

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS  
GENÉTICOS VEGETAIS**

Cristhyane Garcia

**ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS EM  
SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze  
SOB CONDIÇÕES CONTROLADAS DE ARMAZENAMENTO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências, área de concentração Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cileide Maria Medeiros Coelho Arruda de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Maraschin

Florianópolis  
2012

Catálogo na fonte elaborada pela biblioteca  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

G216a Garcia, Cristhyane

Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze sob condições controladas de armazenamento [dissertação] / Cristhyane Garcia ; orientador, Cileide Maria Medeiros Coelho Arruda de Souza. - Florianópolis, SC, 2012.

117 p.: il., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos genéticos vegetais. 2. Lipídios - Peroxidação. 3. Catalase. 4. Superóxido desmutase. 5. Espectroscopia de infravermelho. I. Silva, Aparecido Lima da. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

CDU 631

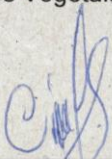
**Alterações fisiológicas e bioquímicas em  
sementes de *Araucaria angustifolia*  
(Bertoloni) Otto Kuntze sob condições  
controladas de armazenamento**

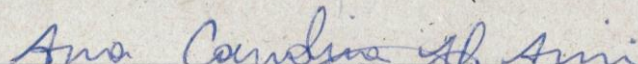
por

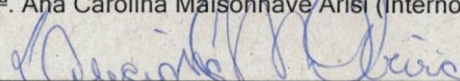
**Cristhyane Garcia**

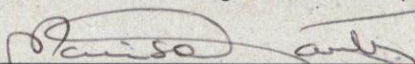
Dissertação julgada e aprovada em 13/02/2012, em sua forma final, pelo Orientador e Membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

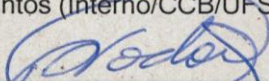
Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Cileide Maria Medeiros Coelho (Presidente /Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Carolina Maisonnave Arisi (Interno/CCA/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Luciana Magda de Oliveira (Externo/CAV/UDESC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marisa Santos (Interno/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, fevereiro de 2012



## AGRADECIMENTOS

A Deus, fortaleza e fonte de toda a sabedoria.

Aos meus pais Sebastião e Sandra, pelo amor incondicional, pelo apoio nas minhas vitórias e nas minhas incertezas.

Ao Rafael pelo amor, pela parceria, pelo incentivo e por se alegrar com minhas conquistas.

À professora Dr<sup>a</sup>. Cileide M. M. Coelho, não só pela orientação, ensinamentos e conselhos, mas por ser uma inspiração, por acreditar no meu trabalho, pelo carinho e amizade dedicados.

Ao professor Dr. Marcelo Maraschin, pela paciência e por tudo que me ensinou profissional e pessoalmente.

Às professoras Dr<sup>a</sup>. Marisa Santos, Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Maisonnave Arisi, Dr<sup>a</sup>. Shirley Kuhnen e Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Viana, pelas importantes contribuições a este trabalho.

Aos professores Dr<sup>a</sup>. Luciana Magda de Oliveira, Dr. Moacir Torres e Dr<sup>a</sup>. Rosete Pescador que colaboraram intelectualmente para que algumas etapas deste trabalho pudessem ser concluídas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, por tamanha dedicação à minha aprendizagem.

Aos colegas dos laboratórios de Sementes, Morfogênese e Bioquímica Vegetal, Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, e Fitopatologia do Departamento de Fitotecnia da UFSC, do laboratório de Ecofisiologia Respiratória do Departamento de Ecologia e Zoologia da UFSC, do laboratório de Produção de Sementes do Departamento de Agronomia da UDESC.

Aos colegas de trabalho Francine Lunardi Farias, Marília Shibata, Camila Martins, Camila Carvalho, Daniele Nerling, Jenny Corredor Prado, Ana Maria Moratelli, Moisés Pollak Júnior, Monique dos Santos, Analice Zaccaron Meurer, Alex Zechini, Hellen Arantes, Flaviane Costa, José Augusto Pavelski e Juliano Gomes pela colaboração, amizade e momentos de descontração, aos queridos laboratoristas Luisa e Luis, a todos os colegas do PPG em Recursos Genéticos Vegetais e à Berna.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, pela oportunidade de aprendizado.

A CAPES, pelo apoio financeiro.

Em especial, agradeço a toda minha família, meu suporte, aqueles responsáveis por quem eu sou, e aqueles por quem eu quero ser cada dia melhor.

A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.

(Albert Einstein)





## RESUMO

As sementes maduras de *A. angustifolia* perdem rapidamente sua qualidade após a colheita. Conhecer os fatores ligados a esse processo é necessário para promover a disponibilidade de sementes com qualidade por período prolongado após a safra anual e facilitar as ações de restauração de áreas e a conservação da espécie. Desta forma, este estudo foi desenvolvido buscando analisar as alterações fisiológicas associadas à perda da viabilidade e do vigor das sementes de *A. angustifolia* e relacioná-las às alterações bioquímicas durante o armazenamento. As sementes foram coletadas no município Paineira (SC) e submetidas às condições de armazenamento em ambiente sem controle térmico, refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C), por 180 dias, sendo avaliadas quanto à viabilidade, vigor, teor dos principais metabólitos de reserva do megagametófito e metabólitos dos embriões, as mudanças no perfil protéico, atividade enzimática e integridade do DNA. A germinação das sementes após a colheita foi de 90% e manteve-se em 64% na condição de refrigerador por 180 dias, mas ocorreu perda total de viabilidade das sementes armazenadas nas demais condições. Apesar da perda total de viabilidade e elevada taxa de condutividade elétrica, as sementes armazenadas em freezer não manifestaram grandes alterações bioquímicas em relação ao teor de proteínas no embrião, teor de carboidratos solúveis e amido no megagametófito, atividade da enzima superóxido dismutase e peroxidação lipídica. Associando-se as alterações fisiológicas e bioquímicas, constatou-se que, em função da elevada viabilidade das sementes, estabilidade no perfil protéico, poucas alterações nos metabólitos presentes no megagametófito e embrião, atividade da SOD e peroxidação lipídica, o armazenamento das sementes de *A. angustifolia* em refrigerador é uma alternativa viável pelo período de 180 dias.

**Palavras-chave:** Vigor, Peroxidação de lipídios, Catalase, Superóxido dismutase, Espectroscopia vibracional de infravermelho.



## ABSTRACT

*A. angustifolia* mature seeds quickly lose their quality after harvest. Knowing the factors associated to this process is necessary to promote the availability of quality seeds for a prolonged period after annual harvest and facilitate actions of restoration areas and species conservation. Therefore, this study was developed to analyze the physiological alterations associated with loss of viability and vigor of seeds and relate to biochemical alterations during storage. The seeds were collected at Paineira county (SC) and subject to storage in ambient without thermal control, refrigerator (5 °C) and freezer (-18 °C) for 180 days, and evaluated as to viability, vigor, content of the main reserve metabolites of megagametophyte and embryos metabolites, changes in protein profile, enzymatic activity and DNA integrity. Seeds germination after harvested was 90% and remained at 64% in refrigerator condition by 180 days, but there was total loss of viability at other storage conditions. Despite the total loss of viability and high rate of electrical conductivity, the seeds stored in the freezer did not show major biochemical changes in relation to protein in the embryo, content of soluble carbohydrates and starch in megagametophyte, superoxide dismutase activity and lipid peroxidation. Associating physiological and biochemical alterations, due to elevated seed viability, stability in the protein profile, few changes in the embryo and megagametophyte metabolites, SOD activity and lipid peroxidation, the storage of *A. angustifolia* seeds at refrigerator is a viable alternative for 180 days.

**Keywords:** Vigor, Lipid peroxidation, Catalase, Superoxide dismutase, Infrared vibrational spectroscopy.



## LISTA DE FIGURAS E TABELA

### ***CAPÍTULO 1***

Figura 1.1 – Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio molecular ( $O_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $H_2O$ ) ..... 35

### ***CAPÍTULO 2***

Figura 2.1 – Grau de umidade de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C)..... 45

Tabela 2.1 – Germinação (%) de sementes de *Araucaria angustifolia* recém-colhidas e durante armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C), antes e após envelhecimento artificial por 5 dias à 40 °C) ..... 497

Figura 2.2 – Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Araucaria angustifolia* recém-colhidas e ao longo do armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C), não envelhecidas (A) e envelhecidas artificialmente (B), ao longo do período de armazenamento..... 50

Figura 2.3 – Taxa média de solutos com base nas leituras da condutividade elétrica de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do armazenamento nas diferentes condições (A); Condutividade elétrica ( $\mu S/cm/g$ ) de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C), após 12 horas de embebição em água ultrapura (B)..... 52

Figura 2.4 – Percentual de sementes viáveis de *Araucaria angustifolia* no teste de tetrazólio ao longo do armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C)..... 54

### ***CAPÍTULO 3***

Figura 3.1 – Teor protéico ( $mg.g^{-1}mf$ ) de embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C)..... 66

Figura 3.2 – Teor de carboidratos solúveis totais ( $\text{mg.g}^{-1}$  mf) do megagametófito de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C)..... 68

Figura 3.3 – Teor de amido ( $\text{mg.g}^{-1}$  mf) do megagametófito de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C) ..... 69

Figura 3.4 – Espectros de FT-IR ( $3000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ ) de amostras de embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C).....712

Figura 3.5 – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR ( $3000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ ) de amostras de embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C)..... 74

#### **CAPÍTULO 4**

Figura 4.1 – Perfil eletroforético de proteínas de reserva em embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento das sementes em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C) ..... 91

Figura 4.2 – Atividade da enzima superóxido dismutase ( $\text{kU SOD.mg prot}^{-1}$ ) em embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento das sementes em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C) ..... 93

Figura 4.3 – Nível de peroxidação lipídica ( $\text{mM.mg prot}^{-1}$ ) (TBARS) em embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento das sementes em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C) ..... 95

Figura 4.4 – Gel de agarose (0,8%) de DNAs genômicos extraídos de embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento das sementes em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C).....97

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA – Ácido Abscísico  
ATR – Reflectância Total Atenuada  
BSA – Albumina de Soro Bovino  
CAT – Catalase  
CIA – Clorofórmio-Álcool Isoamílico  
CTAB – Brometo de Cetiltrimetilamônio  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
DTT – Ditioneitol  
EDTA – Ácido Etilenodiaminotetraacético  
EROs – Espécies Reativas do Oxigênio  
FT-IR – Espectroscopia Vibracional de Infravermelho com Transformada de Fourier  
IUCN – União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais  
IVG – Índice de Velocidade de Germinação  
MDA – Malondialdeído  
PCAs – Análise de Componentes Principais  
PMSF – Fluoreto de Fenilmetilsulfonil  
PVP – Polivinilpirrolidona  
RAS – Regras para Análise de Sementes  
RNA – Ácido Ribonucléico  
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio  
SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio  
SOD – Superóxido Dismutase  
TBA – Ácido Tiobarbitúrico  
TCA – Ácido Tricloroacético





## SUMÁRIO

<b>SUMÁRIO .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>179</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
OBJETIVO GERAL .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>25</b>
1.1 A ESPÉCIE <i>Araucaria angustifolia</i> .....	25
1.2 ASPECTO RECALCITRANTE DAS SEMENTES.....	26
1.3 QUALIDADE FISIOLÓGICA NO ARMAZENAMENTO .....	28
<b>1.3.1 Avaliação do potencial fisiológico das sementes .....</b>	<b>30</b>
1.4 ALTERAÇÕES METABÓLICAS NO ARMAZENAMENTO .....	31
<b>1.4.1 Alterações no metabolismo de reservas.....</b>	<b>32</b>
<b>1.4.2 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes .....</b>	<b>33</b>
<b>1.4.3 Alterações nos sistemas de membranas.....</b>	<b>36</b>
<b>1.4.4 Danos ao dna.....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<i>Alterações fisiológicas em sementes de Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze no armazenamento</i>	
2.1 INTRODUÇÃO .....	41
2.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
2.4 CONCLUSÕES.....	54
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<i>Alterações nos compostos do metabolismo no megagametófito e em embriões de sementes armazenadas de Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze</i>	
3.1 INTRODUÇÃO .....	61

3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	63
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
3.4 CONCLUSÕES .....	77
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

#### ***CAPÍTULO 4***

*Danos bioquímicos às sementes armazenadas de Araucaria angustifolia (Bertol.) Kuntze*

4.1 INTRODUÇÃO .....	85
4.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	87
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	90
4.4 CONCLUSÕES .....	98
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>111</b>

## INTRODUÇÃO

A *Araucaria angustifolia* já foi um dos mais importantes produtos da exportação brasileira, especialmente em função da elevada qualidade da sua madeira. As áreas remanescentes da espécie somam, atualmente, cerca de 2% da área original (GUERRA et al., 2003) distribuídas em ambientes altamente fragmentados, em função da exploração desenfreada da espécie associada à falta de programas de conservação. Por isso, a araucária consta na lista de espécies ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) como criticamente ameaçada (FARJON, 2006) e na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008).

A necessidade de conservação da biodiversidade e de recuperação de ecossistemas florestais que sofreram degradação, especialmente em áreas de preservação permanente e reservas legais é assegurada pela Lei 4.771/65 (BRASIL, 1965). Entretanto, a pouca oferta de sementes e mudas de espécies arbóreas nativas constitui uma dificuldade ao incremento das ações de restauração (HIRANO, 2004). A semente é a principal forma de propagação da araucária (RAMOS; CARNEIRO, 1988), mas a sua rápida perda de viabilidade após a colheita constitui um problema à recomposição de áreas com a espécie. A característica recalcitrante das sementes de araucária (TOMPSETT, 1984; EIRA et al., 1994) e o fato de a espécie apresentar alternância de ciclos de produção, com safras de baixa produtividade (FOWLER et al., 1998), dificultam o estabelecimento de um fluxo uniforme de produção de sementes e de mudas ao longo dos anos. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que permitam armazená-las por um período superior.

Os procedimentos de armazenamento, especialmente as condições de umidade e temperatura (DAVIDE; SILVA, 2008), atuam diretamente sobre a longevidade das sementes e, portanto, devem ser conduzidos visando à redução de sua atividade metabólica. Entretanto, a conservação das sementes recalcitrantes por períodos prolongados pode não ser alcançada com processos similares aos utilizados para as ortodoxas, como através da secagem (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Informações sobre aspectos da fisiologia e bioquímica das sementes de espécies nativas das florestas tropicais são importantes para auxiliar a produção de mudas de alta qualidade para a recuperação das áreas degradadas (BUCKERIDGE et al., 2004), promovendo o restabelecimento da diversidade genética.

Diversas são os mecanismos envolvidos na perda da qualidade das sementes em geral. As alterações citadas com maior frequência na literatura envolvem o esgotamento das reservas alimentares, mudanças na composição química como a quebra parcial das proteínas e a peroxidação dos lipídios, redução da integridade, aumento da permeabilidade e desorganização das membranas celulares, alterações enzimáticas e nos ácidos nucléicos (VILLELA; PERES, 2004). A seqüência de eventos que ocorrem durante a perda da qualidade das sementes de araucária ainda não está elucidada e poucos são os estudos associando as manifestações fisiológicas às alterações ao nível de metabolismo das sementes durante o envelhecimento natural no armazenamento.

A caracterização dos eventos bioquímicos e fisiológicos envolvidos na intolerância das sementes de araucária ao armazenamento pode gerar informações importantes para o desenvolvimento de um método eficiente para o armazenamento das sementes após a colheita, que permita o prolongamento da sua qualidade, aumentando a disponibilidade de sementes, facilitando a produção de mudas e, em consequência, servindo como subsídios essenciais ao uso e à conservação da espécie.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi identificar e monitorar as alterações fisiológicas e bioquímicas envolvidas na deterioração ao longo do processo de envelhecimento natural das sementes de *Araucaria angustifolia* armazenadas sob diferentes condições controladas, visando indicar formas para a melhor conservação da semente.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a viabilidade e vigor das sementes de araucária submetidas ao armazenamento em ambiente sem controle térmico, refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C);

b) Determinar as alterações no teor de carboidratos solúveis totais e amido do megagametófito de sementes de araucária durante o armazenamento, e sua relação com a perda de viabilidade da semente;

c) Analisar o perfil metabólico, através da espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier, associado ao teor de proteína dos embriões nos diferentes tempos e condições de armazenamento das sementes de araucária;

d) Analisar as possíveis alterações no perfil de proteínas, na atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo celular, peroxidação lipídica e na integridade do DNA nos embriões zigóticos de araucária, e relacioná-las à perda da qualidade fisiológica das sementes durante o armazenamento.



## ***CAPÍTULO 1***





## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 A ESPÉCIE *Araucaria angustifolia*

A *Araucaria angustifolia*, também conhecida como araucária, pinho, pinheiro, pinheiro brasileiro, pinheiro do Paraná, pinheiro das missões e pelos nomes indígenas de Curri ou Curi e Curiúva (FERREIRA, 2008), pertence à família Araucariaceae e é a única espécie do gênero nativa do Brasil. Integrando o bioma da Mata Atlântica, a araucária é o principal componente da Floresta Ombrófila Mista, popularmente conhecida como Floresta de Araucária, na qual ocorre com exclusividade e cujo nome evidencia sua importância regional.

A espécie é dióica, raras vezes monóica (REITZ; KLEIN, 1966), originalmente distribuída pelos estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, chegando até o sul de Minas Gerais e Rio de Janeiro, além do leste da Província de Misiones, na Argentina e leste do Paraguai (CARVALHO, 1994).

A araucária apresenta usos diversificados, destacando-se a utilização de sua madeira para construções, serrarias e produção de celulose e papel, além do uso ornamental da árvore, e consumo das suas sementes (pinhões), muito apreciadas pela fauna e na culinária regional (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2003; MATTOS, 2011). Os galhos, refugos e o nó de pinho servem para lenha e combustível de caldeiras (GUERRA et al., 2003). Sua resina é utilizada na fabricação de vernizes, terebentina, acetona, ácido pirolenhoso e outros produtos químicos (CARVALHO, 1994).

Em função do elevado valor econômico, madeireiro, alimentar e resinífero da araucária, suas populações naturais têm enfrentado uma progressiva extinção (EIRA et al., 1994). A madeira serrada e laminada da araucária foi um dos produtos mais importantes na exportação brasileira durante anos (STEINER, 2005). A intensa exploração da espécie ao longo do século passado associada à escassez de programas de conservação ocasionaram a redução de mais de 97% da cobertura original em três gerações da árvore, fato que determinou a inclusão de araucária na lista de espécies ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) como criticamente ameaçada (FARJON, 2006). A espécie consta também na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008).

A Floresta de Araucária, como um todo, apresenta-se em condições de vulnerabilidade (GUERRA et al., 2003), e a fragmentação da paisagem dificulta o fluxo gênico entre as populações remanescentes, ocasionando a erosão genética e a perda da capacidade adaptativa frente às mudanças do ambiente (STEINER, 2009). As restritas ações de recuperação são realizadas, muitas vezes, sem critérios técnico-científicos, utilizando sementes oriundas de populações distintas das locais, sem cuidados de seleção de procedências que melhor se adaptem a determinado local (GUERRA, et al., 2003; HIRANO, 2004). Além disso, a regeneração natural da araucária é dificultada pela predação de suas sementes (LORENZI, 2002), que ocorre antes (0,7% de sementes predadas, segundo Mantovani et al., 2004) e após sua dispersão natural (20,8%, segundo Solórzano Filho, 2001).

## 1.2 ASPECTO RECALCITRANTE DAS SEMENTES

A capacidade de uma semente em reter seu potencial germinativo é denominada “viabilidade”, e o tempo durante o qual a semente é capaz de conservá-la é a sua “longevidade” (CARDOSO, 2004). O período de sobrevivência ou longevidade das sementes é muito variável entre as espécies e também pode variar dentro de uma mesma espécie, devido a diferenças no genótipo e procedência, além de ser dependente das condições de armazenamento (HONG; ELLIS, 1996).

A longevidade de uma semente após a sua dispersão é definida, em geral, durante o seu desenvolvimento (CARDOSO, 2004). Ao final da fase de maturação, algumas sementes sofrem rápida redução no teor de água, não germinando devido à indisponibilidade de água (quiescência); em outras, o teor de água permanece elevado e, uma vez que as sementes nesta fase já estão completamente formadas, inicia-se o processo germinativo, o que, algumas vezes, ocorre ainda na planta-mãe (viviparidade) (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Assim, apesar do comportamento das sementes durante o armazenamento ainda requerer muitos estudos para que haja a correta conservação da biodiversidade (CARVALHO et al., 2006), em geral, as sementes são classificadas em ortodoxas, recalcitrantes e intermediárias quanto ao comportamento em relação ao armazenamento.

As sementes de espécies com comportamento ortodoxo em relação ao armazenamento são aquelas que toleram a secagem (3 a 5% de umidade) e o armazenamento a baixas temperaturas (-20%), sem que ocorram danos ao seu metabolismo (DAVIDE; SILVA, 2008). Assim, podem ser conservadas durante o armazenamento por longos períodos

(MARCOS FILHO, 2005) e mantidas em condições *ex situ* a longo prazo em ambiente adequado (HONG; ELLIS, 1996). As sementes ortodoxas, provavelmente, não só toleram a dessecação, mas dependem dela para redirecionar os processos metabólicos do desenvolvimento em direção à germinação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998).

Já as sementes recalcitrantes como *Araucaria angustifolia*, *Hevea brasiliensis* e *Inga vera*, não sobrevivem com baixos níveis de umidade, o que impede o seu armazenamento por longo prazo (ROBERTS, 1973; MARCOS FILHO, 2005). Em função da ausência da fase de dessecação, o metabolismo do desenvolvimento em sementes recalcitrantes passa diretamente ao metabolismo de germinação, que continua durante o armazenamento (MARCOS FILHO, 2005). O grau de umidade destas sementes normalmente se mantém entre 30% e 70%, sendo que o mínimo teor de água tolerado, em geral, varia entre 20% e 35% (MARCOS FILHO, 2005) além de não tolerarem o armazenamento a baixas temperaturas (DAVIDE; SILVA, 2008). As plantas que produzem sementes recalcitrantes geralmente ocorrem em habitats que permitem rápido estabelecimento de plântulas (MARCOS FILHO, 2005). Assim, as características das sementes recalcitrantes podem ser consideradas vantajosas à espécie do ponto de vista de estabelecimento de plantas sob condições naturais (BERJAK et al., 1989). Mas a manutenção da viabilidade de sementes de espécies com comportamento recalcitrante é problemática (HONG E ELLIS, 1996), e elas não podem ser conservadas sob as técnicas convencionais de armazenamento (CUNHA et al., 1992).

Alguns pesquisadores alertam para a necessidade de manutenção de estoques de sementes para a formação de mudas e composição dos Bancos de Germoplasma (MARCOS FILHO, 2005). Mas o armazenamento de sementes recalcitrantes a longo prazo é dificultado, especialmente quando se deseja armazená-las em Bancos de Germoplasma, em que normalmente se reduz o grau de umidade a níveis entre 3 e 7% (EIRA et al., 1994). Apesar das dificuldades encontradas, a pesquisa de métodos que preservem a qualidade pós-colheita de materiais seminíferos tem recebido pouca atenção (CAÇOLA et al., 2006).

Como nem todas as espécies se enquadram nos padrões descritos, verifica-se a existência de comportamentos intermediários ao ortodoxo e ao recalcitrante em relação ao armazenamento (ELLIS et al., 1990), levando-se em conta a sensibilidade ao dessecação, a resposta à armazenagem úmida e a tolerância ao resfriamento (CARDOSO, 2004). As diferenças observadas no comportamento das sementes são resultado

do processo de seleção natural, em concordância com as condições ambientais em que a espécie se desenvolveu (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998).

As sementes de araucária são classificadas como recalcitrantes (TOMPSETT, 1984; FARRANT et al., 1989; RAMOS; SOUZA, 1991; EIRA et al., 1994; ESPÍNDOLA et al., 1994), pois perdem rapidamente o seu potencial fisiológico após a colheita. Eira et al. (1994) observaram que dois lotes de sementes de araucária, ambos com 44% de umidade, apresentaram diferentes taxas germinativas, de 90% e 42%, característica tipicamente associada às sementes recalcitrantes. Adicionalmente, os mesmos autores constataram que houve perda total de viabilidade quando as sementes atingiram umidade em torno de 38%, sendo este nível considerado letal para as sementes. Em trabalho semelhante, Tompsett (1984) relatou que o nível crítico de umidade para a araucária era de 37%, sendo que, abaixo de 25% de umidade houve perda total da viabilidade das sementes.

Estes fatos demonstram que a característica recalcitrante das sementes de araucária está associada à rápida perda de qualidade fisiológica à medida que há redução no seu grau de umidade, dificultando as ações de conservação. Assim, Bianchetti e Ramos (1981) indicam que, sempre que possível, a sementeira deve ser realizada imediatamente após a colheita.

### 1.3 QUALIDADE FISIOLÓGICA NO ARMAZENAMENTO

A qualidade máxima da semente está associada ao máximo acúmulo de peso seco em função da alocação de substâncias aos tecidos de reserva, atingido ao final da fase de maturação das sementes. Após este período, as sementes recalcitrantes já estão completamente formadas e prontas para a dispersão, pois são independentes da secagem para adquirir a capacidade germinativa (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). A partir deste ponto, o potencial de desempenho apresentado pela semente começa a ser revertido em função do metabolismo degenerativo, cuja conseqüência final e mais drástica é a perda da viabilidade (MARCOS FILHO, 2005). A deterioração das sementes, também conhecida por envelhecimento, é caracterizada pela perda da qualidade da semente em função do tempo (COOLBEAR, 1995). Durante este processo, diversas alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas começam a ser observadas, provocando a inativação progressiva do metabolismo, determinando a queda da qualidade e culminando com a morte da semente (VILLELA; PERES, 2004;

MARCOS FILHO, 2005). Nas sementes recalcitrantes como a araucária, a velocidade e a intensidade de deterioração são maiores, pois as alterações metabólicas associadas à germinação continuam durante o armazenamento.

A taxa de deterioração das sementes é altamente influenciada pelas condições do meio ambiente, dependendo diretamente da temperatura, da umidade relativa do ar e do histórico da população, fatores estes que afetam suas características físicas, químicas, fisiológicas e sanitárias (ROBERTS, 1981). Portanto, as condições de armazenamento influenciam a longevidade da semente, sobretudo pelo teor de água e pela temperatura, a qual atua sobre as atividades respiratórias das sementes e dos microrganismos presentes (VILLELA; PERES, 2004).

Segundo Lorenzi (2002), as sementes de araucária sofrem completa redução de viabilidade 120 dias após a colheita. Mas, como a manutenção da viabilidade é influenciada pelo armazenamento, algumas pesquisas foram desenvolvidas buscando prolongar a qualidade fisiológica das sementes. Em condições de refrigeração, a viabilidade das sementes de araucária pode ser preservada pelo período de 180 dias, apesar de haver redução gradativa do vigor das sementes após 60 dias de armazenamento (CAÇOLA et al., 2006). Se acondicionadas com a umidade apresentada na coleta (43%), em câmara fria e embalagem de polietileno selada, a viabilidade das sementes de araucária pode ser mantida por 12 meses (FOWLER et al., 1998). Já o armazenamento das sementes em temperaturas iguais ou superiores a 20 °C leva à rápida perda de viabilidade fisiológica, em função do gasto energético com a respiração e da desorganização celular relacionada à desidratação e à senescência dos tecidos (AMARANTE et al., 2007). Suiter Filho (1966) verificou que houve melhor conservação da qualidade fisiológica das sementes em ambientes com umidade relativa do ar de 80%, em embalagens plásticas e sob temperatura de 5 °C.

Nas sementes recalcitrantes, a condição de alta umidade confere proteção contra a desorganização das membranas, permite a atuação de mecanismos de reparo, a atividade de enzimas importantes, menor ocorrência de danos por embebição e, conseqüentemente, o prolongamento da conservação (MARCOS FILHO, 2005). Como as sementes de araucária são muito sensíveis à redução do teor de água, deve-se armazená-las logo após a colheita, evitando-se a perda de água durante esse período (EIRA et al., 1994). O acondicionamento das sementes em embalagens plásticas reduz a perda de água, favorecendo sua conservação (POPINIGIS, 1985). Em geral, o armazenamento de

sementes recalcitrantes com teores de água relativamente altos tem gerado resultados favoráveis, apesar das dificuldades encontradas na manutenção desta condição por período prolongado (MARCOS FILHO, 2005).

Contudo, o baixo grau de umidade constitui a condição essencial para o bom armazenamento da maioria das sementes (BACCHI, 1958). O armazenamento de sementes com elevado teor de água pode ocasionar o crescimento de microrganismos, favorecido pela umidade e a germinação de sementes no interior da embalagem, conduzindo-as à rápida deterioração (EIRA et al., 1994; FONSECA; FREIRE, 2003).

### **1.3.1 Avaliação do potencial fisiológico das sementes**

Os eventos bioquímicos ocorridos durante a deterioração refletem na viabilidade e no vigor das sementes, tornando fundamental a avaliação da qualidade das sementes.

Na avaliação da qualidade de sementes, o teste de germinação é uma das técnicas tradicionalmente mais utilizadas. Por se tratar de um teste de controle de qualidade, deve ser realizado em ambiente de laboratório, sob condições controladas de temperatura, teor de água e luz (PIÑA-RODRIGUES et al., 2004). Assim, o teste de germinação fornece valores de germinação máxima sob condições ambientais consideradas ótimas para a espécie em estudo (MARCOS FILHO, 2005).

Para a araucária, o teste de germinação leva em torno de 35 dias (EIRA et al., 1994). A demora na obtenção dos resultados, aliada à característica recalcitrante das sementes de araucária que pode refletir em resultados incorretos de viabilidade, levaram as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) a indicarem o uso do teste de tetrazólio para a análise de sua qualidade. O teste de tetrazólio reflete a atividade de sistemas enzimáticos relacionados com a viabilidade das sementes, através de alterações na coloração dos tecidos vivos em contato com uma solução de sal tetrazólio (OLIVEIRA, 2007). Assim, o teste de tetrazólio permite rápida e eficiente obtenção de resultados de viabilidade das sementes.

Em situações naturais, entretanto, as sementes estão sujeitas a diversas condições desfavoráveis ao seu desempenho germinativo, como a competição e as variações na umidade do solo, na temperatura e na luminosidade. Além disso, até que haja efetivamente a perda de poder germinativo, diversos eventos de deterioração ocorrem nas sementes. Surgiram, então, os testes de vigor, capazes de identificar os lotes que

apresentariam melhor desempenho em condições de campo (PIÑA-RODRIGUES et al., 2004), e favorecer as inferências sobre o estágio de deterioração das sementes.

O vigor das sementes determina seu potencial para uma emergência rápida e uniforme em uma ampla faixa de condições ambientais (AOSA, 1983). Para a avaliação do vigor das sementes, e a fim de complementar os resultados de viabilidade, diversos testes podem ser empregados, sendo classificados segundo McDonald (1975) em:

a) físicos, que avaliam aspectos morfológicos ou características físicas associadas ao vigor, como o teste de raios X;

b) fisiológicos, que determinam atividades fisiológicas específicas, cuja manifestação depende do vigor, tais como o índice de velocidade de germinação, baseado no princípio de que sementes mais vigorosas germinam mais rapidamente;

c) bioquímicos, que avaliam alterações metabólicas relacionadas ao vigor, como a condutividade elétrica, que indica que sementes menos vigorosas apresentam menor velocidade de restabelecimento da integridade das membranas celulares durante a embebição e, em consequência, liberam maiores quantidades de solutos para o meio exterior;

d) resistência a estresse, que avaliam o desempenho de sementes quando submetidas a condições desfavoráveis de ambiente, como o envelhecimento artificial, teste que simula condições de estresse nas sementes gerando altas taxas respiratórias e consumo das reservas, acelerando os processos metabólicos que levam à deterioração.

Quando diversos testes são aplicados simultaneamente, é possível fazer inferências específicas sobre os diferentes aspectos relacionados à qualidade das sementes.

#### 1.4 ALTERAÇÕES METABÓLICAS NO ARMAZENAMENTO

Apesar dos sintomas mais evidentes da deterioração ocorrerem durante a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas, antes destas manifestações, várias outras já ocorreram a nível ultraestrutural e bioquímico, as quais são detectadas somente através de exames mais sofisticados (MARCOS FILHO, 2005).

Diversas são as alterações metabólicas ou bioquímicas relacionadas à deterioração das sementes, mas as citadas com mais frequência na literatura são as mudanças na atividade respiratória e no metabolismo de reservas, as modificações na atividade enzimática e na síntese de proteínas, o acúmulo de substâncias tóxicas, os danos à

integridade do DNA e aos sistemas de membranas, a peroxidação de lipídios e a lixiviação de solutos (COOLBEAR, 1995; McDONALD, 1999; CARDOSO, 2004; SANTOS et al., 2004; MARCOS FILHO, 2005). Tais alterações bioquímicas podem refletir em diversos prejuízos às sementes e plântulas, incluindo redução do vigor e aumento do número de plântulas com anormalidades morfológicas.

#### **1.4.1 Alterações no metabolismo de reservas**

As reservas acumuladas durante o desenvolvimento da semente influenciam diretamente o vigor e o potencial de armazenamento (CARVALHO; NAKAGAWA, 1980; FLORIANI, 2004), pois são fundamentais para a manutenção da viabilidade celular durante períodos de mais baixa atividade metabólica, além de determinar os procedimentos pós-colheita mais adequados à manutenção da qualidade das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

A maior parte dos estudos sobre os componentes de reserva de sementes se relaciona a grupos extremamente restritos de espécies vegetais de importância agrônômica (BUCKERIDGE et al., 2004). Informações sobre aspectos da fisiologia e da composição química das sementes de espécies nativas das florestas tropicais são importantes para auxiliar, por exemplo, a produção de mudas de alta qualidade para a recuperação de áreas que foram degradadas por atividades agrícolas e industriais (BUCKERIDGE et al., 2004).

Cada um dos componentes de reserva nas sementes desempenha uma função, que pode ser vital ao desenvolvimento do embrião e à formação da plântula. Há uma enorme variação na composição de sementes, mas, de modo geral, as principais substâncias de reserva são os carboidratos e lipídios, que servem como fonte de energia e carbono para a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas, e as proteínas, que armazenam principalmente nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários na plântula em crescimento (BUCKERIDGE et al., 2004; MARCOS FILHO, 2005).

No metabolismo germinativo, os carboidratos de reserva, principalmente o amido, são metabolizados e mobilizados com o auxílio das enzimas amilases, maltase e fosforilase, sendo convertidos à sacarose e ATP, utilizados como fonte de energia e na formação de paredes celulares e protoplasma (MARCOS FILHO, 2005). Os carboidratos de reserva solúveis e de parede celular atuam nos mecanismos de embebição de água e na proteção do embrião contra o



dessecamento e o ataque de patógenos (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Durante a deterioração das sementes, pode ocorrer decréscimo no teor destes carboidratos, resultando em queda da capacidade germinativa e do vigor das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

As proteínas exercem duas principais funções nas sementes, atuando como substâncias de reserva e no catabolismo de reações químicas (MARCOS FILHO, 2005). Na germinação, as proteínas são hidrolisadas com auxílio de proteases e peptidases e translocadas aos pontos de crescimento do eixo embrionário, à formação de tecidos vivos, ou participam de reações da cadeia respiratória (MARCOS FILHO, 2005). O teor e a síntese de proteínas decrescem durante a deterioração (MARCOS FILHO, 2005), mas o vigor das sementes está muito mais relacionado à integridade do sistema de síntese durante o processo germinativo do que ao conteúdo de proteínas (ABDUL-BAKI, 1980).

Os lipídios também são importantes constituintes de reserva em sementes de muitas espécies. Juntamente com as proteínas, os fosfolipídios são os principais constituintes das membranas celulares. As enzimas lipases auxiliam a hidrólise dos lipídios que, assim como os carboidratos, são importantes fontes de energia e são utilizados na formação de paredes celulares e protoplasma durante a germinação (MARCOS FILHO, 2005), sendo também importantes para o desenvolvimento da plântula (BUCKERIDGE et al., 2004). Durante a deterioração, a degeneração dos componentes das membranas geralmente têm conseqüências mais graves que a dos lipídios de reserva (MARCOS FILHO, 2005).

#### **1.4.2 Estresse oxidativo e defesas antioxidantes**

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula que possui um ou mais elétrons não pareados na sua órbita externa, o que lhe confere alta reatividade (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; PEREIRA, 2010). Mas, como a maioria das moléculas permanece com os elétrons pareados em meio biológico e, portanto, não se encontram na forma de radicais (PEREIRA, 2010), tem sido empregado o termo “espécies reativas do oxigênio” (EROs), já que, em sua maioria, são derivados do metabolismo do  $O_2$  (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). As principais EROs distribuem-se, portanto, em dois grupos, as radiculares como o radical hidroxila ( $^{\bullet}HO$ ) e ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), e as não-radicalares, como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BARREIROS et al., 2006).

Todas as células produzem EROs durante os processos metabólicos normais ou por alguma disfunção biológica (BARREIROS, et al., 2006). Durante o avanço do processo de envelhecimento dos organismos, observa-se um aumento nas concentrações de EROs endógenas, levando à uma série de mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). Quando as EROs estão presentes em excesso nos organismos, apresentam efeitos prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressões às proteínas, carboidratos e DNA (BARREIROS et al., 2006), resultando em danos celulares, senescência e morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A degradação do sistema de síntese de novas enzimas também está diretamente ligada à produção de radicais livres, que afeta a formação de várias enzimas, mediante a promoção de modificações na sua estrutura (MARCOS FILHO, 2005).

O excesso de EROs é combatido por antioxidantes produzidos pelo próprio organismo, como as enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os antioxidantes são substâncias que, quando presentes em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera-o ou previne significativamente a sua oxidação (HALLIWELL, 2000). As plantas têm sistemas de defesa bem desenvolvidos contra as EROs, que atuam tanto na redução da sua formação, quanto na sua remoção (ALSCHER et al., 2002). Em condições metabólicas normais, a formação e a remoção de EROs estão em equilíbrio, mas sob condições de estresse, o sistema de defesa pode ser sobrecarregado (ALSCHER et al., 2002).

As EROs são formadas através da redução parcial do oxigênio à água, através de sucessivas reações (Figura 1.1).

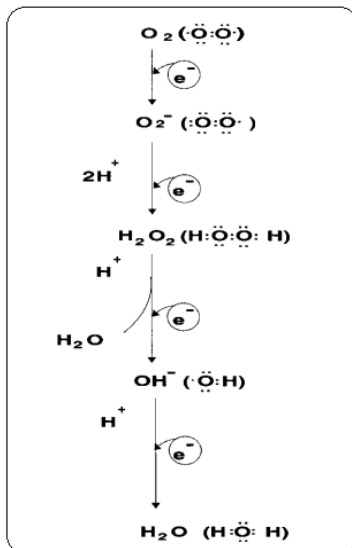
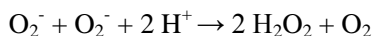


Figura 1.1 – Formação de espécies reativas de oxigênio durante a redução do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) na mitocôndria até a formação de água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) (Adaptado de COHEN, 1989; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

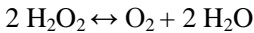
A transferência de um elétron para o oxigênio produz o primeiro intermediário reativo, o ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ). O  $\text{O}_2^{\cdot-}$  é uma das EROs mais importantes e sua presença pode causar sérios danos às células, principalmente indiretamente, pois pode gerar o radical hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), sendo convertido em  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2$  pela ação da enzima superóxido dismutase, encontrada em quase todos os compartimentos celulares (MITTLER, 2002; BLOKHINA et al., 2003; BARREIROS et al., 2006), pela reação:



A decomposição do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  pode ocorrer naturalmente mas, neste caso, é uma reação de segunda ordem, necessitando que ocorra a colisão entre duas moléculas de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (BARREIROS et al., 2006). A presença da enzima SOD favorece essa dismutação, tornando a reação de primeira ordem e permitindo a eliminação do  $\text{O}_2^{\cdot-}$  mesmo em baixas concentrações (BARREIROS et al., 2006).

O  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado, apesar de ser menos reativo que o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , na presença de metais de transição como o  $\text{Fe}^{+2}$ , pode ocorrer a formação de  $\cdot\text{OH}$  através da reação de Fenton (BLOKHINA et al., 2003), ou pela

combinação do  $O_2^-$  com o  $H_2O_2$ , pela reação de Haber-Weiss (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O  $\cdot HO$  é o radical mais deletério aos organismos, causando danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares (BARREIROS et al., 2006). A catalase (CAT) é um antioxidante que atua na detoxificação do  $H_2O_2$ , catalisando sua redução em  $H_2O$  e  $O_2$  e impedindo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BLOKHINA et al., 2003), pela reação:



Ambos os sistemas compostos pela SOD e pela CAT atuam como detoxificadores do agente, antes que a lesão seja provocada, buscando neutralizar as EROs (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; BLOKHINA et al, 2003; PEREIRA, 2010). Os mecanismos enzimáticos de proteção atuam durante o armazenamento das sementes, quando há o avanço no processo deteriorativo (NAKADA et al, 2010).

### 1.4.3 Alterações nos sistemas de membranas

As membranas celulares são compostas por duas camadas de fosfolipídios com as proteínas encaixadas como glóbulos (MARCOS FILHO, 2005), seguindo o modelo mosaico fluido proposto por Singer e Nicolson (1972) e sua organização se mantém estável graças à relação entre seus componentes e a água (MATTHEWS, 1985).

O sistema de membranas se organiza durante a maturação e a máxima organização é alcançada durante a fase final do acúmulo de reservas, próximo à maturidade fisiológica (MARCOS FILHO, 2005). Durante o armazenamento, as sementes perdem gradativamente a integridade do sistema de membranas, com reflexos na taxa de liberação de solutos quando as sementes são embebidas (MARCOS FILHO, 2005). A destruição da integridade das membranas é o principal sintoma fisiológico da deterioração de sementes (COOLBEAR, 1995). O menor controle da permeabilidade seletiva, a perda da compartimentalização e a desorganização do metabolismo celular, e a ineficiência dos mecanismos de reparo e de síntese são conseqüências importantes decorrentes da desorganização de membranas, afetando diretamente o desempenho das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

Assim como a desestruturação das membranas, as mudanças na sua composição podem ocorrer já no início do processo deteriorativo durante o armazenamento (COOLBEAR, 1995). Apesar disso, tem sido relatado que a peroxidação dos lipídios das membranas é um dos

mecanismos mais importantes da deterioração de sementes (COOLBEAR, 1995; McDONALD, 1999; VILLELA; PERES, 2004).

Os danos oxidativos às membranas ocorrem através da peroxidação de lipídios, desencadeada pela ação dos radicais livres (COOLBEAR, 1995; SHIN et al., 2009). Ambos os radicais  $\cdot\text{HO}$  e  $\text{O}_2\cdot^-$  podem desencadear reações oxidativas em cadeia altamente prejudiciais, especialmente com ácidos graxos poliinsaturados como o ácido linoléico para formar hidroperóxidos de lipídios (COOLBEAR, 1995). Para cada molécula de hidroperóxido formada, há a produção de um radical livre, capaz de reagir com outra molécula lipídica (COOLBEAR, 1995). A peroxidação ocorre nos lipídios de reserva e nos componentes das membranas de sementes armazenadas, gerando um aumento nos radicais livres, formando produtos secundários tóxicos, promovendo a perda da permeabilidade seletiva e a desestruturação do sistema de membranas, a oxidação de aminoácidos, e a degradação de DNA e de proteínas (WILSON; MCDONALD, 1986; VIDAS et al., 1992; MARCOS FILHO, 2005). Portanto, a peroxidação lipídica é, provavelmente, a maior consequência da ação deletéria das EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), e constitui um dos fatores que mais influenciam o declínio de vigor e viabilidade das sementes (WILSON; McDONALD, 1986; MARCOS FILHO, 2005; JOSÉ et al., 2010).

#### **1.4.4 Danos ao DNA**

Além dos danos às membranas, os danos ao genoma são citados como causas principais da deterioração em sementes. A redução da integridade do DNA durante o envelhecimento das sementes demonstra que o DNA e as proteínas são propensos à deterioração, e as lesões provocadas podem gerar distúrbios à germinação (MARCOS FILHO, 2005).

A redução da integridade do DNA pode ser provocada pela ação de enzimas hidrolíticas, pela atividade de radicais livres, ou ainda pela interação com produtos secundários da peroxidação lipídica (COOLBEAR, 1995). Estes fatores estão, na verdade, interligados, pois a presença dos radicais livres pode causar a peroxidação de lipídios, que destrói a membrana nuclear, podendo levar à degradação do DNA (McDONALD, 1999).

As sementes com baixa viabilidade podem perder a eficiência em sintetizar RNA e proteínas e as lesões ao DNA acentuam a redução dessas atividades e podem gerar um processo de transcrição defeituoso da mensagem genética (MARCOS FILHO, 2005). Tais danos são

acumulados mais rapidamente em sementes úmidas que nas secas, e estão relacionados ao envelhecimento e à perda da viabilidade das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

## ***CAPÍTULO 2***





## **ALTERAÇÕES FISIOLÓGICAS EM SEMENTES DE *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze NO ARMAZENAMENTO**

### **2.1 INTRODUÇÃO**

A araucária (*Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze) é o principal componente da Floresta Ombrófila Mista, porém, a progressiva extinção de suas populações, decorrentes de seu alto valor madeireiro, resinífero e alimentar (EIRA et al., 1994), levaram-na à inclusão na lista de espécies ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN) como criticamente ameaçada (FARJON, 2006). A espécie consta também na Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (BRASIL, 2008).

A recomposição de áreas com araucária é dificultada pela baixa viabilidade de suas sementes, principal forma de propagação da espécie (RAMOS; CARNEIRO, 1988), que diminui gradativamente após a colheita (LORENZI, 2002), sendo a espécie caracterizada como recalcitrante (TOMPSETT, 1984). Devido a esta característica recalcitrante, as sementes de araucária perdem totalmente a viabilidade em 120 dias (LORENZI, 2002) ou 180 dias (FOWLER et al., 1998) após a maturação, limitando os programas de restauração, os quais exigem grandes quantidades de sementes com boa qualidade fisiológica.

A máxima qualidade fisiológica, alcançada na fase de maturação das sementes, pode decrescer a partir deste ponto, dependendo dos fatores ambientais aos quais as sementes estão expostas. O armazenamento adequado das sementes pode ser uma alternativa para prolongar a sua qualidade fisiológica, diminuindo a velocidade de deterioração. Este fato gerou algumas pesquisas sobre o período de manutenção da viabilidade das sementes de araucária durante condições específicas de armazenamento. Alguns autores indicam que a qualidade das sementes da espécie pode ser mantida, com percentual de germinação de 97%, se armazenadas sob condições de refrigeração entre 0 e 1 °C por um período de até 180 dias (CAÇOLA et al., 2006). De outra forma, tem sido relatado que pode haver 61% de germinação de sementes de araucária armazenadas por período de até 360 dias em embalagem de polietileno semipermeável em câmara fria (4±1 °C e 89±1% de umidade relativa) (FOWLER et al., 1998). Já o armazenamento de sementes da espécie em temperaturas superiores a 20 °C causa perdas significativas de viabilidade devido ao gasto energético com a respiração e à desorganização celular associada à desidratação e à senescência dos tecidos (AMARANTE et al., 2007). No entanto, os

estudos acima referidos não relatam, ou relatam outras características associadas ao vigor, e alguns não especificam claramente o critério utilizado para considerar as amostras como germinadas.

Uma das formas de avaliar o nível de deterioração da semente previamente ao tempo de armazenamento é por meio do teste de envelhecimento artificial, baseado no fato de que há aumento da deterioração das sementes expostas a elevadas temperatura e umidade relativa do ar. Alguns autores observaram reduções nas porcentagens e índices de velocidade de emergência com o aumento do período de envelhecimento de sementes de araucária à temperatura de  $43 \pm 2$  °C (RAMOS; CARNEIRO, 1991). Em outros casos, as sementes de araucária submetidas ao envelhecimento artificial à temperatura de 40 °C atingiram a perda total de viabilidade após 9 dias de envelhecimento (FONTES et al., 2001).

Diante dos relatos de trabalhos na literatura, observa-se a inexistência de um modelo adequado à manutenção da qualidade de sementes de araucária, visto que esta manutenção é altamente dependente das condições de armazenamento. Assume-se que o estudo das alterações fisiológicas e físicas gerará informações mais precisas à preservação da qualidade das sementes de araucária. Portanto, objetivou-se avaliar as alterações na viabilidade através dos testes de germinação e tetrazólio, e no vigor através dos testes de envelhecimento artificial, índice de velocidade de germinação e condutividade elétrica, em sementes de araucária durante o armazenamento controlado.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para o trabalho foram utilizadas sementes maduras de araucária coletadas em uma população no município de Painel ( $27^{\circ}55'$  de latitude sul,  $50^{\circ}06'$  de longitude oeste e altitude média de 1144 metros), no planalto sul de Santa Catarina. A amostra de sementes, depois de separadas das pinhas, foi subdividida em quatro repetições, as quais foram submetidas às diferentes condições de armazenamento: em ambiente de laboratório sem controle térmico, em refrigerador (5 °C), ou em freezer (-18 °C), em embalagens plásticas transparentes vedadas, com porosidade de 0,015  $\mu\text{m}$ . As variações de temperatura e umidade relativa, no ambiente de laboratório, para o período de armazenamento das amostras foram de -3 °C e 33%, até valores máximos de 30 °C e 99%, respectivamente, com temperatura e umidade relativa médias de 15 °C e 80% entre os meses de julho e dezembro de 2010 (EPAGRI/CIRAM, 2011).

Imediatamente após a colheita e a cada 60 dias de armazenamento nas condições anteriormente citadas, por repetição e ao acaso, foram retiradas amostras de trabalho para as avaliações quanto ao grau de umidade, germinação, envelhecimento artificial, índice de velocidade de germinação, condutividade elétrica e tetrazólio, ao longo de um período amostral de 180 dias.

Na avaliação física foi determinado o grau de umidade das sementes a partir de três repetições de três sementes cortadas transversalmente, as quais foram medidas e transferidas à estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , por 24 horas (BRASIL, 2009).

As sementes foram tratadas com solução de hipoclorito de sódio (2%, v/v), por 3 minutos, previamente ao teste de germinação, o qual foi conduzido utilizando-se quatro repetições de 25 sementes/tratamento, acondicionadas em bandejas plásticas com substrato areia, previamente esterilizada, sob luminosidade constante e temperatura constante de  $25^{\circ}\text{C}$ , em câmara germinativa BOD. As avaliações de porcentagens de plântulas normais ocorreram aos 14, 28, 42, 56 e 70 dias após a semeadura. Padronizou-se a avaliação aos 70 dias após o início do teste de germinação para comparação dos efeitos dos tratamentos, por este ser o tempo aonde as sementes expressaram seu máximo potencial germinativo, i.e., alta taxa de germinação das sementes recém-colhidas (90%). Período semelhante (60 dias após instalação do experimento) foi considerado por outros autores para a análise dos resultados do teste de germinação (MOREIRA-SOUZA; CARDOSO, 2003). O critério para avaliação de foi adotado conforme prescrito nas Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

O teste de envelhecimento artificial foi realizado utilizando-se quatro repetições de 25 sementes/tratamento, mantidas por cinco dias em câmara germinativa com controle de umidade relativa, *ca.* 100% e temperatura de  $40^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, procedeu-se ao teste de germinação como previamente descrito e cálculo do índice de velocidade de germinação (IVG). O cálculo do IVG foi realizado a partir da contagem diária de plântulas normais, conforme descrito por Maguire (1962):  $\text{IVG} = \Sigma (\text{NSG}/\text{DAI})$ , onde NSG é o número não acumulado de sementes germinadas e DAI é o número de dias após instalação do teste.

O teste de condutividade elétrica foi realizado com quatro repetições de 10 embriões intactos/tratamento, acondicionados em recipiente contendo 75 mL de água ultrapura e incubados por 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas, sob temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ , conforme descrito por Medeiros e Abreu (2007), com adaptações. Os valores de condutividade

obtidos em  $\mu\text{s}/\text{cm}$  foram corrigidos pela massa das sementes de cada repetição e os resultados expressos em  $\mu\text{s}/\text{cm}/\text{g}$ .

O teste de tetrazólio é indicado nas RAS (BRASIL, 2009) para avaliação de sementes de araucária, devido ao elevado período de permanência das sementes em teste de germinação. Testes preliminares foram realizados a partir das metodologias propostas nas RAS (BRASIL, 2009) e por Oliveira et al. (2009), visando determinar o método mais adequado à correta avaliação da viabilidade das sementes. Na primeira metodologia (BRASIL, 2009), as sementes foram pré-condicionadas por 18 horas em água, com posterior imersão das sementes, sem tegumento e com as partes lateral e terminal cortadas, em solução de 2, 3, 5 trifetil-cloreto de tetrazólio 1% (m/v), a 30 °C, por um período de 18 a 25 horas, para posterior avaliação da viabilidade.

Na segunda metodologia (OLIVEIRA et al., 2009), as sementes foram imersas em água por 18 horas, com posterior remoção do tegumento e do tecido nutritivo. Após a imersão das sementes em solução de 2, 3, 5 trifetil-cloreto de tetrazólio 0,1% (m/v), a 25 °C, por 1 hora, as sementes foram avaliadas quanto a viabilidade em função da coloração e aspecto dos tecidos. Tal metodologia foi adotada para as avaliações realizadas em função da maior facilidade de visualização dos distúrbios de coloração e, portanto, de análise dos tecidos viáveis e inviáveis, da redução dos custos com o sal de tetrazólio e, por fim, da redução do período de execução do teste de tetrazólio.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas no tempo, sendo três condições de armazenamento (ambiente, refrigerador e freezer) e quatro períodos de armazenamento (0, 60, 120 e 180 dias). Os dados obtidos em percentagem foram transformados em arco seno  $\sqrt{\%}$  e realizou-se posterior análise de variância e teste de Tukey para separação de médias, a 5% de probabilidade, através do programa estatístico SAS (2003).

## 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A umidade média apresentada pelas sementes de araucária recém-colhidas foi de 45% e aumentou até os 60 dias de armazenamento (48% para armazenadas em freezer e 49% para armazenadas em refrigerador e ambiente). A partir de 60 dias, a umidade aumentou significativamente apenas para as amostras armazenadas em freezer (51%). Diferenças mais acentuadas ocorreram apenas a partir dos 120 dias para todas as condições de armazenamento, sendo que ocorreu acréscimo significativo de 4% na umidade somente para as amostras armazenadas em ambiente

(Figura 2.1). Considerando-se o intervalo de tempo entre zero e 180 dias de armazenamento, constatou-se uma tendência de acréscimo no grau de umidade apenas para as amostras mantidas em ambiente, o que pode ser explicado em função da elevada umidade relativa do ar no período do experimento, pois as embalagens utilizadas não restringiram as trocas de umidade com o ambiente.

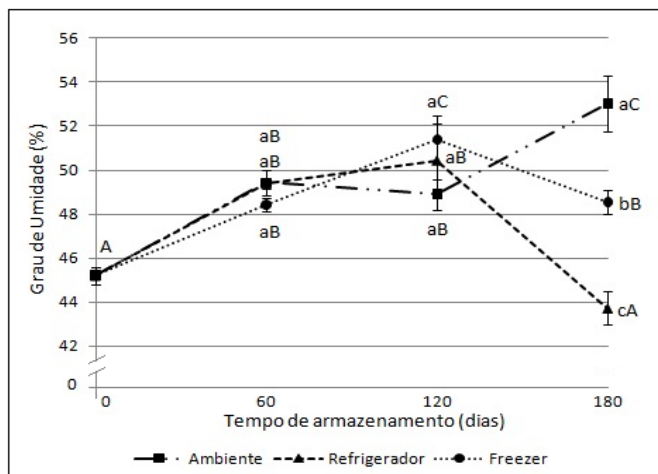


Figura 2.1 – Grau de umidade de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C). As letras referem-se ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), sendo: maiúsculas – comparação entre tempos de armazenamento; minúsculas – comparação entre condições de armazenamento.

Ao comparar as condições de armazenamento, verificou-se que aos 180 dias houve diferenças mais acentuadas no grau de umidade, com maior teor nas amostras armazenadas em ambiente (53%), em comparação àquelas armazenadas em freezer (49%) e em refrigerador (44%). Este resultado demonstra que diferenças entre a umidade das sementes de araucária armazenadas nas condições de ambiente sem controle térmico, refrigerador e freezer foram acentuadas após período prolongado de armazenamento, e que na condição de refrigerador a umidade das sementes aos 180 dias foi semelhante ( $P < 0,05$ ) à umidade após a colheita.

As alterações no teor de água das sementes divergiram das observados por Piriz Carrillo et al. (2003), onde a umidade das sementes

de araucária durante o armazenamento a 4 °C se manteve em torno de 45% até os 180 dias de armazenamento.

No caso das sementes recalcitrantes, é importante relacionar as variações de umidade com o percentual de germinação e vigor, visando observar as alterações fisiológicas decorrentes das condições de armazenamento. Desta forma, observou-se 90% de germinação das sementes recém-colhidas de araucária aos 70 dias após o início do teste de germinação (Tabela 2.1), as quais apresentaram 45% de umidade. Ao longo do armazenamento, independente da condição, os teores de água das sementes não interferiram na sua viabilidade, uma vez que foram acima daqueles considerados críticos para a espécie, pois, segundo alguns autores, a viabilidade das sementes de araucária não é afetada até valores mínimos de 36% (BIANCHETTI; RAMOS, 1981) ou 37% de umidade (TOMPSETT, 1984).

Tabela 2.1 – Germinação (%) de sementes de *Araucaria angustifolia* recém-colhidas e durante armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C), antes e após envelhecimento artificial (5 dias à 40 °C).

Dias após armazenamento	Condição de armazenamento	Germinação (%)							Germinação (%) após envelhecimento artificial							
		ATG	0	14	28	42	56	70	0	14	28	42	56	70		
Recém-colhidas		0	0	0	1	39	80	90	a	0	0	1	12	42	65	a
60 dias	Ambiente	52	0	0	6	71	71	71	Aab	0	0	9	28	31	44	Aab
	Refrigerador	0	0	0	1	19	39	54	Ab	0	0	0	13	26	41	Aab
	Freezer	0	0	0	0	0	0	0	Bb	0	0	0	0	0	0	Bb
120 dias	Ambiente	79	0	0	1	8	22	41	Bb	0	0	0	4	11	22	Bb
	Refrigerador	24	0	0	8	20	37	59	Ab	0	0	0	4	13	26	Abc
	Freezer	0	0	0	0	0	0	0	Cb	0	0	0	0	0	0	Cb
180 dias	Ambiente	80	0	0	0	0	0	0	Bc	0	0	0	0	0	0	Bc
	Refrigerador	30	0	0	15	45	59	64	Aab	0	0	0	0	9	9	Ac
	Freezer	0	0	0	0	0	0	0	Bb	0	0	0	0	0	0	Bb

ATG – percentual de sementes germinadas antes da submissão ao teste de germinação. As letras referem-se ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), sendo: maiúsculas – comparam as condições de armazenamento; minúsculas – comparam o desempenho de cada condição ao longo do tempo de armazenamento.

Conforme a Tabela 2.1, observa-se que a velocidade de germinação das sementes de araucária foi lenta. Considerando os tempos de avaliação de 0, 14, 28, 42, 56 e 70 dias após a instalação do experimento, verificou-se que o início do estabelecimento de plântulas normais para a maior parte das amostras ocorreu somente em torno do 28º dia, atingindo o máximo percentual germinativo após 70 dias e, em geral, para sementes que foram previamente submetidas ao envelhecimento artificial, houve atraso no estabelecimento de plântulas normais (Tabela 2.1). Esta germinação lenta é comum para sementes de araucária, tanto em sementes recém-colhidas quanto após 180 dias armazenamento em câmara fria (0 a 1 °C e 90 a 95% de umidade relativa), onde as amostras levaram 38 e 33 dias, respectivamente, para o início do estabelecimento de plântulas normais (CAÇOLA et al., 2006).

Considerando-se um período médio de 70 dias para a estabilização da germinação, independente da condição de armazenamento (Tabela 2.1), este tempo foi utilizado para comparações entre o percentual de germinação das sementes ao longo do armazenamento em estudo. As amostras recém colhidas apresentaram 90% de germinação, e não diferiram significativamente das amostras armazenadas por 60 dias na ausência de controle térmico, mas diferiram significativamente das amostras armazenadas em refrigerador e freezer. Entretanto, aos 120 dias de armazenamento, as sementes armazenadas em refrigerador permaneceram com percentual de germinação próximo a 59%, enquanto um decréscimo de 30% na germinação foi detectado para as sementes armazenadas em temperatura ambiente (de 71 para 41%). Aos 180 dias de armazenamento as amostras armazenadas em refrigerador mantiveram seu percentual de germinação em 64%, não diferindo significativamente das amostras recém colhidas (Tabela 2.1).

Ao comparar o efeito das condições térmicas de armazenamento para cada período amostral, constatou-se que as amostras armazenadas em refrigerador apresentaram maior percentual de germinação em relação às demais condições a partir de 120 dias, fato que destaca tal condição como superior na manutenção da viabilidade das sementes de araucária.

O armazenamento das sementes a -18 °C determinou a perda total da viabilidade aos 60 dias de armazenamento, ou seja, o congelamento provocou a morte do embrião, o que pode ser observado pela ausência de sementes germinadas (Tabela 2.1). Como a solução intracelular possui elevado teor de água livre, ela é passível de congelamento quando as células são congeladas rapidamente, e os cristais de gelo formados causam injúrias mecânicas às células



(STEPONKUS; WEBB, 1992). No entanto, Caçola et al. (2006) observaram que se armazenadas a temperaturas próximas de 0 °C, as sementes de araucária mantêm seu potencial germinativo de 97% por um período de até 180 dias.

Portanto, observou-se claramente que o armazenamento em refrigerador favoreceu a conservação da viabilidade das sementes até o tempo de 180 dias de armazenamento. Visto que a umidade não foi um fator interferente no processo, constatou-se que a temperatura mais baixa em refrigerador (em média de 5 °C) em relação ao ambiente favoreceu a diminuição da atividade metabólica das sementes, o que possivelmente contribuiu substancialmente para a manutenção da viabilidade das amostras por um período de 180 dias. Estes efeitos positivos concordam com outros autores, que observaram baixas taxas respiratórias em sementes de araucária quando armazenadas em temperaturas de 2 e 10 °C (AMARANTE et al., 2007), ou que observaram que o percentual de germinação de araucária pode ser mantido em 61% se as sementes forem armazenadas em temperatura de 4 °C (FOWLER et al., 1998).

Outra evidência de que as sementes de araucária perdem sua viabilidade rapidamente quando mantidas em ambiente sem controle térmico é o fato de observar-se um elevado percentual de germinação (52%) aos 60 dias de armazenamento antes de iniciar o teste de germinação (Tabela 2.1), valor que aumentou para percentuais próximos a 80% aos 120 e 180 dias de armazenamento, enquanto que as amostras armazenadas em refrigerador atingiram percentual máximo de 30% de germinação antes da submissão ao teste de germinação. Estes resultados demonstram novamente a necessidade de armazenamento das amostras com controle de temperatura.

Ao realizar-se o teste de envelhecimento artificial observaram-se reduções na porcentagem e no índice de velocidade de germinação das sementes nas condições de armazenamento em estudo (Tabela 2.1 e Figura 2.2B). A redução observada foi de 100% na germinação das amostras armazenadas no ambiente e em freezer, no entanto, para as amostras na condição de refrigerador a redução foi de 91%. Este fato indica que as sementes de araucária poderiam permanecer viáveis se armazenadas sob condição de refrigerador, à temperatura de 5 °C, por período superior a 180 dias.

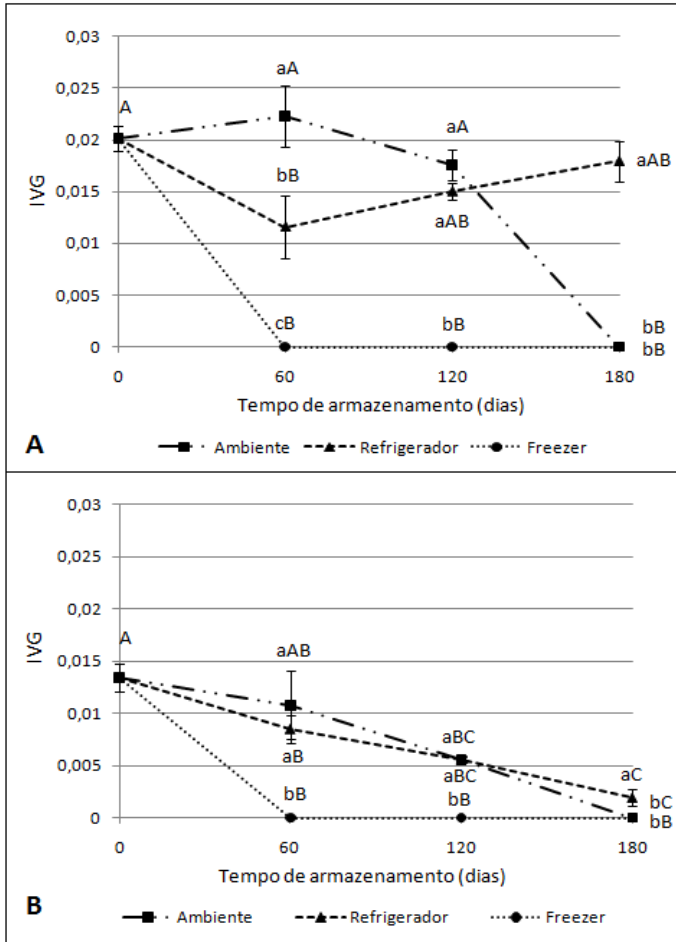


Figura 2.2 – Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de sementes de *Araucaria angustifolia* recém-colhidas e ao longo do armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C), não envelhecidas (A) e envelhecidas artificialmente (B), ao longo do período de armazenamento. As letras referem-se ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), sendo: maiúsculas – comparação entre tempos de armazenamento; minúsculas – comparação entre condições de armazenamento. \*O valor obtido pelo IVG foi dividido pelo número de sementes por repetição.

Além disso, os resultados obtidos sugerem a eficiência do envelhecimento artificial para antecipar os valores de viabilidade das sementes mantidas em condições naturais, uma vez que as sementes

submetidas ao envelhecimento artificial imediatamente após a colheita (65%) apresentaram viabilidade significativamente similar às aquelas envelhecidas naturalmente após 60 dias de armazenamento em refrigerador (54%) e em ambiente sem controle térmico (71%) (Tabela 2.1).

Além do envelhecimento artificial, outro importante teste na avaliação do vigor das sementes durante o envelhecimento natural no armazenamento refere-se ao índice de velocidade de germinação, o qual diferiu entre as condições já nos primeiros 60 dias de armazenamento (Figura 2.2A). O IVG das sementes imediatamente após a colheita foi de 0,02 por semente, não diferindo apenas daquelas sementes armazenadas em ambiente sem controle térmico por 60 dias. Aos 120 dias de armazenamento não houve diferença significativa entre o IVG das sementes armazenadas em refrigerador (0,018) e em ambiente (0,015). Entretanto, com o avanço do período de armazenamento, houve acentuado decréscimo no IVG das sementes armazenadas em ambiente, em contraste com as amostras armazenadas em refrigerador que permaneceram com valores próximos a 0,02. Portanto, a perda de vigor, avaliado através do IVG das sementes durante o armazenamento, precede a perda de viabilidade das mesmas.

As sementes recém-colhidas após o envelhecimento artificial apresentaram um IVG de 0,013 por semente, equivalente ao observado para as sementes não envelhecidas artificialmente, após 120 dias de armazenamento em refrigerador e em ambiente sem controle térmico (Figura 2.2A e 2.2B). A análise do IVG das sementes após envelhecimento artificial demonstrou que o vigor destas, sob condições de armazenamento em refrigerador, mesmo com valores baixos, se manteve superior ( $P < 0,05$ ) às amostras armazenadas no ambiente sem controle térmico, sugerindo que as sementes armazenadas em refrigerador se mantiveram mais vigorosas ao longo dos 180 dias de armazenamento. Este resultado é importante, pois refere-se à capacidade de estabelecimento das sementes em condições de campo (FONTES et al., 2001).

O teste de condutividade elétrica foi utilizado para corroborar as demais análises de vigor das sementes durante o armazenamento, uma vez que o início do processo de deterioração é caracterizado pela desestruturação do sistema de membranas celulares (SANTOS et al., 2005). A condutividade elétrica foi monitorada a cada 2 horas até um tempo final de 24 horas (Figura 2.3A). O tempo de 12 horas de embebição promoveu a menor taxa de lixiviação de solutos, ou seja,

houve estabilização na condutividade, permitindo a comparação entre todas as condições de armazenamento.

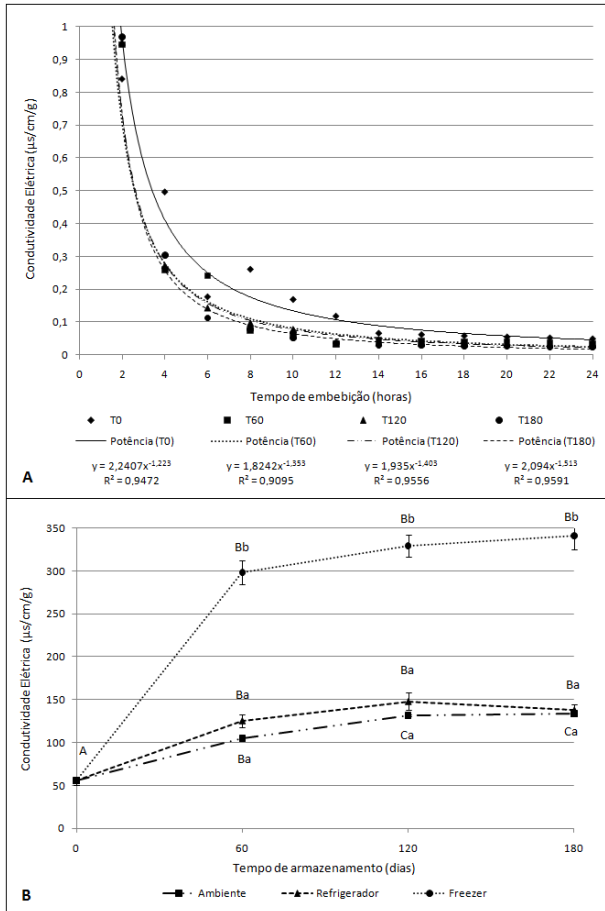


Figura 2.3 – Taxa média de solutos com base nas leituras da condutividade elétrica de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do armazenamento nas diferentes condições (A); Condutividade elétrica (µS/cm/g) de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C), após 12 horas de embebição em água ultrapura (B). As letras referem-se ao teste de Tukey (P<0,05), sendo: maiúsculas – comparação entre tempos de armazenamento; minúsculas – comparação entre condições de armazenamento. Onde: T0 – recém colhidas; T60 – aos 60 dias de armazenamento; T120 – aos 120 dias de armazenamento; T180 – aos 180 dias de armazenamento.

Com o decorrer do tempo de armazenamento, observou-se um aumento na lixiviação de solutos, sendo que, particularmente para as amostras armazenadas no freezer, a lixiviação foi superior, chegando ao valor de 341  $\mu\text{s/cm/g}$  aos 180 dias de armazenamento (Figura 2.3B). Este fato indica que a formação de gelo pode ter provocado a desagregação das células do embrião, pois, em tecidos vegetais, a formação de gelo causa a ruptura mecânica não somente da membrana celular, mas também da estrutura citoplasmática, em função das tensões e da expansão da água congelada, resultando na desagregação celular (ANDRADE; PEREIRA 1997; WOLFE; BRYANT, 1999; SANTOS, 2000). A estabilidade da membrana plasmática, em especial, é a mais importante para a sobrevivência da célula durante o congelamento, pois ela é a principal interface entre o meio extracelular e o citoplasma, agindo como uma barreira semipermeável (SANTOS, 2000).

Já os embriões de sementes armazenadas em refrigerador e ambiente mantiveram condutividades elétricas muito semelhantes até o tempo de 180 dias. Desta forma, o teste de condutividade elétrica não foi sensível para detectar diferenças de vigor entre as sementes armazenadas em ambiente e em refrigerador aos 60, 120 e 180 após a colheita. Assim, a aplicação do teste de condutividade elétrica para sementes de araucária pode ser indicada para detectar graus baixos ou elevados de deterioração, sendo menos sensível para detectar graus intermediários de deterioração.

Já o teste de tetrazólio, método alternativo sugerido pelas RAS (BRASIL, 2009) para análise da viabilidade das sementes de araucária, já foi utilizado com sucesso por outros autores na avaliação da viabilidade de sementes da espécie (SOROL; PÉREZ, 2001; MEDEIROS; ABREU, 2007; OLIVEIRA et al., 2009). Neste trabalho, o teste de tetrazólio demonstrou que o armazenamento em geladeira foi superior na manutenção da viabilidade das sementes ao longo do período de armazenamento em relação às demais condições (Figura 2.4). Aos 180 dias de armazenamento, as sementes conservadas em refrigerador apresentaram 57% de viabilidade, enquanto aquelas em ausência de controle térmico e em freezer apresentaram perda total de viabilidade.

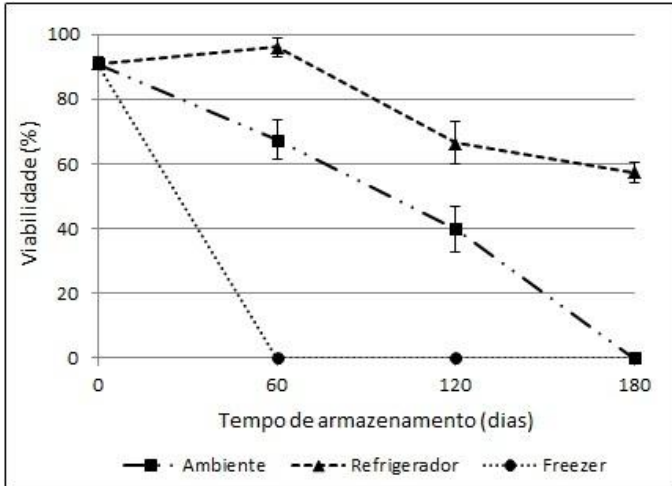


Figura 2.4 – Percentual de sementes viáveis de *Araucaria angustifolia* no teste de tetrazólio ao longo do armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C). As letras referem-se ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), sendo: maiúsculas – comparação entre tempos de armazenamento; minúsculas – comparação entre condições de armazenamento.

O resultado de viabilidade pelo teste de tetrazólio apresentou correlação positiva com os resultados obtidos pelo teste de germinação, sendo mais sensível na detecção das diferenças de viabilidade, pois as sementes armazenadas em geladeira apresentaram viabilidade significativamente diferente em relação às demais condições em todos os tempos de armazenamento.

## 2.4 CONCLUSÕES

As sementes de araucária apresentaram menor redução na viabilidade e vigor quando armazenadas sob temperatura próxima a 5 °C, na condição de armazenamento em refrigerador. A umidade das sementes foi mantida a níveis superiores aos considerados críticos para araucária nas condições de armazenamento estudadas até o tempo de 180 dias de armazenamento, o que permite concluir que a umidade não foi um fator preponderante à perda de vigor e viabilidade das sementes daquela espécie.

A aplicação do teste de condutividade elétrica para embriões de *A. angustifolia* pode ser indicada para detectar graus baixos ou elevados

de deterioração, sendo menos sensível para detectar graus intermediários de deterioração.

## 2.5 REFERÊNCIAS BICLIOGRÁFICAS

AMARANTE, C. V. T. et al. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 346-351, 2007.

ANDRADE, A. C. S.; PEREIRA, T. S. Comportamento de armazenamento de sementes de palmiteiro (*Euterpe edulis* Mart.). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, p. 987-991, 1997.

BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Efeito da temperatura de secagem sobre o poder germinativo de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 2, p. 27- 56, 1981.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa N. 6, de 26 de setembro de 2008. **Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção, 2008**. Disponível em: <(http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao6.pdf)> Acesso em: 14 de maio de 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

CAÇOLA, Á. V. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 391-398, 2006.

EIRA, M. T. S. et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 1994.

EPAGRI/CIRAM. Atlas climatológico do estado de Santa Catarina. Disponível em: <(http://www.ciram.epagri.rct-sc.br)> Acesso em: 20 de junho de 2011.

FARJON, A. 2006. *Araucaria angustifolia*. In: IUCN – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2011. **IUCN red list of threatened species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/32975/0>> Acesso em: 4 de junho de 2011.

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, A. C. Fisiologia e citogenética de sementes envelhecidas de *Araucaria angustifolia*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 2, p.346-355, 2001.

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A.; ZANON, A. **Conservação de sementes de pinheiro-do-paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens**. Colombo: EMBRAPA/CNPQ, Comunicado Técnico, n. 34, p.1-4, 1998.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2002. v. 1. 368 p.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MEDEIROS, A. C. S.; ABREU, D. C. A. de. Desidratação ultra-rápida de embriões. **Pesquisa Florestal Brasileira**, n. 54, p. 119-125, 2007.

MOREIRA-SOUZA, M.; CARDOSO, E. J. B. N. Practical method for germination of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. Seeds. **Scientia Agricola**, v. 60, n. 2, p. 389-391, 2003.

OLIVEIRA, L. M. et al. Tetrazolium test in *Araucaria angustifolia* seeds. In: XIII Congresso Florestal Mundial, 2009, Buenos Aires. XIII Congresso Florestal Mundial, 2009.

PIRIZ CARRILLO, V. et al. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 411-421, 2003.

RAMOS, A.; CARNEIRO, J. G. A. Alterações fisiológicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. armazenadas após secagem



em estufa. In: Congresso Florestal do Paraná, 1988, Curitiba. **Anais...** Curitiba, 1988. p. 628-643.

RAMOS, A.; CARNEIRO, J. G. A. Envelhecimento artificial de sementes do pinheiro do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 26, p. 19-24, 1991.

SANTOS, C. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Modificações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 27, n. 1, p. 104-114, 2005.

SANTOS, I. R. I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 70-84, 2000.

SAS. **SAS Institute Inc® 2003**. Cary, NC, USA, Lic. UDESC: SAS Institute Inc, 2003.

SOROL, C. B.; PEREZ, M. A. Determinacion de la viabilidad de las semillas de araucaria (*Araucaria angustifolia* Bert. O. Ktze.) através de la prueba topográfica por tetrazolio. In: Congresso Brasileiro de Sementes, 2001, Curitiba. **Anais...** Informativo ABRATES: Curitiba, v. 11, n. 2, p. 287, 2001.

STEPONKUS, P. L.; WEBB, M. S. Freeze-induced dehydration and membrane destabilization in plants. In: SOMERO, G. N.; OSMOND, C. B.; BOLIS, C. L. (Eds.). **Water and life: comparative analysis of water relationships at the organismic, cellular and molecular level**. Berlin: Springer-Verlag, 1992, p. 338-362.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of Araucaria seed. **Annals of Applied Botany**, v. 105, n. 3, p.581-586, 1984.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Freezing, drying, and/or vitrification of membrane- solute-water systems. **Cryobiology**, v. 39, p. 103-129, 1999.



### ***CAPÍTULO 3***



## **ALTERAÇÕES NOS COMPOSTOS DO METABOLISMO NO MEGAGAMETÓFITO E EM EMBRIÕES DE SEMENTES ARMAZENADAS DE *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**

### **3.1 INTRODUÇÃO**

As reservas acumuladas durante o desenvolvimento da semente influenciam diretamente o vigor e o potencial de armazenamento (CARVALHO; NAKAGAWA, 1980; FLORIANI, 2004), pois são fundamentais para a manutenção da viabilidade celular durante períodos de mais baixa atividade metabólica, além de determinar os procedimentos pós-colheita mais adequados à manutenção de tal potencial (MARCOS FILHO, 2005). Portanto, o processo de deterioração das sementes é acompanhado por mudanças bioquímicas, as quais afetam o fornecimento da energia necessária à germinação.

As sementes de araucária perdem rapidamente o seu potencial fisiológico após a colheita, pois são recalcitrantes (TOMPSETT, 1984; FARRANT et al., 1989; EIRA et al., 1994; ESPÍNDOLA et al., 1994). Mas, a longevidade das sementes depende, em parte, das condições de armazenamento, as quais devem ser conduzidas de maneira a reduzir ao máximo sua atividade metabólica, desacelerando o processo de deterioração. Durante o armazenamento das sementes de araucária, as alterações na qualidade fisiológica estão ligadas às diversas alterações bioquímicas, que podem ser observadas logo nos primeiros meses de armazenamento.

Alguns autores estudaram a composição química das sementes de araucária, as quais podem apresentar de 5 a 9% de proteínas, 68 a 79% de carboidratos e 73% a 88% de amido (RAMOS, 1987; RAMOS; SOUZA, 1991; PIRIZ CARRILLO et al., 2003; HELM et al., 2005; LEITE et al., 2008; ACORSI et al., 2009; CAPELLA et al., 2009). Contudo, poucos foram os trabalhos avaliando as possíveis alterações nestes metabólitos em função do envelhecimento natural das sementes no armazenamento, como o de Piriz Carrillo et al. (2003), que avaliaram as alterações no teor de amido ao longo do armazenamento refrigerado por 24 meses.

Cada um dos compostos do metabolismo das sementes desempenha uma função, que pode ser vital ao desenvolvimento do eixo embrionário ou de outras regiões da semente. Assim, os carboidratos de reserva solúveis e de parede celular atuam nos mecanismos de embebição de água e na proteção do embrião contra o dessecamento e o ataque de patógenos, tornando-se fundamentais para a manutenção da

viabilidade da semente durante o armazenamento (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998).

Durante a deterioração das sementes é comum ocorrer um decréscimo no teor de carboidratos solúveis totais, o que pode provocar a perda na capacidade de mobilização e utilização destes metabólitos, resultando em queda da capacidade germinativa e do vigor das sementes (MARCOS FILHO, 2005). Em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil), por exemplo, os conteúdos de carboidratos solúveis e amido decrescem durante o armazenamento (HELLMANN et al., 2008). Entretanto, tem sido relatado que a perda de viabilidade das sementes de araucária ao longo do envelhecimento artificial é acompanhada pelo aumento no teor de carboidratos totais, e este aumento é resultante da degradação do amido, cujo teor decresce durante o envelhecimento artificial (RAMOS; CARNEIRO, 1991) e durante o envelhecimento natural no armazenamento (RAMOS; SOUZA, 1991). Portanto, os trabalhos referenciados apresentam controvérsias em relação à alteração no teor de carboidratos totais durante o envelhecimento das sementes.

As alterações no metabolismo de compostos durante a deterioração das sementes também podem refletir na alteração do teor de proteínas. Em geral, ocorre decréscimo no teor de proteínas durante a deterioração de sementes (MARCOS FILHO, 2005). Porém, não foi constatada uma relação entre o teor de proteínas e a perda de viabilidade das sementes de araucária durante o armazenamento (RAMOS; SOUZA, 1991).

Os conhecimentos disponíveis sobre a composição química de uma semente, na maioria dos casos, se restringem ao seu uso como alimento. Considerando a atual situação da araucária, a qual está classificada pela IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais) como criticamente ameaçada (FARJON, 2006), torna-se necessário gerar alternativas para a sua conservação, e o entendimento da alteração na composição química em função das condições de armazenamento pode gerar informações importantes no aspecto de disponibilidade e conservação das sementes ao longo do tempo. Neste sentido, a aplicação de técnicas rápidas de caracterização dos metabólitos das sementes tem despertado o interesse cada vez maior dos pesquisadores e, sob condições experimentais controladas, geram resultados que permitem o entendimento da dinâmica de uso destes compostos como agentes na manutenção da viabilidade e longevidade das sementes como é o caso da espectroscopia vibracional de infravermelho médio.

A espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) se destaca na análise de compostos em geral, devido à sua sensibilidade e rapidez na obtenção dos resultados. Através desta técnica, a capacidade de absorção da radiação eletromagnética de comprimento de onda na faixa do infravermelho permite caracterizar os grupos funcionais das biomoléculas (KUHNNEN, 2007). Cada biomolécula, portanto, possui uma região de absorção característica, conhecida como a sua identidade estrutural. Desta forma, os espectros obtidos permitem a identificação de grupos de metabólitos e a análise comparativa de amostras (DÉLÉRIS; PETIBOIS, 2003; CERNÁ et al., 2003).

Assim, objetivou-se analisar o metabolismo dos principais metabólitos de reserva localizados no tecido do megagametófito e o perfil de metabólitos por espectroscopia vibracional de infravermelho, associado ao teor de proteína dos embriões nos diferentes tempos e condições de armazenamento das sementes de araucária.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

As sementes maduras de araucária foram coletadas no município de Paineira (27°55' de latitude sul, 50°06' de longitude oeste e altitude média de 1144 metros), no planalto sul de Santa Catarina. Após a coleta, a amostra de sementes foi homogeneizada e obteve-se a amostra de trabalho, de onde retirou-se uma fração para cada condição de armazenamento: em ambiente de laboratório sem controle térmico, em refrigerador (5 °C), ou em freezer (-18 °C), em embalagens plásticas transparentes vedadas, com diâmetro de porosidade de 0,015 µm. Para o período de armazenamento das amostras no ambiente de laboratório, as variações de temperatura e umidade relativa foram de -3 °C e 33%, até 30 °C e 99%, respectivamente, com temperatura e umidade relativa médias de 15 °C e 80% entre os meses de julho e dezembro de 2010 (EPAGRI/CIRAM, 2011).

A cada 60 dias, ao acaso, as amostras de trabalho de sementes armazenadas nas diferentes condições citadas tiveram seus embriões cuidadosamente separados manualmente dos tecidos do megagametófito. As amostras de embriões foram utilizadas para as análises do teor de proteínas solúveis totais e para a caracterização dos compostos por espectroscopia vibracional de infravermelho médio, enquanto que as amostras do megagametófito foram utilizadas para as análises do teor de carboidratos solúveis totais e de amido. Tais avaliações foram realizadas em sementes recém-colhidas, e em

intervalos de 60 dias durante o armazenamento nas condições anteriormente descritas, ao longo de um período amostral de 180 dias.

Testes preliminares foram conduzidos para a análise do teor de proteínas totais, com as metodologias descritas por De Mot e Vanderleyden (1989), Steiner (2005) e Santos et al. (2010), para a determinação do protocolo mais adequado à biomassa em estudo, tendo como referência a eficiência do rendimento de extração de proteínas totais em amostras de embriões de araucária. Para os experimentos, utilizou-se a metodologia de Steiner (2005), com adaptações, em que amostras de 100 mg de biomassa fresca foram maceradas com auxílio de nitrogênio líquido e extraídas com tampão de extração composto de 20 mM de fosfato de sódio dibásico (pH 7,5), 1 mM de EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), 50 mM de NaCl, 10% de Glicerol (v/v), 1 mM de PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil) e 1,5% de  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v). Após centrifugação a 4000 rpm, a 4 °C, por 25 minutos, as proteínas totais foram precipitadas com a presença de dois volumes de álcool etílico absoluto para cada volume de sobrenadante, com posterior armazenamento a 4 °C, por 50 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, a 4 °C, por 35 minutos. O sobrenadante foi descartado e as proteínas totais ressuspendidas em solução de 20 mM de fosfato de sódio dibásico (pH 7,5). Os teores de proteínas solúveis totais das amostras foram quantificados espectrofotometricamente pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão (BSA 0 – 800  $\mu$ g/mL,  $R^2 = 0,9845$ ,  $y = 2078,7x - 29,82$ ). As análises foram realizadas a partir de quatro repetições.

As extrações dos carboidratos solúveis totais e do amido foram realizadas a partir da metodologia descrita por McCready et al. (1950), utilizando o tecido do megagametófito das sementes, uma vez que esta é a principal região da semente de araucária no fornecimento de nutrientes para a retomada do desenvolvimento do eixo embrionário durante a germinação. A extração dos carboidratos solúveis foi realizada a partir de 1 g de biomassa fresca, macerada em gral e pistilo, seguida pela extração tripla com auxílio de álcool etílico 80%, em banho-maria por 5 minutos. Após centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm, as amostras foram filtradas e os sobrenadantes coletados para quantificação dos carboidratos solúveis totais. Ao resíduo, adicionou-se 2 mL de água destilada gelada e 2,6 mL de ácido perclórico 52%, para extração do amido. Após adição de 4 mL de água, centrifugaram-se as amostras a 10000 rpm por 15 minutos, e o sobrenadante foi decantado em proveta, em banho de gelo. Ao resíduo, nova extração foi realizada com 1 mL de



água e 1,3 mL de ácido perclórico 52%. Decantou-se o sobrenadante após centrifugação por 10 minutos a 10000 rpm. As frações de amido foram unidas e filtradas em lã de vidro, procedendo-se a quantificação.

Os carboidratos solúveis totais e o amido foram quantificados através de análise colorimétrica, pelo método fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), tendo D-glucose como padrão (Glucose 0 – 100  $\mu\text{g/mL}$ ,  $R^2 = 0,9873$ ,  $y = 0,0214x + 0,0839$ ). Para o procedimento, alíquotas das amostras foram adicionadas a 0,5 mL de fenol 5% e 2,5 mL de ácido sulfúrico, sendo completadas com água destilada para 3,5 mL, com posterior leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro na faixa de 490 nm. As análises foram realizadas a partir de quatro repetições.

As análises de espectroscopia vibracional de infravermelho médio (FT-IR) foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Catarina. Amostras de embriões integrais (biomassa fresca) de araucária foram analisadas em espectrômetro de infravermelho, modelo Bruker IFS 55, equipado com sistema de ATR de reflexão única (Golden Gate), em matriz de brometo de potássio. Coletaram-se 128 varreduras/amostra, em janela espectral de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ . Os espectros foram normalizados e corrigidos para a linha de base na região de interesse (3000 a 600  $\text{cm}^{-1}$ ), e processados com auxílio do programa OPUS (Bruker Biospin, versão 5.0). As análises foram realizadas em triplicata.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas no tempo, sendo três condições de armazenamento (ambiente, refrigerador e freezer) e quatro períodos de armazenamento (0, 60, 120 e 180 dias). A análise dos resultados foi realizada através de análise de correlação e variância com teste de Tukey para separação de médias, a 5% de probabilidade, através do programa estatístico SAS (2003), à exceção dos resultados obtidos espectroscopicamente. O conjunto de dados totais dos espectros processados foi submetido à análise estatística multivariada, através da aplicação dos métodos de componentes principais (PCAs), com auxílio do pacote estatístico The Unscrambler 9.1.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de proteínas solúveis totais armazenado nas sementes de araucária apresentou diferenças significativas ao longo do tempo de armazenamento (Figura 3.1). O teor protéico inicial das amostras de embriões era de 248  $\text{mg.g}^{-1}$ , e foi reduzido significativamente nas

amostras mantidas em ambiente sem controle térmico e em refrigerador ao longo do tempo de armazenamento. Em relação ao teor protéico apresentado pelas amostras recém-colhidas, detectou-se uma redução de 9 ordens de magnitude e 3 ordens de magnitude, respectivamente para os tratamentos de armazenamento em ambiente sem controle térmico e refrigerador. Já o armazenamento na condição de freezer manteve o teor de proteínas solúveis das amostras, pois não se observaram alterações significativas ( $P < 0,05$ ) no teor protéico ao longo do período amostral.

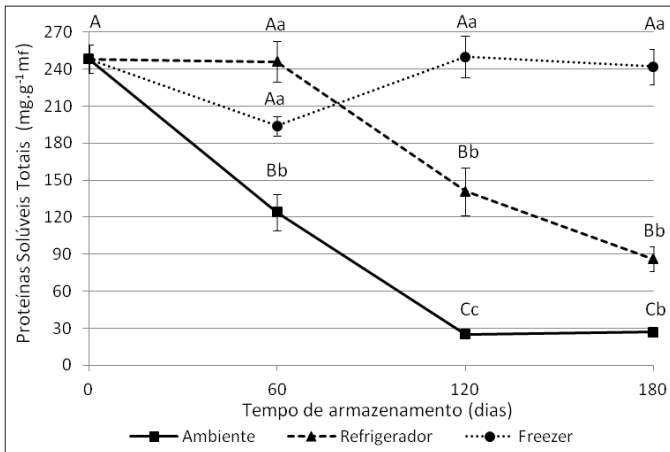


Figura 3.1 – Teor protéico ( $\text{mg.g}^{-1}\text{mf}$ ) de embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico ( $-3$  a  $30$  °C), refrigerador ( $5$  °C) e freezer ( $-18$  °C). As letras referem-se ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), sendo: maiúsculas – comparação entre períodos de armazenamento; minúsculas – comparação entre condições de armazenamento.

O teor protéico dos embriões de sementes recém-colhidas de araucária é acumulado especialmente nas fases finais da embriogênese (SILVEIRA et al., 2008). Entretanto, o conteúdo de proteínas na semente está sujeito a alterações decorrentes do armazenamento. A redução observada no teor de proteínas das sementes armazenadas em refrigerador ( $5$  °C) contradiz o resultado observado por Ramos e Souza (1991), onde, após armazenamento por 180 dias à  $5$  °C, não houve redução significativa no teor de proteínas das sementes. Tem sido relatado que diversos fatores, tais como o genótipo e as condições ambientais, podem influenciar a composição química das sementes (MARCOS FILHO, 2005).

O armazenamento em freezer demonstrou ser a condição mais adequada à manutenção do teor protéico das amostras de embriões zigóticos de araucária, em comparação ao refrigerador e ao ambiente sem controle térmico. O teor de proteínas não modificou significativamente ao longo do período de armazenamento em freezer, mas nas amostras armazenadas em refrigerador e ambiente sem controle térmico, observou-se a hidrólise mais acentuada das proteínas, o que parece estar associado aos primeiros eventos do processo germinativo já que, sob temperaturas mais elevadas de armazenamento, a atividade metabólica das sementes se mantém acentuada.

O teor de carboidratos solúveis totais observado nas sementes de araucária recém-colhidas foi de  $803 \text{ mg.g}^{-1}$ , e não se mostrou alterado significativamente ( $P < 0,05$ ) até os 60 dias de armazenamento, independente da condição (Figura 3.2). Aos 180 dias de armazenamento, houve decréscimo no teor de carboidratos das amostras armazenadas em refrigerador ( $781 \text{ mg.g}^{-1}$ ) e em freezer ( $782 \text{ mg.g}^{-1}$ ) sem, entretanto, diferir significativamente daquele apresentado pelas sementes imediatamente após a colheita. A condição de armazenamento em ambiente sem controle térmico não foi eficiente para retardar o metabolismo das sementes de araucária e, a partir dos 60 dias de armazenamento, houve a germinação das sementes mantidas sob tais condições experimentais, com a hidrólise dos compostos de reserva do megagametófito, permitindo o desenvolvimento do embrião. Desta forma, não foi possível analisar o tecido do megagametófito quanto ao teor de carboidratos para os períodos de armazenamento de 120 e 180 dias. Em função da ausência de tecido, inferiu-se que o teor de carboidratos solúveis totais das amostras era de  $0 \text{ mg.g}^{-1}$  aos 120 e aos 180 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico.

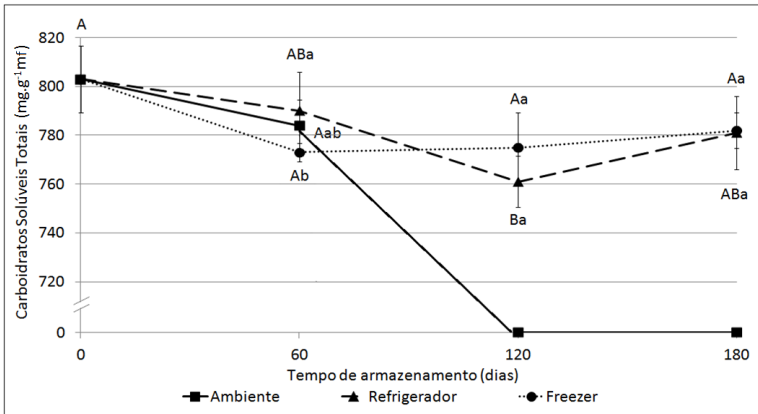


Figura 3.2 – Teor de carboidratos solúveis totais ( $\text{mg.g}^{-1} \text{mf}$ ) do megagametófito de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico ( $-3$  a  $30$  °C), refrigerador ( $5$  °C) e freezer ( $-18$  °C). As letras referem-se ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), sendo: maiúsculas – comparação entre períodos de armazenamento; minúsculas – comparação entre condições de armazenamento.

Entre os carboidratos presentes nas células do megagametófito das sementes de araucária recém-colhidas, o amido é o mais importante, representando  $586 \text{ mg.g}^{-1}$  de sua composição, o que evidencia a importância deste metabólito primário para o crescimento do eixo embrionário (Figura 3.3). Apesar de elevado, este valor foi 32% e 20% inferior ao observado pelos autores Ramos e Souza (1991) e Piriz Carrillo et al. (2003), respectivamente, o que pode ser explicado através de relatos que a composição química das sementes pode variar em função de fatores como o genótipo, o estágio de maturação, as condições climáticas do local de coleta, e a nutrição da planta-mãe (MARCOS FILHO, 2005).

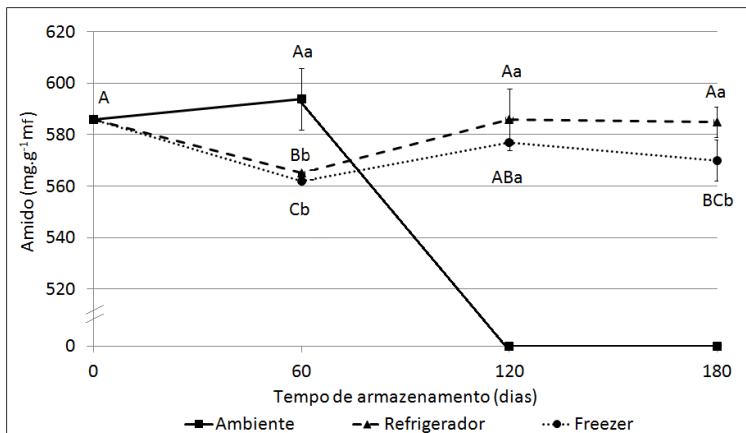


Figura 3.3 – Teor de amido ( $\text{mg.g}^{-1}$  mf) do megagametófito de sementes de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico ( $-3$  a  $30$  °C), refrigerador ( $5$  °C) e freezer ( $-18$  °C). As letras referem-se ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), sendo: maiúsculas – comparação entre períodos de armazenamento; minúsculas – comparação entre condições de armazenamento.

Analisando-se o teor de amido das amostras ao final do período experimental, observou-se que apenas as amostras armazenadas em condição de refrigerador apresentaram valores significativamente semelhantes ( $P < 0,05$ ) aos obtidos nas amostras recém-colhidas. As amostras de freezer apresentaram uma redução significativa de 3% no teor de amido aos 180 dias de armazenamento em relação às recém-colhidas. O teor de amido das amostras armazenadas em condição de ambiente sem controle térmico se manteve estável até os 60 dias de armazenamento. Após este período, houve a germinação das sementes mantidas sob tal condição experimental e não foi possível analisar o tecido do megagametófito quanto ao teor de amido para os períodos de armazenamento de 120 e 180 dias. A ausência de tecido proporcionou inferir que o teor de amido das amostras era de  $0 \text{ mg.g}^{-1}$  aos 120 e aos 180 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico.

A manutenção do teor de amido das sementes de araucária armazenadas em refrigerador ( $5$  °C) foi diferente daquela observada por outros autores, onde o armazenamento de sementes de araucária pelo período de 180 dias, sob temperatura de  $5$  °C e  $4$  °C causou uma redução no teor de amido em cerca de 23% e 12%, respectivamente (RAMOS; SOUZA, 1991; PIRIZ CARRILLO et al., 2003). Com relação ao trabalho de Ramos e Souza (1991), não há especificações sobre

possíveis variações na umidade e atividade metabólica das amostras ao longo do armazenamento e, em ambos os trabalhos, as diferentes metodologias utilizadas para a extração e quantificação do conteúdo de amido podem contribuir para as discrepâncias observadas.

A análise de correlação demonstrou relação positiva e significativa entre o teor de carboidratos solúveis totais e o teor de amido, com coeficiente de correlação de 0,99. Isto demonstra que, independente da condição e do tempo de armazenamento, os resultados obtidos pelas variáveis citadas apresentaram mesmo comportamento durante o armazenamento das sementes. Tanto os teores de carboidratos solúveis como de amido variaram em função da temperatura de armazenamento. Em ambiente sem controle térmico, em que a temperatura média foi de 15 °C, houve a digestão e assimilação de tais reservas, especialmente utilizadas como fontes de energia para a formação de paredes celulares e protoplasma, para que houvesse o desenvolvimento embrionário, uma vez que observou-se alta taxa de germinação (80%), como demonstrado no capítulo 2.

Já para as condições controladas de armazenamento, as pequenas alterações observadas nos compostos de reserva do megagametófito provavelmente são devidas à sua utilização prioritariamente como substrato respiratório, visando manter a viabilidade celular no período de baixa atividade metabólica.

Apesar de ocorrer em menor intensidade, também houve correlação positiva e significativa entre o teor de proteínas (embrião) e o teor de carboidratos solúveis totais (megagametófito), com coeficiente de correlação de 0,78, e o teor de proteínas e o teor de amido das amostras, com coeficiente de correlação de 0,75. Visto que o teor de proteínas foi analisado a partir do tecido do embrião e os teores de carboidratos solúveis e amido foram analisados a partir do tecido do megagametófito, este resultado demonstra que os diferentes tecidos apresentaram mesmo comportamento para as diferentes variáveis, independente da condição e do tempo de armazenamento.

As alterações observadas no teor de proteínas se assemelham às alterações observadas nos teores de carboidratos e amido. No entanto, a magnitude com que as alterações ocorreram difere entre os tecidos do megagametófito e do embrião, e em função da condição de armazenamento. O decréscimo no teor de proteínas do embrião indica que a hidrólise das proteínas já iniciou, para que seus produtos sejam translocados aos pontos de crescimento do eixo embrionário para a formação dos novos tecidos, ou para as reações da cadeia respiratória que, neste caso, está em ritmo mais acelerado em relação ao

megagametófito. Talvez esta constatação remeta aos primeiros eventos da germinação, quando há o alongamento das células do eixo embrionário, sem que haja o acúmulo de matéria seca. Quanto mais elevada a temperatura de armazenamento, maior a velocidade com que tais alterações ocorrem.

A combinação de diversas técnicas analíticas constitui uma estratégia de interesse quando se busca otimizar a determinação dos perfis metabólicos de materiais em estudo. Assim, as análises dos espectros de FT-IR e dos componentes principais podem auxiliar a determinação do perfil metabólico e da similaridade de composição macromolecular das amostras de embriões zigóticos de araucária.

No perfil espectral de FT-IR são coletados os sinais de grupamentos funcionais, os quais podem ser correlacionados com grande precisão à presença de determinadas classes de metabólitos, gerando informações sobre a composição química das amostras. Ao analisar a composição das amostras através dos espectros de FT-IR obtidos, observou-se, em média, 19 a 22 picos relevantes situados na janela espectral entre  $3000 - 600 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 3.4). Tais picos demonstraram as variações entre as amostras quanto à presença dos compostos em função da condição e do período de armazenamento.





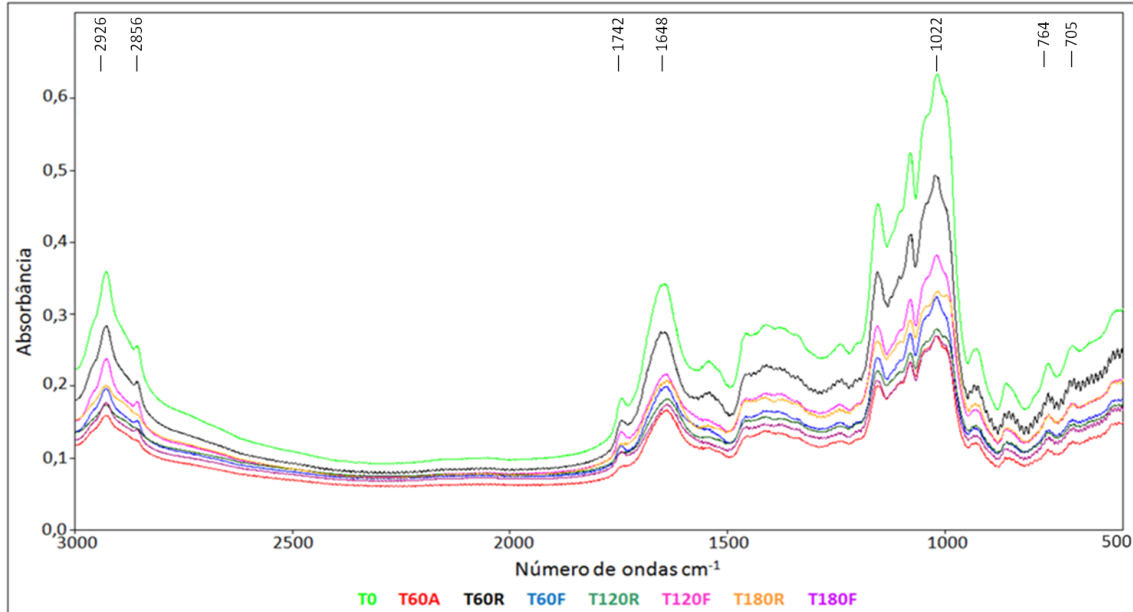


Figura 3.4 – Espectros de FT-IR (3000 – 600  $\text{cm}^{-1}$ ) de amostras de embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C). Onde: T0 – recém colhidas; T60A – aos 60 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico; T60R – aos 60 dias de armazenamento em refrigerador; T60F – aos 60 dias de armazenamento em freezer; T120R – aos 120 dias de armazenamento em refrigerador; T120F – aos 120 dias de armazenamento em freezer; T180R – aos 180 dias de armazenamento em refrigerador; T180F – aos 180 dias de armazenamento em freezer.



A região situada entre  $1200 - 950 \text{ cm}^{-1}$  é considerada identidade dos carboidratos (CERNÁ et al., 2003), que podem absorver até a região de  $800 \text{ cm}^{-1}$  (KUHNEN et al., 2010). Bandas de absorção entre  $1300 - 800 \text{ cm}^{-1}$  apareceram em todos os espectros. Nesta região espectral de infravermelho, as bandas resultam, principalmente, de deformações axiais das ligações C-O, C-C e C-O-C e da presença de grupos COH (SCHULZ; BARANSKA, 2007; KUHNEN et al., 2010). Tais formas vibracionais estão relacionadas com a estrutura de polissacarídeos amiláceos (RUBENS et al., 1999), onde foram observadas as bandas de maior intensidade para as amostras de embriões de araucária (Figura 3.4). Portanto, tais bandas derivam de absorbâncias oriundas dos constituintes amídicos, e.g., amilose ( $1022 \text{ cm}^{-1}$ ) e amilopectina ( $1016 \text{ cm}^{-1}$ ).

Os constituintes protéicos, por sua vez, podem ser visualizados em função da presença de bandas resultantes de deformações axiais do grupo C=O e deformações angulares do grupo  $\text{NH}_2$ , relativas às aminas (LAMBERT, 2001; SCHULZ; BARANSKA, 2007). Estes constituintes podem ser visualizados pela presença de bandas em, aproximadamente,  $1650$  e  $1550 \text{ cm}^{-1}$  (LAMBERT et al., 2001; SCHULZ; BARANSKA, 2007), ou simplesmente de bandas entre  $1650 - 1500 \text{ cm}^{-1}$  (KUHNEN et al., 2010). Portanto, verificou-se a presença dos constituintes protéicos nas amostras de embriões de araucária através da presença das bandas em  $1648 \text{ cm}^{-1}$  (Figura 3.4).

A presença de lipídios, verificada através de grupos carboxílicos, associada à deformação axial do grupo funcional C=O, tipicamente encontrados em ácidos graxos, pode ser detectada pela existência de bandas em, aproximadamente  $1740 \text{ cm}^{-1}$  e  $1440 \text{ cm}^{-1}$  (SILVERSTEIN, 1994; SCHULZ; BARANSKA, 2007). A presença de ácidos graxos também pode ser constatada pelos sinais entre  $3000 - 2800 \text{ cm}^{-1}$ , ligados à deformação axial e angular do grupo metil ( $-\text{CH}_3$ ) e/ou metileno ( $\text{CH}_2$ ) (LAMBERT, 2001; KUHNEN et al., 2010). A análise das amostras de embriões de araucária demonstra a presença dos constituintes lipídicos, que pode ser visualizada (Figura 3.4) pela presença de bandas em  $2926 \text{ cm}^{-1}$ ,  $2856 \text{ cm}^{-1}$  e  $1742 \text{ cm}^{-1}$ .

A existência de bandas entre  $900 - 690 \text{ cm}^{-1}$  sugere a presença de compostos com anéis aromáticos em sua estrutura, tais como os de origem (poli)fenólica, os quais podem ser resultantes de deformações da ligação  $=\text{CH}$  de compostos aromáticos (LAMBERT et al., 2001). Analisando-se a Figura 3.4, percebe-se diversos sinais nesta faixa espectral, relacionados à presença de constituintes fenólicos nas amostras em estudo. Já as bandas existentes em  $1140 - 1150 \text{ cm}^{-1}$

podem identificar a presença de terpenóides (SCHULZ; BARANSKA, 2007; UARROTA, 2011).

Assim, os resultados observados demonstram a ocorrência de sinais típicos de compostos de natureza protéica, lipídica, fenólica e glicídica, neste caso majoritariamente amido.

Os perfis espectrais (Figura 3.4), usualmente, apresentam informações que não são observadas via análise visual. Assim, a identificação de alguns sinais, especialmente aqueles de menor intensidade, e a diferenciação entre as amostras podem ser dificultadas em função das semelhanças estruturais por elas apresentadas e da complexidade dos espectros. Portanto, na intenção de analisar comparativamente o conjunto de perfis espectrais e otimizar a extração de informações a partir dos dados coletados, aplicou-se a análise multivariada através da determinação dos componentes principais (PCA).

A análise quimiométrica através da aplicação de componentes principais neste estudo para fins de análise do perfil metabólico revelou uma clara discriminação das amostras, a partir do cálculo dos componentes principais 1 (PC1) e 2 (PC2), conforme demonstrado na Figura 3.5. A maior parte dos dados pode ser explicada pelo componente PC1 (99%), comparativamente ao PC2 (1%). A análise dos componentes no presente estudo foi eficiente para explicar 100% da variância presente nos dados espectrais de FT-IR observados.

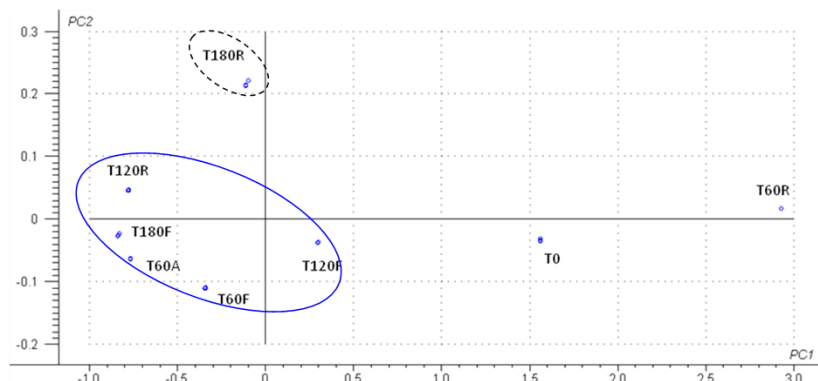


Figura 3.5 – Distribuição fatorial de PC1 e PC2 para os dados espectrais de FT-IR ( $3000 - 600 \text{ cm}^{-1}$ ) de amostras de embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C). Onde: T0 – recém colhidas; T60A – aos 60 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico; T60R – aos

60 dias de armazenamento em refrigerador; T60F – aos 60 dias de armazenamento em freezer; T120R – aos 120 dias de armazenamento em refrigerador; T120F – aos 120 dias de armazenamento em freezer; T180R – aos 180 dias de armazenamento em refrigerador; T180F – aos 180 dias de armazenamento em freezer.

Através da determinação de PCA, pode-se perceber que as amostras coletadas aos 60, 120 e 180 dias diferiram em sua composição em relação às amostras controle (recém-colhidas), independente da condição de armazenamento. A análise do perfil espectral e das contribuições fatoriais em PC1 evidenciou que os sinais em  $1021\text{cm}^{-1}$ ,  $1649\text{cm}^{-1}$  e  $2930\text{cm}^{-1}$  foram determinantes para a separação amostral observada, revelando as alterações na composição química das sementes ao longo do período de armazenamento, comparativamente ao controle.

Desta forma, pode-se perceber que o armazenamento das sementes de araucária em ambas as condições de ambiente sem controle térmico, refrigerador e freezer resultou em alterações no perfil metabólico, apresentando constituições químicas diferentes daquela observada nas amostras imediatamente após a colheita. Tais alterações resultaram de diferenças estruturais conferidas especialmente pela presença das classes de compostos: carboidratos representados pelo amido (sinais em  $1021\text{cm}^{-1}$ ), proteínas (sinais em  $1649\text{cm}^{-1}$ ) e lipídios (sinais em  $2930\text{cm}^{-1}$ ).

A análise da Figura 3.5 revela um padrão de agrupamento para as amostras nos períodos intermediários de armazenamento (60 e 120 dias), implicando em menores discrepâncias metabólicas entre tais materiais. Em contraponto, eles diferem das amostras dos tratamentos T60R, T180R e T0. Tal agrupamento sugere que as amostras armazenadas por 60 dias em ambiente sem controle térmico é similar, ao nível de composição metabólica, às amostras armazenadas em refrigerador por 120 dias e em freezer por 180 dias.

Além disso, a fato das amostras armazenadas em refrigerador por 120 e 180 dias (T120R e T180R) estarem ambas no mesmo quadrante (Figura 3.5) demonstra que há correlação entre tais tratamentos, os quais podem apresentar certa característica, evidenciada pelas contribuições fatoriais em PC1, que não foi observada nos demais. De fato, as análises quantitativas do teor de proteínas, carboidratos solúveis e amido não diferiram ( $P < 0,05$ ) entre tais tratamentos. As contribuições fatoriais indicam que os componentes lipídicos também contribuíram para as semelhanças amostrais observadas.

A distribuição das amostras ao longo de PC2 foi responsável por explicar apenas uma pequena parte dos dados. Tal distribuição revelou alterações na composição fenólica entre as amostras de embriões de araucária, representada pela presença de sinais em  $971\text{cm}^{-1}$ , ao longo do período experimental.

Os resultados observados associados à literatura demonstram que os carboidratos solúveis e o amido são os compostos mais importantes na constituição do megagametófito das sementes de araucária. A análise quimiométrica dos embriões foi eficiente em demonstrar que tais metabólitos também são importantes na constituição do embrião das sementes de araucária, pois os componentes glicídicos foram os mais importantes para a separação amostral observada.

Os constituintes protéicos também foram importantes para as diferenças amostrais observadas. Neste caso, uma melhor relação pode ser feita entre as análises por FT-IR e de forma quantitativa do teor de proteínas nos tecidos do embrião das sementes, já que os espectros foram normalizados em função da intensidade de sinais, a partir dos constituintes amídicos (sinal de maior intensidade), em relação ao sinal proeminente do espectro de referência (T0). A técnica de FT-IR foi eficiente em identificar a alteração metabólica no teor de proteínas, pois observou-se uma diminuição na intensidade das bandas espectrais referentes a tal constituinte, validada pela análise química quantitativa, que demonstrou uma redução no teor de proteínas das amostras com o avanço do período de armazenamento. Assim, o decréscimo observado no teor de proteínas das amostras ao longo do período amostral foi semelhante às diferenças estruturais observadas nos espectros.

A abordagem analítica através dos espectros de FT-IR permitiu detectar os perfis de maior similaridade estrutural entre as amostras armazenadas de embriões de araucária, comparativamente às recém-colhidas. Tais análises foram importantes porque revelaram a presença de proteínas, lipídios, amilose e amilopectina, e também permitiram inferir sobre a presença de compostos do metabolismo secundário, como fenólicos. Se realizadas pelos métodos tradicionais de análises dos metabólitos, como no caso das proteínas, carboidratos totais e amido, despenderiam um tempo superior de análise, com treinamentos mais refinados, e a necessidade de métodos com alta sensibilidade de detecção.

Como diversos autores já sugeriram (SCHULZ; BARANSKA, 2007; KUHNEN et al., 2010), a análise da constituição de uma amostra a partir da espectroscopia de infravermelho médio com transformadas de Fourier revelou ser vantajosa em termos do reduzido tempo de análise,

facilidade de execução, o fato de ser um método não destrutivo, a pequena quantidade de amostra necessária, a multiplicidade de análises a partir de um só espectro. Portanto, pode ser utilizada como uma técnica de análise de rotina (SIMÕES, 2008). No entanto, o ajuste dos espectros a alguns modelos matemáticos com a aplicação de técnicas multivariadas poderia agregar resultados quantitativos relevantes sobre a composição das amostras.

A utilização de métodos quimiométricos, como a análise de PCA, é de grande valia, pois facilita a análise conjunta de todas as variáveis e reduz a dimensionalidade dos dados. Os resultados mostraram que a análise exploratória (PCA) é uma ferramenta útil para tratamento dos dados em questão, pois permitiu a separação dos dados, o que não foi possível perceber apenas pela inspeção visual dos espectros.

A técnica de FT-IR permitiu fazer a caracterização e discriminação das amostras em função das regiões de absorção dos grupos funcionais, identificando os principais metabólitos presentes no embrião das sementes de araucária. A técnica de FT-IR associada à análise quimiométrica demonstrou que os constituintes amídicos também são muito importantes na constituição do embrião, não somente nos tecidos do megagametófito, onde as reservas são tipicamente acumuladas para disponibilização de nutrientes ao início do processo germinativo. Tais análises foram eficientes para demonstrar que as sementes tiveram alterações na sua composição química com o avanço do armazenamento e que o processo ocorre concomitantemente no embrião e no megagametófito.

### 3.4 CONCLUSÕES

A condição de refrigerador foi eficiente no controle da hidrólise dos metabólitos de reserva dos tecidos do megagametófito em sementes armazenadas de *Araucaria angustifolia*, mostrando ser uma alternativa viável de armazenamento das sementes ao longo do tempo de 180 dias.

Caracterizou-se a presença de compostos primários e secundários (amido, proteínas, lipídios e fenólicos) em embriões de *A. angustifolia*.

Independente da condição de armazenamento houve alterações nos metabólitos primários e secundários do embrião das sementes de *A. angustifolia* armazenadas por 180 dias.

A associação da técnica de FT-IR com a análise química quantitativa demonstrou que o teor de proteínas dos embriões reduz gradativamente ao longo do armazenamento em refrigerador e ambiente sem controle térmico nas sementes de *A. angustifolia*.

O uso da técnica de FT-IR foi eficiente para caracterizar o perfil metabólico de embriões de *A. angustifolia* ao longo do período de armazenamento das sementes, de forma simples e rápida.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACORSI, D. M. et al. Viabilidade do processamento de biscoitos com farinha de pinhão. **Ambiência**, v. 5, n. 2, p. 207-212, 2009.

BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação de sementes. **Acta Botânica Brasileira**, v. 12, p. 145-164, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.

CAPELLA, A. C. V.; PENTEADO, P. T. P. S.; BALBI, M. E. Semente de *Araucaria angustifolia*: aspectos morfológicos e composição química da farinha. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 135-142. 2009.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Campinas: Fundação Cargill, 1980. 326 p.

CERNÁ, M. et al. Use of FT-IR spectroscopy as a tool for the analysis of polysaccharide food additives. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 383-389, 2003.

DÉLÉRIS, G.; PETIBOIS, C. Applications of FT-IR spectrometry to plasma contents analysis and monitoring. **Vibrational Spectroscopy**, v. 32, p. 129-136, 2003.

DE MOT, R.; VANDERLEYDEN, J. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. **Canadian Journal of Microbiology**, n. 35, p. 960-967, 1989.

DUBOIS, M.; GILES, K. A.; HAMILTON, J. K. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.



EIRA, M. T. S. et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 1994.

EPAGRI/CIRAM. Atlas climatológico do estado de Santa Catarina. Disponível em: <(http://www.ciram.epagri.rct-sc.br)> Acesso em: 20 de junho de 2011.

ESPINDOLA, L. S. et al. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. **Seed Science Research**, v. 4, n. 2, p. 193-201, 1994.

FARJON, A. 2006. *Araucaria angustifolia*. In: IUCN – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <(http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/32975/0)> Acesso em: 5 de novembro de 2011.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds – a study on three unrelated species. **Planta**, v. 178, n. 2, p. 189-198, 1989.

FLORIANI, E. P. Armazenamento de sementes florestais. In: HOPPE, J. M. **Produção de sementes e mudas florestais**. Santa Maria, UFSM, 2004. p. 82-92.

HELLMANN, M. E. et al. Variações dos carboidratos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas. **Hoehnea**, v. 35, n. 2, p. 255-264, 2008.

HELM, C. V.; FACCIN, M.; SANTOS, M. C. A. Elaboração de massa alimentícia enriquecida com farinha de pinhão (*Araucaria angustifolia*). **Revista UnicenP de Biologia e Saúde**, v. 1, n. 4, p. 29-30, 2005.

KUHNEN, S. Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* L.). Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

KUHNEN, S. et al. ATR-FTIR spectroscopy and chemometric analysis applied to discrimination of landrace maize flours produced in southern

Brazil. **International Journal of Food and Technology**, v. 45, p. 1673-1681, 2010.

LAMBERT, J. B. et al. **Organic Structural Spectroscopy**. Prentice Hall: Upper Saddle River, 2001, 568 p.

LEITE, D. M. C. et al. Nutritional evaluation of *Araucaria angustifolia* seed flour as a protein complement for growing rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p. 1166-1171, 2008.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

McCREADY, R. M. et al. Determination of starch and amylase in vegetables. **Analytical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 1156-1158. 1950.

PIRIZ CARRILLO, V. et al. Refrigerated storage of seeds of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze over a period of 24 months. **Seed Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 411-421, 2003.

RAMOS, A. Deterioração de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert) O. Ktze. em envelhecimento natural e artificial e sua influência na produção de mudas. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1987.

RAMOS, A.; CARNEIRO, J. G. A. Envelhecimento artificial de sementes do pinheiro do Paraná. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, n. 26, p. 19-24, 1991.

RAMOS, A.; SOUZA, G. B. Utilização das reservas alimentícias de sementes de araucária durante o armazenamento. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 22/23, p. 21-27, 1991.

RUBENS, P. et al. In situ observation of pressure-induced gelation of starches studied with FTIR in the diamond anvil cell. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 231-235, 1999.

SANTOS, A. L. W. et al. Biochemical and morphological changes during the growth kinetics of *Araucaria angustifolia* suspension cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 53, n. 3, p. 497-504, 2010.

SAS. **SAS Institute Inc® 2003**. Cary, NC, USA, Lic. UDESC: SAS Institute Inc, 2003.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v. 43, p. 13-25, 2007.

SILVEIRA, V. et al. Endogenous abscisic acid and proteins contents during seed development of *Araucaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, n. 52, v. 1, p. 101-104, 2008.

SILVERSTEIN, R. M. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, 387 p.

SIMÕES, R. F. S. Potencialidades da espectroscopia de infravermelho com transformadas de Fourier na caracterização de aguardentes vínicas. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Química dos Alimentos) – Universidade de Aveiro, Aveiro, 2008.

STEINER, N. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante e embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of Araucaria seed. **Annals of Applied Botany**, v. 105, n. 3, p. 581-586, 1984.

UARROTA, V. G. Perfil metabólico primário (proteínas, amido e lipídios) e secundário [carotenóides, antocianinas e ácidos (poli)fenólicos] de grãos de oito variedades crioulas de milho. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.



## ***CAPÍTULO 4***



## DANOS BIOQUÍMICOS ÀS SEMENTES ARMAZENADAS DE *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze

### 4.1 INTRODUÇÃO

A qualidade fisiológica de uma semente é alta principalmente quando próximo da sua maturidade fisiológica, quando há a máxima alocação de substâncias aos tecidos de reserva. Ao final da fase de maturação, as sementes recalcitrantes já estão completamente formadas, pois são independentes da secagem para adquirir a capacidade germinativa (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Sementes recalcitrantes, como as de araucária (TOMPSETT, 1984; FARRANT et al., 1989; EIRA et al., 1994; ESPÍNDOLA et al., 1994), não suportam grandes reduções no teor de água, e apresentam grande dificuldade de conservação (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Assim, o máximo potencial de desempenho apresentado pela semente é diretamente revertido ao metabolismo degenerativo durante o armazenamento, cuja consequência final é a perda da viabilidade (MARCOS FILHO, 2005).

Este processo de deterioração, que ocorre em todas as sementes, é acelerado e intensificado nas sementes recalcitrantes. A deterioração da semente é evidenciada por danos à integridade do DNA e ao sistema de membranas, peroxidação de lipídios, lixiviação de solutos, mudanças na atividade respiratória, modificações na atividade enzimática e síntese de proteínas, e acúmulo de substâncias tóxicas, entre outros (SANTOS et al., 2004). Tais alterações bioquímicas podem refletir em diversos prejuízos às sementes e plântulas, incluindo redução do vigor e aumento do número de plântulas com anormalidades morfológicas.

O metabolismo e a integridade celulares dependem da habilidade do organismo em sintetizar, ativar e preservar proteínas, em quantidade suficiente (MARCOS FILHO, 2005), e manter ou aumentar a atividade de enzimas envolvidas nos mecanismos de defesa das células a determinado estresse. As células das sementes estão constantemente sujeitas à ação de espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são produzidas por todas as células durante os processos metabólicos (PEREIRA, 2010). Durante o avanço do processo de envelhecimento, observa-se um aumento nas concentrações de EROs endógenas, levando à uma série de mudanças fisiológicas, chamadas de estresse oxidativo, o qual pode provocar danos celulares, senescência e morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Entre as EROs estão os radicais livres, cujos mais importantes são os radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ) e superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (COOLBEAR, 1995;

McDONALD, 1999). Para controlar o nível destas EROs e proteger as células sujeitas a condições de estresse, os tecidos das plantas contém distintas defesas antioxidantes, como a presença de enzimas que buscam neutralizar as EROs, tais como os sistemas compostos pela superóxido dismutase e pela catalase (BLOKHINA et al., 2003; PEREIRA, 2010). Estes sistemas atuam como detoxificadores do agente, antes que a lesão seja provocada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Os mecanismos enzimáticos de proteção atuam durante o armazenamento das sementes, quando há o avanço no processo deteriorativo (NAKADA et al., 2010).

A peroxidação lipídica é, provavelmente, a maior consequência da ação deletéria das EROs (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A instabilidade química dos lipídios constitui um dos fatores que mais influenciam a queda do desempenho das sementes de várias espécies (MARCOS FILHO, 2005; JOSÉ et al., 2010). Por isso, a peroxidação lipídica tem sido relatada como uma das principais alterações envolvidas na deterioração de sementes (McDONALD, 1999; VILLELA; PERES, 2004), correlacionada com o declínio de vigor e viabilidade (WILSON; McDONALD, 1986). Durante o armazenamento, os lipídios, tanto armazenados como nos componentes das membranas, sofrem lenta, mas consistente peroxidação, que gera um aumento nos radicais livres e forma produtos secundários tóxicos (WILSON; McDONALD, 1986; VIDAS et al., 1992), além de promover a perda da permeabilidade seletiva, e a degradação de DNA e de proteínas (MARCOS FILHO, 2005). Em sementes armazenadas de seringueira, a oxidação de lipídios foi considerada a principal causa da deterioração de sementes (DE PAULA et al., 1997).

A redução da integridade do DNA, provocada pela ação de enzimas hidrolíticas, pela atividade de radicais livres, ou ainda pela interação com produtos secundários da peroxidação lipídica (COOLBEAR, 1995), está relacionada ao envelhecimento e à perda da viabilidade das sementes, mas ainda há dúvidas se essas injúrias causam ou são consequências da deterioração (MARCOS FILHO, 2005).

Há ampla literatura relacionando a redução da longevidade das sementes à perda da integridade do DNA, às alterações na síntese de proteínas e atividade de enzimas antioxidantes, ao acúmulo de radicais livres e ao aumento na peroxidação de lipídios. Entretanto, a pesquisa buscando avaliar tais alterações metabólicas em sementes de araucária ainda tem inúmeros desafios, apesar de ser essencial à compreensão dos mecanismos envolvidos na manutenção da sua viabilidade. A atual vulnerabilidade da araucária, a qual consta nas principais listas de espécies ameaçadas de extinção, requer ações urgentes de conservação.



A disponibilidade de sementes restrita a poucos meses por ano dificulta a restauração das áreas remanescentes. Compreender os principais processos envolvidos na perda da qualidade das sementes de araucária pode colaborar para a ampliação do período de manutenção da sua qualidade após a colheita.

Desta forma, objetivou-se analisar as possíveis alterações no perfil de proteínas, na atividade de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo celular, no nível de peroxidação lipídica e na integridade do DNA nos embriões zigóticos de araucária durante o armazenamento das sementes.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, e de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, do departamento de Fitotecnia, e no laboratório de Ecofisiologia Respiratória do departamento de Zoologia e Ecologia, da Universidade Federal de Santa Catarina.

A coleta das sementes maduras de araucária foi realizada no município de Paineira (27°55' de latitude sul, 50°06' de longitude oeste e altitude média de 1144 metros), no planalto sul de Santa Catarina. A amostra de sementes foi homogeneizada e obteve-se a amostra de trabalho, de onde retirou-se uma fração para cada condição de armazenamento: em ambiente de laboratório sem controle térmico, em refrigerador (5 °C), ou em freezer (-18 °C), em embalagens plásticas transparentes vedadas, com porosidade de 0,015 µm. No período de armazenamento das amostras em ambiente de laboratório (Lages, SC), as variações de temperatura e umidade relativa foram de -3 °C e 33%, até 30 °C e 99%, respectivamente, com temperatura e umidade relativa médias de 15 °C e 80% entre os meses de julho e dezembro de 2010 (EPAGRI/CIRAM, 2011).

As avaliações foram realizadas em embriões zigóticos de sementes recém-colhidas, em triplicata, e em intervalos de 60 dias durante o armazenamento nas condições já citadas, quanto ao perfil de proteínas totais, as atividades das enzimas superóxido dismutase e catalase, o nível de peroxidação lipídica e a integridade do DNA, ao longo de um período amostral de 180 dias.

As proteínas presentes nas amostras foram extraídas através de adaptações da metodologia de Steiner (2005), a partir de amostras de 100 mg de matéria seca, com auxílio de tampão de extração composto de 20 mM de fosfato de sódio dibásico (pH 7,5), 1 mM de EDTA (ácido

etilenodiaminotetraacético), 50 mM de NaCl, 10% de Glicerol (v/v), 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonyl) e 1,5% de  $\beta$ -mercaptoetanol (v/v). Após centrifugação a 4000 rpm, a 4 °C, por 25 minutos, o sobrenadante foi coletado e utilizado para todas as análises, à exceção daquelas relativas ao DNA genômico.

Para as análises eletroforéticas, as proteínas totais foram precipitadas com a presença de dois volumes de álcool etílico absoluto para cada volume de sobrenadante, com posterior armazenamento a 4 °C, por 50 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm, a 4 °C, por 35 minutos. O sobrenadante foi descartado e as proteínas totais ressuspendidas em solução de 20 mM de fosfato de sódio dibásico (pH 7,5). Os teores de proteínas totais serviram de referência para as demais análises, e foram quantificados espectrofotometricamente pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina de soro bovino como padrão.

Utilizaram-se 20  $\mu$ g de proteínas para a aplicação em gel de poliacrilamida SDS-PAGE a 12% (gel separador) e 5% (gel concentrador) de acordo com Laemmli (1970), em três repetições. O sistema de eletroforese contendo as amostras foram colocados em solução tampão com pH de 8,3, contendo 50 mM de Tris, 0,384 M de glicina, 5 mM de EDTA, pH 8,8, e 0,25% de SDS (dodecil sulfato de sódio). A corrida eletroforética foi realizada a 80 V por 15 horas. Posteriormente, os géis foram corados com azul de coomassie 0,1% conforme Alfenas (1998) por 12 horas e descorados com solução de ácido acético 10%, metanol 45% e água destilada 45%. A análise das bandas das frações protéicas foi qualitativa, avaliando-se visualmente a presença e a intensidade das bandas.

A análise da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi realizada através da metodologia de Misra e Fridovich (1972). O método baseia-se na oxidação da adrenalina formando o adenocromo, reação que é retardada pela presença da enzima SOD na amostra. Para o ensaio, adicionou-se 1,95 mL de tampão glicina 50mM (pH 10), à 50  $\mu$ L da solução de adrenalina 60 mM (pH 2), observando-se o gráfico com a oxidação da adrenalina expressa pela formação de uma curva ascendente, em espectrofotômetro marca GBC, modelo UV/VIS 916 duplo feixe, ligado a um software, sob comprimento de onda de 480 nm. Agregaram-se alíquotas de 20, 30 e 40  $\mu$ L de amostra durante a reação de oxidação. A porcentagem de inibição foi calculada levando-se em conta a porção ascendente da curva de oxidação da adrenalina e a porção de inibição, expressas no gráfico. Extrapolando 50% de inibição, determinou-se o volume de alíquota correspondente.

Para a análise da atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6), testaram-se três metodologias distintas, onde determinou-se a velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em função de sua degradação pela catalase, em um comprimento de onda de 240 nm. A primeira metodologia testada foi a descrita por Kraus et al. (1995), com adaptações de Azevedo et al. (1998). Neste caso, as amostras foram avaliadas a 25 °C, em uma mistura de reação com 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de ditioneitol (DTT) e 4% de polivinilpirrolidona (PVP), e ao tampão foram adicionados 2,5 µL de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (solução de 30%). Após adicionar-se 25 µL das amostras, iniciou-se a reação, com as atividades sendo determinadas seguindo-se a decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 5 minutos, por alterações na absorbância a 240 nm, em espectrofotômetro GBC UV/VIS 916 duplo feixe.

Para o método descrito por Aebi (1984), preparou-se uma solução de 10 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 50 mM de tampão fosfato de potássio (pH 7,0), utilizada como substrato da reação. Adicionaram-se 2 mL desta solução a 20 µL das amostras, observando-se a velocidade de decomposição do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> através do decaimento na absorbância a 240 nm, por 5 minutos, em espectrofotômetro GBC UV/VIS 916 duplo feixe.

No terceiro caso, adicionou-se Dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%, para promover a lise das membranas celulares. Procedeu-se a análise segundo Aebi (1984), como previamente descrito.

O acúmulo de produtos da oxidação de lipídios, como o Malondialdeído (MDA), é utilizado para medir a peroxidação de lipídios em sementes armazenadas (BEWLEY BLACK, 1994; SMITH; BERJAK, 1995). Assim, a peroxidação de lipídios foi avaliada conforme descrito por Ohkawa et al. (1979), por meio da determinação do índice de ácido tiobarbitúrico (TBA). No processo, uma molécula de MDA reage com duas moléculas de TBA, formando um pigmento cor-de-rosa com absorção máxima entre 532 – 535 nm (PEREIRA, 2010). Para a avaliação, utilizou-se 100 µL de amostra misturados a 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) 12%. Posteriormente, adicionou-se 0,9 mL de tampão Tris-HCl 60 mM e 1 mL de TBA 60 mM. As amostras foram fervidas em banho-maria, a 100 °C, por 1 hora. Após esfriamento, realizou-se a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro GBC UV/VIS 916 duplo feixe, em comprimento de onda de 535 nm.

A extração do DNA genômico de embriões de araucária foi realizada baseada nos protocolos de Doyle e Doyle (1987, 1990) para plantas que apresentam altas concentrações de polissacarídeos. Os embriões foram pulverizados em gral de porcelana com auxílio de

nitrogênio líquido. Adicionaram-se 700  $\mu\text{L}$  de tampão de extração, contendo 1,4 M de NaCl, 100 mM de Tris-HCl (pH 8,0), 20 mM de EDTA (pH 8,0), 1% de PVP 40, 2% de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) e 0,2% de  $\beta$ -mercaptoetanol, e as amostras foram mantidas em banho-maria a 65  $^{\circ}\text{C}$ , por 50 minutos. Após este período, adicionaram-se 650  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool isoamílico (CIA) (24:1) às amostras, que foram centrifugadas a 13500 rpm por 7 minutos. Após a adição de 200  $\mu\text{L}$  de tampão de extração, 650  $\mu\text{L}$  de CIA foram incorporados, com posterior centrifugação a 10000 rpm, por 7 minutos, processo que foi repetido por quatro vezes. O sobrenadante DNA resultante foi precipitado com a adição de um volume de álcool isopropílico, seguido de homogeneização e centrifugação a 10000 durante 7 minutos. O precipitado foi lavado duas vezes com 500  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 70%, sendo centrifugado por 2 minutos. Após seco, o precipitado foi ressuscitado com 40  $\mu\text{L}$  de tampão contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 8,0) e 1 mM de EDTA (pH 8,0). Após extração, o DNA das amostras foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop em absorbância de 260 nm, e submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8% (100 V), na qual os fragmentos de DNA (que são eletronegativos) migram por repulsão do pólo negativo para o pólo positivo da cuba eletroforética, e corado com o corante fluorescente GelRed. O gel foi visualizado em transiluminador sob radiação ultravioleta.

O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em parcelas subdivididas no tempo, sendo três condições de armazenamento (ambiente, refrigerador e freezer) e quatro períodos de armazenamento (zero, 60, 120 e 180 dias). A análise dos resultados dos marcadores de estresse oxidativo foi realizada através de análise de variância e a comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do programa estatístico SAS (2003). A análise dos resultados obtidos pela eletroforese de proteínas e de DNA foi qualitativa, buscando-se avaliar, visualmente, a presença e intensidade das bandas, e a integridade e qualidade das bandas, respectivamente.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações bioquímicas baseadas no perfil das proteínas em embriões de araucária foram analisadas em função da condição e do tempo de armazenamento das sementes. Nas amostras recém-colhidas, as bandas de maior intensidade foram as de, aproximadamente, 55 kDa, 38 kDa, 20 kDa e 15 kDa (Figura 4.1). Ao longo do tempo associado às condições de armazenamento observaram-se alterações no perfil de

proteínas das sementes de araucária. Observou-se a presença das bandas de, aproximadamente, 45 kDa e 32 kDa que previamente não estavam presentes, o aumento na intensidade da banda de 31 kDa, e a ausência da banda de, aproximadamente, 38 kDa, nas sementes armazenadas em refrigerador por 60 dias e nas sementes armazenadas em freezer por 60, 120 e 180 dias. Observou-se também uma diminuição na intensidade de todas as bandas do perfil eletroforético de proteínas nas sementes armazenadas em ambiente sem controle térmico, especialmente após 60 dias de armazenamento, sendo que as proteínas que persistiram até os 180 dias de armazenamento com maior intensidade de bandas foram as de, aproximadamente, 37 kDa e 34 kDa.

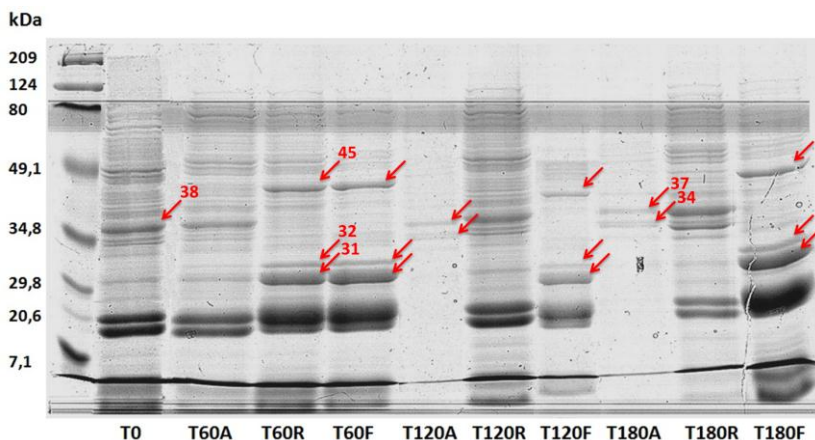


Figura 4.1 – Perfil eletroforético de proteínas de reserva em embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento das sementes em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C). Onde: T0 – recém colhidas; T60A – aos 60 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico; T60R – aos 60 dias de armazenamento em refrigerador; T60F – aos 60 dias de armazenamento em freezer; T120A – aos 120 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico; T120R – aos 120 dias de armazenamento em refrigerador; T120F – aos 120 dias de armazenamento em freezer; T180A – aos 180 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico; T180R – aos 180 dias de armazenamento em refrigerador; T180F – aos 180 dias de armazenamento em freezer.

A degradação das proteínas foi evidenciada pela diminuição na intensidade de bandas, principalmente nas amostras armazenadas em ambiente sem controle térmico, em que houve grande variação de temperatura durante o período de armazenamento (-3 a 30 °C),

comparativamente ao refrigerador (5 °C) e ao freezer (-18 °C) que permaneceram com a temperatura constante e controlada durante todo o período de armazenamento. Este fato demonstra que a elevada amplitude térmica durante o armazenamento pode promover a degradação das proteínas em embriões de araucária. Outros autores relatam que a degradação de proteínas em sementes armazenadas de *Trifolium incarnatum* (trevo encarnado) e *Lolium perenne* (azevém perene) foi dependente da severidade das condições de armazenamento (CHING; SCHOOLCRAFT, 1968). A diminuição na intensidade de bandas também foi observada em sementes de *Handroanthus albus* (ipê-amarelo) após armazenamento por 12 meses, seguido de envelhecimento artificial (SHIBATA et al., 2012).

Algumas das proteínas observadas neste trabalho podem corresponder às proteínas descritas por outros autores e identificadas em embriões maduros de araucária. As proteínas de 20 kDa, cuja banda apresentou elevada intensidade, podem corresponder ao grupo das chaperoninas, proteínas que atuam no processamento da RuBisCo e estão relacionadas ao desenvolvimento do aparelho fotossintético, sendo uma das mais abundantes no final da embriogênese da araucária (BALBUENA, 2009). As proteínas de 31 kDa e 15 kDa podem corresponder as proteínas de reserva vicilinas, identificadas em grande quantidade em embriões maduros de araucária (BALBUENA, 2009). As proteínas de reserva vicilinas também foram encontradas em abundância em embriões somáticos durante o estágio final da embriogênese em araucária (STEINER, 2009). Desta forma, sugere-se que algumas proteínas com funções regulatórias bem definidas durante a embriogênese, também podem estar presentes nos embriões das sementes de araucária.

Algumas enzimas também podem atuar diferentemente ao longo do armazenamento das sementes. Os tecidos das sementes, como de outros tecidos vegetais e animais, podem sofrer danos causados pelos radicais livres, principalmente quando tecidos maduros são submetidos à estresses ambientais e ao envelhecimento (BARBEDO; MARCOS FILHO, 1998). Algumas enzimas podem atuar diretamente contra as espécies reativas do oxigênio (EROs), ou reparar os danos por elas causados ao organismo (BARREIROS et al., 2006).

Uma das EROs mais importantes é o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), que pode causar sérios danos às células, sendo convertido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), encontrada em quase todos os compartimentos celulares (MITTLER, 2002; BARREIROS et al., 2006). A SOD pode

ser encontrada no citoplasma celular e na matriz mitocondrial, e constitui a primeira linha de defesa das células contra as EROs, pois participa dos eventos de necessários à detoxificação ou neutralização das EROs (ALSCHER et al., 2002; CORTE et al., 2010). Sua atividade foi avaliada em embriões maduros de araucária durante o envelhecimento no período de armazenamento das sementes.

A atividade da enzima superóxido dismutase nos embriões das sementes recém-colhidas foi de 11,24 kU SOD.mg prot<sup>-1</sup>, e apresentou alterações ao longo do período experimental, dependentes da condição de armazenamento (Figura 4.2). A atividade da SOD se manteve significativamente baixa ao longo do período de armazenamento apenas em embriões armazenados em freezer. Os embriões armazenados em refrigerador apresentaram aumento gradual da atividade da SOD e, ao final do período experimental, a atividade foi 3,4 ordens de magnitude superior que em embriões recém-colhidos. A atividade da SOD nas amostras armazenadas em ambiente sem controle térmico apresentou tendência de aumento até os 120 dias de armazenamento, sendo 14,4 vezes superior em relação à atividade nas recém-colhidas. Após este período, houve decréscimo acentuado na atividade da SOD.

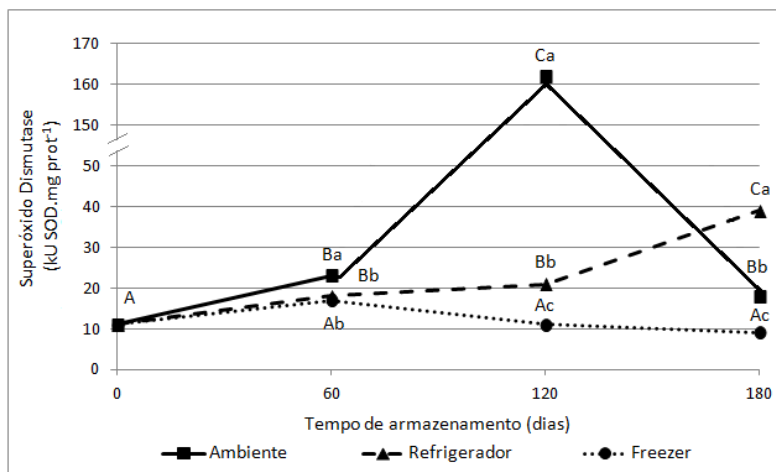


Figura 4.2 – Atividade da enzima superóxido dismutase (kU SOD.mg prot<sup>-1</sup>) em embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento das sementes em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C). As letras referem-se ao teste de Tukey (P<0,05), sendo: maiúsculas – comparação entre períodos de armazenamento; minúsculas – comparação entre condições de armazenamento.

Em função da elevada amplitude na temperatura de armazenamento em ambiente (em média 15 °C) em comparação às demais condições, a atividade metabólica acelerada pode ter conduzido à produção excessiva do  $O_2^-$ , acima da capacidade de eliminação pela ação da SOD. Tal fato pode ter conduzido à degradação protéica e inativação da enzima. Quando há um aumento na concentração de EROs sob condições de estresse elevado, o sistema de defesa antioxidante pode ser sobrecarregado e suprimido (ALSCHER et al., 2002). Por outro lado, a capacidade respiratória das amostras pode ter decaído em função dos danos às membranas mitocondriais (COOLBEAR, 1995) e a indisponibilidade de oxigênio e/ou a baixa atividade da enzima NADPH oxidase pode ter provocado um decréscimo na produção de  $O_2^-$  (BLOKHINA et al., 2003). As alterações observadas na atividade da SOD em embriões de araucária ao longo do armazenamento das sementes não se repetem em algumas outras espécies florestais como *Melanoxylon braúna* (braúna), cujos eixos embrionários de sementes armazenadas por 12 meses não apresentaram alterações na atividade da SOD (CORTE et al., 2010).

A atuação da SOD leva à formação de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o qual é pouco nocivo, mas pode causar dano celular grave devido à geração do radical hidroxila ( $^{\bullet}HO$ ) na presença de metais, especialmente o ferro (reação de Fenton) devido à sua alta biodisponibilidade, pois encontra-se complexado com proteínas de transporte e armazenamento (BARREIROS et al., 2006; PEREIRA, 2010). O  $^{\bullet}HO$  é o radical mais deletério aos organismos, causando danos ao DNA, RNA, proteínas, lipídios e membranas celulares (BARREIROS et al., 2006). A catalase (CAT) é um antioxidante que atua na detoxificação do  $H_2O_2$ , catalisando sua redução em  $H_2O$  e  $O_2$  (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Nos experimentos conduzidos não identificou-se a ação da enzima catalase nos embriões das sementes recém-colhidas e armazenadas nas diferentes condições ao longo do período experimental. A atividade da CAT deve ser medida pela velocidade de decaimento na absorbância a 240 nm, o que não ocorreu em nenhuma das três metodologias testadas. Tal fato indica que novos procedimentos de extração e análise desta enzima devem ser testados em embriões de araucária ou que nas condições de armazenamento, sua atuação não foi favorecida.

No entanto, além da CAT exercer a função de regular o nível de  $H_2O_2$  nas células, existem as peroxidases para tal função (BLOKHINA et al., 2003). A CAT se encontra compartimentalizada nos



peroxissomos, e as peroxidases, como a ascorbato peroxidase, que pode estar presente pelo menos em quatro compartimentos celulares, o citosol, peroxissomos, mitocôndrias e cloroplastos (CHAGAS, 2007; CAVERZAN, 2008) podem ter maior afinidade pelo  $H_2O_2$ . Este pode ser um indicativo de que outras enzimas estejam atuando preferencialmente na eliminação do peróxido de hidrogênio, e que a CAT se tornaria mais importante em condições mais elevadas do  $H_2O_2$ .

As EROs presentes nas células podem desencadear reações oxidativas em cadeia altamente prejudiciais, como a peroxidação dos lipídios (COOLBEAR, 1995). Nos embriões de sementes recém-colhidas de araucária, os resultados indicaram a ocorrência da peroxidação de lipídios de  $2,29 \text{ mM.mg prot}^{-1}$  (Figura 4.3). Este valor se manteve constante nas amostras armazenadas em freezer ( $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por 180 dias, o que difere do observado por outros autores que constataram que o armazenamento sob temperatura negativa ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) favoreceu a formação de peróxidos em sementes de *Helianthus annuus* (girassol) (JOSÉ et al., 2010).

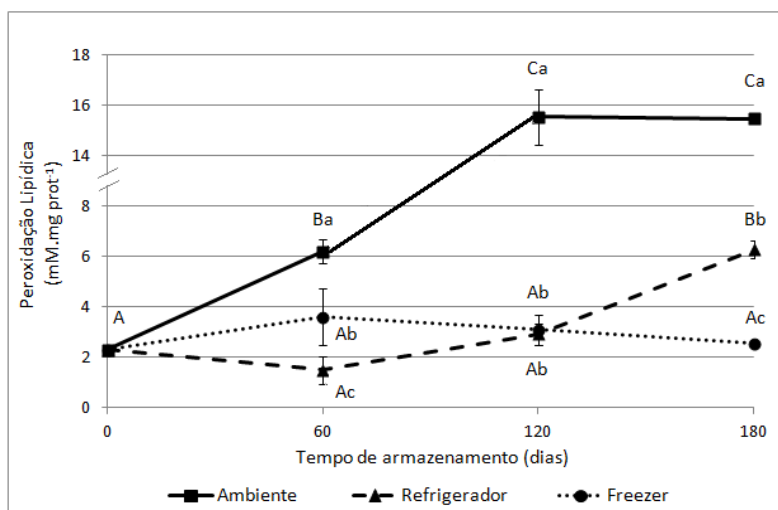


Figura 4.3 – Nível de peroxidação lipídica ( $\text{mM.mg prot}^{-1}$ ) (TBARS) em embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento das sementes em ambiente sem controle térmico ( $-3$  a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ), refrigerador ( $5 \text{ }^\circ\text{C}$ ) e freezer ( $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ ). As letras referem-se ao teste de Tukey ( $P < 0,05$ ), sendo: maiúsculas – comparação entre períodos de armazenamento; minúsculas – comparação entre condições de armazenamento.

Já para as demais amostras, a peroxidação de lipídios foi acentuada em 2,7 ordens de magnitude para as amostras armazenadas em refrigerador e em 6,8 ordens de magnitude para aquelas em ambiente sem controle térmico ao final do período experimental. O aumento na peroxidação de lipídios durante o armazenamento também foi observado em sementes de *Melanoxylon brauna* (braúna) a 20 °C (CORTE et al., 2010) e *Vigna radiata* (feijão-mungô) a 33 °C (MURTHY et al., 2002), sendo associado à perda da viabilidade e deterioração das sementes.

Os resultados observados evidenciam que, quanto menor a temperatura de armazenamento das sementes, menos acentuado será o processo de lipoperoxidação em embriões de araucária. Este resultado difere daquele observado em sementes recalcitrantes de *Hevea brasiliensis* (seringueira), em que houve aumento na peroxidação de lipídios durante o armazenamento por 75 dias, sem que houvesse diferenças significativas na peroxidação entre as condições de armazenamento a 5 °C e a 20 °C (DE PAULA et al., 1998).

A presença dos radicais livres pode causar a peroxidação de lipídios, que destrói a membrana nuclear, podendo levar à degradação do DNA (McDONALD, 1999). A análise da integridade e qualidade do DNA das amostras demonstra que, pelo método de extração utilizado, aparentemente não houve degradação do DNA nos embriões zigóticos de araucária durante o tempo e nas diferentes condições de armazenamento (Figura 4.4). Este resultado pode ser observado em função do gel de DNA apresentar-se íntegro e sem arraste vertical. A condição de armazenamento em ambiente sem controle térmico não foi eficiente para retardar o metabolismo das sementes de araucária e, a partir dos 60 dias de armazenamento, houve a germinação das sementes mantidas sob tais condições experimentais, com a hidrólise das reservas e o desenvolvimento do embrião. O número de embriões intactos não foi suficiente para a realização das análises de integridade do DNA para os períodos de armazenamento de 120 e 180 dias.

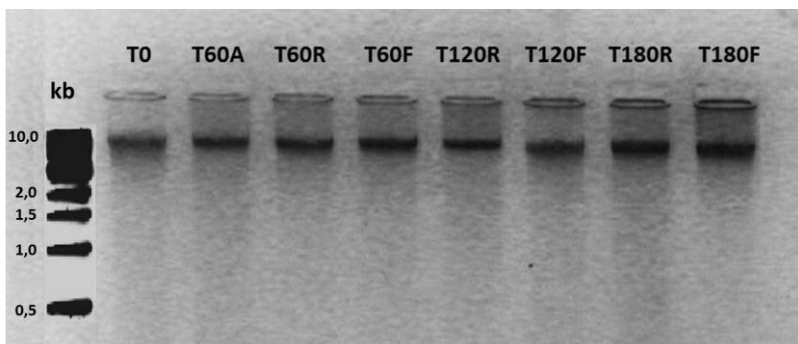


Figura 4.4 – Gel de agarose (0,8%) de DNAs genômicos extraídos de embriões de *Araucaria angustifolia* ao longo do período de armazenamento das sementes em ambiente sem controle térmico (-3 a 30 °C), refrigerador (5 °C) e freezer (-18 °C). Onde: T0 – recém colhidas; T60A – aos 60 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico; T60R – aos 60 dias de armazenamento em refrigerador; T60F – aos 60 dias de armazenamento em freezer; T120R – aos 120 dias de armazenamento em refrigerador; T120F – aos 120 dias de armazenamento em freezer; T180R – aos 180 dias de armazenamento em refrigerador; T180F – aos 180 dias de armazenamento em freezer.

A análise da Figura 4.4 também demonstra que há baixa concentração de polissacarídeos nas amostras e todas elas estavam livres de RNA, indicando que não houve falhas metodológicas, pois o método de extração do DNA foi eficiente e apresentou alto grau de purificação. Segundo Chiari et al. (2009), o fato das bandas não apresentarem forma cônica em direção ao pólo positivo e não haver grande quantidade de DNA retido no poço do gel indicam a ausência de polissacarídeos e, se o RNA estivesse presente, bandas com menor massa molecular seriam observadas no gel.

O fato do DNA das amostras aparentemente se manter íntegro durante os 180 dias no período experimental pode representar que as membranas nucleares não sofreram desestruturação e atuaram como barreiras de proteção ao DNA. No caso da araucária, o metabolismo preparatório para a germinação parece ter se mantido ativo durante o armazenamento, pois as sementes foram armazenadas com elevado teor de água. Um dos primeiros eventos ativados no início do processo germinativo das sementes é a ação de mecanismos de reparo de possíveis danos ao DNA (BOUBRIAK et al., 1997), já que a síntese de RNA e, posteriormente, a síntese de proteínas podem ser diretamente afetadas pela ocorrência de danos ao DNA (MARCOS FILHO, 2005). A degradação do DNA poderia ter sido acentuada, com prejuízos ao

desempenho das sementes, se bloqueios à atuação desses mecanismos tivessem sido desencadeados. Isto permite inferir que a degradação do DNA pode ocorrer em estádios mais avançados do processo de deterioração em sementes armazenadas de araucária.

O ataque promovido por radicais livres pode provocar a destruição da membrana nuclear e, como consequência, causar a degradação do DNA (McDONALD, 1999). Por outro lado, há a possibilidade de que o DNA permaneça funcional durante a deterioração, e resulte na formação de mRNA funcional que, durante o armazenamento pode ser degradado, prejudicando a transcrição e causando a síntese enzimática incompleta ou defeituosa (McDONALD, 1999). Há a necessidade, portanto, de exames mais detalhados a nível de DNA, buscando avaliar tais hipóteses e as possíveis alterações durante o processo germinativo das sementes.

#### 4.4 CONCLUSÕES

O armazenamento em ambiente sem controle térmico provocou grande degradação de proteínas nos embriões zigóticos de *A. angustifolia*.

A presença de proteínas de 45, 32 e 31 kDa foi observada em embriões durante o armazenamento apenas em refrigerador e freezer.

Observou-se um aumento na atividade da superóxido dismutase em embriões durante armazenamento das sementes em ambiente sem controle térmico e refrigerador, com maior incremento entre 60 e 120 dias de armazenamento em ambiente sem controle térmico.

O aumento na peroxidação lipídica dos embriões foi superior em condições de ambiente sem controle térmico em comparação às demais formas de armazenamento.

O DNA nuclear dos embriões de *A. angustifolia* permaneceu, aparentemente, íntegro após 180 dias de armazenamento em refrigerador e freezer.

A condição de freezer manteve as características bioquímicas ao longo do período de armazenamento em relação à atividade da SOD, a lipoperoxidação e a integridade do DNA, com exceção do perfil protéico.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods in Enzymology**, v. 204, p. 234-254, 1984.

ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 574 p.

ALSCHER, R. G; ERTURK, N; HEALTH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental Botany**, v. 53, p. 1331-1341, 2002.

AZEVEDO, R. A. et al. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 280-292, 1998.

BALBUENA, T. S. Proteômica do desenvolvimento da semente de *Araucaria angustifolia*. Tese (Doutorado em Ciências/Botânica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação de sementes. **Acta Botânica Brasílica**, v. 12, p. 145-164, 1998.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 2006.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York, Plenum Press, 1994. 445 p.

BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-194, 2003.

BOUBRIAK, I. et al. The requirement for DNA repair in desiccation tolerance of germinating embryos. **Seed Science Research**, v. 7, n. 2, p. 97-105, 1997.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Instrução Normativa n. 6, de 26 de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao6.pdf>>. Acesso em: 15 mai. 2011.

CAVERZAN, A. Caracterização funcional dos genes de ascorbato peroxidase de arroz (*Oryza sativa* L.) nas interações entre estresse oxidativo e estresses abióticos. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

CHAGAS, R. M. Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.) tratadas com paraquat. Dissertação (Mestrado em Ciências/Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Universidade de São Paulo, 2007.

CHIARI, L.; VALLE, J. V. R.; RESENDE, R. M. S. **Comparação de três métodos de extração de DNA genômico para análises moleculares em *Stylosanthes guianensis***. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 2009, 6 p. (Circular Técnica, 36).

CHING, T. M.; SCHOOLCRAFT, I. Physiological and chemical differences in aged seeds. **Crop Science**, v. 8, n. 4, p. 407-409. 1968.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: The Haworth Press Inc., 1995. p. 223-277.

CORTE, V. B. et al. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, 2010.

DE PAULA, N. F. et al. Alterações fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell.Arg.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 19, n. 2, p. 327-334, 1997.

DE PAULA, N. F. et al. Avaliações bioquímicas e fisiológicas em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 20, n. 2, p. 1-10, 1998.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v. 19, p. 11-15, 1987.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

EIRA, M. T. S. et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 1994.

EPAGRI/CIRAM. Atlas climatológico do estado de Santa Catarina. Disponível em: <(http://www.ciram.epagri.rct-sc.br)> Acesso em: 20 de junho de 2011.

ESPINDOLA, L. S. et al. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. **Seed Science Research**, v. 4, n. 2, p.193-201, 1994.

FARJON, A. 2006. *Araucaria angustifolia*. In: IUCN – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <(http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/32975/0)> Acesso em: 25 de novembro de 2011.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds – a study on three unrelated species. **Planta**, v. 178, n. 2, p. 189-198, 1989.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Nova York: Oxford University Press, 1999. 851 p.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Armazenamento de sementes de girassol em temperaturas subzero: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, 2010.

KRAUS, T. E.; McKERSIE, B. D; FLETCHER, R. A. Paclobutrazol-induced tolerance of wheat leaves to paraquat may involve increased antioxidant enzyme activity. **Journal of Plant Physiology**, v. 145, p. 570-576, 1995.

LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of germination in *Salvia hispanica* L. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, n. 1, p. 37-56, 1987.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **Journal of Biology and Chemistry**, n. 247, p. 188-192, 1972.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

MURTHY, U. M. N.; KUMAR, P. P.; SUN, W. Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 384, p. 1057-1067, 2003.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, 2010.

OHKAWA, H.; OHISHI, H.; YAGI, K. Assay for lipid peroxyde in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.



PEREIRA, A. Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa spp.*). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L. de; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, 2004.

SAS. **SAS Institute Inc® 2003**. Cary, NC, USA, Lic. UDESC: SAS Institute Inc, 2003.

SHIBATA, M. et al. Armazenamento sob condições controladas associado ao envelhecimento artificial promove o aumento do percentual de germinação em sementes de ipê. **Revista Brasileira de Sementes**. No prelo, 2012.

SMITH, M. T.; BERJAK, P. Deteriorative changes associated with loss of viability of stored desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. In: KIEGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker Inc., 1995. p. 701-746.

STEINER, N. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante e embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

STEINER, N. Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK. Tese (Doutorado em Ciências/Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Botany**, v. 105, n.3, p.581-586, 1984.

VIDAS, R. M. R. et al. Relação entre vigor e alterações bioquímicas na germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Fisiologia**, v. 4, n. 1, p. 49-53, 1992.

VILLELA, F. A.; PERES, W. B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 265-281.

WILSON, D. O.; McDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, v. 14, p. 296-300, 1986.

## CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

No presente estudo, foram obtidos resultados relevantes sobre as manifestações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Araucaria angustifolia* durante o armazenamento, as quais refletiram em sua viabilidade e vigor. Aspectos relevantes do metabolismo em sementes maduras imediatamente após a colheita e durante o armazenamento foram identificados e elucidados em função da condição em que as sementes foram armazenadas.

Os resultados observados ao longo do estudo sugeriram que a conservação da qualidade fisiológica e bioquímica das sementes de araucária após a colheita é altamente dependente da condição de armazenamento na qual as sementes estão expostas. De modo geral, a manutenção da viabilidade, observada através dos testes de germinação e tetrazólio, não garantiu que o vigor e a qualidade bioquímica das sementes fossem preservados, e que houvesse bom desempenho no desenvolvimento das sementes e crescimento das plântulas.

Assim, para determinar qual condição de armazenamento foi a mais adequada à conservação das sementes da espécie, tornou-se necessário ponderar quais atributos de qualidade são essenciais para a futura formação de plantas saudáveis. Neste sentido, a condição de armazenamento em refrigerador, sob temperatura de 5 °C, demonstrou ser a mais adequada, entre as condições avaliadas, para a conservação das sementes de araucária por 180 dias. Tal condição manteve a viabilidade das sementes em 64%, apresentou menor redução no vigor em comparação às demais condições, foi eficiente no atraso da hidrólise dos principais componentes de reserva da semente e na supressão da atividade das espécies reativas do oxigênio, possivelmente protegendo as membranas celulares da desestruturação acentuada.

As sementes que foram armazenadas em ambiente sem controle térmico durante o período experimental, em condições de temperatura e umidade relativa do ar semelhantes às do local de coleta, continuaram o desenvolvimento do eixo embrionário durante o armazenamento, e 80% germinaram enquanto armazenadas. Portanto, tal condição não foi eficiente para retardar a hidrólise e assimilação das reservas e a conseqüente germinação das sementes armazenadas. Entre as sementes não germinadas, houve rápida perda de viabilidade, pois, aos 180 dias de armazenamento, 100% estavam inviáveis. Neste caso, parece incerto afirmar que houve “deterioração” das sementes armazenadas, pois as mais vigorosas buscaram utilizar a energia adquirida durante a formação da semente para antecipar o processo germinativo em um esforço de

sobrevivência, mesmo não estando sob as condições mais adequadas de substrato, umidade, temperatura e luminosidade, dentro das embalagens. Em contrapartida, as sementes que mantiveram-se não germinadas durante o armazenamento possivelmente eram as menos vigorosas, pois observou-se que a maioria estava apodrecida, atacada por patógenos ou com anormalidades morfológicas. As reduções acentuadas observadas na viabilidade e no vigor das sementes durante o armazenamento em ambiente sem controle térmico coincidiram com a diminuição na intensidade das bandas de todo o perfil eletroforético de proteínas nas sementes armazenadas em tal condição.

As sementes que foram armazenadas em freezer, sob temperatura de  $-18^{\circ}\text{C}$ , não manifestaram grandes alterações bioquímicas em relação às análises realizadas, mas reduziram a qualidade fisiológica precocemente durante o armazenamento. Temperaturas negativas de armazenamento são eficientes na conservação dos componentes celulares, mas as sementes de algumas espécies perdem a viabilidade quando há redução acentuada da temperatura, especialmente devido ao congelamento. O congelamento da água livre na solução intracelular forma cristais de gelo, os quais provocam a ruptura mecânica da membrana celular e da estrutura citoplasmática em função das tensões e da expansão da água congelada, resultando em injúrias mecânicas e desagregação celular.

Os resultados observados permitem concluir que o congelamento foi responsável pela queda acentuada na viabilidade das sementes de araucária armazenadas em freezer. Apesar da peroxidação de lipídios nas membranas do embrião de araucária não ter aumentado durante o período de armazenamento das sementes, a crescente taxa de condutividade elétrica observada demonstrou que as membranas celulares dos embriões sofreram desestruturação no referido período. Como as sementes foram armazenadas com elevado teor de água (45%), supõe-se que houve o congelamento da água nas células da semente, provocando o rompimento das membranas, com conseqüente aumento na lixiviação de exsudados e resultando na perda da viabilidade das sementes.

A partir dos resultados observados sobre o comportamento das sementes durante o armazenamento nas diferentes condições, novas pesquisas poderiam investigar como o armazenamento em temperaturas similares a utilizada em refrigerador associado a condições controladas de umidade atuariam na conservação das sementes. As avaliações fisiológicas e bioquímicas deveriam ser realizadas entre períodos mais curtos durante o armazenamento, para dar indicativos mais sensíveis de

qualidade das sementes. Além disso, um número maior de populações avaliadas e estádios diferentes de maturação poderiam indicar o ponto exato em que as sementes de araucária devem ser colhidas para que haja o prolongamento da sua viabilidade.

Diversas pesquisas têm sido conduzidas buscando compreender a fisiologia do envelhecimento da semente. Tem sido sugerido que as principais causas do envelhecimento das sementes são a peroxidação de lipídios, a degradação de proteínas e a inativação de enzimas, a ruptura das membranas celulares e os danos à integridade dos ácidos nucleicos, intermediadas pela ação dos radicais livres. Em se tratando de sementes recalcitrantes, pouco se conhece sobre os processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos. No caso do presente trabalho, a semente de araucária continua seu processo metabólico voltado à germinação durante o armazenamento. Isso porque observou-se a hidrólise dos metabólitos de reserva do megagametófito e de proteínas do embrião, ao mesmo tempo em que ocorreu a germinação das sementes durante o armazenamento em ambiente sem controle térmico e refrigerador.

Os mecanismos e os eventos durante o processo de deterioração não são completamente compreendidos e não há regras que se apliquem a todas as espécies. Este estudo foi desenvolvido a fim de subsidiar uma maior compreensão sobre os eventos associados à rápida perda da qualidade em sementes de araucária durante o armazenamento. Conclui-se, em termos gerais, que a perda de viabilidade e vigor das sementes de araucária no armazenamento é acompanhada pela hidrólise das proteínas solúveis totais com alterações no perfil protéico do embrião, hidrólise dos carboidratos solúveis totais e do amido do megagametófito, aumento na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase no embrião, aumento na peroxidação dos lipídios de membranas e possível perda da integridade das membranas celulares do embrião.

Entre as principais causas descritas da deterioração em sementes, estão os danos às membranas e aos ácidos nucleicos. Apesar disso, não foram observados danos à integridade do DNA nos embriões de araucária, mesmo naqueles que haviam perdido a sua viabilidade. Já a integridade das membranas pareceu ser fundamental à manutenção da qualidade dos embriões, pois, após 60 dias de armazenamento em freezer, as sementes perderam a capacidade germinativa e apresentaram aumento acentuado na condutividade elétrica, mas as sementes armazenadas nas demais condições germinaram, e não apresentaram alterações acentuadas na condutividade elétrica.

Análises ultraestruturais dos componentes celulares, com ênfase à estruturação do sistema de membranas, poderiam elucidar questões

como as relacionadas à atividade respiratória. Já informações sobre os componentes de membrana poderiam gerar resultados inéditos sobre a capacidade de armazenamento das sementes, pois há relatos de que a própria organização dos constituintes influencia, por exemplo, na prevenção da peroxidação de lipídios.

Outro fator que pode ter acelerado o processo de deterioração é o fato das sementes recalcitrantes aumentarem a demanda por água, que está indisponível, durante o armazenamento. Como demonstrado no Capítulo 1, após a colheita, as sementes continuaram os processos de respiração e hidrólise dos compostos para iniciar a germinação, e algumas germinaram mesmo sob condições desfavoráveis, ainda nas condições experimentais de armazenamento em ambiente sem controle térmico e em refrigerador. Por isso, mesmo tendo sido armazenadas com elevado teor de água, pode ter ocorrido deficiência hídrica para a fase inicial da germinação, quando a divisão e expansão celulares são crescentes, assim como a demanda por água. A mobilização precoce de metabólitos e ativação da maquinaria metabólica foi mais expressiva nas sementes armazenadas em ambiente sem controle térmico e, possivelmente, a indisponibilidade de água ao embrião foi uma das principais causas da rápida perda de viabilidade apresentada pelas sementes armazenadas sob esta condição, já que as sementes recalcitrantes não acumulam as substâncias responsáveis pela tolerância à dessecação.

A aplicação de substâncias inibidoras da germinação poderia gerar resultados favoráveis na conservação de sementes de araucária. O fornecimento constante de ácido abscísico (ABA), por exemplo, seria uma alternativa a ser testada visando manter o metabolismo do embrião favorável ao desenvolvimento e acúmulo de reservas, impedindo que a germinação ocorresse precocemente.

A ação dos radicais livres também tem sido relacionada à intolerância das sementes recalcitrantes à desidratação e, conseqüentemente, à incapacidade de armazenamento por período prolongado. A presença e integridade dos sistemas enzimáticos de proteção à ação oxidativa é fundamental à manutenção da viabilidade, especialmente em sementes recalcitrantes. A pesquisa sobre a atuação destes sistemas enzimáticos em sementes de araucária está apenas no início. Elucidar a atuação das enzimas antioxidantes é o primeiro passo para manter a integridade do sistema sob condições de estresse elevado.

Esta e as demais áreas abordadas neste estudo são amplas, e os resultados obtidos são uma prévia para direcionar futuras pesquisas que busquem compreender a perda de qualidade das sementes de araucária.

Este estudo colabora para o entendimento do metabolismo das sementes de araucária à perda de viabilidade no armazenamento e indica formas alternativas de armazenamento de sementes que, associadas ao manejo adequado das áreas remanescentes, pode permitir um grande avanço para a restauração das populações de araucária, impedindo a erosão genética e restabelecendo à conservação *in situ* deste importante recurso genético.

Diversos outros fatores que não foram avaliados nesta pesquisa podem ser ainda mais importantes à manutenção da viabilidade de sementes de araucária após a colheita. Por isso, sugere-se que a avaliação da atividade e integridade da mitocôndria e produção de ATP, as alterações na estrutura de enzimas, as alterações no metabolismo de RNA e DNA, a formação de produtos tóxicos às células, e a alteração na sensibilidade à ação de hormônios, por exemplo, poderiam ser estimuladas e, portanto, exploradas com maior precisão e detalhamento.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-BAKI, A. A. Biochemical aspects of seed vigour. **HortScience**, v.15, n. 6, p. 765-771, 1980.
- ALSCHER, R. G; ERTURK, N; HEALTH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental Botany**, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- AMARANTE, C. V. T. et al. Conservação pós-colheita de pinhões [sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertoloni) Otto Kuntze] armazenados em diferentes temperaturas. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 346-351, 2007.
- AOSA. ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. Seed vigour handbook. In: The handbook of seed testing. East Lansing, 1983. 88 p.
- BACCHI, O. Estudos sobre a conservação de sementes: II Citros. **Bragantia**, v. 17, n. 11, p. 157-166, 1958.
- BARBEDO, C. J.; MARCOS FILHO, J. Tolerância à dessecação de sementes. **Acta Botânica Brasílica**, v. 12, p. 145-164, 1998.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, 2006.
- BERJAK, P.; FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W. The basis of recalcitrant seed behavior – cell biology of the homohydrous seed condijions. In: TAYLORSON, R. B. (ed.). **Recent advances in the development and germination of seeds**. New York: Plenum Press, 1989. p. 89-108.
- BIANCHETTI, A.; RAMOS, A. Efeito da temperatura de secagem sobre o poder germinativo de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 2, p. 27- 56, 1981.
- BLOKHINA, O., VIROLAINEN, E.; FAGERSTEDT, K. V. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals of Botany**, v. 91, p. 179-194, 2003.

BRASIL. Instrução Normativa n. 6, de 26 de setembro de 2008. Lista Oficial das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao\\_6.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/instrucao_6.pdf)>. Acesso em: 15 out. 2010.

BRASIL. Lei n. 4.771, de 15 de setembro de 1965. Institui o novo Código Florestal. Brasília, DF, 15 set. 1965. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L4771.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L4771.htm)>. Acesso em: 15 abr.. 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 399 p.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Mobilização de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 163-185.

CAÇOLA, Á. V. et al. Qualidade fisiológica de sementes de *Araucária angustifolia* (Bertol.) Kuntze submetidas a diferentes condições de armazenamento e a escarificação. **Ciência Florestal**, v. 16, n. 4, p. 391-398, 2006.

CARDOSO, V. J. M. Germinação. In: KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 386-408.

CARVALHO, L. R.; SILVA, E. A. A.; DAVIDE, A. C. Classificação de sementes florestais quanto ao comportamento no armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p.15-25, 2006.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. Campinas: Fundação Cargill, 1980. 326 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Brasília: Embrapa. 1994. 640 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, v. 1, 2003. 1039 p.

COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this time for clinical trials? **Annals of Internal Medicine**, v. 111, p. 918-931, 1989.

COOLBEAR, P. Mechanisms of seed deterioration. In: BASRA, A. S. (Ed.). **Seed quality: basic mechanisms and agricultural implications**. New York: The Haworth Press Inc., 1995. p. 223-277.

CUNHA, R. da. et al. Efeito do dessecamento sobre a viabilidade de sementes de *Virola surinamensis* (ROL) WARB. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 69-72, 1992.

DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. da. **Produção de sementes e mudas de espécies florestais**. Lavras: UFLA, 2008. 175 p.

EIRA, M. T. S. et al. Efeito do teor de água sobre a germinação de sementes de *Araucaria angustifolia* (bert.) O. Ktze. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 16, n. 1, p. 71-75, 1994.

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

ESPINDOLA, L. S. et al. Cellular and metabolic damage induced by desiccation in recalcitrant *Araucaria angustifolia* embryos. **Seed Science Research**, v. 4, n. 2, p.193-201, 1994.

FARJON, A. 2006. *Araucaria angustifolia*. In: IUCN – International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 2011. **IUCN Red List of Threatened Species**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/32975/0>> Acesso em: 25 de novembro de 2011.

FARRANT, J. M.; PAMMENTER, N. W.; BERJAK, P. Germination-associated events and the desiccation sensitivity of recalcitrant seeds – a study on three unrelated species. **Planta**, v. 178, n. 2, p. 189-198, 1989.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, D. K. Caracterização genética e estrutura populacional de diferentes origens de *Araucaria angustifolia* na FLONA de Três Barras. Dissertação (Mestrado em Ciências/Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2008.

FLORIANI, E. P. Armazenamento de sementes florestais. In: HOPPE, J. M. **Produção de sementes e mudas florestais**. Santa Maria: UFSM, 2004. p. 82-92.

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

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A.; ZANON, A. **Conservação de sementes de pinheiro-do-paraná sob diferentes condições de ambientes e embalagens**. Colombo: Embrapa-CNPQ, 1998. 4 p. (Comunicado Técnico, 34).

GUERRA, M. P. et al. 2 ed. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Orgs.) **Sustentável Mata Atlântica: a exploração de seus recursos florestais**. São Paulo: Senac, 2003. p. 85-102.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3. ed. Nova York: Oxford University Press, 1999. 851 p.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet**, v. 355, p. 1179-1180, 2000.

HIRANO, E. Maturação fisiológica, tolerância à dessecação e conservação de sementes de lauráceas da Mata de Araucária de Santa Catarina. Tese (Doutorado em Agronomia/Produção Vegetal) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

HONG, T. D.; ELLIS, R. H. A protocol to determine seed storage behavior. **IPGRI Technical Bulletin**, n. 1, 1996. 62 p.

JOSÉ, S. C. B. R. et al. Armazenamento de sementes de girassol em temperaturas subzero: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4, 2010.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. v. 1. 368 p.

MANTOVANI, A.; MORELLATO, P. C.; REIS, M. S. Fenologia reprodutiva e produção de sementes em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 787-796, 2004.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495 p.

MATTHEWS, S. Physiology of seed aging. **Outlook on Agriculture**, v. 14, n. 2, p. 89-94, 1985.

MATTOS, J.R. de. **O Pinheiro Brasileiro**. Florianópolis: UFSC. 2011. 700 p.

McDONALD, M. B. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proceeding of the Association of Official Seed Analysts**, v. 65, p. 109-139, 1975.

McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 177-237, 1999.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, p. 405-410, 2002.

NAKADA, P. G. et al. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3, 2010.

OLIVEIRA, O. S. **Tecnologia de Sementes Florestais**. Curitiba: Imprensa Universitária, 2007, 185 p.

PEREIRA, A. Avaliação das atividades cicatrizante e antitumoral de extratos provenientes da casca de banana cultivar Prata Anã (*Musa* spp). Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FILGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). **Germinação – do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.283-297.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de Sementes**. 2. ed. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

RAMOS, A.; CARNEIRO, J. G. A. Alterações fisiológicas em sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. armazenadas após secagem em estufa. In: Congresso Florestal do Paraná, 1988, Curitiba. Anais... Curitiba, 1988. p. 628-643.

RAMOS, A.; SOUZA, G. B. Utilização das reservas alimentícias de sementes de araucária durante o armazenamento. **Boletim de Pesquisa Florestal**, n. 22/23, p. 21-27, 1991.

REITZ, R.; KLEIN, R. M. **Araucariaceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues. 1966. 62 p.

ROBERTS, E. H. Physiology of aging and its application to drying and storage. **Seed Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 359-372, 1981.

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

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L. de; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, 2004.

SHIN, J. H.; KIM, S. R.; AN, G. Rice aldehyde dehydrogenase<sup>7</sup> is needed for seed maturation and viability. **Plant Physiology**, v. 149, p. 905-915, 2009.

SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.

SOLÓRZANO FILHO, J.A. Demografia e ecologia da dispersão de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bert.) Kutze (Araucariaceae), numa população relictual em Campos do Jordão, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

STEINER, N. Embriogênese somática em *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, *Pinus sylvestris* Linneaus) e *Picea abies* (Linneaus) Karsten: ontogênese, padrão de expressão protéica e do gene SERK. Tese (Doutorado em Ciências/Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

STEINER, N. Parâmetros fisiológicos e bioquímicos durante e embriogênese zigótica e somática de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

SUITER FILHO, W. **Conservação de sementes de *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze**. Piracicaba: ESALQ. 1966. 17 p.

TOMPSETT, P. B. Desiccation studies in relation to the storage of *Araucaria* seed. **Annals of Applied Botany**, v. 105, n. 3, p. 581-586, 1984.

VIDAS, R. M. R. et al. Relação entre vigor e alterações bioquímicas na germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Fisiologia**, v. 4, n. 1, p. 49-53, 1992.

VILLELA, F. A.; PERES, W. B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Orgs.). **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 265-281.

WILSON, D. O.; McDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, v. 14, p. 296-300, 1986.