

GABRIEL FELIPE MANOEL

Redução do metabolismo de sementes
recalcitrantes de *Inga vera* e *Eugenia uniflora* por
exposição à atmosfera modificada

Dissertação apresentada ao Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 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
2024

GABRIEL FELIPE MANOEL

Redução do metabolismo de sementes
recalcitrantes de *Inga vera* e *Eugenia uniflora* por
exposição à atmosfera aumentada

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

ORIENTADORA: DR^a. CATARINA CARVALHO NIEVOLA

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NUCLEO DE BIBLIOTECAS E MAPOTECAS**

Manoel, Gabriel Felipe
M285r “Redução do metabolismo de sementes recalcitrantes de *Inga vera* e *Eugenia uniflora* por exposição à atmosfera modificada”/ Gabriel Felipe Manoel – São Paulo, 2023.
73p.; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Pesquisas Ambientais da Secretaria de Meio Ambiente, Infraestrutura e Logística, 2023.
Bibliografia.

1. Conservação de sementes. 2. Metabolismo de sementes. 3. Respiração. I. Título.

CDU: 631.53.01

À minha família.

“A imaginação é a maior arma da humanidade, pois tudo que hoje existe, algum dia foi imaginado (...)”

Lina Pereira dos Santos

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Pesquisas Ambientais (IPA) e ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente por prover apoio e estrutura para a realização da pesquisa.

À CAPES pelo suporte financeiro fornecido através da bolsa de financiamento à pesquisa.

À minha orientadora, Dra. Catarina Carvalho Nievola, pelo acolhimento, empatia, paciência, disponibilidade e conhecimentos compartilhados.

Ao Dr. Claudio José Barbedo, pela oportunidade, paciência, disponibilidade, contribuições e conhecimentos compartilhados.

À Dra. Marina Crestana Guardia, pela disponibilidade e contribuições.

Ao Dr. Marco Aurélio Silva Tine, pela disponibilidade e contribuições.

Aos meus pais, que sempre estiveram onde eu precisei, me incentivando e gerando o solo fértil para que as minhas ideias mais ambiciosas pudessem florescer, muitas vezes fazendo mais do que a nossa realidade simples permitia. Também por me salvarem nos meus piores momentos e celebrarem os melhores comigo.

À minha irmã, por ser meu porto seguro, minha primeira amiga, e sempre a primeira pessoa a me ouvir e socorrer, tendo a maior paciência e empatia que eu poderia receber de um ser humano, além de me trazer muita força, coragem e colocando um sorriso, mesmo que torto, no meu rosto.

Aos meus professores, que vêm guiando minha trajetória escolar e acadêmica nos últimos 20 anos, instigando minha curiosidade e refinando minha criatividade. Muito do que sou hoje devo a estes seres humanos fantásticos.

Aos meus amigos, que acumulo em todas as fases da minha formação escolar, social e acadêmica.

Aos médicos do grupo de Neurocirurgia do Hospital Heliópolis e do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas.

Aos enfermeiros, técnicos e auxiliares de enfermagem, além dos fonoaudiólogos, fisioterapeutas, técnicos em radiologia e à minha psicóloga.

Aos meus demais familiares, que também se fizeram presentes em todos os momentos importantes.

RESUMO

Alto teor de água, maturação incompleta, e suscetibilidade ao ataque de fungos estão entre os fatores que dificultam o armazenamento de sementes recalcitrantes. Diversos trabalhos vêm investigando formas de viabilizar a conservação dessas sementes. A perspectiva de seu armazenamento está baseada na redução de seu metabolismo. Um trabalho recente demonstrou que a incubação destas sob altos teores de CO_2 reduziu sua atividade respiratória, evidenciada pelo menor consumo de O_2 e menor liberação de CO_2 . Entretanto, não foi documentado se tal redução deveria ser atribuída à maior concentração de CO_2 , ou à menor disponibilidade de O_2 , o que poderia interferir no acúmulo de reservas energéticas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método padronizável para a geração de atmosferas modificadas, cujas concentrações de O_2 e CO_2 fossem controladas e seus efeitos em sementes recalcitrantes avaliados através do conteúdo de carboidratos endógenos. Para o desenvolvimento da técnica, o CO_2 foi obtido da reação entre o ácido acético e bicarbonato de sódio, e o N_2 de um liquefator de gases. Os materiais utilizados foram embriões de ingá (*Inga vera* Wild.), utilizados para testar o método desenvolvido, e sementes de pitanga (*Eugenia uniflora* L.), utilizadas para aprofundar os conhecimentos acerca do método e submetidas à análises bioquímicas de carboidratos. Após a triagem, as sementes foram armazenadas em câmara BOD, a 7 °C, até serem utilizadas na etapa experimental deste trabalho. O desenho experimental fez uso de duas diferentes temperaturas (5 °C e 25 °C), e três misturas de gases: o controle, com parâmetros semelhantes aos da atmosfera terrestre; uma mistura na qual o O_2 foi reduzido através da adição de N_2 ; e uma na qual o O_2 foi reduzido pela adição de N_2 e CO_2 . Quinze embriões de ingá foram utilizados em cada repetição dos experimentos; também vinte sementes de pitanga por repetição. As sementes foram colocadas nos frascos onde foram geradas as atmosferas utilizando as técnicas vácuo compensado e gás insuflado. Os parâmetros de gases foram aferidos no aparelho analisador de gases (Illinois 6600), então os frascos foram vedados com plástico Parafilm antes de serem incubados pelos períodos de 1 dia, a 25 °C ou 5 dias, a 5 °C, nos experimentos com ingá; e 2 dias, a 25 °C ou 10 dias, a 5 °C, nos experimentos com pitanga. Posteriormente, sementes de *E. uniflora* foram congeladas para análises bioquímicas e as demais sementes de ambas as espécies foram conduzidos para testes de germinação. A técnica de vácuo compensado foi eficiente na geração de atmosferas modificadas padronizáveis. A atividade respiratória foi reduzida em ambas as espécies, principalmente nos tratamentos sob baixas temperaturas (5 °C). A respiração foi menor nos tratamentos cujo percentual de dióxido de carbono foi maior. As análises bioquímicas mostraram que houve menor consumo dos carboidratos em sementes sob maiores níveis de CO_2 . Portanto, o método de vácuo compensado mostrou-se eficiente na geração de atmosferas modificadas, reduzindo a atividade respiratória das sementes, o que foi atribuído ao dióxido de carbono e pôde ser observado pelas concentrações de carboidratos, o que contribui com o conhecimento sobre sementes recalcitrantes e seu armazenamento.

Palavras-chave: conservação de sementes, metabolismo de sementes, respiração.

ABSTRACT

High water level, incomplete maturation and vulnerability to microorganism attack are some of the reasons why recalcitrant seed storage is difficult. Several works have been developing techniques to improve recalcitrant seed storage. Perspective on recalcitrant seeds storage is based on reducing their metabolism. A recent work demonstrated that incubating recalcitrant seeds under high CO₂ levels reduces their respiratory rates, as shown by both lower O₂ consumption and CO₂ release. Literature does not attest whether downturn on metabolic rates are related to oxygen lower levels or carbon dioxide higher levels, which indicates they are directly related to metabolic reserves levels. This work aimed at developing a modified atmosphere method that allows changes on O₂ and CO₂ levels, and analyze its role on carbohydrates consumption by recalcitrant seeds. To develop the method, CO₂ was obtained from the reaction between acetic acid and sodium bicarbonate; and N₂, from a gas liquefier. The seeds used in this work came from two different species: ingá (*Inga vera* Wild.), used to corroborate the method efficiency, and pitanga (*Eugenia uniflora* L.), used to contribute on methods precision and submitted to biochemical analysis to verify carbohydrates rates. Past collection, the seeds were placed in a BOD chamber set at a temperature of 7 °C, until they were used in experiments. Two different temperatures were chosen: 5 °C and 25 °C, over three different gas mixes: the first one with earth atmosphere patterns; one of them with lower O₂ levels added with N₂ gas; and the last one with lower O₂ added with N₂ and CO₂. Fifteen ingá embryos were used in each glass jar; as well as twenty pitanga seeds for each glass jar. These seeds were placed inside the jars and the modified atmosphere was generated inside the jars using both techniques (offset vacuum and gas flushing). The O₂ and CO₂ levels were estimated by a gas-analyser (Illinois 6600). Glass jar lids were sealed with Parafilm plastic tape right before being placed into BOD chambers over 1 day at 25 °C or 5 days at 5 °C for ingá, and 2 days at 25 °C or 10 days at 5 °C for pitanga. After a second gas measure, samples of pitanga seeds were collected, frozen and led to biochemical analysis, and seeds of both species were taken to germination tests. The offset vacuum technique proved to be way more efficient on standardizable modified atmosphere generation. Respiratory rates were reduced in both species, primarily on treatments of seeds incubated under lower temperature (5 °C). In addition, the respiratory performance was even lower in seeds incubated under higher CO₂ levels. Biochemical analysis emphasized lower carbohydrate consumption in seeds under lower temperatures. Therefore, offset vacuum technique was more efficient on modified atmosphere generation, shown by reducing the respiratory activity in ingá embryos and pitanga seeds, assigning this role to CO₂ levels and also measured by different consumption taxes on carbohydrate levels, what contributes on recalcitrant seeds knowledge by improving their storage.

Keywords: seeds conservation, seeds metabolism, respiration.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Representação esquemática do processo de obtenção de CO_2 . Inicialmente, uma seringa foi introduzida, por um septo de borracha, em um kitassato de 500 mL vedado, contendo 100 g de bicarbonato de sódio. Por essa seringa, foi retirada a maior quantidade possível de ar de dentro do kitassato (A). Em seguida, foi adicionado ácido acético (20%) ao kitassato, também utilizando-se seringa introduzida pelo septo (B). A reação do bicarbonato de sódio com o ácido acético produziu o dióxido de carbono que, para o sistema de vácuo compensado, foi coletado em um balão de látex preso com barbante ou elástico na saída lateral do kitassato (C). Após preencher o balão, a injeção de ácido cessou.....47

Figura 2. Equipamentos utilizados na produção dos gases. Em A, kitassato com bicarbonato de sódio, seringa com ácido acético e balão de borracha para produção e captação de CO_2 ; em B, garrafa PET com nitrogênio líquido, em caixa de isopor, com tubo de condução do N_2 gasoso para o balão de borracha; em C, bomba de vácuo para captura de ar atmosférico.....48

Figura 3. Representação esquemática do processo de produção de atmosfera modificada pelo sistema de gás insuflado. CO_2 , N_2 e ar atmosférico vão sendo insuflados no misturador de gases, controlando-se as válvulas de acessos de cada gás, até a obtenção da mistura de gases desejada. A partir daí, abre-se a válvula de acesso ao respirômetro onde estão os embriões a serem estudados. Para mais detalhes, consultar a descrição em Material e métodos.....48

Figura 4. Equipamentos utilizados para a obtenção de atmosfera modificada pelo sistema de gás insuflado. Em A, frasco de vidro com tampa plástica contendo sílica gel, denominado misturador; em B, tampa com septos para a inserção das cânulas dos gases à esquerda e de saída da mistura de gases à direita; em C, misturador completo com detalhe das válvulas de controle de entrada dos gases e agulha de saída da mistura no campo tracejado; em D, agulha de saída do misturador inserida no respirômetro para a inserção sob baixa pressão e agulha extra para saída do ar atmosférico e manutenção da pressão; em E, analisador de gases Illinois 6600 utilizado para verificação do percentual dos gases.....49

Figura 5. Representação esquemática do processo de produção de atmosfera modificada pelo sistema de vácuo compensado. Em A, a remoção do ar do respirômetro até os níveis desejados de O_2 ; em B, coleta dos volumes pré-determinados de CO_2 e N_2 nas seringas; em C, inserção dos gases no respirômetro para compor a atmosfera modificada. A remoção de ar e a inserção de CO_2 e N_2 foi realizada pela mesma agulha de seringa, acoplada a uma cânula com válvula (não representados neste esquema). Para mais detalhes, consultar a descrição em Material e métodos.....49

Figura 6. Equipamentos utilizados para a obtenção de atmosfera modificada pelo sistema de vácuo compensado. Em A, frasco de vidro com tampa metálica (respirômetro), sementes e

plástico Parafilm; em B, respirômetro com sementes e com a agulha que coleta amostra para aferição dos gases; em C, analisador de gases Illinois 6600, que mostra os percentuais de oxigênio e dióxido de carbono; em D, respirômetro já vedado por Parafilm, antes de ser levado à incubação.....50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Concentrações de gases O₂ e CO₂ obtidas após processos de produção de atmosfera modificada pelos sistemas de gás insuflado e de vácuo compensado.....46

Tabela 2. Quociente Respiratório (QR) de embriões de ingá. Tratamentos, consumo de oxigênio em micromols por grama de massa seca por dia, liberação de dióxido de carbono em micromols por grama de massa seca por dia e quociente respiratório. Tratamento 1: 20,9% de O₂, 0,03% de CO₂, a 25 °C e incubação por 1 dia; tratamento 2: 20,9% de O₂, 0,03% de CO₂, a 5 °C e incubação por 5 dias; tratamento 3: 18% de O₂, 0% de CO₂, a 25 °C e incubação por 1 dia; tratamento 4: 18% de O₂, 0% de CO₂, a 5 °C e incubação por 5 dias; tratamento 5: 18% de O₂, 3% de CO₂, a 25 °C e incubação por 1 dia; tratamento 6: 18% de O₂, 3% de CO₂, a 5°C e incubação por 5 dias.....46

Tabela 3. Germinação de embriões de ingá ao final dos tratamentos de incubação em diferentes temperaturas e diferentes atmosferas modificadas.....47

CAPÍTULO II

Tabela 1. Germinação de sementes de *Eugenia uniflora* ao final dos tratamentos de incubação em duas temperaturas (5 °C e 25 °C, respectivamente por 10 e 2 dias) e três atmosferas (20,9% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 3% de CO₂). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Tukey a 5%.....71

Tabela 2. Consumo de O₂ e liberação de CO₂ de sementes de *Eugenia uniflora* incubadas em duas temperaturas (5 °C e 25 °C, respectivamente por 10 e 2 dias) e três atmosferas (20,9% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 3% de CO₂) e Quociente Respiratório (QR). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Tukey a 5%.....71

Tabela 3. Tabela 3. Quantificação dos açúcares livres, açúcares totais (Soma entre glucose, frutose e sacarose) e amido em sementes de *Eugenia uniflora* incubadas em duas temperaturas (5 °C e 25 °C, respectivamente por 10 e 2 dias) e três atmosferas (20,9% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 3% de CO₂). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Tukey a 5%.....71

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: Ácido Abscísico

ACD: Atmosfera Controlada Dinâmica

ACD-Et: Atmosfera Controlada Dinâmica baseada em Etanol

ACD-FC: Atmosfera Controlada Dinâmica baseada em Fluorescência de Clorofila

ACD-QR: Atmosfera Controlada Dinâmica baseada em Quociente Respiratório

AM: Atmosfera Modificada

AMs: Atmosferas Modificadas

DCA: *Dynamic Controlled Atmosphere*

DCA-CF: *Dynamic Controlled Atmosphere system based on Chlorophyll Fluorescence*

DCA-Eth: *Dynamic Controlled Atmosphere system based on Ethanol*

DCA-RQ: *Dynamic Controlled Atmosphere system based on Respiratory Quotient*

EROs: Espécies Reativas de Oxigênio

GI: Gás Insuflado

QR: Quociente Respiratório

ROS: *Reactive Oxygen Species*

VC: Vácuo Compensado

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	12
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2. OBJETIVO GERAL.....	18
2.1. Objetivos específicos.....	18
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	19
CAPÍTULO I - Atmosphere modification system for respiration analysis of recalcitrant seeds during storage.....	25
CAPÍTULO II - Conteúdo de açúcares solúveis em sementes de <i>Eugenia uniflora</i> L. dependem da temperatura e variações de oxigênio e dióxido de carbono.....	51
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	72
4.1 Referências das considerações finais.....	73

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação foi dividida em três partes:

A primeira parte apresenta a introdução geral, os objetivos gerais e específicos.

O Capítulo I traz a descrição detalhada de um método para a geração de Atmosferas Modificadas, além da aplicação de tal protocolo no controle do metabolismo respiratório de embriões de *Inga vera*, sob o título “Atmosphere modification system for respiration analysis of recalcitrant seeds during storage”, publicado na Revista Journal of Seed Science.

O Capítulo II conta com o título “Conteúdo de açúcares solúveis em sementes de *Eugenia uniflora* L. dependem da temperatura e variações de oxigênio e dióxido de carbono”, cujo objetivo foi reduzir o metabolismo respiratório de sementes de *Eugenia uniflora* utilizando o método descrito no Capítulo I, além de associar a atividade respiratória das sementes ao consumo de reservas de carboidratos presentes nas mesmas.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O histórico da relação entre sementes e seres humanos vem se estreitando através dos séculos, desde o desenvolvimento da atividade agrícola, com a qual aprendemos, entre outras coisas, as melhores maneiras de plantar, colher e armazenar as sementes de forma a otimizar a produtividade e as colheitas de espécies de interesse. Vários trabalhos científicos alinham descobertas no intuito de melhor compreender a fisiologia das sementes e seus eventos associados, a fim de aprofundar o conhecimento, melhorando o volume produzido nas safras, reduzindo o ataque de pragas, melhorando a conservação dessas espécies, entre outros fatores relacionados (Labouriau, 1990).

A estrutura das sementes, em geral, é baseada em óvulos fecundados, tecidos de proteção e tecidos de reserva (Silva e Paoli, 2006). Elas são um importante ganho evolutivo de grupos derivados de plantas, chamadas de fanerógamas, tendo a função análoga aos esporos de briófitas e samambaias, porém sendo bem menos dependentes da água para sua dispersão (Linkies *et al.*, 2010). As sementes quase sempre contam com reservas nutricionais anexas aos seus embriões, o que lhes confere certo suprimento de reserva energética, entre sua dispersão e o momento em que as plântulas geradas a partir delas passam a ser energeticamente auto-suficientes através da fotossíntese (Castro *et al.*, 2004).

As primeiras sementes suscetíveis à dessecação foram descritas por Kidd (1914, apud Barbedo, 2018), mas foi apenas em 1973, em um trabalho de Roberts, que as sementes foram separadas em dois grandes grupos: ortodoxas, como feijão, soja, arroz, milho, que são dispersas com baixos percentuais de água e tolerando dessecação, o que possibilita a estas sementes serem armazenadas por longos períodos, através de processos como congelamento ou secagem (Bewley e Black, 1994); e recalcitrantes, como abacate, pitanga, ingá, cacau, manga, que são dispersas com altos percentuais de água, não podendo serem secas e congeladas, o que impede longa manutenção de viabilidade (Barbedo e Marcos-Filho, 1998).

Alguns autores optam por distinguir as sementes ortodoxas e recalcitrantes como sementes tolerantes e não-tolerantes à dessecação, respectivamente; visto que, segundo algumas interpretações, as definições de ortodoxa e recalcitrante podem estar invertidas. O termo “ortodoxa” vem do grego *orthos* e significa “verdadeiro” ou “tradicional”, enquanto recalcitrante, do latim *recalcitrants*, faz menção àquilo que resiste ou que foge à norma, segundo o dicionário. Assim, sementes ortodoxas seriam aquelas que obedecem à norma, enquanto as recalcitrantes fogem à regra. Todavia, há discordância sobre o emprego de tais termos, afinal, a vida sempre esteve associada à água (Bruni, 1994), sendo assim, as sementes

que fogem à regra seriam justamente as ortodoxas, que sobrevivem mesmo com baixíssimos percentuais hídricos em seus tecidos.

Diversos trabalhos propuseram classificações entre sementes ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias, com base em aspectos como a tolerância à dessecação, por exemplo. Um desses trabalhos foi o de Farrant *et al.* (1988), no qual foram apresentadas as categorias altamente, moderadamente e minimamente recalcitrantes. Como dito, a classificação entre ortodoxas e recalcitrantes não é necessariamente um consenso acadêmico, embora seja amplamente utilizada na definição e diferenciação conceitual da fisiologia de sementes, uma vez que há sementes que não se enquadram de forma estrita em tais categorias. Por exemplo, sementes classicamente enquadradas como ortodoxas, nos estádios mais iniciais de seu desenvolvimento, apresentam altos percentuais de água, e nessa fase de seu desenvolvimento podem ter comportamento de recalcitrante, com intensa atividade metabólica (Schwallier *et al.*, 2011). Algumas espécies, além disso, podem ser classificadas como intermediárias, categoria sugerida na década de 80, caracterizada por contemplar ambas as classificações, ou fugir delas. A classificação binária entre ortodoxa e recalcitrante torna-se bastante discutível na década de 90, abrindo possibilidade para classificações bem menos engessadas com espécies classificadas como mais ou menos recalcitrantes e ortodoxas, em um amplo gradiente (Berjak *et al.*, 1990; Ballesteros *et al.*, 2021).

O desenvolvimento histofisiológico das sementes ortodoxas é dividido em três etapas. Somente a terceira corresponde à desidratação que, culminando na redução gradual do metabolismo, torna o embrião metabolicamente inativo ou quiescente (Kermode *et al.*, 1989), passando a tolerar secagens que levam os teores de água a níveis muitas vezes próximos a 5% (Ellis *et al.*, 1990). Durante a produção dessas sementes, a fase de desidratação natural deve coincidir com a seca do clima e/ou com a suspensão da irrigação, o que mitiga os danos às sementes (Toledo e Marcos-Filho, 1977; Fonseca e Freire, 2003). Essa fase pode ser compreendida como uma adaptação estratégica para tornar as sementes aptas a sobreviverem após o armazenamento, além de otimizar a disseminação das espécies e fornecer a estas sementes tolerância às mais diversas condições ambientais (Leopold, 1990, apud Guimarães, 2000; Fonseca e Freire, 2003).

O desenvolvimento das sementes recalcitrantes difere do das ortodoxas, por não apresentar a fase de desidratação (Farrant *et al.*, 1988), ou seja, antes da dispersão ocorre a diminuição do teor de água das sementes, não sendo entretanto, significativa quando comparada à fase de desidratação das sementes ortodoxas (Kikuti, 2000). Além disso, a perda de viabilidade das sementes recalcitrantes, em função da dessecação, ocorre após a formação

de superóxidos e peróxidos de hidrogênio, que causam a destruição de lipídios de membranas, liberando íons, devido à perda da compartimentalização celular (Pukacka e Ratajczak, 2006). Outra concepção acerca do desenvolvimento de sementes diz que sementes recalcitrantes se desprendem da planta-mãe em um estágio de maturação menos avançado que as ortodoxas, e quanto mais imaturas no momento da dispersão, maior é o seu grau de recalcitrância (Barbedo, 2018).

Um aspecto importante sobre o desenvolvimento das sementes é a assincronia entre o estágio de maturação de frutos e suas sementes, como pode ser observado em frutos maduros de pau-brasil (*Paubrasilia echinata* Lam. — Gagnon, H.C.Lima e G.P.Lewis). Essa espécie de sementes ortodoxas que, embora os frutos apresentem deiscência, quando maduros, dispersam sementes que ainda não concluíram seu desenvolvimento (Lamarca *et al.*, 2013).

A literatura indica que a dificuldade de armazenamento e conservação das sementes recalcitrantes está associada à incapacidade do controle do seu intenso metabolismo (Leprince *et al.*, 1999). Além disso, devido ao aporte de reservas energéticas, baixa eficiência da ação dos agentes antioxidantes e a quantidade de água, as sementes ficam vulneráveis à ação de agentes microbiológicos, especialmente fungos, muitos desses associados às sementes desde o início de seu desenvolvimento (Goldbach, 1979).

Uma das primeiras classificações para a viabilidade de sementes visava a longevidade como parâmetro. A longevidade pode ser interpretada como o intervalo de tempo em que as sementes se mantêm viáveis e podem germinar, se colocadas em condições adequadas, segundo Fonseca e Freire (2003). Em 1908, Ewart (apud Hong e Ellis, 1996) classificou as sementes entre microbiótica, quando sua longevidade é inferior a 3 anos; mesobiótica, quando sua longevidade oscila entre 3 e 15 anos; e macrobiótica, quando sua longevidade é superior a 15 anos. Nos dias atuais, a separação entre sementes ortodoxas, intermediárias e recalcitrantes ainda que sigam alguns critérios rigorosos culminam em diferentes classificações nas quais as sementes podem ser enquadradas, resultando em um gradiente de classificação (Berjak *et al.*, 1990; Ballesteros *et al.*, 2021). A velocidade da deterioração pode ser controlada dependendo da longevidade, da qualidade inicial das sementes e das condições ambientais. Sendo a longevidade uma característica genética inata à espécie, somente a qualidade inicial das sementes e as condições ambientais de armazenamento podem ser manipuladas (Toledo e Marcos-Filho, 1977; Carvalho e Nakagawa, 2012).

Segundo Bass (1979), as sementes, sejam essas ortodoxas, recalcitrantes ou intermediárias, com elevado percentual de água são suscetíveis ao congelamento, pois isso leva à formação de cristais de gelo e expansão da água congelada, o que rompe estruturas,

como a membrana celular (Fujikawa, 1980). Além da temperatura, a proliferação de agentes microbiológicos também interfere na conservação de sementes.

A respiração também é um aspecto importante na conservação de sementes, de acordo com King e Roberts (1979), pois o aporte de oxigênio é essencial às sementes armazenadas com altos teores de água, como as recalcitrantes, já que está diretamente associado ao processo de geração de energia, através da respiração celular. Além disso, os índices respiratórios devem ser mantidos mínimos para manter baixo o consumo de reservas energéticas e/ou oxidação degenerativa (Fowler, 2000). Já em sementes ortodoxas, a redução da atividade respiratória pode ser realizada livremente através de processos de secagem que, entre outras coisas, reduz o metabolismo das sementes e dos organismos que podem vir a atacá-las (Silva *et al.* 2018; Stavrinides *et al.* 2019). Para possibilitar a atividade respiratória das sementes recalcitrantes, embalagens permeáveis devem ser consideradas para o armazenamento, já que favorecem as trocas gasosas com o ambiente, além da entrada e saída de água (Marco-Filho, 2004).

A primeira atividade metabólica em sementes, concomitante à reidratação, é a respiração (Bewley e Black, 1994), que é diretamente influenciada pela permeabilidade das membranas (Popinigis, 1985). A perda da organização de membranas e o consequente descontrole da permeabilidade estão entre os primeiros eventos do processo degenerativo das sementes e apresentam fortíssima relação com a atividade respiratória, com as mudanças na atividade de enzimas, com a redução de tecidos de reserva, com a queda na velocidade e na capacidade de germinação e com o desenvolvimento de plântulas anormais (Delouche e Baskin, 1973). A deterioração é um processo complexo e progressivo que envolve mudanças de natureza metabólica, bioquímica, citológica, genética e fisiológica. A atividade metabólica tende a ser acelerada principalmente quando o teor de água das sementes e as temperaturas do ambiente estão elevadas, aumentando as taxas respiratórias, e consequentemente, o consumo das reservas (Carvalho e Nakagawa, 2012).

A respiração celular está diretamente relacionada ao consumo de reservas de carboidratos e pode ser influenciada por fatores ambientais, como citado por Hellmann *et al.* (2008) no qual sementes de pau-brasil (*P. echinata* Lam. — Gagnon, H.C.Lima e G.P.Lewis), expostas a diferentes temperaturas durante o armazenamento, apresentaram variação no consumo de reservas energéticas. No início da germinação, as sementes fazem uso de açúcares livres presentes no embrião e, assim que essas reservas se esgotam, as reservas de carboidratos complexos, como o amido presentes em tecidos de reserva, são mobilizados para dar continuidade no aporte energético exigido pelo processo germinativo, até o estabelecimento

da plântula (Carvalho e Nakagawa, 2012). Tal correlação também pôde ser observada no trabalho de Buckeridge *et al.* (1992), que demonstra, a partir da análise de sementes de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.), que a concentração de açúcares livres durante a germinação tende a diminuir.

Sabe-se que técnicas não convencionais que reduzem a atividade respiratória são potenciais ferramentas para a conservação de sementes recalcitrantes. Uma dessas técnicas é o uso de atmosferas modificadas, que consiste em armazenar sementes em embalagens vedadas, nas quais a concentração dos gases é alterada. De acordo com Steffens *et al.*, (2007), a redução da pressão parcial do O₂ e/ou o aumento da pressão parcial do CO₂ diminui a atividade respiratória de tecidos vegetais, reduzindo o consumo das reservas energéticas de sementes durante o armazenamento, mantendo sua viabilidade e vigor (Brackmann *et al.*, 2002).

Vários trabalhos vêm sendo desenvolvidos a fim de compreender mais a fundo os processos fisiológicos das sementes recalcitrantes com o uso de técnicas não convencionais de conservação.

Embora a temperatura possa estar diretamente associada aos danos causados às sementes com altos percentuais de água, quando utilizada de forma adequada, as baixas temperaturas podem ser aliadas no aumento da viabilidade de sementes recalcitrantes (Popinigis, 1985), por exemplo, através da redução do desenvolvimento de microrganismos, como fungos. Porém, esta prática não contempla as sementes de todas as espécies (King e Roberts, 1979). Sabe-se que armazenar as sementes recalcitrantes em condições de baixas temperaturas, sem congelá-las, prolonga sua viabilidade, que passa de algumas semanas para vários meses, como observado por Maluf *et al.* (2003), visto que baixas temperaturas limitaram a ação de enzimas associadas ao metabolismo, como dito por Bonjovani (2011). Até o presente momento, a técnica que se mostra mais eficiente para a manutenção da qualidade de sementes recalcitrantes tem sido o armazenamento sob baixas temperaturas sem processos de secagem (Bonjovani e Barbedo, 2014).

Outras técnicas como a utilização de ácido abscísico (ABA) para inibir a germinação foi aplicada em sementes de *Melicoccus bijugatus* Jacq, *Eugenia brasiliensis* Lam. (Goldbach, 1979) e em *Inga uruguensis* Hooker et Arnott (Barbedo e Cicero, 2000), método este que visa paralisar ou limitar o crescimento do eixo embrionário, a fim de ampliar o período de conservação das sementes recalcitrantes quando mantidas em meio suficientemente úmido. Associando controle osmótico, aplicação de ABA, Bonjovani e Barbedo (2020) avaliaram a respiração de embriões de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington sob

diferentes temperaturas, sendo possível armazenar os diásporos, sem muita influência do ABA, mas com redução substancial das atividades respiratória e oxidativa. O controle de percentual hídrico é mais uma técnica amplamente estudada e aplicada na conservação de sementes recalcitrantes, como realizado com *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, por Gasparin *et al.* (2017), onde foram avaliadas as respostas fisiológicas e estruturais de tais sementes, ou com *Eugenia pyriformis* (Cambess), no qual Lamarca *et al.* (2013) avaliaram a maturação de sementes desta espécie sob diferentes condições termais e hídricas, e em 2016, quando Lamarca *et al.* avaliaram a variação na tolerância à dessecação de sementes da mesma espécie dispersas em diferentes estádios de maturação.

Em 2020, Cécel e Barbedo observaram que a incubação de sementes recalcitrantes de *Eugenia brasiliensis* (Lam.) sob atmosferas com altos percentuais de dióxido de carbono reduziu o metabolismo através da diminuição da atividade respiratória. Resultado semelhante foi observado também por Pammenter e Berjak (1999). Ao final do trabalho uma nova questão foi elaborada: a que se atribui a redução do metabolismo respiratório, à alta do percentual de dióxido de carbono ou à queda proporcional na disponibilidade percentual de oxigênio? A partir de tal questionamento, o presente trabalho foi proposto, com o intuito de atribuir a redução do metabolismo ao aumento de CO₂ ou à diminuição de O₂, além de analisar e associar a respiração ao consumo das reservas energéticas pelas sementes. Foi necessário, para isso, o desenvolvimento de um método padronizável para gerar diferentes misturas de gases nas quais as sementes pudessem ser incubadas, já que os métodos disponíveis, apesar de atenderem às necessidades de seus respectivos trabalhos, não atendiam às necessidades deste. Para tanto, a hipótese do presente trabalho é: a intensidade do metabolismo das sementes recalcitrantes condiciona a taxa de sua deterioração e o controle desse metabolismo pode ampliar sua capacidade de conservação.

2. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de método padronizável para a geração de atmosferas modificadas nas quais as sementes foram incubadas.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reduzir a atividade respiratória de sementes recalcitrantes a partir da incubação sob atmosferas modificadas;
- Verificar a ação dos gases dentro das atmosferas e associar redução da respiração a um deles;
- Associar atividade respiratória e consumo de reservas de carboidratos pelas sementes.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

BALLESTEROS, D.; FANEGA-SLEZIAK, N.; DAVIES R. M. 2021. Cryopreservation of Seeds and Seed Embryos in Orthodox-, Intermediate-, and Recalcitrant-Seeded Species. In: WOLKERS W.F.; OLDENHOF H. (eds) Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology, Humana, New York, NY. v. 2180.

BARBEDO, C. J.; MARCOS-FILHO, J. 1998. Tolerância à dessecação em sementes. *Acta Botanica Brasilica*, 12(2), 145–164.

BARBEDO, C.J.; CICERO, S.M. 2000. The effects of initial quality, low temperature and ABA on the imbibed storage of seeds of *Inga uruguensis*, a tropical species with recalcitrant seeds. SEED SCIENCE AND TECHNOLOGY, Zurich, v. 28, n.3, p. 793-808.

BARBEDO, C. J. 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. Journal of Seed Science, v. 40, n. 3, p. 221-236.

BASS, L. N. 1979. Physiological and other aspects of seed preservation. In: RUBENSTEIN, I.; PHILLIPS, R.L.; GREEN, C.E.; GENGENBACH, B.G. *The plant seed: development, preservation and germination*. New York: Academic Press, 1979. p.145-170.

BERJAK P.; FARRANT J. M.; MYCOCK D.J.; PAMMENTER N.W. 1990. Recalcitrant (homoiohydrous) seeds: the enigma of their desiccation-sensitivity. Seed Sci. Technol. 18:297-310.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. 1994. Seeds: physiology of development and germination. Seed Science Research, v. 5, Issue 2.

BONJOVANI, M.R. 2011. Taxa respiratória em sementes recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. affinis (DC.) T. D. Pennington. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, 131p.

BONJOVANI, M.R.; BARBEDO, C.J. 2014. Induction of tolerance to desiccation and to subzero temperatures in embryos of recalcitrant seeds of inga. *Journal of Seed Science*, v.36, p.419-426.

BONJOVANI, M.R.; BARBEDO, C.J. 2020. Respiração de embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington sob diferentes temperaturas, potenciais osmóticos e aplicação de ABA. *HOEHNEA*, v. 47, p. e012020.

BRACKMANN, A.; NEUWALD, D.A.; RIBEIRO, N.D.; MEDEIROS, E. A. A. 2002. Condição de armazenamento de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) do grupo carioca 'FT Bonito'. *Revista Brasileira de Armazenamento*, v.27, p.16-20.

BRUNI, J. C. 1994. A água e a vida. *Tempo Social; Rev. Sociol. USP*, S. Paulo, v. 5(1-2), p. 53-65.

BUCKERIDGE, M.S.; ROCHA, D.C.; REID, J.S.G.; DIETRICH, S.M.C. 1992. Xyloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorffii* from savanna and forest populations. *Physiologia Plantarum*, v. 86, p.145-151.

CARVALHO, N.M. E NAKAGAWA, J. 2012. Sementes: Ciência, tecnologia e produção. FUNEP, Jaboticabal, 590 p.

CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J, HILHORST, H.W.M. 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In*: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. 2004. Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 324p.

CÉCEL, A. T.; BARBEDO, C. J. 2020. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob diferentes concentrações de CO₂. Instituto de Botânica, São Paulo.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. 1973. Accelerated aging techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.1, n.2, p.427-452.

ELLIS, R. H.; HONG, T. D.; ROBERTS, H. 1990. An intermediate category of seed storage behaviour?: I., coffee. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 41, n. 230, p. 1167-1174.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. 1988. Recalcitrance: a current assessment. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.16, p.155-166.

FONSECA, S. C. L.; FREIRE, H. B. 2003. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. *Bragantia*, Campinas, v. 62, n. 2, p. 297-303.

FOWLER, J. A. P. 2000. Superação de dormência e armazenamento de sementes de espécies florestais. In: GALVÃO, A.P.M (Org.). *Reflorestamento de propriedades rurais para fins produtivos e ambientais: um guia para ações municipais e regionais*. Brasília, DF: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. Colombo, Embrapa Florestas, p. 77-99.

FUJIKAWA, S. 1980. Freeze-fracture and etching studies on membrane damage on human erythrocytes caused by formation of intracellular ice. *Cryobiology*, Espanha, v.17, p.351-362, 1980.

GASPARIN, E.; FARIA, J.M.R.; JOSÉ, A.C.; HILHORST, H.W.M. 2017. Physiological and ultrastructural responses during drying of recalcitrant seeds of *Araucaria angustifolia*. *Seed Science and Technology*, v.45, p.112-129.

GOLDBACH, H. 1979. Imbibed storage of *Melicoccus bijugatus* and *Eugenia brasiliensis* using abscisic acid as a germination inhibitor. *Seed Science and Technology*, Zurich, v.7, p.403-406.

GUIMARÃES, R.M. 2000. Tolerância à dessecação e condicionamento fisiológico em sementes de cafeeiro (*Coffea arabica*, L.). 180f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras.

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*, v. 35(2), p. 255–264.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. 1996. A protocol to determine seed storage behavior. In: ENGELS, J.M.M; TOLL, J. Rome: IPGRI. 62p. (IPGRI Technical Bulletin n.1)

KERMODE, A. R.; OISHI, M. Y.; BEWLEY, J. D. 1989. Regulatory roles for desiccation and abscisic acid in seed development: a comparison of the evidence from whole seeds and isolated embryos. In: STANWOOD, P.C.; McDONALD, M.B. *Seed moisture* Madison: CSSA, p.23-50.

KIKUTI, A. L. P. 2000. Aplicação de antioxidantes em sementes de cafeeiro visando à preservação da qualidade. 72f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras.

KING, M. W.; ROBERTS, E. H. 1979. The storage of recalcitrant seeds: achievements and possible approaches. Rome: IBPGR, 96p.

LABOURIAU, L. F. G. 1990. O interesse do estudo das sementes. Estudos avançados, v. 4, n. 9.

LAMARCA, E. V.; BONJOVANI, M. R.; FARIA, J. M. R.; BARBEDO, C. S. 2013. Taxas Respiratórias e Velocidade de Deterioração de Sementes de *Paubrasilia echinata* Lam. em Função de Variações Hídricas e Térmicas. Rodriguésia. v. 64(4), p. 877-885.

LAMARCA, E.V.; PRATAVIERA, J.S.; BORGES, I.F.; DELGADO, L.F.; TEIXEIRA, C.C.; CAMARGO, M.B.P.; FARIA, J.M.R.; BARBEDO, C.J. 2013. Maturation of *Eugenia pyriformis* seeds under different hydric and thermal conditions. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v.85, p.223-233.

LAMARCA, E.V.; CAMARGO, M.B.P.; TEIXEIRA, S.P.; SILVA, E.A.A.; FARIA, J.M.R.; BARBEDO, C.J. 2016. Variations in desiccation tolerance in seeds of *Eugenia pyriformis*: dispersal at different stages of maturation. Revista Ciência Agronômica, v.47, p.118-126.

LEPRINCE, O.; BUITINK, J.; HOEKSTRA, F. A. 1999. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. Journal of Experimental Botany, v. 50, p.1515-1524.

LINKIES, A.; GRAEBER, K.; KNIGHT, C.; LEUBNER-METZGER, G. 2010. The evolution of seeds. *New Phytologist*, v:186, p. 817-831.

MALUF, A.M.; BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. 2003. Drying and storage of *Eugenia involucrata* seeds. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v.60, n.3, p.471-475.

MARCOS-FILHO, J. 2004. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ, 495p.

PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms. *Seed Science Research*, Wallingford, v.9, n.1, p. 13-37, 1999.

POPINIGIS, F. 1985. Fisiologia da semente. Brasília: AGIPLAN, 289p.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. 2006. Antioxidative response of ascorbate-glutathione pathway enzymes and metabolites to desiccation of recalcitrant *Acer saccharinum* seeds. *Journal of Plant Physiology*, v.163, p.1259-1266.

ROBERTS, E.H. 1973. Predicting the storage life of seeds. *Seed Science and Technology*, Zurich, v. 1, n. 4, p. 499-514.

SCHWALLIER, R.; BHOOPALAN, V.; BLACKMAN, S. 2011. The influence of seed maturation on desiccation tolerance in *Phalaenopsis amabilis* hybrids. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 128, n. 2, p. 136-140.

SILVA, E. A. A.; OLIVEIRA, J. M.; PEREIRA, W. V. S. 2018. Fisiologia das sementes. In: Barbedo, C.J. & Santos Junior, N.A. (orgs.) *Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira*. Instituto de Botânica, São Paulo. pp. 15-40.

SILVA, L.L.; PAOLI, A.A.S. 2006. Morphology and anatomy of seeds of *Dictyoloma vandellianum* Adr. Juss. (Rutaceae). *Revista Brasileira de Sementes* v.28(3), p.116-120.

STAVRINIDES, A.; DUSSERT, S.; COMBES, M.C.; FOCK-BASTIDE, I.; SEVERAC, D.; MINIER, J.; BASTOS-SIQUEIRA, A.; DEMOLOMBE, V.; HEM, S.; LASHERMES, P.; JOËT, T. 2019. Seed comparative genomics in three coffee species identify desiccation tolerance mechanisms in intermediate seeds. *Journal of Experimental Botany*, v. 71, p. 1418–1433.

STEFFENS, C.A.; BRACKMANN, A.; PINTO, J.A.V.; EISERMANN, A.N. 2007. Taxa respiratória de frutas de clima temperado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.42, p.313-321.

TOLEDO, F.F.; MARCOS-FILHO, J. 1977. *Manual de sementes: tecnologia da produção*. São Paulo: Agronômica Ceres, 224p.

CAPÍTULO I

**“Atmosphere modification system for respiration analysis of
recalcitrant seeds during storage”**

**SciELO - Brasil - Atmosphere modification system for respiration analysis of
recalcitrant seeds during storage Atmosphere modification system for respiration
analysis of recalcitrant seeds during storage**

Atmosphere modification system for respiration analysis of recalcitrant seeds during storage

Gabriel Felipe Manoel¹, Marco Aurelio Tiné¹, Marina Crestana Guardia¹, Claudio José Barbedo¹, Catarina Carvalho Nievola^{1*}

ABSTRACT – The modification of atmosphere composition is a strategy to prolong the storage of organisms susceptible to senescence. Atmospheres with high levels of carbon dioxide could be applied to prolong the viability of recalcitrant seeds, which are in a constant process of deterioration due to intense metabolic activity. However, there is a need to develop methods that allow the standardized generation of these modified atmospheres to isolate the effect of low oxygen from high carbon dioxide. In this study, the generation of modified atmospheres was carried out by experiments with insufflated gas (IG) or compensated vacuum (CV), on recalcitrant *Inga vera* embryos as an experimental model. In IG, CO₂ and N₂ were uninterruptedly injected into a mixing chamber, in which the gases underwent turbulence to be homogenized and subsequently applied to the flasks where the embryos were incubated. In CV, the embryos were placed in flasks, from which a fraction of the air present inside was removed, and subsequently, the gases of interest were injected in defined fractions. The CV method proved to be more efficient and it was possible to restrict the respiratory metabolism of the *Inga vera* embryos by reducing respiration with the increase in carbon dioxide applied exogenously.

Index terms: conservation, *Inga vera*, metabolic control.

Instituto de Pesquisas Ambientais. Avenida Miguel Stefano, 3687, São Paulo – SP.

*Corresponding author: ccnievola@sp.gov.br

**Sistema de modificação da atmosfera para análise de respiração de sementes
recalcitrantes durante o armazenamento**

RESUMO: A modificação da composição atmosférica é uma estratégia para prolongar o armazenamento de organismos suscetíveis à senescência. Atmosferas com elevados índices de dióxido de carbono podem ser aplicadas para prolongar a viabilidade de sementes recalcitrantes, que estão em constante processo de deterioração pela intensa atividade metabólica. Contudo, há necessidade de desenvolvimento de métodos que possibilitem a geração padronizável dessas atmosferas modificadas de forma a isolar o efeito da concentração de oxigênio da alta concentração de dióxido de carbono. Neste trabalho, a geração de atmosferas modificadas foi conduzida em experimentos com gás insuflado (GI) ou com vácuo compensado (VC) sobre embriões recalcitrantes de *Inga vera* (ingá), como modelo experimental. Em GI, CO₂ e N₂ foram ininterruptamente injetados em uma câmara para mistura, na qual os gases sofrem turbulência para serem homogeneizados e posteriormente aplicados nos recipientes onde os embriões foram incubados. Em VC, os embriões foram transferidos para frascos, de onde foi retirada uma fração do ar presente no mesmo, e posteriormente injetados os gases de interesse em frações definidas. O método VC se mostrou mais eficiente e foi possível restringir o metabolismo respiratório dos embriões de *I. vera* pela redução da respiração com o aumento do uso do dióxido de carbono aplicado exogenamente.

Termos para indexação: conservação, *Inga vera*, controle do metabolismo.

INTRODUÇÃO

Atmosferas modificadas (AMs) apresentam grande potencial para o controle do metabolismo respiratório das sementes e, conseqüentemente, para a ampliação de sua conservação durante o armazenamento. Tal controle é especialmente importante para o desenvolvimento de tecnologias que permitam armazenar sementes recalcitrantes (sensíveis à dessecação) por longos períodos. Em consequência de seu intenso metabolismo, essas sementes estão constantemente passando por estresses fisiológicos, não podendo serem secas ou congeladas para serem armazenadas (Barbedo, 2018; Xu *et al.*, 2020), como normalmente são armazenadas as sementes ortodoxas, tolerantes à dessecação (Redden e Partington, 2019). Em sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixama), por exemplo, aumentos na concentração de dióxido de carbono no ar resultaram em diminuição da atividade respiratória (Cécel e Barbedo, 2021), o que poderia contribuir para a preservação dessas sementes por períodos maiores do que os limites atuais.

A conservação de sementes recalcitrantes em armazenamento prolongado, ou seja, que permita sua inclusão em bancos de germoplasma, continua sendo um dos maiores desafios da fisiologia e tecnologia de sementes (Wyse *et al.*, 2018). Por não poderem ter seu teor de água reduzido até valores próximos ou abaixo de 10%, também não podem ser armazenadas em temperaturas negativas, como as utilizadas em bancos de sementes. Esses dois processos, ou seja, a redução quase completa do teor de água e a manutenção em temperaturas de congelamento, são os principais métodos de redução das taxas metabólicas em sementes ortodoxas (tolerantes à dessecação), o que permite sua inclusão nos bancos de germoplasma por décadas ou séculos (Liu *et al.*, 2018; Solber *et al.*, 2020). Não sendo possível adotar esses métodos para sementes recalcitrantes, outras formas de contenção do metabolismo devem ser investigadas, como a modificação da concentração dos gases no ambiente, ou seja, o uso de AMs.

AMs consistem em técnicas aplicadas a espaços, embalagens ou recipientes nos quais aspectos como balanço de gases são alterados com objetivo de prolongar a validade e viabilidade de vários alimentos. Os principais gases empregados na geração de atmosferas modificadas são o nitrogênio, o dióxido de carbono e o oxigênio, agregados em diferentes proporções a fim de atender aos diferentes objetivos ou caráter do material a ser conservado (Philips, 1996). Com o intuito de preservar diferentes tipos de alimentos, que vão desde vegetais até carnes e laticínios, muitas vezes as AMs podem ser empregadas juntamente com outras técnicas, como a refrigeração que, juntas, otimizam a conservação (Santos e Oliveira, 2012).

As AMs são divididas entre ativas, passivas e a vácuo. As ativas consistem na alteração artificial e forçosa dos percentuais dos gases de interesse (Lana e Finger, 2000), principalmente a redução da oferta de oxigênio. A menor disponibilidade deste gás tende a restringir a atividade respiratória e, portanto, o metabolismo dos materiais de estudo, o que reduz a atividade celular e, consequentemente, a deterioração de frutas e vegetais (Arruda *et al.*, 2011). As AMs ativas são divididas em dois sistemas: vácuo compensado e gás insuflado. O primeiro consiste na retirada do ar atmosférico presente no ambiente onde a atmosfera modificada (AM) será gerada, levando à formação de um vácuo. Posteriormente, a mistura de gases desejada é injetada no ambiente e o vácuo é anulado. Já no sistema de gás insuflado há injeção constante da mistura de gases desejada no ambiente da AM, de forma que a mistura de gases atenua os parâmetros de gases atmosféricos, até que o ambiente seja completamente preenchido pela mistura de gases, que substitui progressivamente a atmosfera anterior (Mantilla *et al.*, 2010).

Segundo Weber *et al.* (2017), existem três principais técnicas modernas para a avaliação de AMs: atmosfera controlada dinâmica baseada em fluorescência de clorofila - ACD-FC (*dynamic controlled atmosphere system based on chlorophyll fluorescence* -

DCA-CF), que avalia com sensores, por meio do nível de fluorescência da clorofila, a resposta de frutos ao baixo índice de oxigênio, pois sabe-se que a fluorescência da clorofila é resposta ao estresse fisiológico. A atmosfera controlada dinâmica baseada em etanol - ACD-Et (*dynamic controlled atmosphere system based on ethanol* - DCA-Eth), que é uma técnica que avalia a concentração de etanol no ambiente ou na polpa do fruto; etanol este que pode ser gerado a partir de fermentação alcoólica, indicando a baixa disponibilidade de oxigênio. E a atmosfera controlada dinâmica baseada em quociente respiratório - ACD-QR (*dynamic controlled atmosphere system based on respiratory quotient* - DCA-RQ), que avalia a relação entre o percentual de dióxido de carbono produzido e oxigênio consumido, analisando, entre outras coisas, qual substrato foi consumido durante a geração de energia pelas células.

AMs podem se tornar importante ferramenta para a ampliação da capacidade de conservação de sementes recalcitrantes, mas há necessidade do desenvolvimento de técnicas de produção da atmosferas modificadas e a identificação da participação de cada gás modificado nos processos biológicos alterados nas sementes. No estudo de Cécel e Barbedo (2021), por exemplo, a inserção progressiva de dióxido de carbono reduziu o percentual de oxigênio disponível para as sementes. Dessa forma, não foi possível atribuir a redução da atividade respiratória especificamente ao aumento do dióxido de carbono ou à redução equivalente do oxigênio. Há necessidade, portanto, de se avaliar o efeito destes gases isoladamente sobre as sementes. Para tal, um método que possibilite rotineiramente a geração de AMs, com controle tanto de CO₂ quanto de O₂, se faz necessário.

Sendo assim, neste trabalho objetivou-se desenvolver métodos que possibilitem a geração de AMs de forma padronizável e, assim, que permitam analisar a redução do metabolismo respiratório de sementes recalcitrantes. Posteriormente, utilizaram-se embriões recalcitrantes de *Inga vera*, reconhecidamente entre os mais recalcitrantes conhecidos

(Bonjovani e Barbedo, 2020; Pereira *et al.*, 2020) como modelo de controle dessa respiração, buscando-se atmosferas que reduzam as taxas respiratórias desses embriões durante seu armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos gases para as atmosferas modificadas

Dois experimentos foram conduzidos para a obtenção das atmosferas modificadas (AMs), um com o sistema de gás insuflado (GI) e o outro com o de vácuo compensado (VC). Os gases utilizados na geração das AMs por GI foram ar atmosférico, nitrogênio (N_2) e dióxido de carbono (CO_2); já na AM por VC os gases utilizados foram nitrogênio (N_2) e dióxido de carbono (CO_2).

O CO_2 foi obtido a partir da reação entre o bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e o ácido acético (CH_3COOH). Para tal, 100 g de bicarbonato de sódio foram colocados em um kitassato de 500 mL. Em seguida, o bocal da vidraria foi selado com um septo de borracha e plástico Parafilm. Na saída lateral foi colocado um balão de látex preso com barbante ou elástico, para o sistema de vácuo compensado (Figuras 1 e 2), ou uma cânula com válvula de baixa pressão que alimentaram o interior do frasco chamado 'misturador de gases', no sistema de GI (Figuras 3 e 4). Para garantir que a quantidade de ar dentro do sistema fosse mínima, o ar atmosférico foi retirado de dentro do kitassato, através do septo, com o auxílio de uma seringa de 20 mL e agulha, até onde fosse possível, criando um vácuo parcial dentro do frasco. Após isso, a mesma seringa foi preenchida com uma solução de ácido acético a 20%, que foi injetado no frasco através do septo, desta forma reagindo com o bicarbonato de sódio. Por segurança, a injeção de ácido foi feita de forma lenta, para que nem a geração de dióxido de carbono, nem a efervescência da reação, causassem vazamentos de gás. Para o sistema de

VC, após preencher o balão com o gás, a injeção de ácido cessou. Posteriormente, foi colocada uma válvula de baixa pressão no bocal do balão, que controlou a vazão do gás no momento da coleta.

O N₂ foi obtido através da evaporação do nitrogênio líquido, obtido de um condensador, que liquefaz o nitrogênio da atmosfera e o filtra até valores de aproximadamente 99,99% de pureza, para garantir que substâncias contaminantes, como oxigênio e água, não interfiram nos processos nos quais o nitrogênio é utilizado. O nitrogênio liquefeito foi coletado em uma garrafa PET, de 2 litros, envolta em papel alumínio e armazenada em caixa de isopor, para controle da evaporação do gás (Figura 2B). Na tampa da garrafa foi introduzida uma longa mangueira plástica, para garantir que o gás alcançasse a temperatura ambiente à medida que evaporasse. Para o sistema de VC, o gás foi armazenado em balões de látex, tendo acesso apenas por uma válvula de baixa pressão presa por elástico de borracha ou barbante no bocal, por onde o gás foi acessado. Para o sistema de GI, a mangueira foi conectada diretamente ao misturador de gases.

O ar atmosférico, utilizado apenas na técnica de GI, foi obtido a partir de uma bomba de vácuo modelo Tecnal TE-0581 (Tecnal Equipamentos Científicos, Piracicaba), conectada a um tubo que se ligava diretamente ao misturador de gases (Figuras 2C e 3).

Os gases coletados em balões foram utilizados para a execução da AM do tipo vácuo compensado; já para a técnica do gás insuflado, a mangueira de saída do nitrogênio e a saída lateral do kitassato, por onde saiu dióxido de carbono após a reação, foram conectadas às cânulas com válvulas de baixa pressão que alimentaram o interior do frasco chamado ‘misturador de gases’.

Geração de AMs no sistema de gás insuflado

A câmara na qual as AMs do sistema de gás insuflado foram geradas consistiu em um frasco de vidro transparente com bocal roscado, tampa de plástico e aproximadamente 3 litros

de volume, onde foram colocadas 500 mL de sílica gel, para que os gases sofressem turbulência e tivessem a umidade residual removida (Figuras 3 e 4A). Na tampa do frasco foram feitos três furos para a entrada de cânulas que alimentavam o interior do frasco com os gases, furos estes que foram cobertos com septo de borracha para vedação e perfurados na parte central para a passagem da cânula. Além disso, um quarto furo com septo de borracha e cânula foi feito (Figura 4B), para deslocamento dos gases aos frascos finais, onde os embriões foram incubados para avaliação da respiração, chamados de ‘respirômetros’. Estes se caracterizaram por frascos de vidro com bocal roscado de 600 mL de volume, com tampa metálica com furo coberto por um septo através do qual era possível inserir a agulha de seringa (Figura 4D). A mistura de gases foi gerada a partir da mistura dos gases de interesse no misturador (Figura 3) e transferido para o interior dos respirômetros via cânula com agulha, através do septo. A aferição da concentração de dióxido de carbono (CO_2) e oxigênio (O_2), ou seja, dos gases de interesse para os estudos de respiração dos embriões, foi feita pela coleta de amostra do ar do interior do respirômetro e injeção em medidor de gases Modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsbury, Figura 4E). Nos respirômetros, além da agulha que injetou a mistura de gases, uma segunda agulha foi posicionada na tampa, através do septo, para que o ar atmosférico anteriormente presente no interior do frasco fosse removido pela entrada da mistura de gases, sem gerar aumento na pressão interna do sistema.

Geração de AMs no sistema de vácuo compensado

Neste sistema, as AMs foram geradas diretamente no interior dos respirômetros, a partir da substituição de parte do ar atmosférico presente no interior dos frascos por gases de interesse (neste caso, nitrogênio e dióxido de carbono). A alteração no balanço dos gases começou com a redução da concentração de oxigênio pela retirada de parte do ar atmosférico do respirômetro (Figura 5A), fazendo com que a quantidade de oxigênio fosse proporcionalmente removida e substituída. Para tanto, foi desenvolvida e utilizada a equação

$V_{atm} = [(a - b) / (a \cdot 10^{-2})] \cdot c \cdot 10$, onde V_{atm} é o volume de ar atmosférico a ser retirado de cada respirômetro para alcançar o valor percentual de oxigênio desejado (em mL), a é a concentração de oxigênio na atmosfera, b é a concentração de oxigênio que se desejava alcançar e c é o volume do respirômetro (em L). Desta forma, o volume de ar a ser retirado de um frasco de 600 mL, para alcançar a concentração de 18% de oxigênio, foi 83,2536 mL; esse volume, posteriormente, foi completado com os gases de interesse, como descrito a seguir.

Para aumentar a concentração de dióxido de carbono, foi desenvolvida e utilizada a equação $V_{apl} = d \cdot c \cdot 10$, onde V_{apl} é o volume de CO₂ a ser aplicado no frasco, para alcançar o valor desejado, d é a concentração desejada de dióxido de carbono e c é o volume do respirômetro (em L). Desta forma, após a retirada do volume de ar atmosférico calculado, foram injetados 18 mL de dióxido de carbono no respirômetro (600 mL), com o objetivo de alcançar a atmosfera modificada com 3% de CO₂. Sabendo disso, o volume de dióxido de carbono foi subtraído do valor de ar atmosférico retirado do frasco (83 - 18 = 65 mL) e o valor restante foi o volume de nitrogênio que foi injetado no respirômetro para alcançar novamente a pressão inicial, dentro do frasco, antes da retirada de ar atmosférico, evitando, desta forma, a geração de vácuos parciais. Em caso da geração de AM em frascos de 600 mL sem adição de CO₂, o valor integral de 83,2536 mL foi preenchido por N₂.

Para remoção ou introdução de ar e gases nos respirômetros, assim que estes foram fechados uma seringa anexada a uma cânula foi inserida no septo da tampa. A outra extremidade da cânula contava com uma pequena válvula de baixa pressão, onde foi encaixado o bico da seringa, para remover ou injetar os gases. As entradas e saídas de gases foram feitas através desta cânula, uma vez que a agulha já se encontrava inserida na tampa do respirômetro. O objetivo deste acesso com agulha, cânula e válvula foi evitar consecutivas perfurações no septo dos frascos, o que poderia aumentar as injúrias e vazamentos dos gases.

Assim que a AM era gerada no interior dos respirômetros, estes tiveram os valores de oxigênio e dióxido de carbono conferidos no medidor de gases Illinois 6600, para garantir que as concentrações fossem iguais às desejadas para o experimento.

Incubação dos embriões nas AMs

Embriões de ingá (*Inga vera* Willd. (DC.) T.D. Pennington) foram obtidos no Parque Villa-Lobos (23°32 'S; 46°43'O) São Paulo, SP. Na coleta, os frutos foram colhidos manualmente quando maduros, conforme descrições de Bonjovani e Barbedo (2020). Os frutos foram então conduzidos ao Laboratório de Análise de Sementes, onde tiveram seus diásporos (embriões e sarcotesta) extraídos e lavados. A sarcotesta foi removida e os embriões foram então lavados em água corrente para retirar quaisquer resíduos de açúcares, que poderiam comprometer o armazenamento dos mesmos. Os embriões tiveram o excesso de água das lavagens removido com papel filtro, e então foram armazenados em sacos plásticos de polipropileno, onde foram feitos furos, com uma agulha, para que o material pudesse respirar (Bonjovani e Barbedo, 2020).

Os embriões de ingá foram incubados em 3 misturas de gases e duas temperaturas. Para as misturas de gases, uma delas foi considerado controle, ou seja, com concentrações de oxigênio e dióxido de carbono iguais às da atmosfera (20,9% e 0,03%, respectivamente); a segunda mistura de gases visou isolar a ação do oxigênio, reduzindo sua concentração, sem adicionar dióxido de carbono (18% de O₂ e 0% de CO₂) tendo a injeção de nitrogênio como gás inerte para completar o volume do frasco; a última mistura de gases também manteve o nível do oxigênio a 18%, porém, foi injetado dióxido de carbono nesse tratamento, visando a concentração de 3%.

Para avaliar a respiração dos embriões, quatro frascos respirômetros com 15 embriões de *I. vera* foram utilizados em cada tratamento. Todos os espirômetros foram incubados a 5°C por 5 dias e a 25 °C por 1 dia, baseado em estudos prévios para avaliar a respiração de tais embriões. Esses períodos foram escolhidos baseados no tempo mínimo necessário para que ocorresse uma mudança mínima na concentração de gases, de forma que esta mudança pudesse ser aferida, mas antes que alguma alteração ocorresse e causasse qualquer dano aos embriões, resultando na alteração do padrão respiratório dos mesmos (Bonjovani e Barbedo, 2019, 2020; Parisi *et al.*, 2019; Lamarca *and* Barbedo, 2021). Em cada temperatura, as concentrações de O₂ e CO₂ citadas acima foram utilizadas. Após os períodos definidos, o consumo de O₂ e a produção de CO₂ pelos embriões nos respirômetros foram avaliados, como previamente citado, calculando a taxa respiratória e quociente respiratório, como descrito por Kader e Saltveit (2002). Ao fim dos períodos de incubação, os embriões foram removidos dos frascos e avaliados quanto à viabilidade através do teste de germinação, como descrito por Bonjovani e Barbedo (2020). Todos os experimentos foram conduzidos em design completamente randomizado e os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste F a nível de probabilidade de 5%. Quando significativa, as diferenças foram comparadas entre si usando o teste de Tukey, também a 5% de nível de probabilidade (Santana e Ranal, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Geração de Atmosferas Modificadas

A geração de atmosferas modificadas a partir do sistema do vácuo compensado se mostrou mais eficiente, pois na segunda tentativa já se obtiveram os valores desejados. Já no sistema de gás insuflado, mesmo após 3 tentativas as concentrações de O₂ ficaram muito aquém da desejada (Tabela 1). A mistura de gases, no sistema de gás insuflado, foi exaustiva e imprecisa, já que este necessita de constante entrada dos gases sob vazão adequada para

formar a AM de interesse, o que exige preciso controle da evaporação do nitrogênio e da reação ácido-base para geração de dióxido de carbono. Além disso, a pressão gerada pelo fluxo dos gases no sistema de gás insuflado foi insuficiente para realizar a injeção e substituição dos gases nos respirômetros. No sistema do vácuo compensado, a utilização de ar atmosférico é dispensável, já que os únicos gases utilizados são nitrogênio e dióxido de carbono. Além disso, como ocorre substituição do ar atmosférico por gases específicos, o controle de balanço entre os gases é mais equilibrado e preciso.

Outro importante aspecto a ser observado é que o sistema do gás insuflado exigiu volumes muito maiores de gases para funcionar apropriadamente, já que foi necessário ajustar a vazão dos gases e a eficiência do misturador, além da pressão e do volume morto, neste caso. O sistema do vácuo compensado, além de não demandar ajustes de vazão, também exige menos gases e dispensa o uso da sílica, já que as próprias sementes podem gerar a turbulência necessária para a homogeneização da mistura de gases.

A vedação por plástico parafilm se mostrou eficiente, isolando os respirômetros. Contudo, é aconselhável que a camada que recobre o septo seja mantida, além da camada que recobre a circunferência da região de intersecção tampa-frasco, como já realizado em trabalhos anteriores de avaliação da respiração desta mesma espécie (Bonjovani e Barbedo, 2019, 2020; Parisi *et al.*, 2019; Lamarca e Barbedo, 2021) ou mesmo de outras espécies (Lamarca e Barbedo, 2012; Cécel e Barbedo, 2021). A vedação do misturador de gases com plástico parafilm poderia ter reduzido as perdas de gases no sistema de gás insuflado. Apesar de exigir menos gases, um misturador menor também teria problemas para garantir fluxo constante dos gases de interesse, já que a velocidade da reação para gerar dióxido de carbono e mudança de estado do nitrogênio influenciam diretamente na pressão exercida no sistema do gás insuflado.

A equação para mensurar a quantidade de ar atmosférico que deve ser retirada do frasco, para reduzir o percentual de oxigênio, se mostrou eficiente (Tabela 1) e aplicável para outras situações em que se tenha o objetivo de reduzir o oxigênio em outras proporções. Isso vale também para o cálculo de enriquecimento de dióxido de carbono. Combinados, os dois cálculos podem gerar atmosferas modificadas de diferentes padrões, que atendam às mais diversas necessidades e objetivos e, conseqüentemente, podem restringir o volume final de nitrogênio na mistura.

Tanto a obtenção do dióxido de carbono quanto a de nitrogênio foram eficientes. Contudo, retirar um maior volume de ar do frasco kitassato no momento da geração de CO₂ garante maior pureza ao dióxido de carbono. Além disso, soluções ácidas mais concentradas se mostraram mais eficientes em reagir com o bicarbonato de sódio, apesar do risco do sistema ser sobrecarregado pela pressão gerada ser maior.

Em função da ineficiência do sistema de gás insuflado em produzir as AMs desejadas, a incubação dos embriões de ingá nas diferentes AMs foi realizada somente com o sistema de vácuo compensado.

A análise da respiração de sementes pode ser importante ferramenta para diagnóstico do metabolismo da semente (Gao *et al.*, 2023). De maneira geral, os embriões tiveram atividade respiratória mais intensa a 25 °C do que a 5 °C (Tabela 2), o que já era esperado uma vez que já foi demonstrada a intensa atividade metabólica desses embriões quando a temperatura é mais elevada (Pereira *et al.*, 2020). Valle *et. al.* (2021) também constataram aumento nas taxas respiratórias de sementes de milho tanto com o aumento da temperatura quanto com o do teor de água das sementes. Tal resultado pode ser explicado pela redução da atividade metabólica como consequência de baixas temperaturas, que afeta a ação enzimática (Ruelland e Zachowski, 2010), como também observado por Bonjovani e Barbedo (2020), que descrevem que mesmo sob temperaturas ainda menores, como -2 °C, os embriões de ingá

ainda apresentam atividade respiratória. Além disso, as baixas temperaturas tendem a limitar a difusão do oxigênio (Buckeridge *et al.*, 2004). Comparativamente, os embriões nos tratamentos sob altas temperaturas, como observado na Figura 5, apresentam maior taxa respiratória, o que indica maior atividade metabólica e pode culminar mais rapidamente na deterioração destes diásporos, como também observado em *Paubrasilia echinata*, no trabalho de Lamarca e Barbedo (2012). Na temperatura de 5 °C, com concentrações iniciais de 3,0% de CO₂ e 18,0% de O₂, os valores desses gases foram os mesmos de suas concentrações na atmosfera normal, sugerindo vazamento de gases nos respirômetros. Isso não permitiu incluir esse tratamento na análise dos demais resultados.

A 25 °C, a redução na concentração de O₂, de 20,9% para 18,0%, proporcionou redução no consumo de O₂ pelos embriões, independente da concentração de CO₂ ter ou não sido alterada (Tabela 2), o que poderia ser explicado pela menor disponibilidade de oxigênio que poderia ter reduzido as taxas respiratórias. Contudo, quando se analisam as alterações na liberação de CO₂ por esses embriões verifica-se que o menor consumo de O₂ pode ter sido, na verdade, resultado de menores taxas de outros processos oxidativos que não a respiração, pois os valores de CO₂ não se alteraram quando se alterou apenas a concentração de O₂ no respirômetro. Corroborar essa hipótese o fato de o QR (quociente respiratório) ter aumentado (Tabela 2). A atividade respiratória de fato foi reduzida quando houve aumento na concentração de CO₂ no respirômetro. A taxa respiratória no tratamento com enriquecimento de dióxido de carbono foi a menor das três, tal qual foi observado em *Eugenia brasiliensis* por Cécel e Barbedo (2021). Na temperatura de 5 °C, não houve mudança significativa do consumo de O₂ ou na liberação de CO₂ com as AMs. Neste caso, é possível que o tempo de incubação dos embriões não tenha sido suficiente para detectar diferenças na atividade respiratória.

O QR nos tratamentos 1, 2 e 5 foi próximo ou inferior a 0,5, o que pode indicar atividade oxidativa; no tratamento 3, o QR de 0,66 pode indicar que os embriões estavam consumindo lipídios como substrato para seu processo respiratório; e os tratamentos 4 e 6, cujos valores de QR foram maiores que 1, pode indicar que os embriões poderiam estar realizando fermentação (Kader e Saltveit, 2002).

Praticamente todos os embriões mantiveram-se vivos durante as incubações, pois atingiram valores próximos a 100% de germinação em todos os tratamentos (Tabela 3). Nas avaliações de respiração pelo método de análise da concentração de gases em respirômetros, o tempo de incubação dos embriões não deve permitir que percam a viabilidade pois a mudança na massa respirante levaria a imprecisões na análise das taxas respiratórias. Por outro lado, o tempo de incubação deve ser suficiente para que a respiração dos embriões seja suficiente para causar alteração na concentração dos gases no respirômetro. O próprio aumento da concentração de CO₂, ou da redução de O₂, resultante da respiração de embriões (ou sementes), pode levar muitos à morte, como observado por Cécel e Barbedo (2021) em sementes de *Eugenia brasiliensis*. Como os embriões de ingá do presente trabalho chegaram vivos ao final das incubações, é possível que o tempo de incubação tenha sido correto para a temperatura de 25 °C, mas que tenha sido insuficiente para a temperatura de 5 °C. É importante salientar que a alteração na composição dos gases nos respirômetros, depende, entre outros fatores, da temperatura, do volume de ar do respirômetro e da massa de embriões/sementes respirantes. Em função disso encontram-se várias combinações entre temperatura e tempo de incubação nos diferentes trabalhos com respiração de embriões/sementes (Lamarca e Barbedo, 2012; Parisi *et al.*, 2019; Bonjovani e Barbedo, 2020; Lamarca e Barbedo, 2021).

Analisando os resultados de respiração do presente trabalho, verifica-se que a redução das taxas respiratórias dos embriões de ingá ocorreu essencialmente quando se reduziu a

temperatura ou quando se aumentou a concentração de CO₂ na atmosfera dos respirômetros. A redução nas taxas respiratórias pode indicar redução no metabolismo geral desses embriões, fornecendo importante subsídio para o desenvolvimento de técnicas que permitam conservar sementes recalcitrantes por períodos prolongados, uma vez que o intenso metabolismo dessas sementes tem se mostrado como o principal fator de sua rápida deterioração (Barbedo, 2018). O prolongamento na capacidade de armazenamento de sementes, com o aumento da concentração de CO₂ na atmosfera foi observado em sementes de *Triticum durum*, sementes tolerantes à dessecação e com baixo teor de água (Bennici *et al.*, 1984). No presente trabalho demonstrou-se que as taxas metabólicas podem ser reduzidas também em sementes sensíveis à dessecação e com elevado teor de água. O controle da atmosfera de armazenamento dessas sementes pode, dessa forma, auxiliar na busca pela tecnologia de armazenamento dessas sementes, especialmente o aumento controlado do CO₂.

O sistema de *vácuo compensado* foi o que propiciou melhores resultados para a obtenção de atmosfera modificada para embriões de *Inga vera*. A atmosfera modificada pelo aumento da concentração de CO₂ permitiu reduzir as taxas respiratórias desses embriões.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, M.C.; JACOMINO, A.P.; TREVISAN, M.J.; JERONIMO, E.M.; MORETTI, C.L. Atmosfera modificada em laranja “Pêra” minimamente processada. *Bragantia*, v.70, n.3, p.664-671, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0006-87052011000300023>
- BARBEDO, C.J. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science*, v.40, n.3, p.221-236, 2018. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v40n3207201>
- BENNICI, A.; BITONTI, M.B.; FLORIS, C.; GENNAI, D.; INNOCENTI, A.M. Ageing in *Triticum durum* wheat seeds: early storage in carbon dioxide prolongs longevity. *Environmental and Experimental Botany*, v.24, n.2, p.159-165, 1984.

BONJOVANI, M.R.; BARBEDO, C.J. Respiration and deterioration of *Inga vera* ssp. *affinis* embryos stored at different temperatures. *Journal of Seed Science*, v.41, n.1, p.44-53, 2019. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v41n1193955>

BONJOVANI, M.R.; BARBEDO, C.J. Respiração de embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington sob diferentes temperaturas, potenciais osmóticos e aplicação de ABA. *Hoehnea*, v.47: e012020, 2020. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-01/2020>

CÉCEL, A.T.; BARBEDO, C.J. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob atmosferas modificadas. *Hoehnea*, v.48, e052020, 2021. <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-05/2020>

GAO, L.; ZANG, Y.; ZHAO, G.; QI, H.; TANG, Q.; LIU, Q.; JIA, L. Research on the seed respiration CO₂ detection system based on TDLAS technology. *International Journal of Optics*, v.2023, article 8017726, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/8017726>

KADER, A.A.; SALTVEIT, M.E. Respiration and gas exchange. In: J.A. Bartz, J.K. Brecht e J. Weichmann (orgs.). *Postharvest physiology and pathology of vegetables*. Marcel Dekker, New York, p.7-29, 2002.

LAMARCA, E.V.; BARBEDO, C. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. *Hoehnea*, v.39, n.4, p.577-586, 2012. <https://doi.org/10.1590/S2236-89062012000400006>

LAMARCA, E.V.; BARBEDO, C. Respiratory rates and freezing tolerance of embryos of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. from different regions. *Journal of Seed Science*, v.43, e202143017, 2021. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v43247247>

LANA, M.M.; FINGER, F.L. *Atmosfera modificada e controlada: aplicação na conservação de produtos hortícolas*. Brasília: Embrapa Hortaliças, p.34, 2000.

- LIU, U.; BREMAN, E.; COSSU, T.A.; KENNEY, S. The conservation value of germplasm stored at the Millenium Seed Bank, Royal Botanic Gardens, Kew, UK. *Biodiversity and Conservation*, v.27, p.1347-1386, 2018. <https://link.springer.com/article/10.1007/s10531-018-1497-y>
- MANTILLA, S.P.F.; MANO, S.B.; VITAL, H.C.; FRANCO, R.M. Atmosfera modificada na conservação de alimentos. *Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais*, v.8, p.437-448, 2010.
- PARISI, J.J.D.; BIAGI, J.D.; BARBEDO, C.J.; MEDINA, P.F.; LAMARCA, E.V. Respiratory rates of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. seeds. *Floresta e Ambiente*, v. 26, e20171033, 2019. <https://doi.org/10.1590/2179-8087.103317>
- PHILIPS, C.A. Review: Modified atmosphere packaging and its effects on the microbiological quality and safety of produce. *International Journal of Food Science and Technology*, v.31, p.463-479, 1996. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00369.x>
- PEREIRA, L.C.V.; MAYRINCK, R.C.; ZAMBON, C.R.; JOSÉ, A.C.; FARIA, J.M.R. Storage of short-lived seeds of *Inga vera* subsp. *affinis* in osmotic medium. *Seed Science Research*, v.30, p.156-160, 2020. <https://doi.org/10.1017/S0960258520000185>
- REDDEN, R.; PARTINGTON, D. Gene bank scheduling of seed regeneration: Interim report on a long term storage study. *Journal of Integrative Agriculture*, v.18, n.7, p. 1529-1540, 2019. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62730-9](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62730-9)
- RUELLAND, E.; ZACHOWSKI, A. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, v.69, n.3, p.225-232, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.011>
- SANTANA, D.G.; RANAL, M. *Análise da germinação: um enfoque estatístico*. Ed. Universidade de Brasília, Brasília, 2004.

- SANTOS, J.S.; OLIVEIRA, M.B.P.P. Revisão: Alimentos frescos minimamente processados embalados em atmosfera modificada. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.15, p.1-14, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1981-67232012000100001>
- SOLBER, S.O.; BRODAL, G.; VON BOTHMER, R.; MEEN, E.; YNDGAARD, F.; ANDREASEN, C.; ASDAL, A. Seed germination after 30 years storage in permafrost. *Plants*, v.9, n.5, 579, 2020. <https://doi.org/10.3390/plants9050579>
- VALLE, F.J.M.; GASTÓN, A.; ABALONE, R.M.; TORRE, D.A.; CASTELLARI, C.C.; BARTOSIK, R.E. Study and modelling the respiration of corn seeds (*Zea mays* L.) during hermetic storage. *Biosystems Engineering*, v.208, p.45-57, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2021.05.009>
- VELTMAN, R.H.; VERSCHOOR, J.A.; VAN DUGTEREN, J.H.R. Dynamic control system (DCS) for apples (*Malus domestica* Borkh. cv. 'Elstar'): optimal quality through storage based on product response. *Postharvest Biology and Technology*, v.27, n.1, p.79-86, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00186-2](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00186-2)
- WEBER, A.; BRACKMANN, A.; BOTH, V.; PAVANELLO, E.P.; ANESE, R.O.; THEWES, F.R. Respiratory quotient: innovative method for monitoring 'Royal Gala' apple storage in a dynamic controlled atmosphere. *Scientia Agricola*, v.72, n.1, p.28-33, 2015. <https://doi.org/10.1590/0103-9016-2013-0429>
- WEBER, A.; THEWES, F.R.; ANESE, R.O.; BOTH, V.; PAVANELLO, E.P.; BRACKMANN, A. Dynamic controlled atmosphere (DCA): interaction between DCA methods and 1-methylcyclopropene on 'Fuji Suprema' apple quality. *Food Chemistry*, v.235, p.136-144, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.047>
- WYSE, S.V.; DICKIE, J.B.; WILLIS, K.J. Seed banking not an option for many threatened plants. *Nature Plants*, v.4, p.848-850, 2018. <https://www.nature.com/articles/s41477-018-0298-3>

XU, S.; XU, S.; ZHOU, Y.; GU, R.; ZHANG, X.; YUE, S. Long-term seed storage for desiccation sensitive seeds in the marine foundation species *Zostera marina* L. (eelgrass). *Global Ecology and Conservation*, v.24, e01401, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01401>

Tabela 1. Concentrações de gases O₂ e CO₂ obtidas após processos de produção de atmosfera modificada pelos sistemas de gás insuflado e de vácuo compensado.

Sistema	Tentativa	Concentrações desejadas		Concentrações obtidas	
		O ₂	CO ₂	O ₂	CO ₂
Vácuo compensado	1 ^a	18%	3%	16%	4%
	2 ^a	18%	3%	18%	3%
	3 ^a	18%	0%	18%	0%
Gás insuflado	1 ^a	18%	3%	2%	7%
	2 ^a	18%	3%	8%	5%
	3 ^a	18%	3%	9%	3%

Tabela 2. Quociente Respiratório (QR) de embriões de ingá. Tratamentos, consumo de oxigênio em micromols por grama de massa seca por dia, liberação de dióxido de carbono em micromols por grama de massa seca por dia e quociente respiratório. Tratamento 1: 20,9% de O₂, 0,03% de CO₂, a 25 °C e incubação por 1 dia; tratamento 2: 20,9% de O₂, 0,03% de CO₂, a 5 °C e incubação por 5 dias; tratamento 3: 18% de O₂, 0% de CO₂, a 25 °C e incubação por 1 dia; tratamento 4: 18% de O₂, 0% de CO₂, a 5 °C e incubação por 5 dias; tratamento 5: 18% de O₂, 3% de CO₂, a 25 °C e incubação por 1 dia; tratamento 6: 18% de O₂, 3% de CO₂, a 5°C e incubação por 5 dias.

Concentração dos gases, temperatura (T) e tempo de incubação (t) dos embriões				Consumo de O ₂ pelos embriões	Liberação de CO ₂ pelos embriões	QR
[O ₂]	[CO ₂]	T	t	($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{dia}^{-1}$)	
20,9%	0,03%	25 °C	1 dia	123,53 a*	60,18 a	0,48 c
20,9%	0,03%	5 °C	5 dias	24,07 c	12,08 bc	0,50 c
18,0%	0,03%	25 °C	1 dia	96,34 b	63,47 a	0,66 b
18,0%	0,03%	5 °C	5 dias	6,02 c	10,21 c	1,20 a
18,0%	3,0%	25 °C	1 dia	87,49 b	23,09 b	0,26 d
18,0%	3,0%	5 °C	5 dias	-	-	-

*Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Tabela 3. Germinação de embriões de ingá ao final dos tratamentos de incubação em diferentes temperaturas e diferentes atmosferas modificadas.

Temperatura	25 °C			5 °C		
Concentração O ₂	20,9%	18,0%		20,9%	18,0%	
Concentração CO ₂	0,0%	0,0%	3,0%	0,0%	0,0%	3,0%
Germinação	96% a*	99% a	99% a	95% a	95% a	94% a

*Médias seguidas pela mesma letra, nas linhas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

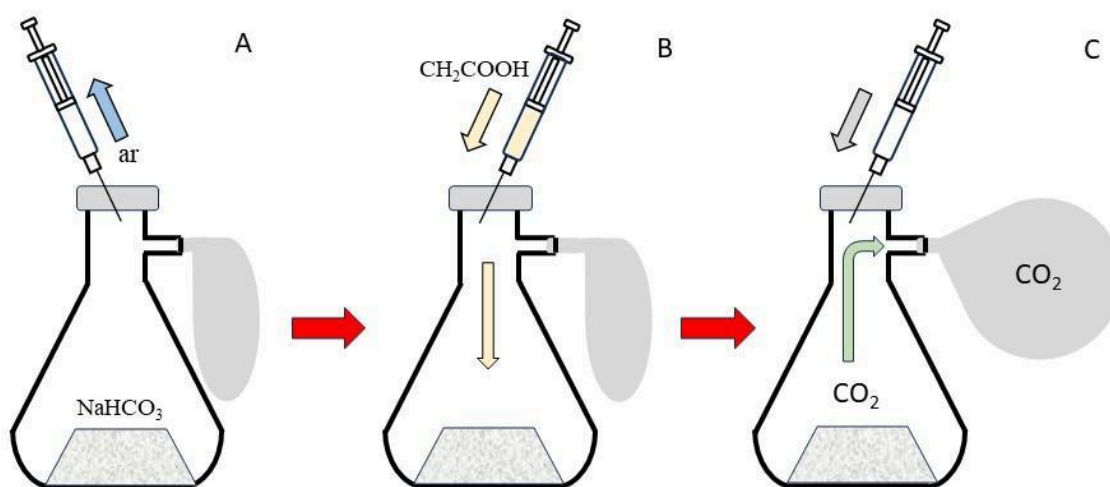


Figura 1. Representação esquemática do processo de obtenção de dióxido de carbono. Inicialmente, uma seringa foi introduzida, por um septo de borracha, em um kitassato de 500 mL vedado, contendo 100 g de bicarbonato de sódio. Por essa seringa, foi retirada a maior quantidade possível de ar de dentro do kitassato (A). Em seguida, foi adicionado ácido acético (20%) ao kitassato, também utilizando-se seringa introduzida pelo septo (B). A reação do bicarbonato de sódio com o ácido acético produziu o dióxido de carbono que, para o sistema de vácuo compensado, foi coletado em um balão de látex preso com barbante ou elástico na saída lateral do kitassato (C). Após preencher o balão, a injeção de ácido cessou.

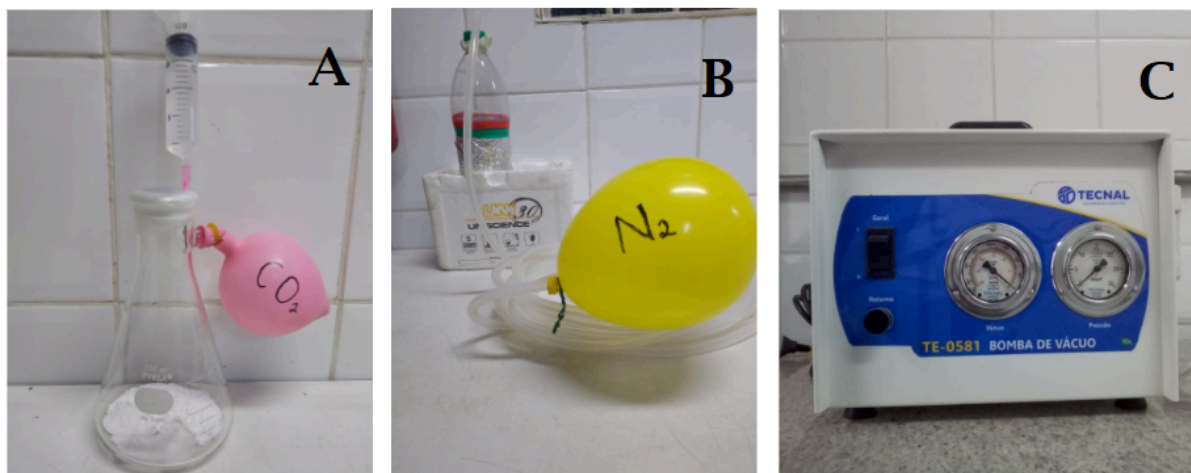


Figura 2: Equipamentos utilizados na produção dos gases. Em A, kitassato com bicarbonato de sódio, seringa com ácido acético e balão de borracha para produção e captação de CO_2 ; em B, garrafa PET com nitrogênio líquido, em caixa de isopor, com tubo de condução do N_2 gasoso para o balão de borracha; em C, bomba de vácuo para captura de ar atmosférico.

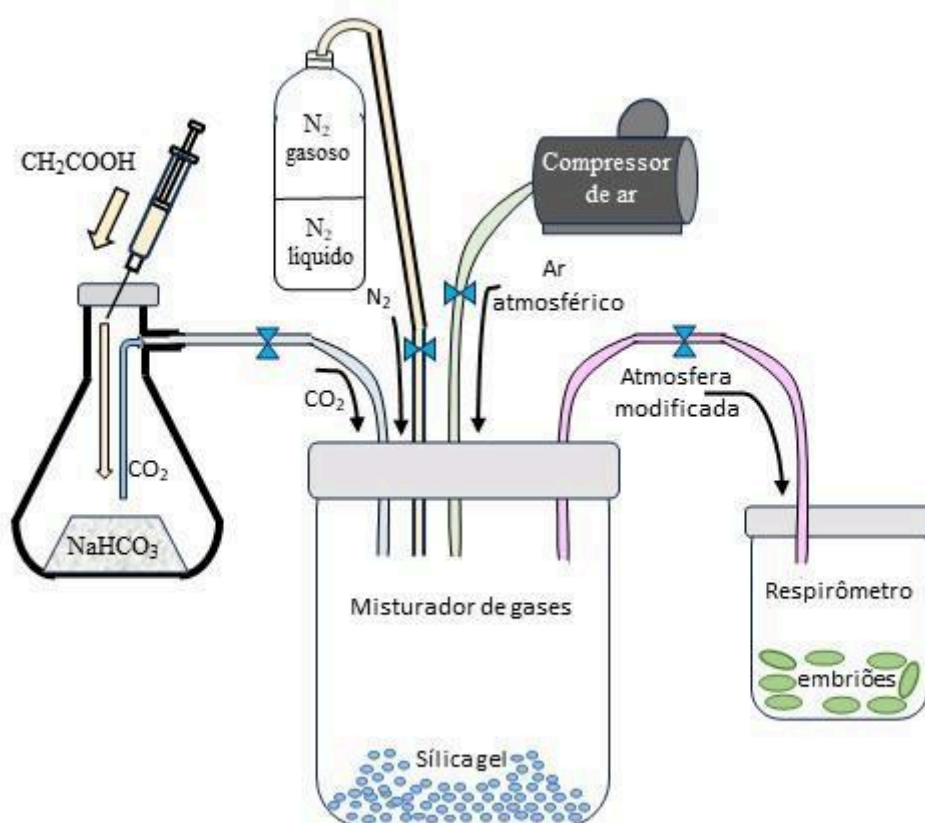


Figura 3. Representação esquemática do processo de produção de atmosfera modificada pelo sistema de gás insuflado. CO_2 , N_2 e ar atmosférico vão sendo insuflados no misturador de gases, controlando-se as válvulas de acessos de cada gás,

até a obtenção da mistura de gases desejada. A partir daí, abre-se a válvula de acesso ao respirômetro onde estão os embriões a serem estudados. Para mais detalhes, consultar a descrição em Material e métodos.

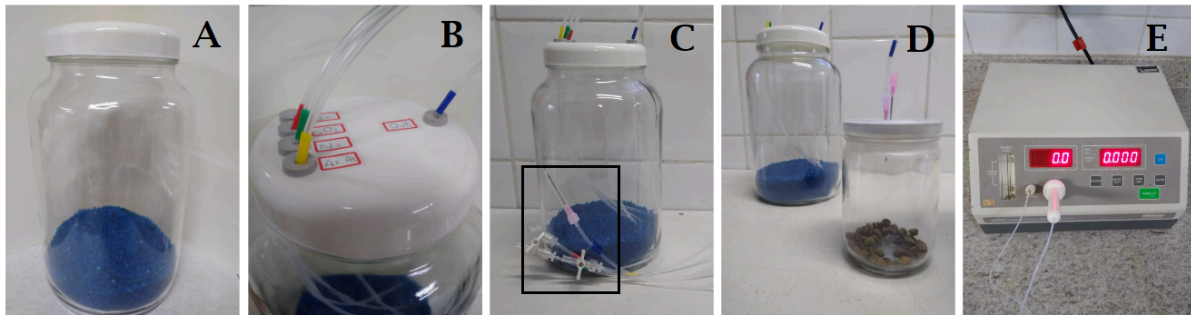


Figura 4: Equipamentos utilizados para a obtenção de atmosfera modificada pelo sistema de gás insuflado. Em A, frasco de vidro com tampa plástica contendo sílica gel, denominado misturador; em B, tampa com septos para a inserção das cânulas dos gases à esquerda e de saída da mistura de gases à direita; em C, misturador completo com detalhe das válvulas de controle de entrada dos gases e agulha de saída da mistura no campo tracejado; em D, agulha de saída do misturador inserida no respirômetro para a inserção sob baixa pressão e agulha extra para saída do ar atmosférico e manutenção da pressão; em E, analisador de gases Illinois 6600 utilizado para verificação do percentual dos gases.

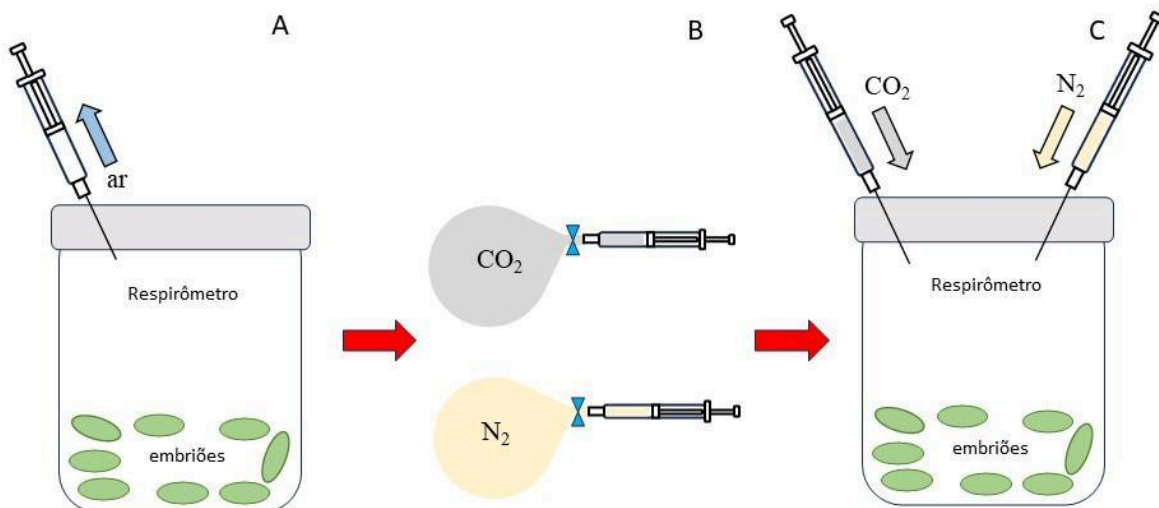


Figura 5. Representação esquemática do processo de produção de atmosfera modificada pelo sistema de vácuo compensado. Em A, a remoção do ar do respirômetro até os níveis desejados de O_2 ; em B, coleta dos volumes pré-determinados de CO_2 e N_2 nas seringas; em C, inserção dos gases no respirômetro para compor a atmosfera modificada. A remoção de ar e a inserção de CO_2 e N_2 foi realizada pela mesma agulha de seringa, acoplada a uma cânula com válvula

(não representados neste esquema). Para mais detalhes, consultar a descrição em Material e métodos.

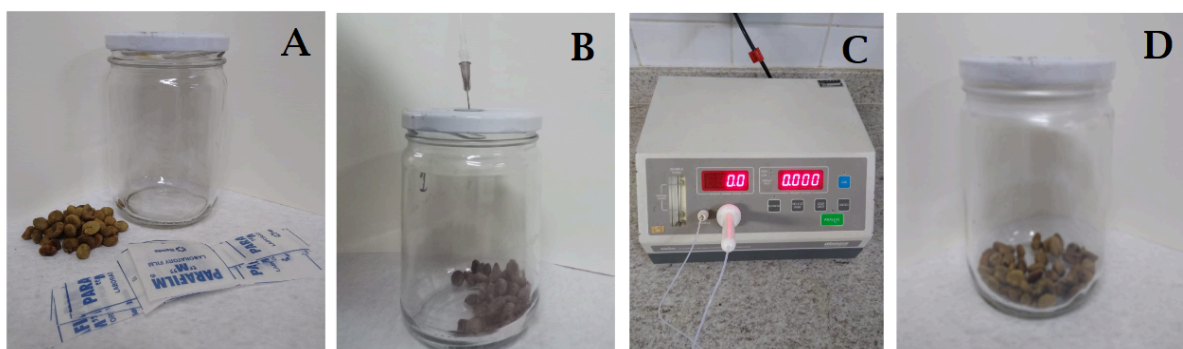


Figura 6: Equipamentos utilizados para a obtenção de atmosfera modificada pelo sistema de vácuo compensado. Em A, frasco de vidro com tampa metálica (respirômetro), sementes e plástico Parafilm; em B, respirômetro com sementes e com a agulha que coleta amostra para aferição dos gases; em C, analisador de gases Illinois 6600, que mostra os percentuais de oxigênio e dióxido de carbono; em D, respirômetro já vedado por Parafilm, antes de ser levado à incubação.

CAPÍTULO II

“Conteúdo de açúcares solúveis em sementes de *Eugenia uniflora* L. dependem da temperatura e variações de oxigênio e dióxido de carbono”

Conteúdo de açúcares solúveis em sementes de *Eugenia uniflora* L. dependem da temperatura e variações de oxigênio e dióxido de carbono

Gabriel Felipe Manoel², Marco Aurelio Tiné², Marina Crestana Guardia², Claudio José Barbedo², Catarina Carvalho Nievola^{2,3}

¹ Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor no Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, do Instituto de Pesquisas Ambientais, São Paulo, SP.

² Instituto de Pesquisas Ambientais. Avenida Miguel Stefano, 3687, São Paulo – SP.

³ Autor para correspondência: ccnievola@sp.gov.br

ABSTRACT - (Soluble sugar content in seeds of *Eugenia uniflora* L. depend on temperature and variations of oxygen and carbon dioxide). Recalcitrant seeds are intolerant to desiccation and difficult to store. Incubation under modified atmospheres can prolong the viability of these seeds, as such treatments reduce respiratory activity. In the present study, the carbohydrate content of recalcitrant seeds of *E. uniflora* was evaluated when maintained at different concentrations of O₂ and CO₂. The results indicate that it is possible to associate the respiratory rate with the use of carbohydrates, establishing conditions that can favor the development of technology to store these seeds for prolonged periods.

Keywords: carbohydrates in seeds, cellular respiration, seed conservation.

RESUMO - (Conteúdo de açúcares solúveis em sementes de *Eugenia uniflora* L. dependem da temperatura e variações de oxigênio e dióxido de carbono). Sementes recalcitrantes são sensíveis à dessecação e apresentam metabolismo intenso o que dificulta seu armazenamento. A incubação destas sob atmosferas modificadas parece diminuir a atividade metabólica, prolongando sua viabilidade. No presente estudo avaliou-se o conteúdo de carboidratos em sementes recalcitrantes de *E. uniflora* submetidas a diferentes concentrações de O₂ e CO₂. Os resultados indicam que é possível associar a taxa respiratória ao uso de carboidratos, estabelecendo condições que podem favorecer o desenvolvimento de tecnologia para armazenar sementes por períodos prolongados.

Palavras-chave: carboidratos em sementes, conservação de sementes, respiração celular.

INTRODUÇÃO

Sementes recalcitrantes (sensíveis à dessecação) apresentam maiores dificuldades para seu armazenamento do que sementes ortodoxas (tolerantes à dessecação), principalmente pelo seu intenso metabolismo devido ao seu elevado teor de água (Barbedo, 2018). Dessa forma, processos tradicionais de conservação das sementes, como secagem, congelamento ou ambos, não podem ser aplicados às recalcitrantes e, até o presente momento, não há tecnologia suficientemente eficiente para reduzir esse metabolismo, viabilizando o armazenamento. Consequentemente, espécies com sementes recalcitrantes são mais vulneráveis a serem perdidas quando entram em risco de extinção por não poderem ser incluídas em bancos de germoplasma, nos quais ocorre a conservação por longo tempo, mantendo-se a viabilidade (Wyse *et al.*, 2018; Xu *et al.*, 2020).

O entendimento sobre a fisiologia respiratória de sementes apresenta grande potencial para responder dúvidas acerca do seu metabolismo e do seu vigor (Bradford *et al.*, 2013). As taxas respiratórias são mais elevadas, por exemplo, em sementes com teor de água mais elevado (Garwood e Lighton, 1990), indicando metabolismo mais intenso. Particularmente para as recalcitrantes, que caracteristicamente tem teor de água bastante elevado, a análise das taxas respiratórias pode permitir melhor compreensão sobre seu intenso metabolismo, permitindo o desenvolvimento de tecnologia que permita armazenar essas sementes por longos períodos por redução do metabolismo (Bonjovani & Barbedo 2019). Este é um dos maiores desafios atuais da pesquisa com sementes recalcitrantes (Barbedo, 2018).

A avaliação da redução nas taxas respiratórias de sementes pode ser realizada por meio da incubação destas no interior de respirômetros e posterior acompanhamento da modificação nas concentrações de oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂) do ar, devido ao processo respiratório (Jiang *et al.*, 2018; Huang & Taylor, 2019; Bonjovani & Barbedo, 2020; Lamarca & Barbedo, 2021; Valle *et al.*, 2021; Widajati *et al.*, 2023). O controle das taxas

respiratórias poderia ser controlado, por exemplo, com modificação da atmosfera, método que tem sido amplamente utilizado em frutas e hortaliças (Almenar *et al.*, 2006; Calbo *et al.*, 2007; Cunha Junior *et al.*, 2012).

A geração de atmosferas modificadas para aplicação em sementes foi relatada por Manoel *et al.* (2024), que desenvolveram um método que permite, em ambiente isolado, alterar as concentrações de oxigênio (O₂) e dióxido de carbono (CO₂). Dessa forma, pode-se verificar as alterações nas taxas respiratórias dessas sementes, quando incubadas em atmosfera modificada, analisando-se o consumo de O₂ e a liberação de CO₂ pelas sementes. Essa análise pode ser um importante indicativo do metabolismo durante a incubação e germinação das sementes.

Sementes incubadas em frascos denominados respirômetros podem ser adequadas à avaliação do consumo de carboidratos endógenos, provenientes do metabolismo nas diferentes condições de disponibilidade de O₂ e CO₂. Neste caso, a coleta das sementes poderia ser realizada quando estas estivessem expostas a diferentes concentrações de gases. Portanto, a quantificação destes indicaria o uso de carboidratos endógenos durante o processo germinativo como fonte energética a partir da oxidação de açúcares simples, como a glicose, no processo de respiração celular, gerando ATP (Bender & Mayes, 2007). Tais carboidratos são os principais substratos oxidados na respiração, podendo ser empregados como ferramentas para análises biológicas acerca de diversos processos fisiológicos, especialmente metabólicos, sendo indicativos diretos ou indiretos de atividades celulares. A análise da concentração de carboidratos solúveis, como polióis, glicose, frutose, sacarose e rafinose em *Paubrasilia echinata* (Lam.) Gagnon, H.C.Lima e G.P.Lewis (pau-brasil) revelou que o armazenamento em diferentes temperaturas (25°C e -18°C), durante períodos de 15 e 90 dias, alterou a concentração de tais carboidratos, com exceção à sacarose, reduzindo os níveis de hexoses, exceto nos cotilédones de sementes armazenadas sob temperaturas baixas,

demonstrando a influência da temperatura no processo de conversão do amido em açúcares simples, como glicose e frutose (Hellmann *et al.*, 2008).

A redução da temperatura do ambiente de armazenamento é frequentemente utilizada como ferramenta para redução do metabolismo de sementes (Emer *et al.*, 2019; Nadarajan *et al.*, 2023), tendo fornecido bons resultados para o armazenamento de sementes recalcitrantes (Von Bülow *et al.*, 1994; Bonjovani & Barbedo, 2020). Em sementes recalcitrantes de *Eugenia brasiliensis* (Lam.) foi demonstrado que a incubação sob atmosferas modificadas, com aumento percentual de CO₂, também pode prolongar a viabilidade dessas sementes, já que tal condição reduz a atividade respiratória, segundo Cécel & Barbedo (2021). Nessa pesquisa, os autores verificaram redução das taxas respiratórias nos tratamentos com percentuais elevados de CO₂, desde 1,9% até 3,7%. Esses tratamentos poderiam ser aplicados às sementes de *E. uniflora*, para as quais o armazenamento prolongado ainda é um desafio, pois perdem rapidamente a viabilidade (Comin *et al.*, 2014; Wagner Junior *et al.*, 2020).

A intensidade do metabolismo de sementes recalcitrantes é indicada pela taxa de consumo de suas reservas energéticas, ou seja, hipotetiza-se que a concentração de carboidratos seja consumida quando o metabolismo respiratório for mais intenso a partir do início do processo de germinação, sendo que o consumo de reservas energéticas sob baixas temperaturas tende a ser menor. Entretanto, não se sabe se o possível efeito da redução do metabolismo seja devido ao aumento do CO₂ ou à redução do O₂, sendo necessário utilizar um sistema no qual seja possível controlar a concentração desses gases durante o processo germinativo. Portanto, a manutenção do sistema de atmosferas modificadas controladas sob diferentes temperaturas, permitiria essa análise visando agrupar a influência dos gases e a produção de carboidratos em condições distintas de armazenamento.

Considerando que as atmosferas modificadas apresentam grande potencial para o controle do metabolismo respiratório de sementes recalcitrantes e, conseqüentemente, para a

ampliação de seu tempo de conservação durante o armazenamento, no presente trabalho objetivou-se analisar as taxas respiratórias e a concentração de carboidratos de sementes recalcitrantes de *E. uniflora* quando submetidas à incubação em sistema de atmosfera controlada, variando-se a concentração de O₂ e de CO₂, e a temperatura do ambiente de armazenamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de material biológico - As sementes de *E. uniflora* L. (pitanga) foram obtidas no Jardim Botânico de São Paulo (23°38'25.6"S 46°37'32.9"W), São Paulo, SP. Na coleta, os frutos foram colhidos manualmente quando maduros, conforme descrições de Delgado e Barbedo (2020). Os frutos foram então conduzidos ao Laboratório de Sementes do IPA - Unidade Jardim Botânico, onde tiveram suas sementes extraídas e lavadas. As sementes tiveram o excesso de água das lavagens removido com papel filtro, e então foram armazenadas em sacos plásticos de polipropileno, onde foram feitos furos, com uma agulha, para que as sementes pudessem respirar, e assim permaneceram por alguns dias, a 7°C, até a montagem dos experimentos (Figura 1- fotos da prancha).

Geração de atmosfera modificada - As atmosferas modificadas foram analisadas pelo método estabelecido por Manoel *et al.*, (2023), no sistema de vácuo compensado, sendo geradas diretamente no interior de frascos de vidro, denominados respirômetros (Bonjovani & Barbedo, 2020). Estes frascos têm volume de 600 mL, são fechados hermeticamente com tampa de metal na qual são feitos três furos, que são fechados por septo de borracha, além de terem sua tampa vedada por plástico tipo Parafil. Por esses septos é introduzida agulha para inserção ou coleta da amostra de ar (Manoel *et al.*, 2023).

Obtenção de gases - O CO₂ foi obtido a partir da reação entre o bicarbonato de sódio (NaHCO₃) e o ácido acético (CH₃COOH), como descrito em Manoel *et al.* (2023). O

nitrogênio foi obtido através da evaporação do nitrogênio líquido, obtido de um condensador, que liquefaz o nitrogênio da atmosfera e o filtra até valores de aproximadamente 99,99% de pureza, para garantir que substâncias contaminantes, como O₂ e água, não interfiram nos processos nos quais o nitrogênio é utilizado.

Incubação das sementes - Sementes de *E. uniflora* foram incubadas em três misturas de gases e sob duas temperaturas diferentes. Para as misturas de gases, a primeira foi considerada controle, ou seja, com concentrações de O₂ e CO₂ iguais às da atmosfera (20,9% e 0,03%, respectivamente). A segunda mistura de gases visou isolar a ação do O₂, reduzindo sua concentração, sem adicionar CO₂ (18% de O₂ e 0% de CO₂), tendo a injeção de nitrogênio como gás inerte para completar o volume do frasco. A última mistura de gases também manteve o nível do O₂ a 18%, porém foi injetado CO₂ nesse tratamento, visando a concentração de 3%.

Baseando-se em estudos prévios de avaliação da respiração dessas sementes (Delgado & Barbedo, 2007; Cécel & Barbedo, 2021), estas foram incubadas sob a temperatura de 5°C por 10 dias e sob 25°C por 2 dias. Assim, os tratamentos consistiram em: 1) 20,9% de O₂, 0,03% de CO₂, sob 5°C e incubação por 10 dias; 2) 20,9% de O₂, 0,03% de CO₂, sob 25°C e incubação por 2 dias; 3) 18% de O₂, 0% de CO₂, sob 5°C e incubação por 10 dias; 4) 18% de O₂, 0% de CO₂, sob 25°C e incubação por 2 dias; 5) 18% de O₂, 3% de CO₂, sob 5°C e incubação por 10 dias; 6) 18% de O₂, 3% de CO₂, sob 25°C e incubação por 2 dias.

Os tratamentos 1 e 2 consistiram na composição natural do ar atmosférico. Nos tratamentos 3 e 4 buscou-se a redução da concentração de O₂, sem alterar a pressão geral dos frascos ou aumentar a concentração de CO₂. E os tratamentos 5 e 6 visaram a redução da concentração de O₂, sem alterar a pressão geral dos frascos, porém aumentando a concentração de CO₂. Para as incubações, foram utilizados quatro frascos em cada tratamento com 20 sementes em cada frasco (Cécel & Barbedo, 2021).

Todos os respirômetros foram encaminhados para incubação em BOD sem luz, nas respectivas temperaturas. Passados os períodos definidos, foram avaliados com o uso do respirômetro o consumo de O_2 e a produção de CO_2 pelas sementes em cada respirômetro, como descrito anteriormente. Ao final da incubação, as sementes foram retiradas dos respirômetros e avaliadas quanto à sua viabilidade, através do teste de germinação, como descrito por Delgado & Barbedo (2007) fazendo uso de 10 sementes por repetição.

Quantificação de açúcares totais - Amostras de sementes de cada um dos tratamentos foram congeladas em tubos Falcon logo após a incubação e posteriormente liofilizadas. Foi separada aleatoriamente uma semente de cada uma das quatro repetições de cada tratamento, além de uma quinta, também sorteada aleatoriamente, entre os tratamentos. As sementes liofilizadas tiveram seu tegumento removido, então foram maceradas, tiveram a massa determinada, armazenadas individualmente em tubos tipo Eppendorf de 2ml identificados. Depois disso, em cada tubo foi colocado 1,5 ml de etanol 80% e o conteúdo foi homogeneizado. As amostras foram então levadas ao banho-maria, sob 60°C, por 15 minutos, para inativação de enzimas (Pollock & Jones, 1979). Os precipitados foram re-extraídos, por mais quatro vezes e os sobrenadantes juntados em tubos do tipo Falcon, onde foram concentrados em evaporador rotatório sob 40° C, até cerca de 1 mL, sendo considerados os extratos brutos. As amostras foram secas, e posteriormente ressuspensas em 1ml de água quente, filtradas e acrescidas de 100 µl de clorofórmio, depois homogeneizadas e centrifugadas a 10.000 rpm, durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram realocadas em novos tubos, tendo a preocupação de extrair com a pipeta apenas a água, onde os açúcares estavam dissolvidos. Mais uma vez, 100 µl de clorofórmio foram adicionados, sendo as amostras homogeneizadas e centrifugadas, a 10.000 rpm, por 2 minutos. Os conteúdos de água com açúcares foram realocados em novos tubos. As amostras foram dissolvidas na proporção de 10 µl de solução para 490 µl de água ultrapura (Milli-Q®) e analisadas quanto

aos conteúdos de açúcares em HPLC de íons, tendo glucose, frutose e sacarose como padrões, nas dissoluções de 50 µg por litro (Itaya *et al.*, 1997).

Quantificação de amido - A extração e quantificação de amido seguiram o método descrito por Amaral *et al.* (2007). Ao precipitado resultante da extração de açúcares totais foram adicionados 0,5 ml (120 U/ml) de α -amilase (Megazyme, Irlanda) diluída em tampão MOPS 10 mM, pH 6,5. As amostras foram incubadas sob 75° C por 30 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas até 50° C e nelas foram adicionadas 0,5 ml de uma solução contendo 30 U/ml de amiloglucosidase (Megazyme, Irlanda) em tampão de acetato de sódio 100 mM, pH 4,5. As amostras foram incubadas sob 50° C por 30 minutos. Após as incubações supracitadas, os processos foram repetidos mais duas vezes. Os extratos foram centrifugados a 10.000 rpm por 2 minutos para retirada de alíquotas de 40 µl, às quais foram adicionados 600 µl do reagente Glucose PAP Liquiform (CenterLab, Brasil), contendo as enzimas glucose-oxidase (~11.000 U/ml) e peroxidase (~700 U/ml), 290 µmol/l de 4-aminoantipirina e 50 mM de fenol, pH 7,5. Após incubação de 15 minutos sob 37° C, o teor de glucose foi determinado em leitor de microplacas de ELISA a 490 nm, tendo curva padrão como métrica.

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado e os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelo teste F, a 5%. Quando significativo, as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, também a 5% (Santana e Ranal, 2004).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes de *Eugenia uniflora*, incubadas por 10 dias sob 5°C e por 2 dias sob 25°C, semelhante ao observado por Cécel & Barbedo (2021), mantiveram-se viáveis durante todo o período de incubação nas diferentes concentrações de O₂ e CO₂ testadas (tabela 1)

indicando que possuíam metabolismo ativo. Essa massa de sementes respirantes apresentou maior atividade na temperatura maior (25°C), demonstrada tanto pelos valores mais elevados de consumo de O₂ e liberação de CO₂ (tabela 2), quanto pelo maior consumo de carboidratos (tabela 3). Nessa mesma temperatura, quando foi fornecido 20,9% de O₂ e 0,03% CO₂, as sementes acumularam cerca da metade (289,75ug.gMS⁻¹) do valor de carboidratos, em comparação aos tratamentos cujo percentual de oxigênio foi suprimido ou reduzido, respectivamente, 574,65ug.gMS⁻¹ e 589,75ug.gMS⁻¹ (tabela 3). Já a 5°C, não houve diferença significativa entre esses mesmos tratamentos, para valores de açúcares solúveis, indicando que baixas temperaturas reduzem a atividade metabólica. De modo interessante, nessa temperatura, os níveis de sacarose foram maiores nas sementes mantidas somente com O₂, indicando que o metabolismo desse carboidrato foi reduzido nessa condição, como também observado em outros trabalhos (Zhu *et al.*, 1997; Echeverria, 1998; Terauchi *et al.*, 2000), que demonstram o papel das baixas temperaturas no acúmulo de sacarose. A maior atividade respiratória na temperatura mais elevada já era esperada, como já verificado em sementes de outras espécies (Garwood & Lighton, 1990; Lamarca & Barbedo, 2012; Valle *et al.*, 2021) e, também, do mesmo gênero da espécie estudada (Lamarca *et al.*, 2020; Cécel & Barbedo, 2021). Tal observação pode ser explicada, segundo Ruelland e Zachowski (2010), pois baixas temperaturas reduzem a ação das enzimas glicose-6-fosfato desidrogenase e malato desidrogenase, como demonstrado por Marini *et al.* (2012) que avaliaram a ação da temperatura sobre atividade das enzimas malato desidrogenase e glicose-6-fosfato. Esses autores verificaram que sob temperaturas mais baixas (15°C) ocorreu significativa redução da atividade dessas enzimas em comparação às sementes mantidas a 35°C, indicando menor atividade na respiração celular. Esses resultados foram utilizados para caracterizar o processo de deterioração de sementes de arroz sob diferentes temperaturas de armazenamento. A função dessas enzimas está relacionada como segue: a glicose-6-fosfato desidrogenase opera

na rota alternativa das pentoses monofosfatadas, responsável pela manutenção do nível de NADPH nas células (Lin *et al.* 2005); e a enzima malato desidrogenase catalisa a conversão de malato a oxaloacetato, no ciclo do ácido tricarboxílico, além de participar da movimentação de malato através da membrana mitocondrial (Tunes *et al.*, 2011).

No presente trabalho, entretanto, mesmo sob temperatura mais baixa, verificou-se atividade respiratória, o que demonstra que, apesar de reduzir significativamente a atividade metabólica de sementes, as baixas temperaturas não são suficientes para cessar por completo o metabolismo das mesmas e possibilitar armazenamentos a longo prazo. Valores similares foram obtidos por Lamarca *et al.* (2020), em seu trabalho sobre taxas respiratórias de *Eugenia pyriformis* (Cambess.), com sementes incubadas a 10°C. Na atmosfera normal (20,9% O₂ e 0,0% de CO₂) e em temperatura próxima à condição em que as sementes são dispersas (25°C), o consumo de O₂ foi praticamente duas vezes maior que a liberação de CO₂, resultando em quociente respiratório de 0,49 (tabela 2), o que sugere a presença de outros processos oxidativos além da respiração. Essa diferença no consumo de O₂ e na liberação de CO₂ também foi observada para outras sementes recalcitrantes, mas não em ortodoxas hidratadas até os níveis das recalcitrantes (Bonjovani & Barbedo, 2019).

Os menores valores de carboidratos totais nas sementes incubadas na temperatura mais elevada (25°C), sob atmosfera normal (20,9% de oxigênio e 0,03% de dióxido de carbono), na tabela 3, sugerem maior consumo dos mesmos para a respiração, sendo sua concentração, em média, 50% menor que a concentração dos valores de carboidratos totais de sementes incubadas a 5°C, sob a mesma atmosfera. Contudo, entre todos os tratamentos não houve diferenças nos valores de amido (tabela 3). Quando não estão sendo mobilizados para a geração de energia, os carboidratos podem ser agrupados em macromoléculas, como polissacarídeos, e armazenados como reservas energéticas, tal qual o amido em plantas (Dernardin & Silva, 2009). Neste trabalho, foi avaliada a condição inicial de armazenamento

que incluiu o consumo de carboidratos solúveis. É possível supor, portanto, que o tempo de incubação não tenha sido suficiente para esgotar os açúcares solúveis utilizados na respiração, não sendo necessário recorrer às reservas de amido. A seleção dos períodos avaliados neste trabalho foi baseada no fato de que períodos maiores de incubação poderiam iniciar tanto a germinação quanto processos de deterioração, afetando os objetivos do presente trabalho. Além disso, a própria respiração das sementes, mantidas em períodos superiores, poderia elevar a concentração de CO₂ na atmosfera a níveis tóxicos para essas sementes, como demonstrado por Cécel & Barbedo (2021).

Os resultados de consumo de O₂, de liberação de CO₂ e de açúcares totais auxiliaram na compreensão dos efeitos benéficos do armazenamento de sementes recalcitrantes sob baixas temperaturas, pois o acúmulo de açúcares totais a 5°C pode ter ocorrido porque a taxa metabólica foi menor, de modo semelhante ao observado por Bonjovani & Barbedo (2019), Gasparin *et al.* (2020), e Elias *et al.* (2023), para consumo de oxigênio e liberação de dióxido de carbono inclusive de outras espécies de *Eugenia* (Andrade & Ferreira, 2000; Kohama *et al.*, 2006). Contudo, no presente trabalho, o acúmulo de carboidratos que não foram consumidos em sementes de *E. uniflora* pode indicar diminuição do metabolismo, contribuindo para um melhor entendimento da influência das atmosferas modificadas no processo do consumo desse tipo de reservas.

Em relação à atmosfera modificada, ficou evidente que a redução da concentração de O₂ e elevação da de CO₂ ocasionou redução das taxas respiratórias das sementes de *E. uniflora* na temperatura mais elevada (tabela 2). Cécel & Barbedo (2021) observaram redução nas taxas respiratórias quando as sementes de *E. brasiliensis* foram submetidas à atmosfera com redução da concentração de O₂ (de 20,9% para até 11,8%) e aumento da de CO₂ (de 0,03% para até 3,7%), porém sem identificar se os principais efeitos foram devidos ao aumento de um gás ou à redução do outro. No entanto, no presente trabalho verificou-se

que a redução da concentração de O_2 , isoladamente, não teve o mesmo efeito que quando acompanhada de aumento na concentração de CO_2 .

Segundo Fonseca *et al.* (2002), a redução nas taxas respiratórias devido à redução na concentração de O_2 deve-se provavelmente à redução da atividade metabólica como um todo, incluindo não apenas a respiração, mas também a redução da atividade de oxidases como polifenoloxidase, oxidase do ácido ascórbico e oxidase do ácido glicólico. A redução da respiração em função da elevação da concentração do CO_2 não é tão clara. Há algumas hipóteses sobre a alteração nas taxas respiratórias quando em elevada concentração de CO_2 , como a simples reação de inibição à alta concentração, uma vez que o CO_2 é produto da própria respiração (Wolfe, 1980), algum efeito na atividade mitocondrial (Fonseca *et al.* 2002) ou em enzimas do ciclo do ácido tricarboxílico (Kader, 1989), entre outros. Os dados do presente trabalho demonstraram que à 25°C, a elevação da concentração do CO_2 reduziu as taxas respiratórias das sementes recalcitrantes de *E. uniflora*, visto tanto pela redução do consumo de O_2 e emissão de CO_2 (tabela 2), quanto pelo menor consumo de carboidratos solúveis (tabela 3). As sementes incubadas nesta atmosfera (25°C) modificada não apenas puderam manter suas reservas de amido, como também não consumiram os açúcares livres tão intensamente quanto as dos demais tratamentos (na mesma temperatura), que são de uso mais imediato para a manutenção das funções fisiológicas do embrião (Carvalho & Nakagawa, 2012). No entanto, sob temperaturas baixas, não foi observado o mesmo resultado, pois a presença de O_2 e a ausência de CO_2 culminaram no maior acúmulo de carboidratos totais.

Deve-se salientar que a redução do O_2 , não pelo aumento de CO_2 , mas pelo aumento do N_2 , não promoveu a mesma redução nas taxas respiratórias, sugerindo que o controle da respiração das sementes foi devido ao aumento do CO_2 . Portanto, é possível associar a temperatura à respiração celular de sementes com o consumo de suas reservas energéticas, o

que, conseqüentemente, poderia permitir armazenamento por maiores períodos que os obtidos até então. No presente trabalho foi observado que a quantidade de CO₂ liberado não é equivalente à quantidade de O₂ consumida (Tabela 2), indicando que parte do oxigênio foi consumido por processos oxidativos. Tal resultado não diferiu entre as duas diferentes temperaturas analisadas (5°C e 25°C), indicando atividade oxidativa, exceto no tratamento a 25°C cujo percentual de CO₂ foi aumentado, porém ainda indicando atividade oxidativa.

REFERÊNCIAS

- ALMENAR, E., HERNÁNDEZ-MUNHOZ, P., LAGARÓN, J.M., CATALÁ, R.; GAVARA, R. 2006. Controlled atmosphere storage of wild strawberry fruit (*Fragaria vesca* L.). Journal of Agricultural Food Chemistry 54: 86-91.
- AMARAL, L.I.V., GASPAR, M., COSTA, P.M.F., AIDAR, M.P.M.; BUCKERIDGE, M.S. 2007. Novo método enzimático rápido e sensível de extração e dosagem de amido em materiais vegetais. Hoehnea 34(4): 425–431.
- ANDRADE, R.N.B.; FERREIRA, A.G. 2000. Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (*Eugenia pyriformis* Camb.) - Myrtaceae. Revista Brasileira de Sementes 22(2): 118-125.
- BARBEDO, C.J. 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. Journal of Seed Science 40(3): 221-236.
- BENDER, D.A.; MAYES, P.A. 2007. Glicólise e oxidação do piruvato. In Murray, R.K., Granner, D.K.; Rodwell, V.W. (orgs.) Harper: bioquímica ilustrada. 27a ed. McGraw-Hill, São Paulo. pp.170-177.
- BONJOVANI, M.R.; BARBEDO, C.J. 2019. Respiration and deterioration of *Inga vera* Willd. ssp. *affinis* embryos stored at different temperatures. Journal of Seed Science 41(1): 44-53.

- BONJOVANI, M.R.; BARBEDO, C.J. 2020. Respiração de embriões recalcitrantes de *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Pennington sob diferentes temperaturas, potenciais osmóticos e aplicação de ABA. *Hoehnea* 47: e012020.
- BRADFORD, K.J., BELLO, P., FU, J.C.; BARROS, M. 2013. Single-seed respiration: a new method to assess seed quality. *Seed Science and Technology* 41(3): 420-438.
- CALBO, A.G., MORETTI, C.L.; HENZ, G.P. 2007. Respiração de frutas e hortaliças. Comunicado Técnico 46, Brasília, Embrapa. 9p.
- CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. 2012. Sementes: Ciência, tecnologia e produção. FUNEP, Jaboticabal, 590 p.
- CÉCEL, A.T.; BARBEDO, C.J. 2021. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob atmosferas modificadas. *Hoehnea* 48: e052020.
- COMIN, A., PEREIRA, L.D., MACIEL, C.G., CHIES, J.; MUNIZ, M.F.B. 2014. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia uniflora* L. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 9(1): 84-90.
- CUNHA JUNIOR, L.C., JACOMINO, A.P., OGASSAVARA, F.O., TREVISAN, M.J.; PARISI, M.C.M. 2012. Armazenamento refrigerado de morango a altas concentrações de CO₂. *Horticultura Brasileira* 30: 688-694.
- DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 265-272.
- DELGADO, L.F.; BARBEDO, C.J. 2020. Regeneração de raízes e plântulas de sementes de *Eugenia* spp. (Myrtaceae) de diferentes estádios de maturação. *Hoehnea* 47: e042020.
- ELIAS, R.A., GOETEN, D., SILVA, M.M., SANTOS, A.; STEINER, N. 2023. Vigor and viability during seed storage of three *Campomanesia* species endemic to southern Brazil. *Trees* 43: on line <https://doi.org/10.1007/s00468-023-02433-1>.

- EMER, A.A., LUCCHESI, J.R., FIOR, C.S.; SCHAFER, G. 2019. Viabilidade de sementes de *Campomanesia aurea* em diferentes temperaturas de armazenamento. Pesquisa Florestal Brasileira 39: e201701475.
- FONSECA, S.C., OLIVEIRA, F.A.R.; BRECHT, J.K. 2002. Modeling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: a review. Journal of Food Engineering 52: 99-119.
- GARWOOD, N.C.; LIGHTON, J.R.B. 1990. Physiological ecology of seed respiration in some tropical species. New Phytologist 115(3): 393-579.
- GASPARIN, E., FARIA, J.M.R., JOSÉ, A.C., TONETTI, O.A.O., MELO, R.A.; HILHORST, H.W.M. 2020. Viability of recalcitrant *Araucaria angustifolia* seeds in storage and in soil seed bank. Journal of Forestry Research 31: 2413-2422.
- 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.
- HUANG, W.; TAYLOR, A.G. 2019. Water uptake, respiration and germination of eastern gamagrass (*Tripsacum dactyloides*) seeds as influenced by mechanical seed treatments: unlocking mechanisms of seed dormancy. Seed Science and Technology 47(2): 171-185.
- ITAYA, N.M., BUCKERIDGE, M.S.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L. 1997. Biosynthesis in vitro of high molecular mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). New Phytologist 136: 53-60.
- JIANG, F.L., BO, L.P., XU, J.J.; WU, Z. 2018. Changes in respiration and structure of non-heading Chinese cabbage seeds during gradual artificial aging. Scientia Horticulturae 238: 14-22.
- KADER, A.A. 1989. Mode of action of oxygen and carbon dioxide on postharvest physiology of 'Bartlett' pears. Acta Horticulturae 258: 161-167.

- KOHAMA, S., MALUF, A.M., BILIA, D.A.C.; BARBEDO, C.J. 2006. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). Revista Brasileira de Sementes 28(1): 72-78.
- LAMARCA, E.V.; BARBEDO, C.J. 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. Hoehnea 39(4): 577-586.
- LAMARCA, E.V.; BARBEDO, C. 2021. Respiratory rates and freezing tolerance of embryos of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D. Penn. from different regions. Journal of Seed Science 43: e202143017.
- LAMARCA, E.V., PARISI, J.J.D.; BARBEDO, C.J. 2020. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia pyriformis* Cambess. dispersas em diferentes estádios de maturação. Hoehnea 47: e1012019.
- LIN, S.Z., ZHANG, Z.Y., LIU, W.F., LIN, Y.Z., ZHANG, Q., ZHU, B.Q. 2005. Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase in freezing-induced freezing resistance of *Populus suaveolens*. Zhi Wu Sheng Li Yu Fen Zi Sheng Wu Xue Xue Bao, 31(1): 34-40.
- MANOEL, G.F., TINÉ, M.A., GUARDIA, M.C., NIEVOLA, C.C., BARBEDO, C.J. 2023. Atmosphere modification system for respiration analysis of recalcitrant seeds during storage. Journal of Seed Science, submetido para publicação.
- MARINI, P., MORAES, C. L., MARINI, N., MORAES, D. M., AMARANTE, L. 2012. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de arroz submetidas ao estresse térmico. Revista Ciência Agrônômica, 43(4), 722–730.
- NADARAJAN, J., WALTERS, C., PRITCHARD, H.W., BALLESTEROS, D.; COLVILLE, L. 2023. Seed longevity - the evolution of knowledge and a conceptual framework. Plants 12: 471.
- POLLOCK, C.J.; JONES, T. 1979. Seasonal Patterns of Fructan Metabolism in Forage Grasses. New Phytologist 83: 9-15.

- RUELLAND, E.; ZACHOWSKI, A. 2010. How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany*, v.69, n.3, p.225-232.
- SANTANA, D.G.; RANAL, M. 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Brasília, Universidade de Brasília.
- TERAUCHI, T., MAKOTO, M., MAKOTO, K., HIROSHI, N. 2000. Activity of sucrose phosphate synthase in relation to sucrose concentration in sugarcane internodes. *Japan Journal Tropical Agriculture*, Tokyo, v.44, n.3, p.141-151.
- TUNES, L. M., BADINELLI, P. G., BARROS, A. C. S. A., MENEGHELLO, G. E., AMARANTE, L. 2011. Influência dos diferentes períodos de colheita na expressão de isoenzimas em sementes de cevada. *Revista Ceres*, 58(2), 178–184.
- VALLE, F.J.M., GASTÓN, A., ABALONE, R.M., TORRE, D.A., CASTELLARI, C.C.; BARTOSIK, R.E. 2021. Study and modelling the respiration of corn seeds (*Zea mays* L.) during hermetic storage. *Biosystems Engineering* 208: 45-47.
- VON BÜLOW, J.F.W., CARMONA, R.; PARENTE, T.V. 1994. Armazenamento de tratamento de sementes de pitanga-vermelha-do-cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 29(6): 961-970.
- WAGNER JUNIOR, A., MACIEL, E.C.J., RADAELLI, J.C.; GUOLLO, K. 2020. Conservação de sementes nos frutos de pitangueira: estágio de maturação, embalagem alternativa e períodos de armazenamento. *Acta Iguazu* 9(3): 1-8.
- WIDAJATI, E., PUTRO, T.Y., DEWI, E.M., AINI, M.A.; KAHARDHIKA, A. 2023. Analysis of seed viability through respiration metabolism using CO₂ sensors and internet of things (IoT) system. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* 1133: 012074.
- WOLFE, S.K. 1980. Use of CO- and CO₂ enriched atmospheres for meats, fish and produce. *Food Technology* 34(3): 55-63.

WYSE, S.V., DICKIE, J.B.; WILLIS, K.J. 2018. Seed banking is not an option for many threatened plants. *Nature Plants* 4: 848-850.

XU, S., XU, S., ZHOU, Y., GU, R., ZHANG, X.; YUE, S. 2020. Long-term seed storage for desiccation sensitive seeds in the marine foundation species *Zostera marina* L. (eelgrass). *Global Ecology and Conservation* 24: e01401.

Tabela 1. Germinação de sementes de *Eugenia uniflora* ao final dos tratamentos de incubação em duas temperaturas (5 °C e 25 °C, respectivamente por 10 e 2 dias) e três atmosferas (20,9% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 3% de CO₂). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Tukey a 5%.

Temperatura	Concentração de O ₂ (%)	Concentração de CO ₂ (%)	Germinação (%)
5 °C	20,9	0,0	82 a
5 °C	18,0	0,0	77 a
5 °C	18,0	3,0	84 a
25 °C	20,9	0,0	88 a
25 °C	18,0	0,0	90 a
25 °C	18,0	3,0	95 a

Tabela 2. Consumo de O₂ e liberação de CO₂ de sementes de *Eugenia uniflora* incubadas em duas temperaturas (5 °C e 25 °C, respectivamente por 10 e 2 dias) e três atmosferas (20,9% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 3% de CO₂) e Quociente Respiratório (QR). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Tukey a 5%.

Temperatura	Concentração (%) de		Consumo de O ₂ ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	Liberação de CO ₂ ($\mu\text{mol.gMS}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	QR
	O ₂	CO ₂			
5 °C	20,9	0,0	0,56 c	0,29 c	0,56
5 °C	18,0	0,0	*	*	*
5 °C	18,0	3,0	0,29 c	0,14 c	0,56
25 °C	20,9	0,0	9,72 a	4,73 a	0,49
25 °C	18,0	0,0	8,60 a	5,18 a	0,60
25 °C	18,0	3,0	5,39 b	1,16 b	0,20

* amostras perdidas

Tabela 3. Quantificação dos açúcares livres, açúcares totais (Soma entre glucose, frutose e sacarose) e amido em sementes de *Eugenia uniflora* incubadas em duas temperaturas (5 °C e 25 °C, respectivamente por 10 e 2 dias) e três atmosferas (20,9% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 0,0% de CO₂, 18% de O₂ e 3% de CO₂). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, nas colunas, pelo teste de Tukey a 5%.

Temperatura	Concentração (%)		CHO Totais ($\mu\text{g.gMS}^{-1}$)	Açúcares Solúveis ($\mu\text{g.gMS}^{-1}$)			Amido (%)
	O ₂	CO ₂		Glu	Fru	Sac	
5 °C	20,9	0,0	550,08 a	175,75 a	224,3 ab	150,02 b	12,63 a
5 °C	18	0,0	393,87 ab	136,08 ab	145,53 b	112,26 c	13,78 a
5 °C	18	3,0	463,21 ab	173,66 a	168,44 b	121,11 c	16,83 a
25 °C	20,9	0,0	283,35 b	81,84 c	103,07 c	98,44 c	15,51 a
25 °C	18	0,0	574,65 a	168,51 a	206,88 b	199,26 a	10,34 a
25 °C	18	3,0	589,75 a	162,48 a	261,23 a	165,99 b	15,60 a

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O método do tipo “vácuo compensado” demonstrou ser eficiente na geração de atmosferas modificadas para o controle da atividade respiratória de sementes recalcitrantes, isolando a atuação dos gases envolvidos, além de responder à questão levantada por Cécel e Barbedo (2021), atribuindo a redução da respiração aos elevados níveis de dióxido de carbono na atmosfera sob a qual as sementes foram incubadas. Os resultados evidenciaram que a redução do oxigênio, sem adição de dióxido de carbono às atmosferas modificadas, pode promover efeitos indesejados na conservação de sementes recalcitrantes, como o aumento da atividade oxidativa, que já se sabe ser deletéria.

A técnica para a geração de atmosfera modificada demonstrou ser uma ferramenta de ampla aplicação para a redução do metabolismo respiratório de sementes recalcitrantes e quaisquer outros materiais biológicos que apresentam a taxa de deterioração condicionada por sua respiração. A padronização de tal técnica favorece a sua replicação e eventuais apontamentos para melhorias. Além disso, o método desenvolvido neste trabalho pode contribuir para o entendimento da fisiologia das sementes recalcitrantes, somando-se a vários outros trabalhos que vêm investigando a ecologia, anatomia e fisiologia dessas há várias décadas.

A relação entre a respiração e quantificação de carboidratos aponta que o dióxido de carbono em níveis suficientes é capaz de reduzir a respiração de sementes recalcitrantes, como constatado pela redução do consumo de oxigênio e liberação do dióxido de carbono. O menor consumo de reservas de carboidratos no tratamento com maior percentual de dióxido de carbono foi atribuído, a princípio, ao fechamento dos estômatos descritos em sementes de pitanga, reduzindo a disponibilidade de oxigênio para a respiração.

A associação entre atividade respiratória e consumo de reservas energéticas de sementes recalcitrantes mostrou-se uma ferramenta adequada para avaliação da mobilização de suas reservas de carboidratos, quando incubadas sob misturas com diferentes proporções de gases para geração de atmosferas modificadas, exemplificando a ação do ambiente sobre as funções fisiológicas, como a atividade respiratória.

A atividade oxidativa ainda demonstra ser uma barreira prevalente na conservação de sementes recalcitrantes. Os tratamentos cujo percentual de oxigênio foi reduzido sem a adição de dióxido de carbono foram os tratamentos nos quais a taxa oxidativa foi maior. Entende-se, a partir de consultas à literatura (Barbosa *et al.*, 2010) e da análise dos dados de quociente respiratório, que menores níveis de oxigênio favorecem espécies reativas de oxigênio (EROs ou ROS). Portanto, estudos com incubação de sementes recalcitrantes sob

atmosferas modificadas cujo percentual de oxigênio seja igual ou superior aos valores encontrados na atmosfera terrestre, somado ao aumento de dióxido de carbono, podem colaborar ainda mais para a conservação de sementes, através da redução da atividade respiratória e oxidativa, e pode ser uma contribuição à conservação de sementes recalcitrantes.

4.1. REFERÊNCIAS DAS CONSIDERAÇÕES FINAIS

BARBOSA, K.B.F., COSTA, N.M.B., ALFENAS, R.C.G., DE PAULA, S.O., MINIM, V.P.R., BRESSAN, J. 2010. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista De Nutrição*, v.23(4), p.629–643.

CÉCEL, A.T., BARBEDO, C.J. 2021. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob atmosferas modificadas. *Hoehnea* 48: e052020.