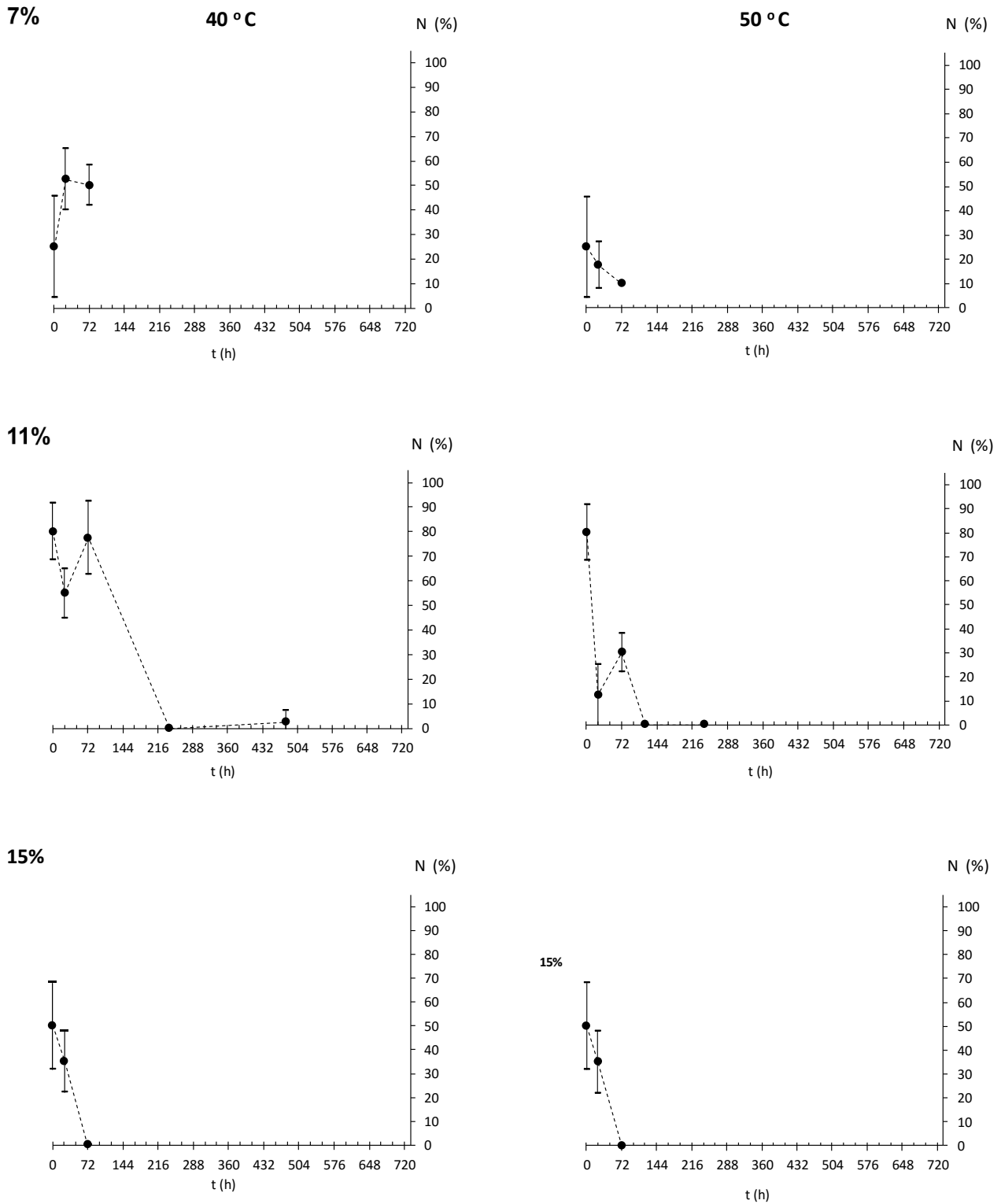


Figura 9. Valores médios e desvios obtidos para plântulas normais (N) nos testes de germinação de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. com diferentes teores de água (7%, 11% e 15%), procedentes de São Paulo (2014), após tratamentos de deterioração através de incubação por diferentes períodos (t) a 40°C e a 50°C,



Figura 10. Diferenças de vigor no desenvolvimento de plântulas normais de *Caesalpinia echinata* Lam. A. Plântulas normais vigorosas. B. Plântulas normais não vigorosas. C. Plântulas normais dispostas em gradiente decrescente de vigor.



Figura 11. Teste de tetrazólio. Sementes inviáveis de *C. echinata* Lam. (segundo classificação de Lamarca *et al.* 2009 para a espécie), após um ano armazenadas a -18°C . Sementes com tecidos em alto grau de deterioração (A - vermelho) e com mais de 75% de tecido morto (B - não corado).

4.3. Determinação de constantes e equação de previsibilidade da viabilidade

Quando se observam as curvas de sobrevivência de sementes de *C. echinata*, obtidas a partir da transformação dos dados de germinação em *probit* e regressão linear (figuras 12 e 13), nota-se que as variações nos teores de água e nas temperaturas de incubação influenciaram de diferentes formas, porém com efeitos cumulativos ou sinérgicos.

Para as sementes com teor de água de 7%, a viabilidade não foi significativamente afetada pela alteração de 10°C na temperatura de incubação (dados experimentais obtidos até o período de 10 dias e tendência).

Como pode ser observado nas figuras 12 e 13, a inclinação das retas obtidas para germinação (G%) nas duas temperaturas a 7% de umidade foi mais aproximada, quando comparada às obtidas a 11% e 15%.

Contudo, quando se consideram somente as taxas de plântulas normais, pode-se constatar que a elevação de 10°C na temperatura da incubação (de 40°C para 50°C) já foi suficiente para diminuir o vigor dessas sementes, mesmo com o menor teor de água (7%).

Quando o teor de água das sementes foi de 11%, uma maior velocidade de deterioração das sementes pode ser constatada nas duas temperaturas (fig. 12 e 13), devido à maior inclinação das retas obtidas para germinação e, portanto, maiores taxas de deterioração (dadas pelos coeficientes angulares das retas) e menores os valores calculados a partir destes para σ , ou seja, menores os períodos necessários para que a germinação caia de um *probit*.

Também se observa maior distanciamento entre as tendências dos resultados de germinação a 40°C e a 50°C, demonstrando que, com este aumento de umidade nas sementes, a ação da temperatura na sua deterioração foi intensificada. O mesmo padrão se observa para plântulas normais resultantes nessas condições.

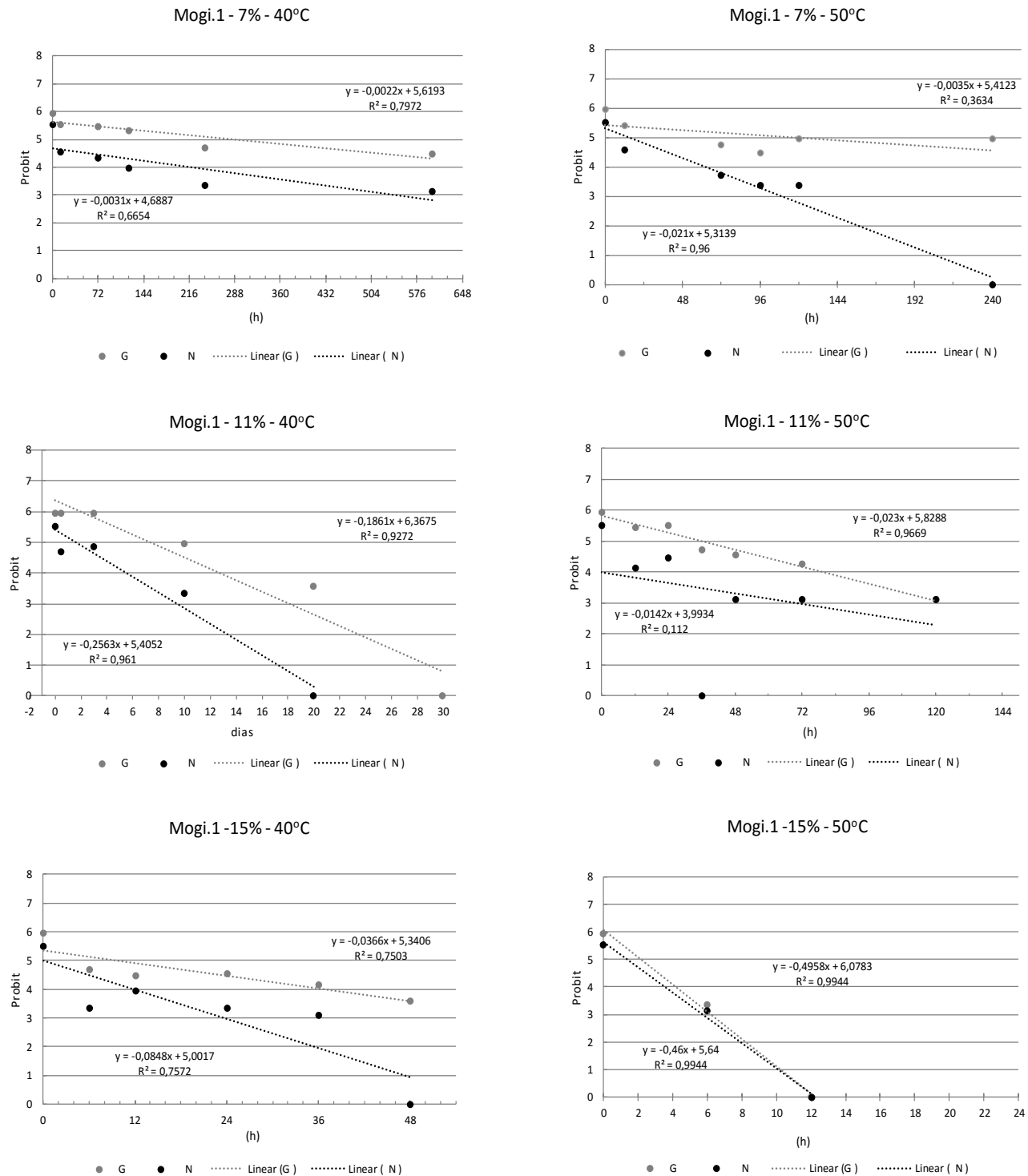


Figura 12. Curvas de sobrevivência de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. coletadas em Mogi Guaçu (2013) após incubação a 40°C e 50°C, com três níveis de teor de água (7%, 11% e 15%) por diferentes períodos. Sementes germinadas (G, linha cinza) e plântulas normais (N, linha preta). $Y_{G,7\%,40^\circ C} = -0,0022X + 5,6193$, $R^2 = 0,7972$; $Y_{N,7\%,40^\circ C} = -0,0031X + 4,6887$, $R^2 = 0,6654$; $Y_{G,7\%,50^\circ C} = -0,0035X + 5,4123$, $R^2 = 0,3634$; $Y_{N,7\%,50^\circ C} = -0,021X + 5,3139$, $R^2 = 0,96$; $Y_{G,11\%,40^\circ C} = -0,1861X + 6,3675$, $R^2 = 0,9272$; $Y_{N,11\%,40^\circ C} = -0,2563X + 5,4052$, $R^2 = 0,961$; $Y_{G,11\%,50^\circ C} = -0,023X + 5,8288$, $R^2 = 0,9669$; $Y_{N,11\%,50^\circ C} = -0,0177x + 4,7353$, $R^2 = 0,6419$; $Y_{G,15\%,40^\circ C} = -0,0366X + 5,3406$, $R^2 = 0,7503$; $Y_{N,15\%,40^\circ C} = -0,0848X + 5,0017$; $R^2 = 0,7572$; $Y_{G,15\%,50^\circ C} = -0,4958X + 6,0783$; $R^2 = 0,9944$, $Y_{N,15\%,50^\circ C} = -0,4275X + 5,315$, $R^2 = 0,9846$.

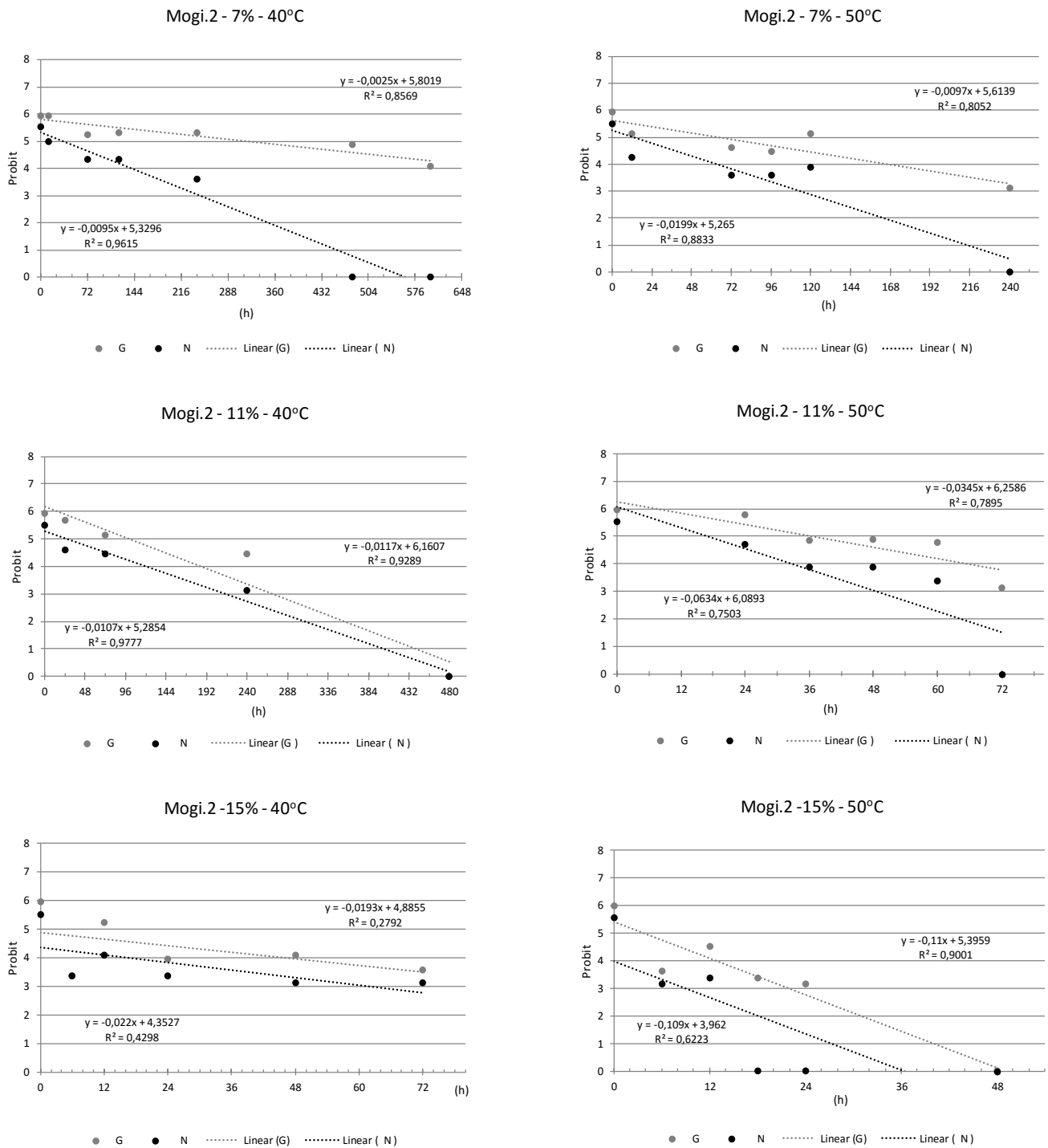


Figura 13. Curvas de sobrevivência de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. coletadas em Mogi Guaçu (2014) após incubação a 40°C e 50°C, com três níveis de teor de água (7%, 11% e 15%) por diferentes períodos. Sementes germinadas (G, linha cinza) e plântulas normais (N, linha preta). $Y_{G,7\%,40^\circ C} = -0,0025X + 5,8019$, $R^2 = 0,8569$; $Y_{N,7\%,40^\circ C} = -0,0095X + 5,3296$, $R^2 = 0,9615$; $Y_{G,7\%,50^\circ C} = -0,0097X + 5,6139$, $R^2 = 0,8052$; $Y_{N,7\%,50^\circ C} = -0,0199X + 5,265$, $R^2 = 0,8833$; $Y_{G,11\%,40^\circ C} = -0,0117X + 6,1607$, $R^2 = 0,9289$; $Y_{N,11\%,40^\circ C} = -0,0107X + 5,2854$, $R^2 = 0,9777$; $Y_{G,11\%,50^\circ C} = -0,0345X + 6,2586$, $R^2 = 0,7895$; $Y_{N,11\%,50^\circ C} = -0,0634X + 6,0893$, $R^2 = 0,7503$; $Y_{G,15\%,40^\circ C} = -0,0193X + 4,8855$, $R^2 = 0,2792$; $Y_{N,15\%,40^\circ C} = -0,022X + 4,3527$, $R^2 = 0,4298$; $Y_{G,15\%,50^\circ C} = -0,11x + 5,3959X$, $R^2 = 0,9001$; $Y_{N,15\%,50^\circ C} = -0,109X + 3,962$, $R^2 = 0,6223$.

Para permitir uma melhor visualização, as retas obtidas são apresentadas em função das temperaturas (figura 14) e em função do teor de água (figura 15).

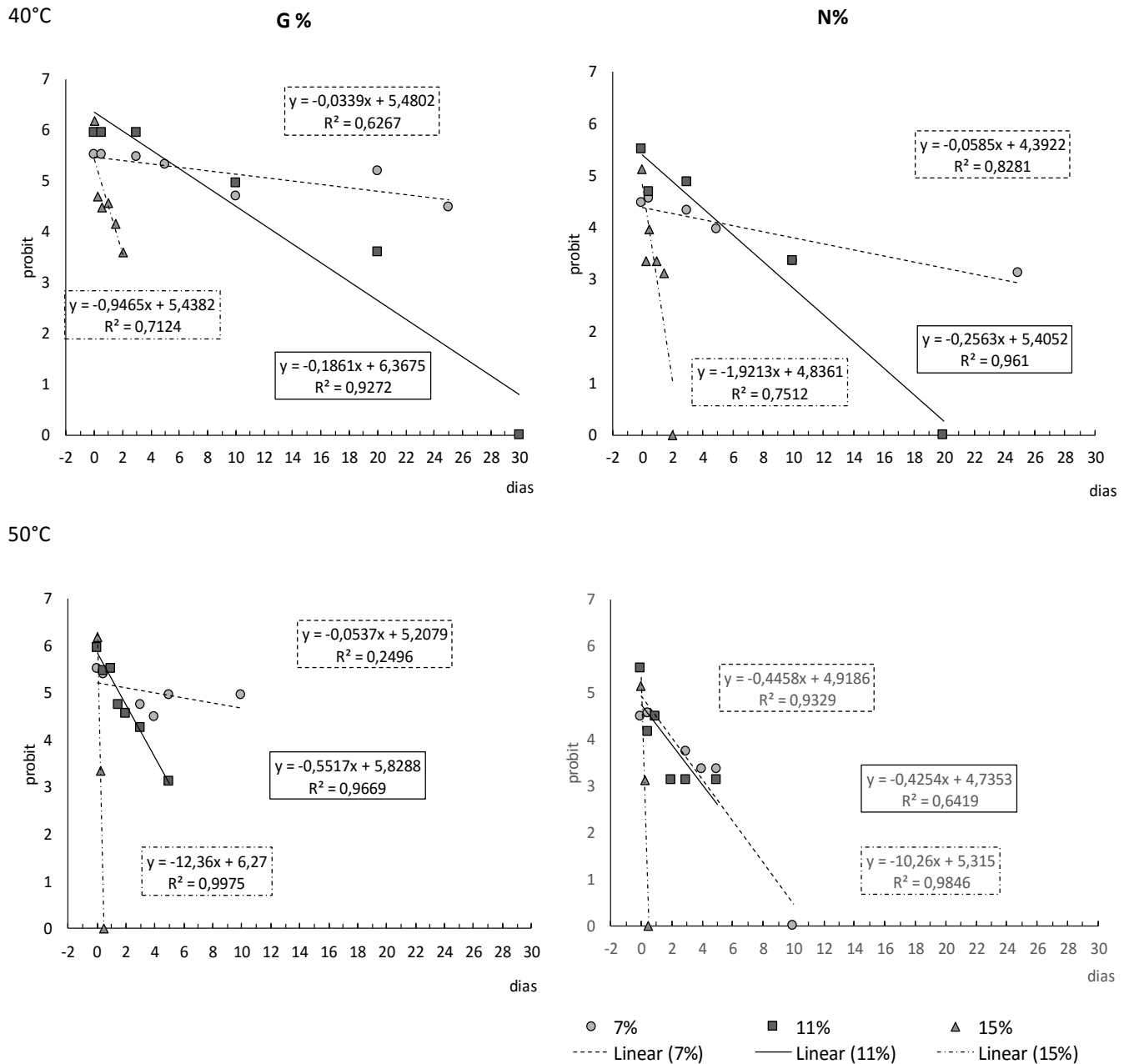


Figura 14. Curvas de sobrevivência de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. coletadas em Mogi Guaçu (2013), com valores de germinação (G) e de plântulas normais (N) transformados em *probit*, em três níveis de teor de água (7% ● ---, 11% ■ — e 15% ▲ ...) em cada temperatura de incubação (40°C e 50°C).

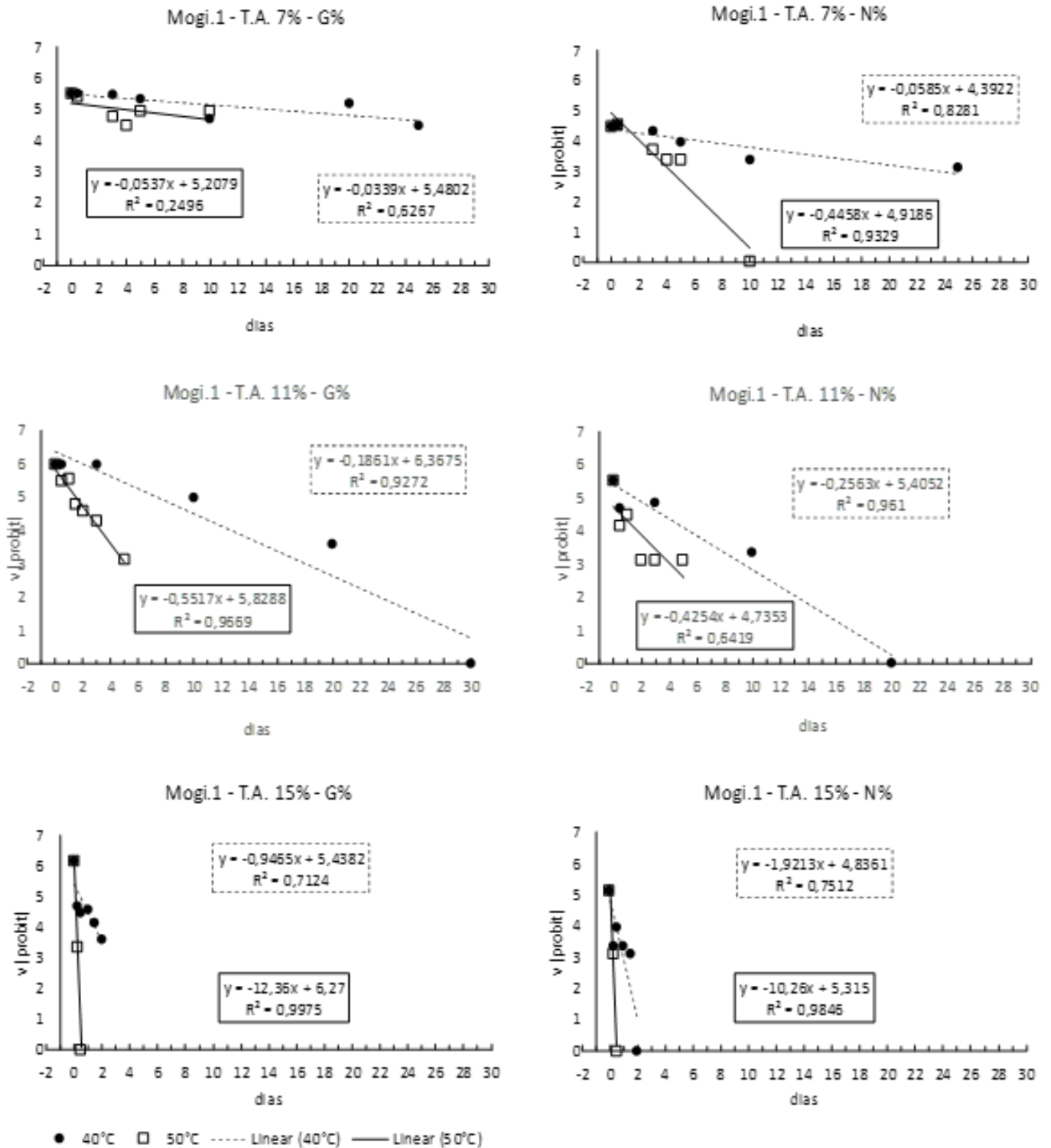


Figura 15. Curvas de sobrevivência de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. coletadas em Mogi Guaçu (2013), com valores de germinação (G) e de plântulas normais (N) transformados em *probit*, após incubação a 40°C (● ---) e 50°C (□ —) em cada nível de teor de água (7%, 11% e 15%).

Pode-se observar na tabela 6 a diminuição também exponencial dos valores obtidos para o desvio-padrão da distribuição de frequências de sementes mortas no tempo (sigma, em dias), à medida que os tratamentos empregaram maiores teores de água e temperatura.

Nas sementes de *C. echinata* com teor de água ainda mais elevado (15%), a queda na viabilidade foi drástica, nas duas temperaturas de incubação (fig. 15). Aparentemente, para essas sementes, a ação combinada de altas temperaturas e alto teor de água tem efeito sinérgico na sua deterioração, traduzida pela queda exponencial da sua viabilidade, dada tanto pelos resultados de germinação quanto de plântulas normais (fig.14 e 15). Essa queda exponencial resulta na mudança de escala de tempo na obtenção das curvas de sobrevivência, de dias para horas (ou frações de dia).

Tabela 6. Valores experimentais de viabilidade inicial (Ki) e obtidos através de regressão linear, taxa de deterioração ($-tg\beta$) e sigma (σ) para sementes de Mogi.1, e período máximo avaliado para cada tratamento combinando T.A.(%)/T°C.

Tratamentos T.A. /T °C		Ki exper. (probit)	Ki estim.	$tg\beta$	σ (dias)	$\log\sigma$	p máx. (dias)
7/40	G	5,52	5,48	-0,0339	29,50	1,4698	25
	N	4,48	4,39	-0,0585	17,09	1,232844	25
7/50	G	5,52	5,21	-0,0537	18,62	1,270026	10
	N	4,48	4,92	-0,4458	2,24	0,35086	10
11/40	G	5,95	6,37	-0,1861	5,37	0,730254	30
	N	5,52	5,41	-0,2563	3,90	0,591251	20
11/50	G	5,95	5,83	-0,5517	1,81	0,258297	5
	N	5,52	4,74	-0,4254	2,35	0,371203	5
15/40	G	5,52	5,44	-0,9465	1,06	0,023879	2
	N	4,48	4,84	-1,9213	0,52	-0,2836	2
15/50	G	5,52	6,27	-12,3600	0,08	-1,09202	0,5
	N	4,48	5,32	-10,2600	0,10	-1,01115	0,5

Para as constantes calculadas a partir de cada grupo de 3 tratamentos (T.A./temperatura) os valores obtidos (tabela 7) apresentaram grande variação ($K_v = 4,6 \pm 2,6$; $C_1 = 0,080 \pm 0,195$; $C_2 = 0,065 \pm 0,021$).

As equações decorrentes dessas constantes (tabela 8), por conseguinte, apresentaram as mesmas variações. A simulação do período médio de viabilidade, utilizando as diferentes equações, durante armazenamento, por exemplo, à temperatura de -18°C e T.A. de 10%, oscilou de 12 a 1.024 anos, ou seja, uma variação inaceitável para o planejamento e manejo de sementes em banco de germoplasma.

No armazenamento real sob essas mesmas condições, Mello *et al.* (2013) verificaram que após 5 anos, a germinação caiu de 80% para 60%, o que indica que o período médio de viabilidade seria próximo de 5 anos. Este período curiosamente está bastante próximo do período estimado pela mesma equação de previsibilidade (Roberts 1973), quando se utilizaram as constantes obtidas a partir de testes realizados em temperaturas menores (5°C , 15°C e 25°C), próximas às naturais para a espécie (C. J. Barbedo 2014, comunicação pessoal), segundo as quais o período médio de viabilidade seria de 3 anos.

Para empregar a equação melhorada proposta por Ellis & Roberts (1980),

$$v = K_i - p/10^{(K_E - C_W \log m - C_H t - C_Q t^2)},$$

obtiveram-se, a partir da relação logarítmica entre σ e o teor de água (m) (figura 16), as constantes C_w (relativa à variação de umidade) e da espécie, K e K_E (tabela 9).

Tabela 7. Constantes de previsibilidade calculadas para sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (coletadas em Mogi Guaçu – 2013), a partir de 12 combinações de 3 tratamentos cada.

	Tratamentos						
	T.A. / T°C			Kv	C₁	C₂	
1	7/40	7/50	11/40	5,2671	0,1102	0,0782	
2	7/40	7/50	11/50	6,1286	0,2332	0,0782	
3	7/40	7/50	15/40	5,7542	0,1798	0,0782	
4	7/40	7/50	15/50	6,5790	0,2976	0,0782	
5	11/40	11/50	7/40	0,5585	-0,2332	0,0439	
6	11/40	11/50	7/50	1,5457	-0,1235	0,0494	
7	11/40	11/50	15/40	9,0543	0,3595	0,0933	
8	11/40	11/50	15/50	4,2617	0,1235	0,0494	
9	15/40	15/50	7/40	1,9325	-0,1178	0,0943	
10	15/40	15/50	7/50	1,5422	-0,1231	0,0492	
11	15/40	15/50	11/40	5,6390	0,2494	0,0492	
12	15/40	15/50	11/50	6,9921	0,0005	0,0329	
	média			4,6046	0,0797	0,0645	
	desvio			2,6443	0,1946	0,0209	

Tabela 8. Equações de previsibilidade resultantes, obtidas para sementes de *C. echinata* (coletadas em Mogi Guaçu – 2013), a partir de 12 combinações de 3 tratamentos cada.

	Tratamentos									
	T.A. / T°C			v = Ki - p / 10	Kv	-	C1	. m -	C2	
1	7/40	7/50	11/40	v = Ki - p / 10	5,2671	-	0,1102	. m -	0,0782	. t
2	7/40	7/50	11/50	v = Ki - p / 10	6,1286	-	0,2332	. m -	0,0782	. t
3	7/40	7/50	15/40	v = Ki - p / 10	5,7542	-	0,1798	. m -	0,0782	. t
4	7/40	7/50	15/50	v = Ki - p / 10	6,5790	-	0,2976	. m -	0,0782	. t
5	11/40	11/50	7/40	v = Ki - p / 10	0,5585	-	-0,2332	. m -	0,0439	. t
6	11/40	11/50	7/50	v = Ki - p / 10	1,5457	-	-0,1235	. m -	0,0494	. t
7	11/40	11/50	15/40	v = Ki - p / 10	9,0543	-	0,3595	. m -	0,0933	. t
8	11/40	11/50	15/50	v = Ki - p / 10	4,2617	-	0,1235	. m -	0,0494	. t
9	15/40	15/50	7/40	v = Ki - p / 10	1,9325	-	-0,1178	. m -	0,0943	. t
10	15/40	15/50	7/50	v = Ki - p / 10	1,5422	-	-0,1231	. m -	0,0492	. t
11	15/40	15/50	11/40	v = Ki - p / 10	5,6390	-	0,2494	. m -	0,0492	. t
12	15/40	15/50	11/50	v = Ki - p / 10	6,9921	-	0,0005	. m -	0,0329	. t

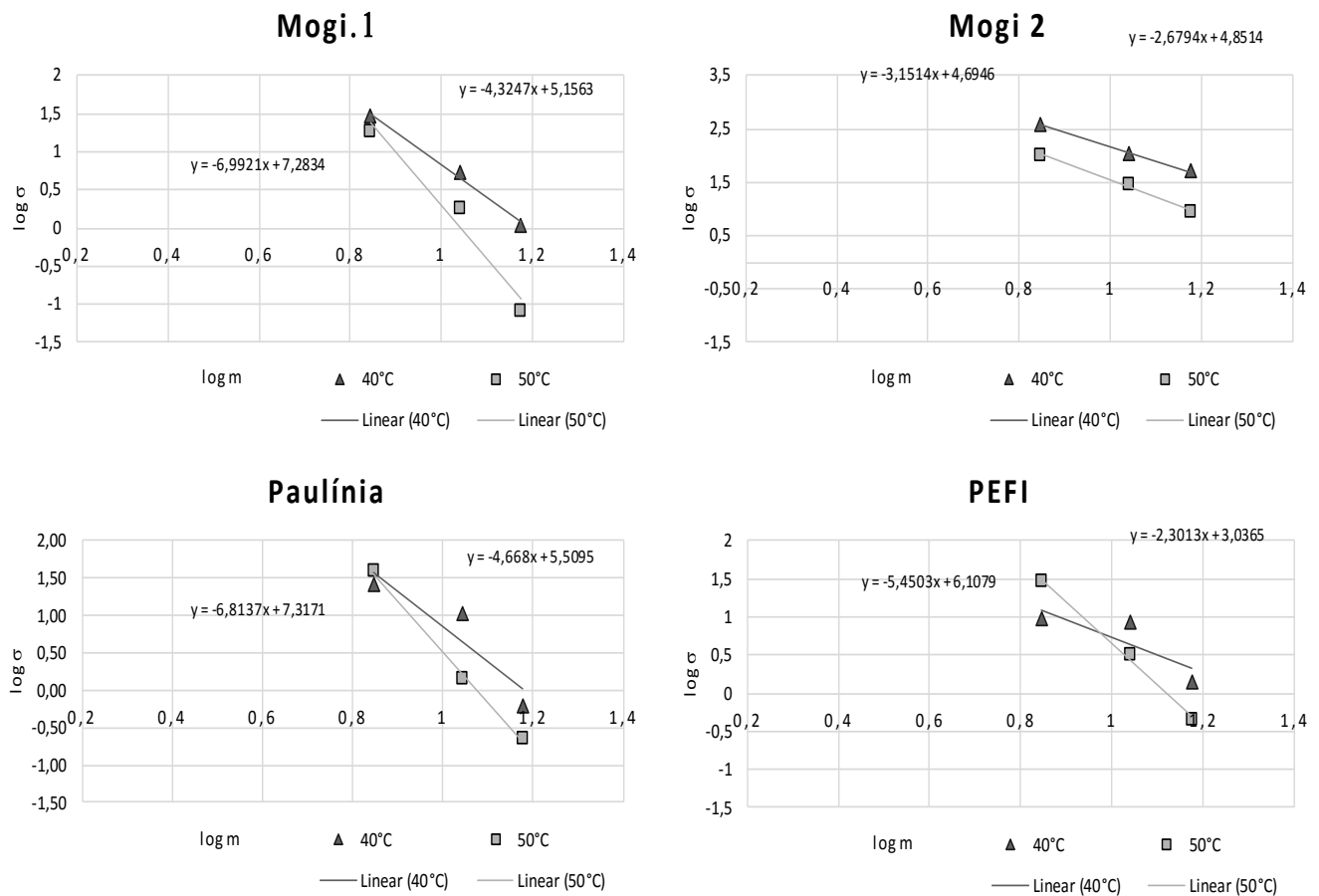


Figura 16. Relação logarítmica entre o teor de água **m** (T.A.%, b.u.) e sigma (**σ**), para sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. incubadas a 40°C e 50°C, com três níveis de teor de água (7%, 11% e 15%), coletadas em Mogi Guaçu (2013- Mogi.1 e 2014 – Mogi.2), Paulínia e São Paulo (PEFI).

Os valores obtidos para esses coeficientes variaram bastante, dependendo do lote e da temperatura de incubação (tabela 9). Ignácio (2013) também encontrou grande variação nos coeficientes determinados para pau-marfim (*Balfourodendron riedellianum* Engler) de diferentes procedências.

Esta variação não permite a aplicação da equação de previsibilidade com segurança, pois os valores estimados variam de acordo com os coeficientes utilizados, ainda que se adotem os valores universais para as constantes C_H (0,0329) e C_Q (0,000478).

Tabela 9. Constantes de previsibilidade C_w , K e KE , calculadas para sementes de *Caesalpinia echinata* Lam., coletadas em Mogi Guaçu (2013 – M1 e 2014 – M2), Paulínia e São Paulo (PA e SP, 2014), após tratamentos de deterioração a 40°C e a 50°C.

T °C	lote	C_w	K	KE
40	M1	4,3247	5,1563	4,718924
	M2	2,6794	4,8514	4,414072
	PA	4,6680	5,5095	5,072172
	P	2,3013	3,0365	2,599172
50	M1	2,6794	4,8514	4,414072
	M2	3,1514	4,6946	4,257272
	PA	6,8137	7,3171	6,879772
	PE	5,4503	6,1079	5,670572

Provavelmente isso se deve à desuniformidade encontrada em sementes de espécies nativas, mesmo quando procedentes de uma só população, coletadas na mesma data. Ellis & Roberts (1980) desenvolveram essa equação para utilização com lotes de sementes homogêneos e de alta qualidade. Os autores enfatizam que as equações, quando são aplicadas, devem ser usadas apenas como guia aproximado para o comportamento esperado de lotes de sementes de alta qualidade, além de que a extrapolação para ambientes de armazenamento extremos pode ser imprecisa.

As altas temperaturas empregadas para os tratamentos de deterioração, associadas a altos níveis de teor de água das sementes mostraram-se inadequados para aplicação nos modelos de previsibilidade propostos neste trabalho para *Caesalpinia echinata* Lam.

4.4. Análise das taxas de respiração e ação oxidativa sobre a deterioração de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam.

Os dados analisados para taxas respiratórias das sementes de pau-brasil são apresentados na figura 17. Os gráficos resultantes a partir dos valores médios obtidos evidenciaram um comportamento errático, especialmente em relação à temperatura de incubação, sem tendências evidentes.

Na incubação das sementes de pau-brasil de todas as procedências, os valores obtidos para consumo de O_2 e para liberação de CO_2 a $22^\circ C$ (figura 17) foram inferiores aos descritos por Lamarca & Barbedo (2012), evidenciando que tanto a respiração quanto os demais processos oxidativos foram menores que os encontrados por aqueles autores. Contudo, quando se elevou a temperatura para $40^\circ C$ e $50^\circ C$, os valores de consumo de O_2 aumentaram substancialmente. Interessante observar que o aumento foi expressivamente maior que o aumento na liberação de CO_2 , sugerindo que as taxas de oxidação não respiratórias ocorreram de forma mais intensa que a própria respiração.

Outro aspecto interessante foi que tal aumento não foi uniforme nem entre as sementes das diferentes regiões de coleta, nem entre anos diferentes da mesma região. Assim, a $50^\circ C$, o consumo de O_2 seguiu essa tendência para as sementes de M2 e de São Paulo, contudo para as de M1 foi equivalente para sementes com 11% e 15% de umidade.

Para as sementes de Paulínia, constatou-se elevação no consumo de O_2 conforme se aumentou o teor de água das sementes. No entanto, a produção de CO_2 não seguiu o mesmo padrão, sendo ainda pequena para todas as procedências, com discreta elevação à medida em que se aumentou o teor de água, sendo mais evidente para as sementes de Paulínia a $50^\circ C$ e, a $40^\circ C$, para as de São Paulo.

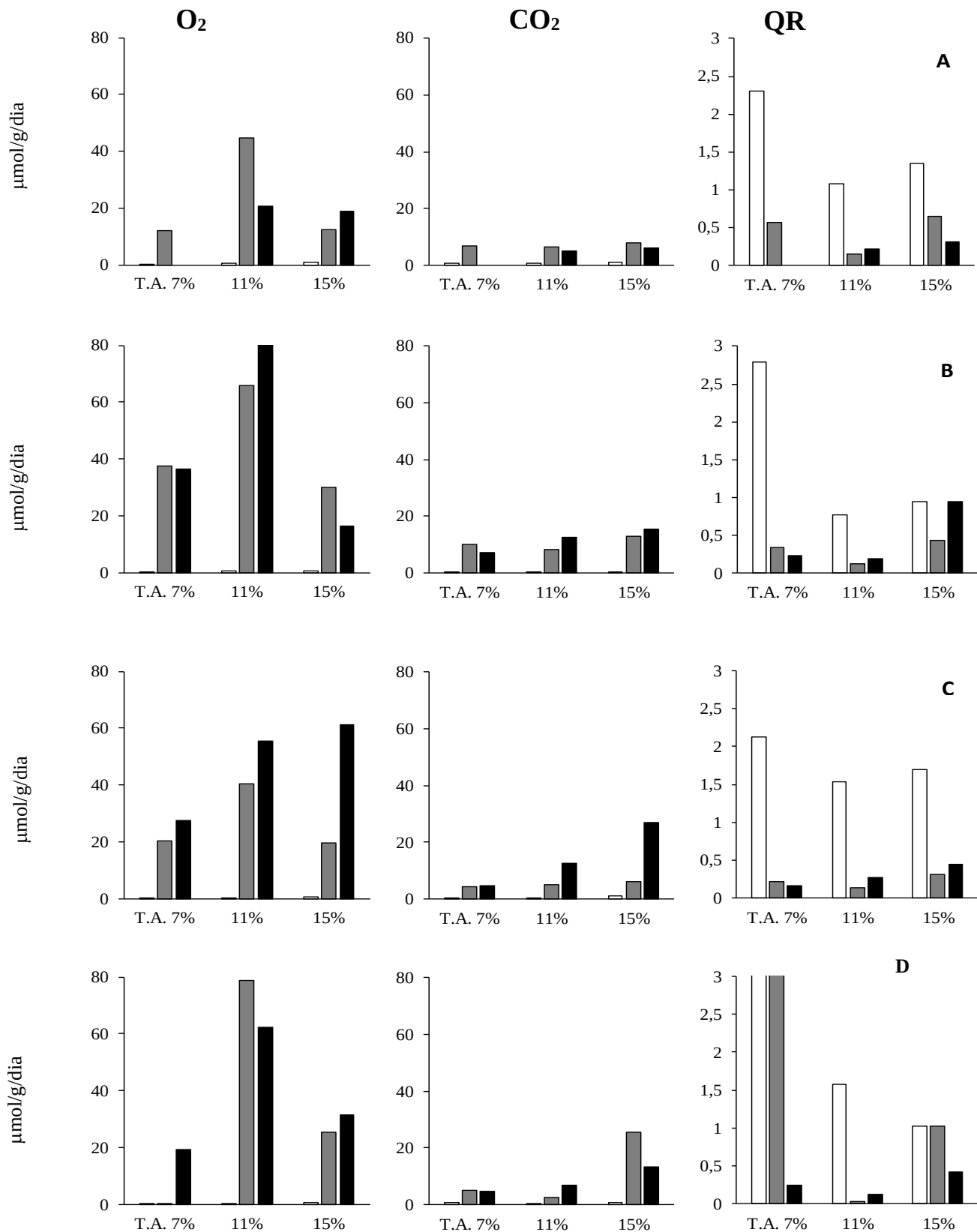


Figura 17. Consumo de O_2 , liberação de CO_2 e quociente respiratório (QR) de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. de quatro origens distintas (A: Mogi Guaçu, safra 2013); B: Mogi Guaçu, safra 2014; C: Paulínia; D: São Paulo) e três níveis de hidratação (T.A. de 7%, 11% e 15%), incubadas em três temperaturas (colunas em branco: 22°C; em cinza: 40°C; em preto: 50°C).

Em consequência dessa variação nos resultados, o quociente respiratório também foi variável. Os valores obtidos para QR foram maiores em todos os tratamentos a 22°C, com médias superiores a 2; e variaram de aproximadamente 1 até 1,5 a 40°C e 50°C, para os demais níveis de teor de água e procedências (excetuando-se as sementes de São Paulo com T.A.7% a 40°C, quando foi maior que 3), e menor ou igual a 1 para os tratamentos a 40°C e 50°C, para sementes de todas as procedências e níveis de umidade.

De acordo com Marcos Filho (2015), durante o armazenamento, podem ocorrer alterações peroxidativas nos lipídios dos mitocôndrios, acarretando problemas na reconstrução das membranas na embebição, antes que se possa detectar redução no vigor. Essas alterações respiratórias diminuem o consumo de oxigênio pelos tecidos da semente, com maior liberação de dióxido de carbono e consequente aumento do Quociente de Respiração – QR.

Em estudo prévio com *Caesalpinia echinata*, Lamarca & Barbedo (2012) obtiveram valores de QR bem menores que 1, devido ao consumo de oxigênio até 50 vezes a produção de CO₂, indicativo de utilização de ácidos graxos na respiração ou a ocorrência de reações oxidativas.

Essa variação nas taxas de O₂ e CO₂ para as sementes submetidas a altas temperaturas por períodos crescentes somente nos permite concluir que ocorrem alterações em função de temperatura de incubação e umidade das sementes, porém afetando-as de maneira desigual, aparentemente caótica. Isso deve estar relacionado às múltiplas formas de atuação dessas condições nos processos envolvidos na deterioração das sementes em todos os níveis, celular ou metabólico, com resultados variáveis para o comportamento respiratório das sementes. Tal variação pode ainda ser resultante da diversidade genotípica e/ou das condições ambientais durante a formação das sementes.

De qualquer forma, ressalta-se a importância dessas taxas de consumo/liberação dos gases nos trabalhos que envolvem a simulação da deterioração ao longo do armazenamento.

Tais valores normalmente não são considerados nesses tipos de experimentos, a despeito da observação feita por Roberts (1973) da possibilidade de interferência, especialmente do O₂. Assim, estudos mais detalhados devem ser desenvolvidos a fim de permitir uma compreensão maior sobre os processos envolvidas na deterioração das sementes, especialmente as de *Caesalpinia echinata* para as quais já foi demonstrada a influência do O₂ nas taxas de deterioração (Lamarca & Barbedo 2012).

4.5. Avaliação do potencial antioxidante

O potencial antioxidante de substâncias presentes no tegumento das sementes foi avaliado através da quantificação de compostos fenólicos totais, expresso em equivalente de ácido gálico ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de tegumento). Os dados obtidos são apresentados na figura 18.

Pode-se verificar nessa figura que ocorreu diminuição desses compostos quando o período de incubação das sementes com T.A. 11% aumentou de 48 para 72h e que foi concomitante à queda na germinação. Observa-se que as mesmas quedas não ocorreram com sementes com T.A. 7%, mesmo após períodos bem maiores de incubação a 50°C (até 10 dias). Contudo, neste tratamento, embora a germinação total não tenha sido afetada, a taxa de plântulas normais obtidas caiu nos períodos maiores de incubação (após 5 dias). O mesmo ocorreu com sementes com T.A. 11%, após 48 horas de incubação, sem que ocorresse redução dos fenólicos. Este fato indica que os primeiros sintomas de deterioração de sementes de *C. echinata*, como a redução no vigor, acarretando maior ocorrência de plântulas anormais, foi anterior à queda dos compostos fenólicos. Assim, a redução desses compostos no tegumento deve estar relacionada à diminuição da capacidade germinativa, detectável num nível mais adiantado de deterioração das sementes.

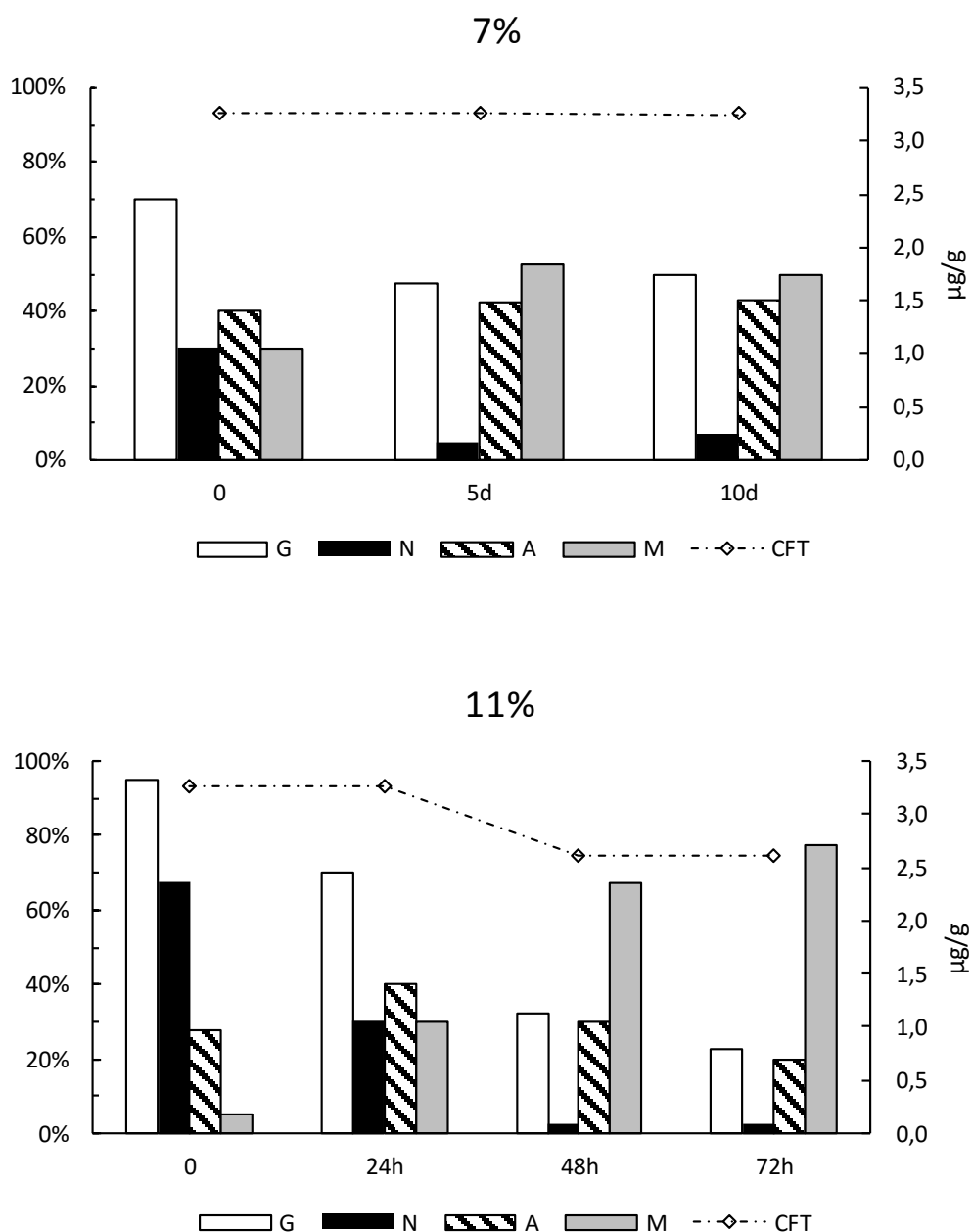


Figura 18. Valores médios de sementes germinadas (G) e mortas (M) e de plântulas normais (N) e anormais (A) de *Caesalpinia echinata* Lam. coletadas em Mogi Guaçu (2013), com dois níveis de teor de água (7% e 11%), após incubação a 50°C, e quantificação de compostos fenólicos totais (CFT) no tegumento das sementes.

A ação antioxidante desses compostos foi demonstrada em estudo com frutos de *Caesalpinia spinosa* Kuntze (Doroteo *et al.* 2012) e extratos de tegumento de sementes do jatobá apresentaram 26% de compostos fenólicos, sendo o ácido gálico majoritário (Souza *et al.* 2011). A presença destes compostos nos extratos pode explicar a forte atividade antioxidante do extrato de tegumento de jatobá (L. M. B. Torres 2015, comunicação pessoal).

Hellmann *et al.* (2006) relataram escurecimento gradativo no tegumento das sementes de *C. echinata* armazenadas por até cinco anos em diferentes temperaturas (7°C, 2°C, 5°C e -18°C). Constataram que o escurecimento foi progressivo e consistente com a degradação das sementes. As sementes ficaram mais escuras na medida em que se aumentaram as temperaturas e períodos de armazenamento. Tal fato pode ser sugestivo da oxidação de substâncias presentes no tegumento e consequente diminuição de proteção antioxidante, conforme progride a deterioração das sementes, o que pode estar relacionado à presença de compostos fenólicos no tegumento das sementes.

Embora as sementes de pau-brasil empregadas no presente trabalho tenham sido submetidas aos tratamentos de incubação em altas temperaturas por diferentes períodos e níveis de T.A, os quais resultaram na deterioração progressiva até a perda total da capacidade germinativa, não se verificou a ocorrência de escurecimento no seu tegumento, como pode ser constatado na figura 19. Este fato indica que os processos metabólicos que acontecem durante o envelhecimento natural das sementes armazenadas podem não ser os mesmos quando elas são submetidas a processos forçados de deterioração.

A redução dos compostos fenólicos constatada neste experimento, coincidente com a queda na germinação, mas não com a maior ocorrência de plântulas anormais, sugere que diferentes mecanismos antioxidantes estejam envolvidos com a manutenção da capacidade germinativa e do vigor das sementes. Marcos Filho (2015) aponta a ocorrência de sistemas antioxidantes enzimáticos, envolvendo enzimas removedoras de produtos tóxicos e radicais livres, as “scavengers”, tais como superóxido dismutase, catalase e peroxidase, entre outras.

O envelhecimento natural é um declínio relacionado com o tempo nos processos biológicos, acelerado pelos estresses bióticos e abióticos (Benson 2008), quando ocorrem alterações fisiológicas, bioquímicas e citológicas, com a consequente perda de viabilidade (Marcos Filho 2015). Já o envelhecimento das sementes através da aceleração de sua deterioração, empregando temperaturas elevadas e alta umidade, pode ocorrer de forma diversa do natural, com diferentes processos metabólicos e oxidativos.

Assim, para uma melhor compreensão da atividade antioxidante que ocorre durante o envelhecimento de sementes de *Caesalpinia echinata*, são necessários novos estudos, mais abrangentes e detalhados.

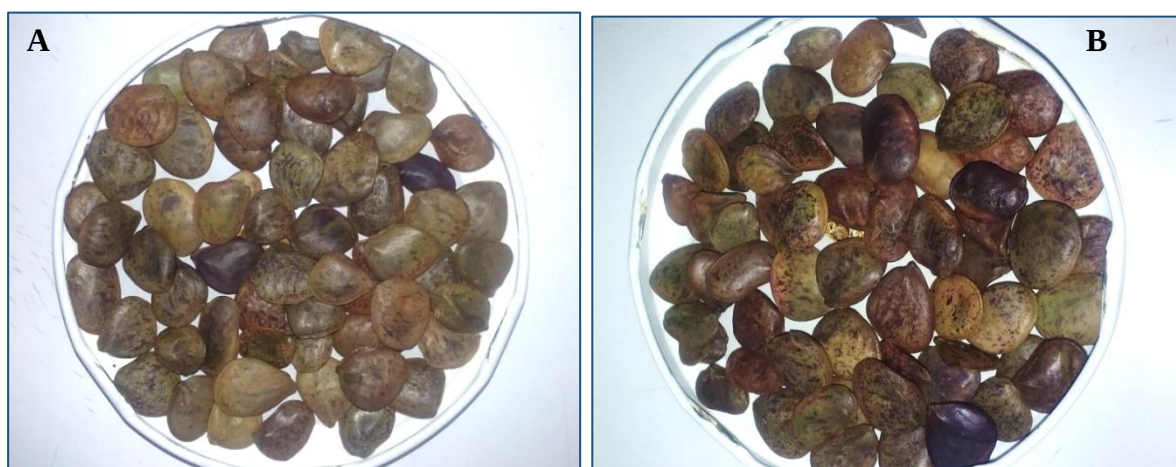


Figura 19. Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. provenientes de Mogi Guaçu, submetidas a incubação a 50°C por 48 h (A) e por 60 h (B), com teor de água de 15%.

5. Considerações finais

Pelos resultados obtidos neste trabalho, constatamos a necessidade de estudos mais detalhados sobre os processos relacionados à perda da capacidade germinativa e de produzir plântulas normais de sementes de *Caesalpinia echinata*, tanto sobre a cinética da sua deterioração quanto sobre os metabólitos relacionados à manutenção ou à perda da viabilidade.

No presente trabalho, mais uma vez se evidenciou a influência do oxigênio na taxa de deterioração dessas sementes. A deterioração das sementes de pau-brasil é tão mais intensa quanto mais elevada a temperatura e tal fato tem forte correlação com o aumento do consumo de O_2 sem equivalente liberação de CO_2 . Isso sugere que a deterioração dessas sementes decorre de processos oxidativos, inibidos somente quando em temperatura de congelamento. Este comportamento tem sido analisado em temperaturas elevadas, porém ainda dentro dos limites encontrados pela espécie no seu ambiente natural. No presente trabalho, em que se extrapolou esses limites, houve um aumento das taxas oxidativas, de forma irregular. Tal fato sugere que o metabolismo deteriorativo das sementes nas condições a que foram submetidas para simulação do armazenamento pode não corresponder ao metabolismo durante o armazenamento natural.

A grande variação demonstrada entre as constantes e equações de viabilidade obtidas neste trabalho, o quê, conforme apontado anteriormente, seria inaceitável para o planejamento e manejo de sementes em banco de germoplasma, indica que a utilização da metodologia não foi adequada para que se pudessem aplicar modelos de previsibilidade e estimar a longevidade de sementes de *Caesalpinia echinata* em condições de armazenamento. As altas temperaturas utilizadas podem ter alterado completamente o metabolismo, especialmente respiratório e oxidativo e, conseqüentemente, as taxas de deterioração, interferindo na eficiência da aplicação do modelo adotado.

Portanto, modelos que utilizam temperaturas fora da faixa de ocorrência natural da espécie, não seriam recomendáveis a todas as espécies, como aqui demonstrado para a previsibilidade de conservação de sementes de pau-brasil.

Além disso, os modelos atuais não incluem as taxas de respiração e oxidação.

Estudos mais detalhados, utilizando temperaturas não tão elevadas e modelos matemáticos alternativos, devem ser realizados para possibilitar melhor compreensão dos processos metabólicos e da cinética da deterioração das sementes de pau-brasil, permitindo assim a sua conservação em bancos de germoplasma com maior segurança e embasamento científico, para preservação de tão importante e vulnerável espécie de nossa flora.

6. Referências bibliográficas

- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Botânica* 25(4): 431-439.
- Borges, I.F., Del Giudice Neto, J., Bilia, D.A.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C. & Barbedo, C.J.** 2005. Maturation of Seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an Endangered Leguminous Tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Braz. Archives of Biology and Technol.* 48 (6): 851-861.
- 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). *Braz. J. Plant Physiol.*, 18 (4): 475-482.
- 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.
- Brasil.** 2008. Lista das espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.
- Brasil.** 2009. Regras para Análise de Sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.
- Carvalho, N.M.** 1994. O conceito de vigor de sementes. In: Vieira, R.D. & Carvalho, N.M. (Ed.) Testes de vigor em sementes. FUNEP, Jaboticabal. p.1-30.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 1980. Sementes: Ciência, Tecnologia e Produção. Fundação Cargill, Campinas.
- Castro, R.D., Bradford, K.J. & Milhorst, H.W.M.** 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: A.G. Ferreira & F. Borguetti (orgs.). Germinação – do básico ao aplicado. Artmed, Porto Alegre.
- Chaves, M.M.F.** 2001. Previsão da longevidade de sementes de *Dimorphandra mollis* Benth. (faveiro) e *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. ex Benth.) (jacarandá-da-bahia). Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Chaves, M.M.F. & Usberti, R.** 2003. Previsão da longevidade de sementes de faveiro (*Dimorphandra mollis* Benth.). *Revista Brasileira de Botânica* 26(4): 557-564.

- Delgado, L.F. & Barbedo, C.J.** 2012. Water potential and viability of seeds of *Eugenia* (Myrtaceae), a tropical tree species, based upon different levels of drying. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 55: 583-590.
- Delouche, J.C.** 2002. Germinação, deterioração e vigor de sementes. *Seed News* 6: 1-7.
- Dickie, J. B. & Smith, R. D.** 1995. Observations on the survival of seeds of *Agathis* spp. stored at low moisture contents and temperatures. *Seed Science Research* 5: 5-14.
- Ellis, R.H. & Hong, T.D.** 2006. Temperature sensitivity of the below-moisture contents limit to the negative seed longevity –moisture content relationships in hermetic storage. *Annals of Botany*, 97(5): 785-791.
- Ellis, R.H. & Hong, T.D.** 2007. Quantitative of longevity of seeds of twelve crops to temperature and moisture in hermetic storage. *Seed Science and Technology* 35: 432-444.
- Ellis, R. H. & Roberts, E. H.** 1980a. Improved equations for the prediction of seed longevity. *Annals of Botany* 45: 13-30.
- Ellis, R.H. & Roberts, E.H.** 1980b. The influence of temperature and moisture on seed viability period in barley (*Hordeum distichum* L.). *Annals of Botany* 45: 31-37.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E. H.** 1985. Principles and methodology. *Handbook of seed technology for genebanks*. International Board for Plant Genetic Resources, Handbooks for genebanks, n° 2, vol.1.
- Ellis R.H., Hong, T.D., Roberts E.H. & Tao, K.L.** 1990. Low moisture content limits to relations between seed longevity and moisture. *Annals of Botany* 65:493-504.
- Ellis, R.H., Hong, T.D. & Roberts, E.H.** 1992. The low-moisture content limit to the negative logarithmic relation between seed longevity and moisture content in three subspecies of rice. *Annals of Botany* 69: 53-58.
- Fantinatti, J.B. & Usberti, R.** 2007. Seed viability constants for *Eucalyptus grandis*. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42 (1) Brasília.
- Finney, D.J.** 1952. Probit analysis. Cambridge, England. Cambridge University Press. *apud* Ignácio, V.L. 2013. Germinação e conservação de sementes de *Balfourodendron riedelianum* (Engler) Engler. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná.
- 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 *Caesalpinia echinata* Lam. (brazilwood)

seeds, na endangered leguminous tree from the brazilian atlantic forest. *Braz. J. Biol.*, 66(2B): 739-745.

Hay, F.R. & Probert, R.J. 2013. Advances in seed conservation of wild plant species: a review of recent research. *Conservation Physiology* 1: 1-11.

Hay, F.R., Guzman, F., Ellis, D., Makahiya, H., Borromeo, T. & Hamilton, N.R.S. 2013. Viability of *Oryza sativa* L. seeds stored under genebank conditions for up to 30 years. *Genetic Resources and Crop Evolution* 60:275–296.

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 inicial. *Revista Brasil. Bot.*29(1): 93-101.

Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Barbedo, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2008. Variações dos carboidratos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas. *Hoehnea* 35(2): 255-264.

Ignácio, V.L. 2013. Germinação e conservação de sementes de *Balfourodendron riedelianum* (Engler) Engler. Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Paraná.

ISTA. 2005. International Rules for Testing Seeds. International Seed Testing Association. <http://www.seedtest.org>.

Kader, A.A. & Saltveit, M.E. 2002. Respiration and gas exchange. *In*: J.A. Bartz, J.K. Brecht & J. Weichmann (eds.). *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. Marcel Dekker, New York, pp. 7-29.

Kryzanowski, F.C., Vieira, R.D. & França Neto, J.B. (eds.). 1999. Vigor de sementes: conceitos e testes. Associação Brasileira de Tecnologia, Comitê de Vigor de Sementes, Londrina.

Lamarca, E.V., Leduc, S.N.M. & Barbedo, C.J. 2009. Viabilidade e vigor de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil – Leguminosae) pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Botânica* 32(4): 793-803.

Lamarca, E.V. & Barbedo, C.J. 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* seeds as a consequence of oxidative processes. *Revista Hoehnea* 39: 577-586.

Leduc, S.N.M., Silva, J.P.N., Gaspar, M., Barbedo, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. 2012. Non-structural carbohydrates of immature seeds of *Caesalpinia echinata* (Leguminosae) are involved in the induction of desiccation tolerance. *Australian Journal of Botany* 60, 42 –48.

- Lima, M. de J.V. Jr., Ellis, R.H.** 2005. Seed survival of four tropical tree species in response of environment. *Seed Science & Technology* 33: 157-166.
- Lima, M. de J.V. Jr., Ellis, R.H., Hong, T.D. & Ferraz, I.D.K.** 2005. Drying methods influences the development of geminability, dessication tolerance and subsequeute longevity of immature seeds of sumaúma (*Ceiba petandra* (L.) Gaertn. [*Bombacaceae*]). *Seed Science & Technology* 33: 147-156.
- Lisbôa-Padulla, T., Moraes, M.H.D., Menten, J.O.M. & Barbedo, C.J.** 2009. Tratamento de sementes de pau-brasil com fungicidas: efeito na incidência de fungos, germinação e transmissão de fungos pelas sementes. *Summa Phytopathologica* 35: 148-150.
- Malavasi, M.M.** 1988. Germinação de Sementes. In: F.C.M. Piña-Rodrigues (coord.). *Manual de Análise de Sementes Florestais*. Fundação Cargill, Campinas.
- Marcondes, M.C., Andreoli, C. & Miglioranza, E.** 2007. Equação de viabilidade para determinar a longevidade de sementes de trigo sob condições diferenciadas em armazenamento convencional. *Revista Brasileira de Sementes* 29(3): 202-207.
- Marcos Filho, J.** 2015. *Fisiologia de Sementes de Plantas Cultivadas*. 2.ed. ABRATES, Londrina, PR.
- Marinova, D., Ribarova, F. & Atanassova, M.** 2005. Total phenolics and total flavonoids in bulgarian fruits and vegetables. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*. 40 (3): 255-260.
- Martini Neto, N., Lamarca, E.V. & Barbedo, C.J.** 2014. Cinética da liberação de eletrólitos pelas sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) durante a embebição Rev. Ceres, Viçosa 61 (1): 090-097.
- Medeiros, A.C.S.** 1996. Comportamento fisiológico, conservação de germoplasma a longo prazo e previsão de longevidade de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (Fr. All.) Engl.). Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
- Mello, J.I.O. & Barbedo, C.J.** 2007. Temperatura, luz e substrato para germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae - Caesalpinioideae). *Revista Árvore* 31(4): 645-655.
- Mello, J.I.O., Barbedo, C.J., Salatino, A. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2010. Reserve Carbohydrates and Lipids from the Seeds of Four Tropical Tree Species with Different Sensitivity to Desiccation. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 53 (4): 889-899,

- Mello, J.I.O., Centeno, D.C., Barbedo, C.J. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2011. Changes in carbohydrate composition in seeds of three tropical tree species submitted to drying and storage at freezing temperature. *Seed Sci. & Technol.*, 39, 465-480.
- Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2013. Sub-zero temperature enables storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. *Journal of Seed Science* 35(4): 519-523.
- Nagel, M. & Börner, A.** 2010. The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Science Research* 20: 1–12.
- Pozitano, M. & Usberti, R.** 2009. Deterioração controlada de sementes de três híbridos interespecíficos de capim-elefante × milheto. *Revista Bras. Zootecnia* 38(3): 428-434.
- Pritchard, H.W. & Dickie, J.B.** 2003. Predicting seed longevity: the use and abuse of seed viability equations. *In*: R.D. Smith, J.B. Dickie, S.L. Linington, H.W. Pritchard & R.J. Probert (eds.). *Seed conservation: turning science into practice*, Royal Botanic Gardens, Kew, p. 653-722.
- Roberts, E.H.** 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science & Technology* 1: 499-514.
- Roberts, E.H. & Ellis, R.H.** 1989. Water and Seed Survival. *Annals of Botany* 63: 39–52.
- Rocha, Y. T.** 2004. Ibirapitanga: história, distribuição geográfica e conservação do pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae) do descobrimento à atualidade. PhD Thesis, University of São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Rocha, Y. T., Del Giudice Neto, J., Alves, E.S., Barbedo, C.J., Domingos, M. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 2006. Pau-brasil – conhecer para conservar. *Ciência hoje* 38(226): 22-29.
- Sinício, R.** 2015. Modelamento matemático da longevidade de sementes de camu-camu. *Engenharia na agricultura* 23(3). Viçosa – MG.
- Sinício, R., Bhering, M.C. & Vidigal, D.S.** 2013. Equação de longevidade para sementes de jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) O. Berg). *Engenharia na Agricultura* 21(4): 323-333.
- Sinício, R., Bhering, M.C., Vidigal, D.S. & Dias, D.C.F.S.** 2009. Validação do aplicativo computacional *Seedsolve* para previsão das perdas de germinação e vigor de sementes armazenadas. *Revista Brasileira de Sementes* 31(2): 09-18.
- Souza, F.H.D. & Marcos-Filho, J.** 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Revista Brasileira de Botânica* 24(4): 365-375.

Usberti, R., Roberts, E.H. & Ellis, R.H. 2006. Prediction of cottonseed longevity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 41(9): 1435-1441.

Valentini, S.R.T. 1992. Efeito da secagem de sementes de peroba-rosa (*Aspidosperma polyneuron* M. Arg.). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.