

Deise Munaro

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DURANTE  
ARMAZENAMENTO E DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE  
*Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae):  
ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia de Fungos, Algas e Plantas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Biologia de Fungos, Algas e Plantas.

Orientador: Prof. Dr.<sup>a</sup> Áurea Maria Randi  
Coorientador: Dr.<sup>a</sup> Fernanda Ramlov

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Munaro, Deise

Comportamento fisiológico durante armazenamento e  
dessecação de sementes de *Eugenia uniflora*  
L. (Myrtaceae): aspectos bioquímicos e  
ultraestruturais / Deise Munaro ; orientador, Áurea  
Maria Randi, coorientador, Fernanda Ramlov, 2017.  
82 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos,  
Algas e Plantas, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biologia de Fungos, Algas e Plantas. 2.  
sementes recalcitrantes, armazenamento de sementes,  
tolerância à dessecação. I. Randi, Áurea Maria. II.  
Ramlov, Fernanda. III. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia  
de Fungos, Algas e Plantas. IV. Título.

Deise Munaro

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO DURANTE  
ARMAZENAMENTO E DESSECAÇÃO DE SEMENTES DE  
*Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae):  
ASPECTOS BIOQUÍMICOS E ULTRAESTRUTURAIIS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Biologia de fungos, algas e plantas, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biologia de fungos, algas e plantas.

Florianópolis, 4 de Maio de 2017.

---

Prof. Dr. Ricardo Dreschler dos Santos  
Coordenador do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Áurea Maria Randi  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr.<sup>a</sup> Fernanda Ramlov  
Corientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina



Aos meus amáveis pais Edilia e Gregório,  
pela confiança, amor e carinho; à minha  
querida irmã Elaine, pela amizade e  
carinho.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

Aos meus pais Edilia e Gregório, pelo amor incondicional, pelo exemplo, apoio e carinho em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã e companheira Elaine Cristina, por todo carinho e amor, e por sempre acreditar em mim.

Ao meu querido namorado Felipe, por todo apoio, incentivo e carinho nos momentos difíceis.

À minha querida dinda Rita Cristina, segunda mãe e as minhas maninhas Diana e Geovana.

À amiga Caline Cardoso, por nunca ter me abandonado desde o início da graduação.

À minha orientadora Professora Áurea M. Randi, por inicialmente ter me aceito, pela paciência e carinho aos momentos que me ensinou profissionalmente e pessoalmente.

À minha corientadora Fernanda Ramlov, por ter estado presente desde o princípio, por todos os ensinamentos, por acreditar no meu trabalho e principalmente pela amizade e carinho.

Aos Professores do Departamento de Botânica em especial à Professora Neusa Steiner pela dedicação à minha aprendizagem e pelos ensinamentos no Laboratório de Fisiologia Vegetal.

À Professora Marisa Santos pelos ensinamentos e atenção com as micrografias eletrônicas de varredura e de transmissão.

Aos meus colegas de mestrado, Amanda, Grazi, Carol, Luciana, Thaisoca, Thaís, Tiago, Bruno, Vanessa, Maruca, Maridê, Maryzinha, Julio, Rosa e Samuel por toda amizade e parceria e em especial ao Herlon pelo tempo compartilhado no laboratório e a Anni por dividir também um lar durante parte deste tempo.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Vegetal do departamento de Botânica por todos os momentos e conhecimentos compartilhados durante este trabalho.

Ao laboratório de Laboratório de Microscopia Eletrônica-LCME especialmente a técnica Eliana de Medeiros Oliveira.

Aos integrantes do Laboratório do Departamento de Biologia Celular da UFSC, em especial a doutoranda Débora Tomazi Pereira por todo auxiliou no processamento das minhas amostras para microscopia como para os ensaios das atividades enzimáticas.

Aos integrantes do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da UFSC, pelo auxílio e colaboração durante os experimentos realizados naquele espaço.

Ao Laboratório de Sementes da UFSC por conceder o espaço para o experimento de dessecação das sementes e em especial à Marília Shibata, por todo auxílio e pela valiosa ajuda com estes experimentos.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de fungos algas e plantas, pela oportunidade de aprendizado.

A CAPES, pelo apoio financeiro.



“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

(Leonardo Da Vinci)



## RESUMO

As sementes de *Eugenia uniflora* L. perdem rapidamente sua qualidade fisiológica após sua dispersão. Conhecer os fatores ligados a esse processo é necessário para o armazenamento de sementes após a safra anual facilitando ações de restauração de áreas e 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 *E. uniflora* e relacioná-las às alterações bioquímicas e ultraestruturais durante o armazenamento e após sua dessecação. Sementes tratadas com fungicida Captan e ácido abscísico (ABA) foram armazenadas em refrigerador (8°C), durante 135 e 190 dias sendo avaliados: viabilidade, vigor, teor de carboidratos totais, amido, flavonoides e compostos fenólicos totais e a sua ultraestrutura por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). A germinação das sementes após a colheita foi de 94% não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as sementes controle e as tratadas superficialmente com Captan e ABA. Após armazenamento sob refrigeração por 135 e 190 dias, houve redução dos percentuais de germinação das sementes em todos os tratamentos. Não houve mudanças nos teores de carboidratos totais ao longo dos 190 dias de armazenamento, porém o conteúdo de amido decresce após 135 dias, para todos os tratamentos. Também houve redução nos teores de compostos fenólicos e flavonoides ao longo do tempo de armazenamento. Os grãos de amido das sementes recém coletadas apresentam características de birrefringência, e após armazenamento por 135 dias aparentemente ocorreu diminuição desta característica, indicando que alterações estruturais e bioquímicas estão relacionadas com o processo. Análise em MEV mostrou, nas células cotiledonares de sementes após 135 dias a separação de paredes celulares adjacentes. Análise em MET revelou paredes celulares das células cotiledonares retraídas, com vacúolos e modificação na morfologia de mitocôndrias após 135 dias de armazenamento. A atividade enzimática da catalase (CAT), a condutividade elétrica e a germinabilidade foram avaliadas em sementes recém coletadas que apresentaram 55,45% de água e em sementes desseçadas. A dessecação moderada (sementes com 46,06 e 40,73% de água) diminuiu significativamente o percentual de germinação, e a dessecação severa (sementes com 22,66% de água) provocou perda total de viabilidade. A condutividade elétrica aumentou nas sementes a medida que a umidade diminuía. A atividade da CAT não foi detectada em sementes recém-coletadas, mas sim nas que sofreram perda moderada de umidade

enquanto que a perda severa de umidade inibiu totalmente a atividade desta enzima bem como provocou perda total de viabilidade das sementes.

**Palavras-chave:** Sementes recalcitrantes. Armazenamento de sementes. Microscopia eletrônica de transmissão. Microscopia eletrônica de varredura. Tolerância à dessecação. Catalase.

## ABSTRACT

The seeds of *Eugenia uniflora* L. rapidly lose their physiological quality after dispersion. Knowing the factors related to this process is necessary for the storage of seeds after the annual harvest facilitating actions of restoration of areas and conservation of the species. Thus, this study was developed to analyze the physiological changes associated with loss of viability and vigor of *E. uniflora* seeds and to relate them to biochemical and ultrastructural changes during storage and after desiccation. Seeds treated with fungicide Captan and abscisic acid (ABA) were stored in refrigerator (8 ° C), for 135 and 190 days, being evaluated: viability, vigor, total carbohydrate content, starch, flavonoids and total phenolic compounds and their ultrastructure by Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Seed germination after harvest was 94%, and there were no statistically significant differences between control seeds and those treated superficially with Captan and ABA. After storage under refrigeration for 135 and 190 days, seed germination percentages were reduced in all treatments. There were no changes in total carbohydrate contents over the 190 days of storage, but the starch content decreased after 135 days, for all treatments. There was also a reduction in the contents of phenolic compounds and flavonoids throughout the storage time. The starch grains of the newly collected seeds presented birefringence characteristics, and after storage for 135 days, a decrease in this characteristic apparently occurred, indicating that structural and biochemical changes are related to the process. SEM analysis showed, in the cotyledonary seed cells after 135 days, the separation of adjacent cell walls. MET analysis revealed cell walls of retracted cotyledon cells with vacuoles and modified mitochondrial morphology after 135 days of storage. The catalase enzymatic activity (CAT), the electrical conductivity and the germinability were evaluated in freshly collected seeds that presented 55.45% water and in desiccated seeds. Moderate desiccation (seeds with 46.06 and 40.73% water) significantly reduced the percentage of germination, and severe desiccation (seeds with 22.66% water) caused a total loss of viability. The electrical conductivity increased in the seeds as the moisture decreased. The activity of CAT was not detected in freshly harvested seeds, but in those that suffered moderate loss of moisture, while the severe loss of moisture totally inhibited the activity of this enzyme as well as caused a total loss of viability of the seeds.

Key words: Recurrent seeds. Storage of seeds. Transmission electronic microscopy. Scanning electron microscopy. Desiccation tolerance. Catalase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma do processo de coleta e beneficiamento das sementes de <i>E. uniflora</i> posteriormente armazenadas (Experimento I).....	41
Figura 2 – Curva de dessecação utilizada para obter os teores de água nas sementes de <i>E. uniflora</i> através da massa das sementes.....	48
Figura 3 – Organograma do processo de coleta e beneficiamento das sementes de <i>E. uniflora</i> posteriormente dessecadas (Experimento II). ....	51
Figura 4 – Eletromicrografia de varredura de células cotiledonares de <i>E. uniflora</i> . ....	62
Figura 5 – Eletromicrografias de transmissão de sementes de <i>E. uniflora</i> ...	66





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de água de sementes de <i>E.uniflora</i> em função do tratamento e do período de armazenamento..	54
Tabela 2 - Porcentagem de germinação de sementes de <i>E. uniflora</i> em função do tratamento e do período de armazenamento.	54
Tabela 3 - Índice de velocidade de germinação de sementes de <i>E. uniflora</i> em função do tratamento e do período de armazenamento.....	57
Tabela 4 - Teor de açúcares solúveis totais (mg g <sup>-1</sup> massa seca) em sementes de <i>E. uniflora</i> em função do tempo de armazenamento (temperatura de $\pm 8^{\circ}\text{C}$ ) e dos tratamentos..	59
Tabela 5 - Teor de Amido (mg g <sup>-1</sup> massa seca) em sementes de <i>E. uniflora</i> em função do tempo de armazenamento (temperatura de $\pm 8^{\circ}\text{C}$ ) e dos tratamentos.....	59
Tabela 6 - Concentração de compostos fenólicos e flavonóides ( $\mu\text{g g}^{-1}$ de massa seca) em sementes de <i>E. uniflora</i> em função do tempo de armazenamento (temperatura de $\pm 8^{\circ}\text{C}$ ) e dos tratamentos..	61
Tabela 7 - Porcentagem de germinação e IVG de sementes de <i>E. uniflora</i> em função do teor de água inicial e após dessecação em estufa a $40^{\circ}\text{C}$ .....	68
Tabela 8 - Condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1}\text{ g}^{-1}$ ) de sementes de <i>E. uniflora</i> em função do teor de água inicial e após dessecação em estufa a $40^{\circ}\text{C}$ .....	69
Tabela 9 - Atividade enzimática da catalase ( $\mu\text{mol min}^{-1}\ \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) de sementes de <i>E. uniflora</i> em função do teor de água inicial e após dessecação em estufa a $40^{\circ}\text{C}$ .....	71



## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- DBO - Demanda Bioquímica de Oxigenio
- DMSO - Dimetil Sulfóxido
- LABCEV - Laboratório de Biologia Celular Vegetal
- LMBV – Laboratório de Morfogênes e Bioquímica Vegetal
- LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
- MCW – Metanol, clorofórmio, água
- MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina
- EROS - Espécies Reativas de Oxigênio
- CAT- Catalase
- ABA- Ácido abscísico
- LEA – Late Embryogenesis abundant
- FS – Formulação Solúvel
- IVG – Índice de velocidade de germinação
- ATO – Azul de toluidina
- UV- VIS –Ultravioleta visível
- EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
- DTT – Ditiotretitol
- PVP- Polivinilpirrolidona
- PMSF- Fluoreto de fenilmetilsulfonil



## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
1.1 Introdução Geral .....	23
1.2 Tolerância ao dessecamento em sementes .....	25
1.3 Características de recalitrância em sementes .....	27
1.4 Deterioração de sementes: aspectos fisiológicos e bioquímicos .....	30
1.5 Metabólitos de interesse em sementes .....	32
1.6 Ácido Abscísico em sementes .....	36
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>38</b>
2.1 Objetivo Geral .....	38
2.2 Objetivos Específicos .....	38
<b>3.METODOLOGIA .....</b>	<b>39</b>
3.1 Obtenções do material biológico .....	39
3.2 Armazenamento de sementes – Experimento I .....	39
3.3 Determinação do teor de água das sementes .....	42
3.4 Testes de Germinação.....	42
3.5 Análise de Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	43
3.6 Análise de Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	43
3.7 Extração e determinação de açúcares solúveis totais .....	44
3.8 Extração e determinação de Amido .....	45
3.9 Extração e determinação de Compostos fenólicos totais .....	46
3.10 Extração e determinação de flavonoides totais .....	46
3.11 Dessecação de sementes em estufa a 40°C: teor de água, condutividade elétrica e atividade da enzima catalase – Experimento II .....	47
3.12 Análise estatística dos dados .....	52

<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
4.1 Teor de água inicial (Experimento I) .....	53
4.2 Germinabilidade e índice de velocidade de germinação de sementes recém-coletadas e armazenadas (Experimento I) .....	54
4.3 Teor de açúcares solúveis totais e amido (Experimento I) .....	57
4.4 Compostos fenólicos totais e flavonoides (Experimento I) .....	59
4.5 Caracterização ultraestrutural das células cotiledonares de <i>E. uniflora</i> (Experimento I) .....	61
4.6 Teor de água inicial, germinação, IVG, condutividade elétrica e atividade da enzima catalase de sementes de <i>E. uniflora</i> após dessecação(Experimento II) .....	67
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>74</b>

## 1.INTRODUÇÃO

### 1.1 Introdução Geral

A Mata Atlântica e seus ecossistemas associados sofrem devastação desde a colonização do Brasil sendo que atualmente estima-se que existam apenas 8,5 % da área da cobertura original. Mesmo com a extrema redução ocorrida, este domínio ainda abriga altíssimos níveis de riqueza biológica e de espécies endêmicas, sendo considerado um hotspot mundial de biodiversidade, contendo uma das áreas mais ricas em biodiversidade e mais ameaçadas do planeta (Fundação SOS Mata Atlântica, 2015). Necessita-se de um melhor conhecimento das espécies típicas deste bioma, sendo a recuperação e o manejo deste domínio fundamentais para o desenvolvimento de estratégias e métodos adequados para a conservação.

A família Myrtaceae está inserida na ordem Myrtiliflorae (Myrtales). A família apresenta cerca de 150 gêneros com aproximadamente 3600 espécies, sendo a segunda maior família da ordem. Existem dois grandes centros de dispersão das Myrtaceae: na América do Sul, mais precisamente onde há ocorrência de clima tropical (Barroso, 1991) e no sul da Austrália, onde predomina o clima temperado (Cronquist, 1981). Mesmo não sendo tão frequente, esta família ocorre em praticamente todo o globo. Dentre as mirtáceas, o gênero *Eugenia* é um dos maiores da família. O gênero está distribuído principalmente nas Américas Central e do Sul. Encontra-se desde o México e Caribe, até o Norte da Argentina, com aproximadamente 350 espécies ocorrendo no Brasil (Landrum & Kawasaki, 1997).

Por possuírem frutos amplamente consumidos pela avifauna que auxiliam na dispersão das sementes, ou por frugivoria (Castro & Galetti, 2004), existe um interesse no gênero *Eugenia*, para seu uso em programas de

recuperação de áreas degradadas e de preservação permanente. A espécie *Eugenia uniflora* L., popularmente conhecida como pitangueira é uma espécie de fácil adaptação, estando distribuída em quase todo território brasileiro, ocorrendo nas variadas formações fisiográficas: Caatinga, Cerrado e Mata atlântica (Lorenzi, 1992).

O fruto da pitangueira é conhecido como pitanga, pitanga-rósea, pitanga-vermelha, pitanga-do-mato, nangaripé e arrayán (Sanchotene, 1989). Seu nome comum tem origem indígena, do tupi *pi'tãg*, que significa vermelho, pela cor que o fruto apresenta (Donadio *et al.*, 2002). Seu fruto consiste em uma baga, globosa e sulcada, com cálice persistente, apresentando cerca de 30 mm de diâmetro, geralmente apresenta uma única semente, de coloração branco-acinzentada (Lorenzi, 2002; Sanchotene, 1989). A anatomia de sementes de Myrtaceae foi investigada com alguma ênfase para espécies de importância econômica, segundo Landrum & Stevenson (1986) a subtribo Myrtinae apresenta predominância de sementes pequenas com eixo embrionário volumoso e rico em reservas. O embrião do gênero *Eugenia* é globoso, sem diferenciação aparente entre o eixo embrionário e os cotilédones, considerando-se o embrião “conferruminado”, sem distinção entre a linha de soldadura e os cotilédones (Barroso, 2002).

O desenvolvimento da semente como um órgão especializado para a nutrição, proteção e dispersão da próxima geração foi um importante caminho da evolução no mundo das plantas vasculares. As sementes são muito variadas quanto às suas formas e longevidade. Na sua organização geral, as sementes contêm um embrião formado a partir de um zigoto diploide, resultado da fusão do núcleo espermático com a oosfera. A testa ou tegumento é uma estrutura protetora, formada pelos integumentos que



envolvem o óvulo, podendo apresentar-se muito resistente ou como uma camada superficial. Além destas estruturas, e em espécies nas quais as reservas nutritivas não são armazenadas dentro dos cotilédones, apresentam tecidos de armazenamento alternativos, como o endosperma (Popiginis, 1985; Bewley *et al.*, 2013).

Diversas espécies arbóreas, que possuem um grande potencial para serem utilizadas tanto na arborização urbana como também em programas de reflorestamento, não são utilizadas muitas vezes pela escassez de informações técnicas sobre o manejo de suas sementes, como é o caso de algumas espécies de *Eugenia* (Barbedo *et al.*, 1998). Dentre as principais características, informações sobre o armazenamento figuram como uma das mais importantes, sabendo-se que através deste conhecimento inicial, o manejo correto das sementes pós-colheita poderá ser direcionado para as melhores alternativas de conservação das sementes.

## **1.2 Tolerância ao dessecação em sementes**

O fenômeno de controle e aquisição da tolerância à dessecação em sementes ortodoxas parece ser pré-programado e desenvolvido ainda durante o desenvolvimento do embrião (Bewley, 1979, 1997; Bewley & Black, 1994; Bewley *et al.*, 2013).

A água assume importante papel dentro do desenvolvimento e maturação das sementes. Segundo as definições de Castro *et al.*, (2004), existem três diferentes fases de desenvolvimento de sementes: a primeira delas, a embriogênese, onde ocorre intensa divisão celular e um rápido aumento da massa e do teor de água nas sementes. Posteriormente a esta fase, ocorre um aumento na expansão e na deposição de reservas e neste momento,

os vacúolos diminuem de tamanho ao passo que os compostos de reserva acumulam-se com conseqüente aumento de massa seca. Ao final deste processo de desenvolvimento, as sementes tolerantes ao dessecação passam por uma fase de desidratação, com perda de água e diminuição do peso fresco (Bewley & Black, 1994), favorecendo a tolerância ao dessecação.

As sementes que não passam pela fase de dessecação ao final da maturação, sendo dispersas da planta-mãe com teor elevado de água (entre 40% a 70%), apresentam um metabolismo ativo, sendo sensíveis ao dessecação. Estas características fazem com que as sementes percam seu poder germinativo em teores de água inferiores a um nível crítico mínimo. Este nível crítico mínimo pode variar com a espécie, devendo ser armazenada com teores de água alto (Bewley & Black, 1994).

Vertucci (1990) analisou propriedades calorimétricas e identificou nas sementes cinco níveis de hidratação diferentes. Cada um destes níveis apresenta propriedades físicas diferenciadas, relacionando-se com o estado metabólico das sementes. No nível mais alto de água (nível V, correspondente ao conteúdo de água maior que  $0,55 \text{ g g}^{-1}$ ), as sementes estão hidratadas e apresentam metabolismo em pleno funcionamento, podendo iniciar o processo de germinação. No nível IV ( $0,035\text{-}0,55 \text{ g. g}^{-1}$ ) é possível que ocorra síntese de proteínas e de ácidos nucleicos, além da respiração. Neste nível, é provável que não exista água suficiente para o crescimento celular e para a germinação. No nível III ( $0,24\text{-}0,035 \text{ g.g}^{-1}$ ), a síntese de proteínas fica impossibilitada, porém a respiração ainda não foi inibida. Em níveis ainda mais baixos de hidratação da semente ( $< 0,24 \text{ g g}^{-1}$ ), ocorrem

apenas eventos catabólicos, contanto que as sementes sejam tolerantes a estes níveis de dessecação.

### **1.3 Características de recalcitrância em sementes**

A longevidade, característica que permite às sementes manterem seu potencial germinativo, relaciona-se ao tempo durante o qual é possível conservá-las sem que apresentem perda de viabilidade (Cardoso, 2004). O período pelo qual as sementes permanecem viáveis varia dentro de uma mesma espécie, devido a diferenças no genótipo, além da dependência por fatores de armazenamento (Hong & Ellis, 1996).

A longevidade das sementes é uma característica que é determinada durante seu desenvolvimento (Cardoso, 2004). O metabolismo durante o desenvolvimento da semente é predominantemente anabólico, com maciço processo de síntese e de deposição de polímeros de reservas nos tecidos. A síntese proteica é um aspecto importante estudado na dessecação das sementes, bem como no processo de desenvolvimento e no processo germinativo (Jiang & Kermodé, 1994). As sementes recalcitrantes iniciam o metabolismo de germinação ao final do desenvolvimento por não passarem pela fase de dessecação, podendo germinar quando ainda se encontram ligadas a planta-mãe (Marcos Filho, 2005). Portanto, não apresentam período de transição entre a maturação e a germinação e raramente apresentam dormência. Essas sementes em geral possuem períodos de vida muito limitados, morrendo devido à desidratação (Bewley & Black, 1994).

Sementes recalcitrantes já foram classificadas de várias maneiras, inicialmente por Roberts (1973), como processo “tudo ou nada”, entre sementes que suportassem dessecação, (ortodoxas) e as que não tolerariam, (recalcitrantes). Posteriormente, Ellis e colaboradores (1990), classificaram

as sementes em fatores intermediários de recalcitrância, além dos já propostos por Roberts. Atualmente os estudos reclassificaram-nas em níveis de recalcitrância (Farrant *et al.*, 1998; Berjak & Pammenter, 2008; Walters, 1999; Daws *et al.*, 2004, 2006; Kermode & Finch-Savage, 2002; Angelovici *et al.*, 2010; Oliver *et al.*, 2010). Após a histodiferenciação, as células de sementes ortodoxas completam os vacúolos com proteínas, acumulam açúcares, alteram a composição da membrana, produzem proteínas LEA (do inglês “late-embryogenesis-abundant”) e entram no estado vítreo. Essas modificações hipoteticamente seriam responsáveis por conferir tolerância à desidratação. No entanto, estes mesmos processos podem ocorrer nos mesmos graus em sementes recalcitrantes, dificultando a demonstração de que atuariam como protetores. Portanto, a ideia de recalcitrante ou tolerante à desidratação foi modificada de um conceito de “tudo ou nada” para um conceito mais quantitativo. Assim podemos relacionar o estudo do dano por desidratação com o resultado de um ou mais estresses e de tolerância a uma série de mecanismos protetores (Walters 1999).

Os danos mais evidentes durante a deterioração das sementes estão relacionados aos que surgem durante a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas, porém ainda antes destes ocorrerem, outros relacionados com a ultraestrutura e ligados aos fatores bioquímicos podem ser identificados (Marcos Filho, 2005).

Algumas deteriorações bioquímicas ou metabólicas em sementes são identificadas como, por exemplo, mudanças na atividade respiratória e no metabolismo de reservas, alterações no aparato enzimático e na síntese proteica, deposição de substâncias tóxicas, danos ao sistema de membranas e ao DNA, lixiviação de solutos e peroxidação de compostos lipídicos.

(Cardoso, 2004; Marcos Filho, 2005; Santos *et al.*, 2004). O decréscimo do teor dos carboidratos solúveis totais é comum durante a deterioração de sementes resultando na redução da germinabilidade e do vigor (Marcos Filho, 2005).

Com relação aos mecanismos que podem estar envolvidos na capacidade de tolerar a dessecação em tecidos vivos, existem semelhanças entre briófitas, plantas revivescentes, esporos de samambaias, grãos de pólen e sementes. De modo geral o metabolismo diminui durante a perda de água e é restabelecido com a reidratação (Alpert & Oliver, 2002; Scott, 2000). Pammenter & Berjak (1999), caracterizam as sementes recalcitrantes por geralmente não apresentarem redução no metabolismo, antecedendo a sua dispersão.

Do ponto de vista celular e estrutural Berjak & Pammenter (2000) enfatizam eventos com efeitos sobre a arquitetura intracelular podendo resultar em profundas consequências sobre o funcionamento da célula, pois o citoesqueleto é uma estrutura tridimensional dinâmica, responsável pela manutenção das posições intracelulares das organelas umas em relação às outras. Portanto a desorganização do citoesqueleto pode levar a perda da função celular caso o dano não possa ser reparado. Características típicas de sementes recalcitrantes evidenciam células da medula do eixo embrionário com citoplasma denso; já em células ricas em carboidratos de reserva, o citoplasma é periférico, indicando células com vacuolização (Berjak & Pammenter, 2000) Tais evidências representam uma limitação à tolerância à dessecação, ocorrendo estresse mecânico sobre as células durante a secagem.

#### **1.4 Deterioração de sementes: aspectos fisiológicos e bioquímicos**

O envelhecimento de sementes envolve uma série de processos, os quais levam a um declínio na qualidade fisiológica e posteriormente à perda da viabilidade. De acordo com Delouche & Baskin (1973), a deterioração é considerada um processo inevitável e irreversível, porém com possibilidades de retardo, através de práticas que possibilitem o melhor armazenamento para a espécie. Eventos ocorrem durante a deterioração de sementes envolvendo a degeneração das membranas celulares, a redução das atividades respiratórias e biossintéticas, a redução do potencial de armazenamento, a redução da germinação, o retardamento do crescimento e do desenvolvimento das plântulas. O dano metabólico em sementes recalcitrantes é intimamente ligado com a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), aonde as defesas antioxidantes intracelulares são inadequadas para extingui-las (Francini *et al.*, 2006; Ntuli *et al.*, 2011). Foi sugerido também, que a perda da viabilidade durante a dessecação de diversas sementes sensíveis a este processo, é acompanhada por um acúmulo de radicais livres, tóxicos às células (Leprince & Bronchart; Deltour, 1990). Desta maneira, mesmo não havendo um consenso com relação ao sistema de ativação e supressão contra radicais livres durante a hidratação, é incontestável sua importância. A sensibilidade das sementes ao estresse oxidativo aumenta com a redução da atividade antioxidante. Berjak (2006) afirma que superóxido dismutase, catalase e peroxidase compõem o principal sistema enzimático contra radicais livres em sementes.

Nos organismos, existem vários mecanismos antioxidantes capazes de reduzir o estresse oxidativo pela remoção das espécies reativas de oxigênio. A ação da enzima catalase é conhecida por converter  $H_2O_2$  a

oxigênio e água. Trabalhos, investigando a sensibilidade à dessecação e atividade de enzimas removedoras de radicais livres em sementes, descreveram altas correlações entre a atividade destas enzimas e a viabilidade das sementes estudadas (Rosa *et al.*, 2005). O peróxido de hidrogênio pode facilmente ser difundido pelo sistema biológico de membranas podendo, portanto, causar estresse oxidativo fora do local de formação. Apesar de  $H_2O_2$  ser um oxidante relativamente estável e não altamente reativo, algumas biomoléculas, como determinadas proteínas, são diretamente sensíveis ao mesmo (Scandalios & Guan Polidoros, 1997).

As principais maneiras de manter o vigor e a viabilidade de sementes recalcitrantes é mantê-las em condições que evitem perda de água, temperatura mais baixa, bem como tratamentos que evitem a infestação ou minimizem a micoflora associada a sementes (Berjak e Pammenter, 2008). No entanto, o armazenamento de sementes não é totalmente garantido por estes procedimentos. Esta limitação deve-se ao fato de as sementes recalcitrantes serem metabolicamente ativas, e isso faz progredir o início da germinação ainda quando armazenadas (Daws *et al.*, 2012).

Uma das principais técnicas utilizadas para a preservação de sementes e de sua qualidade fisiológica é realizada com a redução do conteúdo de água ou com a redução da temperatura durante o armazenamento. Porém estas técnicas funcionam somente para sementes tolerantes a certos níveis de dessecação (Vieira *et al.*, 2001).

O favorecimento da deterioração das sementes pode ser acelerado com a presença de microrganismos como fungos que se estabelecem durante o armazenamento (Marcos Filho, 2005). Fungos são encontrados aderidos passivamente sobre a superfície das sementes, junto a detritos vegetais e

partículas do solo, e internamente como patógenos da semente. Estes fungos quando presentes no tegumento, no endosperma ou no embrião, podem causar a destruição dos cotilédones e justamente por estarem localizados na parte interna das sementes, apresentam maiores chances de sobrevivência (Santos *et al.*, 2000). Berjak & Pammenter (2008) e Daws *et al.* (2004) argumentam que sementes tropicais produzidas ao final do verão são mais susceptíveis ao ataque de microrganismos patógenos e também apresentam uma qualidade inferior devido às altas temperaturas que essas sementes foram submetidas durante o desenvolvimento.

As sementes atacadas por fungos e/ou contaminadas durante o beneficiamento sofrem redução da capacidade germinativa e do vigor das mudas, além de tombamento de plântulas recém-emergidas e redução da população. O baixo poder germinativo muitas vezes pode ser confundido com a manifestação de doenças como “damping-off”, caracterizada pela presença de lesão fúngica na porção basal da plântula, em fase de pós-germinação da semente (Menten, 1995). O tratamento de sementes com fungicidas é umas das medidas mais antigas e eficientes de controle de patógenos, sendo normalmente de baixo custo, e com ação direta no inóculo. A destruição de esporos da superfície das sementes depende da espécie do fungo e da condição da semente. O hipoclorito de sódio (NaClO) é bastante usado para eliminar contaminantes superficiais de material vegetal e também no controle de organismos patogênicos (Coutinho *et al.*, 2007).

### **1.5 Metabólitos de interesse em sementes**

A grande maioria das sementes possuem compostos poliméricos de reserva, a maioria deles sendo carboidratos, lipídios e proteínas. O amido, um polímero de glicose, é um dos mais comuns polissacarídeos de reserva



em sementes e acha-se contido em grânulos no citoplasma ou em palstídeos, denominados amiloplastos (Popiginis, 1985). A hemicelulose, comumente é encontrada em paredes celulares, geralmente como polímeros de mananos. Os óleos são triacilgliceróis, compostos por três ácidos graxos que são específicos para cada tipo de óleo. As proteínas de armazenamento, por sua vez podem ser albuminas, e prolaminas e estão armazenadas em vacúolos de armazenamento proteico (Bewley *et al.*, 2013).

Durante a germinação, para ativar o metabolismo e permitir o desenvolvimento inicial do embrião, as sementes necessitam de suas reservas nutritivas, que serão metabolizadas até a formação de uma plântula, com competências para manter-se autotrófica. Os carboidratos e os lipídios são utilizados como principais fontes de carbono, enquanto as proteínas são fontes de nitrogênio e enxofre, indispensáveis para a síntese de novas proteínas, enzimas e ácidos nucleicos e compostos do metabolismo secundário, imprescindíveis ao desenvolvimento da plântula (Buckeridge *et al.*, 2004).

Além dos constituintes acima mencionados, existem outros em menores quantidades, que não são considerados estritamente como componentes de armazenamento. Alguns, no entanto merecem ser investigados e mencionados devido a sua importância nas sementes. Os compostos fenólicos como a cumarina e o ácido clorogênico, e outros derivados do ácido ferúlico, cafeico e ácido sinápico fazem parte deste grupo, geralmente encontrados no tegumento das sementes. Estes podem desde inibir a germinação da própria semente como também inibir por ação alelopática o desenvolvimento vizinho de outras espécies (Bewley *et al.*, 2013). Cada um dos componentes desempenha um papel fundamental, que

pode ser vital ao desenvolvimento do embrião (Floriani, 2004; Marcos Filho, 2005; Bewley *et al.*, 2013). Os fenólicos abrangem desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização. Nas plantas, estão presentes de forma livre ou ligada a açúcares (glicosídeos) e proteínas (Bravo, 1998). Shahidi & Naczk (2006) dividem os compostos fenólicos em seis subclasses, baseados em sua estrutura química: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanas, taninos e cumarinas.

### ***Carboidratos***

A sacarose, um dissacarídeo, é o açúcar mais abundante e universal das plantas, devido a sua estabilidade estrutural e solubilidade em água, que fazem dela ser o principal carboidrato transportado pelo floema (Dietrich *et al.*, 1998). Também é reconhecida por ter importante função na regulação metabólica, sinalizando processos na expressão de genes e na determinação do desenvolvimento e diferenciação das plantas (Salisbury & Ross, 1992; Chourey *et al.*, 1995). A quebra enzimática da sacarose em órgãos drenos pode ser de grande importância para o mecanismo da conversão em amido, seja transitoriamente ou como depósito a longo prazo. A essência de toda a reação é o acoplamento da sacarose sintase com clivagem da UDP-glicose dependente de pirofosfato, para produzir glicose-1-fosfato, catalisando o primeiro passo da biossíntese de amido nestes órgãos (Guerin & Carbonero, 1997).

No metabolismo germinativo, os carboidratos de reserva, principalmente o amido, são metabolizados e mobilizados com o auxílio das enzimas amilase, maltase, dextrinase e fosforilases, sendo convertidos a sacarose e ATP, utilizados como fontes de energia e na produção de esqueletos de carbono para a formação das paredes celulares e protoplasma

(Marcos Filho, 2005). Os carboidratos de reserva solúveis e de parede celular atuam nos mecanismos de embebição de água e proteção do embrião contra o dessecamento e ataque de microrganismos. O decréscimo no teor destes componentes durante o desenvolvimento ou armazenamento das sementes resulta na queda da capacidade germinativa e do vigor das sementes.

### ***Proteínas***

As proteínas de estocagem nas sementes têm como principal função armazenar principalmente nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de novas proteínas, ácidos nucleicos e compostos secundários na plântula em crescimento. A síntese das proteínas de reserva ocorre em períodos bem definidos durante o desenvolvimento da semente, geralmente nos tecidos de reserva como cotilédones e endosperma, onde os mRNA codificam as proteínas presentes nestes tecidos (Buckeridge *et al.*, 2004). Dentro do grupo relacionado à proteção estão às proteínas LEAs, que são acumuladas tardiamente ao final do desenvolvimento das sementes e estão relacionadas à aquisição da tolerância à dessecação. Podem também ser expressas quando induzidas pelo frio, pelo estresse osmótico, ou por aplicações de ácido abscísico. Estas proteínas impedem a desnaturação de macromoléculas e estabilizam estruturas intracelulares sob condições de estresse, incluindo estresse hídrico severo (Close, 1997). Foi sugerido por Berjak & Pammenter (2008) que proteínas LEA de alguns grupos poderiam manter uma camada de hidratação em torno de estruturas intracelulares e macromoléculas. Outra hipótese relaciona o sequestro de íons durante a desidratação. Esta ação também pode ser atribuída à característica hidrofílica do segmento K, rico em lisina do grupo 2 das proteínas LEA (deidrinas). Essas interações estão ligadas a área hidrofílica intermolecular. Ao serem passadas por um processo

de secagem (rápido ou lento) estas proteínas assumem uma conformação alfa-helicoidal semelhante à morfologia dos filamentos intermediários do citoesqueleto, conferindo força e resistência às células vegetais, além de prevenir uma plasmólise e deformação celular durante a dessecação (Berjack & Pammenter, 2007, Wise & Tunacliffe, 2004). A conformação helicoidal também tem por função a base para a formação e manutenção do estado vítreo intracelular (Wolkers *et al.*, 2001).

### **1.6 Ácido Abscísico em sementes**

As sementes em desenvolvimento são ricas fontes de fitormônios (Bewley & Black, 1978). Algumas substâncias presentes em sementes são uma das causas da dormência, sendo extraídas de algumas espécies vegetais. Os fitormônios participam dos processos de desenvolvimento, germinação e dormência de sementes. Inibidores endógenos exercem controle durante a embriogênese e a maturação das sementes, particularmente atuando na prevenção de germinação precoce. A localização destas substâncias varia de acordo com a espécie, sendo encontradas no embrião ou no endosperma ou ainda em ambas as partes, no tegumento ou pericarpo do fruto (Carvalho & Nakagawa, 2000).

O ácido abscísico (ABA) atua na biossíntese de substâncias de reservas e na manutenção de dormência. Durante a primeira metade do desenvolvimento os níveis de ABA se elevam e declinam ao final da maturação, quando o nível de água das sementes diminui (Koornneef *et al.*, 2002). Além de estar envolvido na supressão da germinação, o ABA está relacionado aos processos envolvendo síntese de proteínas de armazenamento, a indução da tolerância a dessecação e a indução a síntese

de proteínas LEA. Durante o período entre a fase intermediária e a fase tardia no desenvolvimento de sementes, ocorre tanto o acúmulo de RNAs-mensageiros específicos, quanto o aumento dos níveis endógenos de ABA. Boa parte destes codificam as proteínas LEA, envolvidas na tolerância à dessecação (Taiz & Zeiger, 2004; Finkelstein, 2013).

A viviparidade ocorre em mutantes que não possuem fatores que inibem a germinação durante o desenvolvimento da semente. O desenvolvimento de sementes de mutantes com defeitos em enzimas na via de biossíntese de ABA, ou de carotenoides, pode exibir viviparidade (Bewley *et al.*, 2013). A adição de ABA em sementes desenvolvidas não-dormentes de *Arabidopsis*, inibiu a germinação. Garcarrubio *et al.* (1997) sugeriram que essas sementes não germinaram porque o ABA impediu a degradação de proteínas de reserva nas sementes, restringindo assim a disponibilidade de energia e metabólitos das sementes. Segundo estes autores, este efeito do ABA pode estar relacionado com sua função natural de inibidor endógeno da germinação precoce durante a formação da semente. Estudos realizados por Barbedo & Cicero (2000) mostraram que sementes de elevada qualidade de *Inga uruguensis*, quando armazenadas hidratadas e embebidas em solução de ácido abscísico  $10^{-4}$ M em câmara fria, podem apresentar germinação superior a 80% após 40 dias.

Desta forma, o conhecimento do comportamento de sementes de *E. uniflora* durante seu armazenamento e após a redução de água, podem ajudar a elevar sua capacidade de conservação por períodos mais longos, desde que sejam empregadas técnicas adequadas. Este conhecimento é fundamental tanto do ponto de vista científico como também do tecnológico.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

- Analisar aspectos bioquímicos e ultraestruturais e descrever o comportamento das sementes de *E. uniflora* durante o armazenamento e a dessecação, testando alternativas para o armazenamento destas sementes.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a germinabilidade das sementes armazenadas sob-refrigeração durante 135 e 190 dias.
- Avaliar o efeito de tratamentos (controle), Captan e Ácido abscísico na germinabilidade de sementes armazenadas durante 135 e 190 dias.
- Avaliar quantitativamente carboidratos totais, amido e compostos fenólicos em sementes de *E. uniflora* armazenadas sob refrigeração por 135 e 190 dias relacionando-os ao metabolismo e germinabilidade das sementes.
- Analisar a ultraestrutura de sementes de *E. uniflora* recém-coletadas e armazenadas durante 135 dias.
- Avaliar a germinabilidade e o índice de velocidade de germinação em sementes de *E. uniflora* que passaram por dessecação.
- Avaliar a condutividade elétrica de sementes de *E. uniflora* que passaram por dessecação.
- Avaliar a atividade enzimática da enzima catalase em sementes recém-coletadas e após a desidratação.

### 3.METODOLOGIA

#### 3.1 Obtenções do material biológico

As sementes de *Eugenia uniflora* L. foram obtidas de frutos maduros (verificando-se coloração e consistência) de pitangueira de plantas na restinga ao longo da rodovia SC-406, em frente ao Parque Municipal da Lagoa do Peri, Florianópolis. Os frutos intactos foram armazenados sob-refrigeração durante aproximadamente quinze dias até o início dos procedimentos.

#### 3.2 Armazenamento de sementes – Experimento I

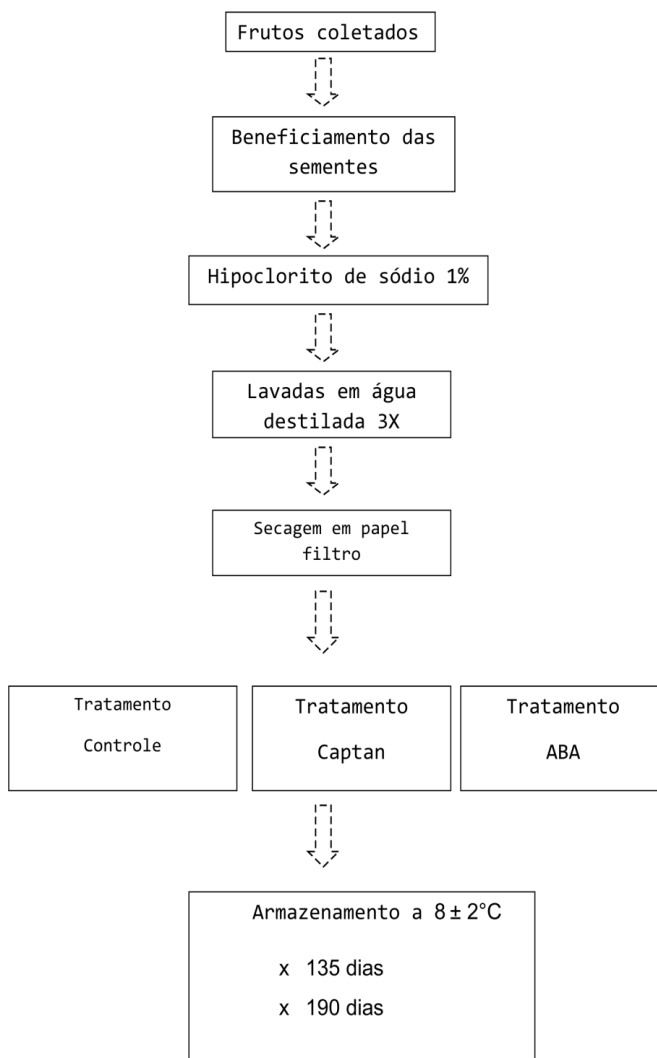
O processo de extração e beneficiamento das sementes foi realizado no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Santa Catarina. A despolpa foi manual, com eliminação de sementes infectadas por insetos (que apresentassem danos físicos). Após a retirada da polpa, as sementes passaram previamente por uma desinfestação em hipoclorito de sódio 1% por dez minutos, seguidas de três lavagens em água esterilizada e posteriormente secas superficialmente em papel filtro. Depois deste procedimento as sementes foram subdivididas em dois grupos: sementes recém-coletadas e sementes a serem armazenadas sob-refrigeração em temperatura de  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ , conforme adaptação de Khoama *et al.* (2006).

Foram realizados os seguintes tratamentos de armazenamento sob refrigeração: 1) Controle: sementes desinfetadas em hipoclorito de sódio 1% durante 15min; 2) sementes desinfetadas em hipoclorito de sódio 1% durante 15min e imersas em solução de fungicida Captan 200 FS na concentração de  $2,4 \text{ g L}^{-1}$ , durante 15 min 3) sementes desinfetadas com hipoclorito de

sódio 1% durante 15min e imersas em solução de ácido abscísico (ABA) adaptado de Carneiro *et al.* (2001) na concentração de  $150 \mu\text{g L}^{-1}$  durante 15 min. Em seguida, as sementes foram secas superficialmente com papel toalha e colocadas em embalagens de polietileno com vedação. O ABA foi manipulado na menor presença possível de luminosidade, devido à fotossensibilidade desse hormônio. Após estes procedimentos, as sementes previamente tratadas foram armazenadas em refrigerador Electrolux df 34, durante 135 e 190 dias (Fig.1).



Figura 1 – Organograma do processo de coleta e beneficiamento das sementes de *E. uniflora* posteriormente armazenadas (Experimento I).



### 3.3 Determinação do teor de água das sementes

Para a determinação do teor de água das sementes utilizou-se a metodologia proposta pelo manual de Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009). Foram separadas quatro repetições de cinco sementes, pesadas em balança analítica, com quatro casas decimais. A seguir as amostras devidamente identificadas foram colocadas em cápsulas de alumínio tampadas e levadas à estufa durante 24h em temperatura de  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ . A determinação da massa de matéria seca ocorreu através da pesagem das amostras depois do tempo de permanência estabelecido. O teor de umidade nas sementes foi calculado pela equação;

$$\text{H}_2\text{O} (\%) = ((M_f - M_s) / M_f \times 100)$$

Onde,  $M_f$  é o valor de matéria fresca,  $M_s$  é o valor de matéria seca após secagem em estufa a  $105^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  por 24h.

### 3.4 Testes de Germinação

A germinabilidade das sementes foi avaliada utilizando-se quatro repetições de 25 sementes por tratamento. O teste foi realizado em caixas de polietileno transparente de 18x10x8cm, previamente desinfestadas. Utilizou-se como substrato vermiculita autoclavada. O teste foi conduzido em câmara do tipo D. B.O, com fotoperíodo de 12h e temperatura de  $25^{\circ}\text{C}$ . As avaliações foram realizadas semanalmente, durante sessenta dias. As sementes que apresentavam crescimento de 5 mm de raiz primária foram consideradas como germinadas. Avaliou-se a porcentagem de sementes germinadas e o índice de velocidade de germinação (Maguire, 1962):

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

Sendo:  $G_1, G_2, G_n$  = número de sementes germinadas na primeira, segunda, até a última contagem e  $N_1, N_2, N_n$  = número de semanas desde a primeira, segunda, até a última contagem.

### **3.5 Análise de Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A fixação do material foi realizada no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LBCEV) da Universidade Federal de Santa Catarina. Amostras de quatro repetições de cinco sementes recém-coletadas e sementes armazenadas por 135 dias, foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, sacarose 2% e cacodilato 0,1M (pH 7,2) *overnight* (Schmidt *et al.*, 2009). Após três lavagens no mesmo tampão, as amostras foram pós-fixadas em tampão cacodilato 0,1M contendo tetróxido de ósmio ( $OsO_4$ ) 1% por 4 horas. A seguir, foram lavadas em tampão cacodilato 0,1M, desidratadas em séries crescentes de álcool etílico e secas em ponto crítico de  $CO_2$  (EM-CPD-030, Leica, Heidelberg, Alemanha). Após, foram aderidas ao suporte de alumínio com fita de carbono dupla face, e revestidas com 20nm de ouro, em metalizador marca Baltec, modelo CED 030. As amostras foram analisadas e registradas em MEV modelo JEOL (JSM) 6390LV SEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japão) a 10 KV no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME- UFSC).

### **3.6 Análise de Ultraestrutura por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Amostras de quatro repetições de cinco sementes recém coletadas e de sementes armazenadas por 135 dias, foram fixadas e pós-fixadas conforme protocolo utilizado para MEV no LBCEV. As amostras foram desidratadas em série crescente de acetona e infiltradas em resina Spurr (Spurr, 1969). As

secções semi-finas (700 nm) foram coradas com azul de toluidina (AT-O) e analisadas em microscópio óptico Leica DM2500, com registro de imagens capturadas com câmera fotográfica digital (Leica DFC295) acoplada. As secções ultrafinas (70 nm) foram contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo, de acordo com procedimentos de Reynolds (1963). Após foram analisadas e registradas em TEM modelo JEOL(JEM) 1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 80Kv), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

### **3.7 Extração e determinação de açúcares solúveis totais**

A extração e quantificação de açúcares solúveis totais, assim como os itens 3.8 e 3.9 foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Bioquímicas Vegetal (LMBEV) da UFSC. A extração de açúcares solúveis totais foi realizada segundo o método de Shannon (1968). Uma amostra de 300 mg de sementes foi macerada com graal e pistilo em 2 ml de solução de metanol, clorofórmio e água destilada (MCW) na proporção de 12:5:3, posteriormente triturados em Ultraturrax. O extrato foi centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e o precipitado foi submetido a uma nova extração, como descrito anteriormente. Este extrato foi novamente centrifugado nas mesmas condições e os sobrenadantes das duas extrações foram reunidos. Para cada quatro partes de sobrenadante, foram adicionadas uma parte de clorofórmio e uma e meia de água destilada. Esta mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos, coletando-se posteriormente a fase aquosa superior, anotando-se os volumes extraídos.

A dosagem dos açúcares foi realizada pelo método de Umbreit & Burris (1964), utilizando o reagente antrona 0,2% (p/v) em ácido sulfúrico

95%. Esta solução foi preparada imediatamente antes do uso. Três alíquotas de 1 ml foram obtidas de cada extrato e foram acrescidas de 2ml do reagente antrona. Em seguida, as amostras foram agitadas no vórtex, aquecidas a 100°C por 3 minutos e resfriadas à temperatura ambiente. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 620nm. A concentração de açúcares solúveis totais para cada amostra foi calculada a partir da curva padrão de glicose (0 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  de glicose por mg de matéria seca.

### **3.8 Extração e determinação de Amido**

A extração de amido foi realizada segundo o método de McCready *et al.* (1950). Os resíduos das amostras utilizadas para a extração de açúcares solúveis totais foram extraídos em 2 mL de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 30% (v/v). O extrato obtido foi centrifugado a 3000 rpm por 5 minutos, coletando-se o sobrenadante e utilizando-se o precipitado para uma segunda extração com 2 mL de  $\text{HClO}_4$  30% (v/v). O segundo extrato foi centrifugado nas condições descritas anteriormente e os sobrenadantes de ambas as extrações foram reunidos.

A dosagem de amido foi realizada pelo método de Umbreit & Burris (1964), utilizando-se o reagente antrona 0,2%. Três alíquotas de 1 mL foram obtidas de cada extrato e foram acrescidas de 2 mL do reagente antrona. Em seguida, as soluções foram agitadas em vórtex, mantidas a 100°C por 3 minutos e resfriadas em temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 620 nm. A concentração de amido foi calculada a partir de uma curva padrão de D-glicose (0 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expressos em  $\mu\text{g}$  de glicose por mg de matéria seca.

### 3.9 Extração e determinação de Compostos fenólicos totais

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais foi feita de acordo com a metodologia descrita por Schiavon *et al.* (2012). Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, utilizaram-se três amostras de 600 mg da massa inicial de sementes maceradas e trituradas em Ultraturrax. Foram adicionados 5 mL do extrato metanólico (metanol 80%), seguido de agitação no vórtex. Dessa solução, foram retirados 300  $\mu\text{L}$  do extrato e a este, foram acrescidos 225  $\mu\text{L}$  do reativo de Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de carbonato de sódio 2%, seguido de agitação e repouso de 1 hora em câmara escura. Em seguida procedeu-se a leitura das amostras a 750 nm em espectrofotômetro UV-vis. A quantificação dos compostos fenólicos totais foi feita a partir da curva padrão de ácido gálico (50 a 800  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  –  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 1,254x$ ). As análises foram realizadas em triplicatas e expressas em  $\mu\text{g}$  de ácido gálico por gramas de massa seca.

### 3.10 Extração e determinação de flavonoides totais

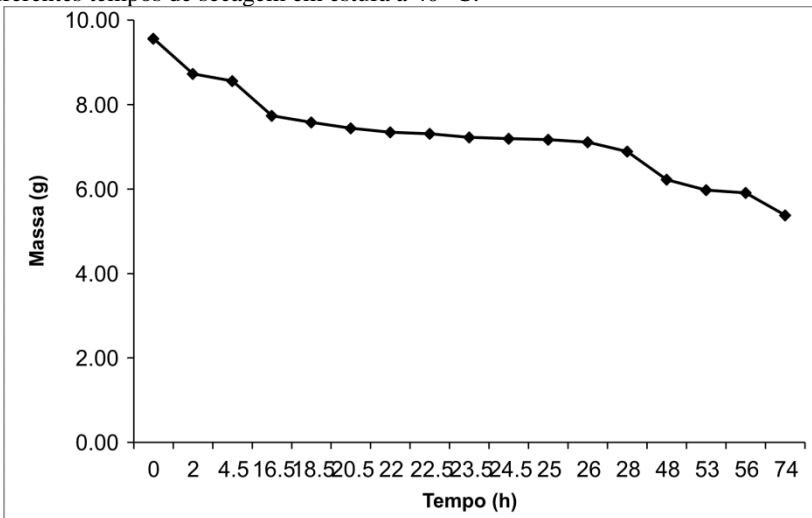
A determinação de flavonoides totais foi adaptada a partir do método de Zacarias *et al.* (2007). Foram utilizadas três amostras de 600 mg de sementes que foram extraídas em 5 mL do solvente metanol 80% para a extração inicial, macerando-se e triturando-se as sementes com auxílio de um triturador. Três alíquotas de 500  $\mu\text{L}$  do extrato foram utilizadas para a determinação do conteúdo de flavonoides totais, na presença de 500  $\mu\text{L}$  de Cloreto de alumínio (2% em metanol) e 2,5 mL de etanol. Após repouso de 1 hora, fez-se a leitura a 420 nm em espectrofotômetro UV-vis. A quantificação dos flavonoides foi feita a partir da curva padrão de quercetina (0,5 a 100  $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  –  $r^2 = 0,99$ ;  $y = 0,009x$ ).

### **3.11 Dessecação de sementes em estufa a 40°C: teor de água, condutividade elétrica e atividade da enzima catalase – Experimento II**

Após serem despulpadas, as sementes foram lavadas em água corrente e posteriormente embrulhadas em papel toalha para a remoção do excesso de umidade. O teor de água foi determinado por meio de método de estufa a  $105 \pm 3$  °C por 24 horas (Brasil, 2009), utilizando-se quatro repetições de quatro sementes por recipiente de alumínio. Os resultados foram expressos como porcentagem em relação à massa úmida da semente. Posteriormente, separaram-se quatro grupos com 190 sementes observando-se que em cada grupo estivessem presentes sementes de variados tamanhos. Todas as amostras foram pesadas no início do experimento. Uma amostra testemunha não recebeu tratamento de secagem (teor de água). As amostras foram levadas para secagem intermitente em estufa de circulação forçada de ar a  $40 \pm 2$  °C com 8 horas de ventilação e 16 horas de repouso, baseado em estudos de dessecação de sementes de Myrtaceae (Barbedo *et al.*, 1998; Delgado & Barbedo, 2007). As sementes usadas para a dessecação foram expostas em peneiras para melhor circulação de ar e impedir o acúmulo de água na prateleira. As amostras para controle de umidade dos lotes foram constantemente retiradas para pesagem até a obtenção dos valores estimados de redução de peso das sementes, estas foram retiradas à medida que as sementes atingiram 55,45%, 46,06%, 40,73% e 22,66% de água (figura 2). Cada amostra foi pesada logo após a retirada da estufa, a fim de monitorar a perda de umidade, utilizando-se a expressão descrita por Hong & Ellis (1996). Calculou-se a perda de massa durante a secagem pela seguinte fórmula:

$$\text{Massa (g) umidade desejada (\%)} = \frac{(100 - \text{umidade inicial})}{(100 - \text{umidade desejada})} \times \text{Massa inicial}$$

Figura 2 – Curva de dessecação utilizada para obter os teores de água nas sementes de *E. uniflora* através da massa das sementes. Teores de água determinados em diferentes tempos de secagem em estufa a 40° C.



Ao final do tempo de secagem de cada amostra, tomaram-se quatro amostras de 4 sementes para determinação do teor de água pelo método em estufa a 105°C ± 3°C, durante 24 horas (Brasil, 2009). As sementes restantes de cada amostra foram subdivididas em 25 sementes e colocadas para germinar seguindo o mesmo procedimento descrito no item 3.4. Foi avaliada a porcentagem de germinação total e o índice de velocidade de germinação, segundo Maguire (1962):

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

Sendo:  $G_1, G_2, G_n$  = número de sementes germinadas na primeira, segunda, até a última de contagem e  $N_1, N_2, N_n$  = número de semanas desde a primeira, segunda, até a última de contagem.

Do mesmo grupo de sementes que passaram por secagem, retiraram-se amostras para o teste de condutividade elétrica. Utilizaram-se quatro



repetições com 10 sementes, embebidas em 75ml de água destilada, mantidas a 25°C, realizando-se leituras em condutivímetro portátil Quimis modelo Q795 durante 0 e 24 horas de embebição. Os dados obtidos para cada grupo foram expressos em  $\mu\text{S}/\text{cm}/\text{g}$  de sementes. Calculou-se a taxa média de solutos liberados entre dois diferentes tempos de embebição para o período de estabilização nas leituras de condutividade elétrica, baseado na diferença entre a primeira leitura e posteriormente, dividindo pela massa das sementes.

$$\text{Taxa média de solutos} = \frac{L2-L1}{M}$$

Onde:

L1: Primeira leitura da condutividade elétrica durante tempo 0 horas de embebição.

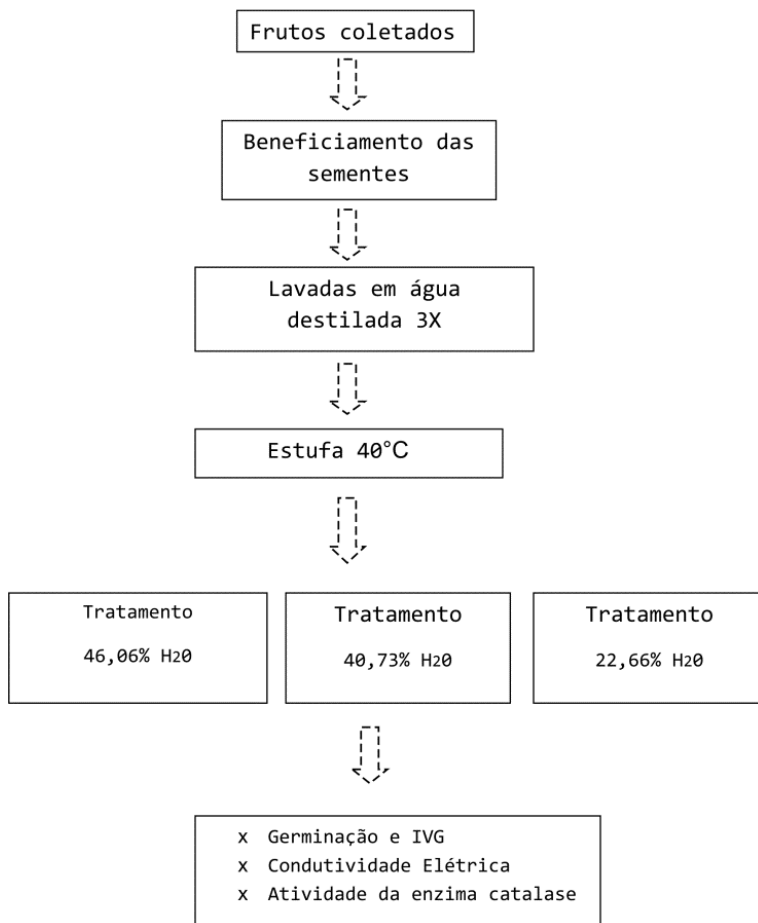
L2: Segunda leitura da condutividade elétrica durante tempo 24 horas de embebição.

M: Valor da massa total das sementes

A análise da atividade da enzima catalase foi verificada a partir da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio em um comprimento de onda de 240nm. As avaliações da enzima catalase foram realizadas em sementes recém-colhidas e dessecadas, conforme descrito anteriormente. Para a extração da catalase foram feitas extrações a partir de amostras de 200 mg de matéria seca, com auxílio de tampão de extração composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo 1 mM de EDTA, 3 mM de ditioneitol (DTT), 4% de polivinilpirrolidona (PVP) e 1 mM de PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonil). O extrato foi então centrifugado a 3000 rpm, a 4°C, por 10 minutos, e o sobrenadante foi coletado e utilizado para as análises. Para medir a atividade enzimática, 20  $\mu\text{L}$  de extrato proteico foram adicionados a 280  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato de potássio (50 mM, pH 7)

suplementado com peróxido de hidrogênio até a absorbância da solução ficar entre 0,38 e 0,40. As absorbâncias foram medidas em um leitor de placa, sendo que a velocidade de decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi medida de 20 em 20 segundos durante 10 minutos a  $25^\circ\text{C}$ . As amostras foram analisadas em triplicatas, sendo os valores expressos em  $\text{mmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$  (Aebi, 1984). Os teores de proteínas solúveis totais das amostras foram quantificados em espectrofotômetro pelo método de Bradford (1976) a  $595\text{nm}$ .

Figura 3 – Organograma do processo de coleta e beneficiamento das sementes de *E. uniflora* posteriormente dessecadas (Experimento II).



### **3.12 Análise estatística dos dados**

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA), seguida do teste de comparação de médias (Tukey 5%), quando os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas. Os dados foram analisados utilizando-se os programas computacionais Excel, Statistica 7.0, e R/R Studio.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Teor de água inicial (Experimento I)

O teor de água de sementes recém-coletadas de *Eugenia uniflora* foi de 52,10% de umidade (Tabela 1), confirmando o teor descrito por Delgado & Barbedo (2007). Os mesmos autores também avaliaram o teor de umidade de sementes recém-coletadas para outras espécies do gênero *Eugenia* onde *Eugenia brasiliensis* Lam. apresentou teor de 49,6%, *Eugenia pyriformis* Cambess. 66,8%, *Eugenia umbelliflora* Berg. 42,5% e *Eugenia cerasiflora* apresentou teor de água de 62,8%. Estes valores são bastante comuns para espécies do gênero *Eugenia*. Maluf e colaboradores (2003) em estudo com outra Myrtaceae encontraram teor de água de 57% em sementes de *Eugenia involucrata* DC. Calvi e colaboradores (2015) descreveram teor de umidade de 60% para *Eugenia stipitata* Mc Vaugh. Gentil & Ferreira (1999), descreveram teor de 58,8% para a mesma espécie de *Eugenia* estudada por Calvi *et al.* (2015), espécie de ocorrência natural na Amazônia. *Eugenia dysenterica* DC. e *Eugenia rostrifolia* D Legr. apresentaram entre 47 a 53% e 43% respectivamente, segundo Andrade *et al.* (2003) e Santos *et al.* (2004). Os elevados teores de água encontrados nessas espécies de *Eugenia* são característicos de recalcitrância em sementes. Nessas espécies, esse teor de água mantém a atividade metabólica, sendo possível algum nível de síntese de proteínas e de reparo de ácidos nucleicos (Vertucci & Farrant, 1995).

Em algumas espécies recalcitrantes, a respiração celular é alta em sementes recém-coletadas (Pammenter & Berjak, 1999) e o metabolismo dessas sementes mantém-se ativo quando apresentam conteúdo de água superior a 0,25g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> de matéria seca, ou seja cerca de 20% de umidade (Vertucci & Leopold, 1984).

Tabela 1 - Teor de água de sementes de *E.uniflora* em função do tratamento e do período de armazenamento. Médias seguidas de desvio padrão (n=4).

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)	
	0	135
Controle	52,10 ± 3,03	53,89 ± 4,46
Captan	-	52,52% ± 4,23
ABA	-	53,09% ± 4,73

#### 4.2 Germinabilidade e índice de velocidade de germinação de sementes recém-coletadas e armazenadas (Experimento I)

Os resultados dos testes de germinação estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Porcentagem de germinação de sementes de *E. uniflora* em função do tratamento e do período de armazenamento. Médias seguidas de desvio padrão (n=4). Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (colunas). Letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre períodos de armazenamento (linhas). Letras iguais não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)		
	0	135	190
	<b>Germinação (%)</b>		
Controle	94,00 ± 7,65 <sup>Aa</sup>	58 ± 10,58 <sup>Ab</sup>	41% ± 3,82 <sup>Ab</sup>
Captan	87% ± 6,00 <sup>Aa</sup>	57% ± 8,86 <sup>Ab</sup>	41% ± 15,44 <sup>Ab</sup>
ABA	77% ± 11,94 <sup>Aa</sup>	44% ± 15,31 <sup>Ab</sup>	40% ± 15,14 <sup>Ab</sup>

Neste trabalho observou-se redução da porcentagem de germinação de sementes de *E. uniflora* após 135 dias de armazenamento e não houve diferenças estatisticamente significativas após 135 dias e 190 dias de armazenamento (Tabela 2). Em estudo com Myrtaceas realizado por Bordignon (2000), com sementes de pitangueira e de guaviroveira

(*Campomanesia xanthocarpa* Berg.) armazenadas em frascos de vidro refrigerados a 4°C por até 105 dias, a autora também relata a redução da porcentagem de germinação de *E. uniflora*, onde a germinação decresceu de 88% para 73% no período final de armazenamento. Nota-se que após 135 dias de armazenamento a porcentagem de germinação decaiu para quase metade da germinação inicial. Analisando-se os resultados obtidos para a germinação de sementes de *E. uniflora* tratadas com Captan, neste trabalho, observou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (Tabela 2). Oliveira *et al.* (2011), em estudo sobre deterioração por microrganismos e uso de fungicidas, mostraram que carbendazim associado ao thiran, reduziu a incidência de fungos comparando-se aos tratamentos térmico e osmótico, diferentemente do que encontrado no presente trabalho para o uso de captan. Bonome (2006) avaliando a germinação de sementes de seringueira armazenadas em temperaturas controladas e temperatura ambiente mostrou que as sementes apresentaram porcentagem menor de germinabilidade quando tratadas com fungicidas Tecto 600 e Captan, comparando-as com sementes não tratadas. Este efeito pode ser atribuído à fitotoxicidade dos fungicidas em sementes que apresentam elevado teor de umidade, pois por estarem metabolicamente mais ativas, absorvem o produto químico com maior facilidade o que posteriormente provoca danos celulares. Bonone & Von Pinho (1999) em estudo com semente recalcitrante, que apresentava elevado teor de umidade, comprovaram o efeito fitotóxico dos fungicidas citados anteriormente. No presente estudo, nota-se que a aplicação do fungicida captan não apresentou efeitos fitotóxicos sobre as sementes, pois estas mantiveram seu percentual de germinação estatisticamente igual ao percentual das que não passaram

pelo fungicida. Visualmente ambos os tratamentos apresentaram desenvolvimento de fungos ao longo do período de armazenamento, fato que é acompanhado com a redução da germinação ao longo do tempo para todos os tratamentos testados.

O tratamento com ABA, no presente trabalho, não inibiu a germinação das sementes de *E.uniflora*, e também não foi efetivo em retardar a perda de viabilidade das sementes ao longo do período de armazenamento (Tabela 2). O ácido abscísico atua na biossíntese de substâncias de reservas e na manutenção de dormência de sementes (Bewley, 1997; Koornneef *et al.*, 2002). Tao & Khan (1976), notaram que 20  $\mu\text{mol}$  de ABA aplicados aos embriões de pêra, prolongaram sua dormência. Estudos envolvendo ABA e o retardo de germinação foram realizados em sementes de *Medicago sativa*, por Carneiro *et al.* (2001), também em espécies de Brassicaceae (Müller *et al.*, 2006) e em sementes de *Inga vera* por Barbedo & Cícero (2000). Contudo, no presente trabalho não foi observado o retardo de germinação das sementes tratadas com ABA (Tabela 2). É possível que a semente necessite de um tempo maior para absorver este composto para surtir algum efeito retardatório na sua germinação e que isto não tenha ocorrido no presente trabalho.

O IVG das sementes armazenadas tanto aos 135 dias como aos 190 dias de armazenamento diminuiu comparando-se com as sementes que não foram armazenadas (Tabela 3). Portanto a perda de vigor, avaliado através do IVG das sementes durante o armazenamento, acompanha a perda de viabilidade das mesmas.



Tabela 3 - Índice de velocidade de germinação de sementes de *E. uniflora* em função do tratamento e do período de armazenamento. Médias seguidas de desvio padrão (n=4). Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (colunas). Letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre períodos de armazenamento (linhas). Letras iguais não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)		
	0	135	190
Controle	4,41 ±0,76 <sup>Aa</sup>	1,4 ±1,03 <sup>Ab</sup>	1,18 ±0,08 <sup>Ab</sup>
Captan	3,43 ±0,81 <sup>Aa</sup>	1,10±0,55 <sup>Ab</sup>	1,65 ±0,82 <sup>Ab</sup>
ABA	3,09 ±1,17 <sup>Aa</sup>	1,03 ±0,56 <sup>Ab</sup>	1,15 ±0,86 <sup>Ab</sup>

### 4.3 Teor de açúcares solúveis totais e amido (Experimento I)

Durante o período de armazenamento de sementes de *E. uniflora*, os tratamentos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de açúcares solúveis totais ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). Bordignon (2000), não observou diferenças estatisticamente significativas para teores de açúcares solúveis totais para sementes de *E. uniflora* armazenadas por 60 e 105 dias. Em outras espécies também se verificou o decréscimo dos carboidratos solúveis de cotilédones durante o armazenamento. Isto foi observado por Hellmman e colaboradores (2008) estudando sementes de *Caesalpinia echinata*. Lam. (Fabaceae). Bonome (2006) também verificou o aumento nos teores de açúcares solúveis totais no endosperma de *Hevea brasiliensis* Muell. Arg. (Euphorbiaceae), após armazenamento por 105 dias, havendo um decréscimo destes componentes após 160 dias, o que está de acordo com os resultados observados nessa investigação. O processo respiratório envolve a produção de energia oriunda da oxidação dos açúcares solúveis totais, o que possivelmente poderia explicar um declínio destes

compostos ao longo do armazenamento das sementes (Bewley *et al.*, 2013). Neste trabalho não foi detectada redução destes carboidratos ao longo do tempo de armazenamento.

Com relação aos teores de amido durante o armazenamento das sementes de *E. uniflora*, neste trabalho não houve aumento estatisticamente significativo deste polissacarídeo após 135 dias de armazenamento (Tabela 5). Por outro lado, houve diminuição dos teores de amido após 190 dias de armazenamento em todos os tratamentos, em comparação aos teores encontrados em sementes recém-coletadas (Tabela 5). Após 190 dias, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos quanto aos teores de amido (Tabela 5). Bonome (2006), analisando o teor de amido em sementes de seringueira armazenadas em câmara fria e em temperatura ambiente evidenciou que o endosperma destas sementes manteve o teor de amido nos meses iniciais de armazenamento, com posterior declínio até o final do período de armazenamento (165 dias), com redução de até 31% dos teores iniciais. O mesmo foi mencionado em sementes de *A. angustifolia* por Ramos & Souza (1999). Garcia (2012) também avaliando o teor de amido em sementes de *A. angustifolia* refrigeradas, mostrou que houve uma queda do teor inicial de amido aos 60 dias de armazenamento. Este fato pode estar relacionado com a maior atividade de amilases metabolizando estes carboidratos em açúcares solúveis para a utilização como substrato respiratório e esqueletos de carbono (Roberts, 1979). A queda no teor de amido durante o armazenamento de sementes de *E. uniflora* por 190 dias, pode estar associada de fato à degradação do composto, observando-se simultaneamente a manutenção dos teores de açúcares solúveis totais ao final do armazenamento. Tendo em vista que as sementes estão com seu

metabolismo ativo, estes carboidratos estão sendo consumidos ao passo que o amido é quebrado e repõe o estoque dos açúcares solúveis.

Tabela 4 - Teor de açúcares solúveis totais (mg g<sup>-1</sup> massa seca) em sementes de *E. uniflora* em função do tempo de armazenamento (temperatura de  $\pm 8^{\circ}\text{C}$ ) e dos tratamentos. Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (colunas). Letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre períodos de armazenamento (linhas). Letras iguais não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)		
	0	135	190
Controle	20,91 $\pm$ 1,99 <sup>a</sup>	28,81 $\pm$ 5,40 <sup>Aa</sup>	27,703 $\pm$ 6,47 <sup>Aa</sup>
Captan	-	34,34 $\pm$ 3,96 <sup>Aa</sup>	26,705 $\pm$ 6,80 <sup>Aa</sup>
ABA	-	32,39 $\pm$ 7,05 <sup>Aa</sup>	30,366 $\pm$ 6,09 <sup>Aa</sup>

Tabela 5 - Teor de Amido (mg g<sup>-1</sup> massa seca) em sementes de *E. uniflora* em função do tempo de armazenamento (temperatura de  $\pm 8^{\circ}\text{C}$ ) e dos tratamentos. Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos (colunas). Letras minúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre períodos de armazenamento (linhas). Letras iguais não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)		
	0	135	190
Controle	21,96 $\pm$ 6,53 <sup>ab</sup>	31,59 $\pm$ 7,54 <sup>Aa</sup>	14,70 $\pm$ 2,05 <sup>Ab</sup>
Captan	-	33,29 $\pm$ 1,95 <sup>Aa</sup>	15,82 $\pm$ 6,90 <sup>Ab</sup>
ABA	-	38,11 $\pm$ 1,48 <sup>Aa</sup>	15,83 $\pm$ 1,15 <sup>Ab</sup>

#### 4.4 Compostos fenólicos totais e flavonoides (Experimento I)

Os mecanismos antioxidantes estão relacionados com a aquisição da tolerância à dessecação das sementes em desenvolvimento e durante o armazenamento (Bailly, 2004). A perda da viabilidade durante a secagem está relacionada com as falhas desses mecanismos (Finch-Savage *et al.*,

1994). Os compostos fenólicos têm propriedades anti-oxidantes *in vitro* (Rice-Evans *et al.*, 1996). As sementes de *Theobroma cacao* L. (Malvaceae) também classificada como recalcitrante, apresentaram grande quantidade de compostos fenólicos, porém estas sementes também são intolerantes à dessecação (Chandel *et al.*, 1995; Niemenak *et al.*, 2006).

Estes compostos estão relacionados muitas vezes com sinais regulatórios positivos para a simbiose com microrganismos do solo. Por estarem presentes no tegumento em muitas sementes, são liberados como exudados durante a embebição, atuando como fungicidas ou induzindo nodulações com populações microbianas no solo circundante. Ecologicamente, esta seria uma estratégia de melhorar habilidades até que as plântulas possam se estabelecer (Ceballos, 1998; Shirley, 1998).

As sementes de pitanga apresentaram um conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides maior nas sementes recém-coletadas, diminuindo as concentrações destes compostos ao longo do tempo de armazenamento, mostrando diferenças estatisticamente significativas de 135 dias para o tempo de 190 dias de armazenamento (Tabela 6). Estes compostos, principalmente os flavonoides que possuem suas propriedades antioxidantes bem definidas, atuam também prevenindo o envelhecimento das sementes aonde o estresse oxidativo, resultado dos danos à membrana devido à peroxidação lipídica e o acúmulo de radicais livres, levam a uma perda de vigor e de viabilidade das sementes (Rice-Evans *et al.*, 1997; Walters, 1998). Landry e colaboradores (1995) testando mutantes de *Arabidopsis* notaram um nível mais alto de peroxidação lipídica nos mutantes deficientes na biossíntese de flavonoides do que nas plantas selvagens expostas a UVB. Outra utilidade destes compostos, também pode estar relacionada com defesas para resistir ao

ataque de herbívoros e patógenos, um mecanismo de defesa complexo é formado nas plantas, onde o sistema radicular de plantas desempenha um papel importante neste processo. Comumente, as células do parênquima de plantas sintetizam ativamente, armazenam e modificam substâncias fenólicas e as liberam como forma de proteção contra patógenos e microrganismos prejudiciais ao vegetal (Zengqi *et al.*, 2012). Estes mecanismos também podem estar relacionados com a defesa contra estes patógenos em sementes, observando-se que neste trabalho a redução da germinação também vem acompanhada com a redução destes compostos nas sementes.

Tabela 6 - Concentração de compostos fenólicos e flavonóides ( $\mu\text{g g}^{-1}$  de massa seca) em sementes de *E. uniflora* em função do tempo de armazenamento (temperatura de  $\pm 8^\circ\text{C}$ ) e dos tratamentos. Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras maiúsculas representam diferenças estatísticas para tempos entre tratamentos (colunas). Letras minúsculas representam diferenças ao longo do tempo para cada tratamento (linhas). Letras iguais não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tratamento	Tempo de armazenamento (dias)		
	0	135	190
<b>Compostos Fenólicos Totais</b>			
Controle	627,40 $\pm$ 2,79 <sup>a</sup>	433,81 $\pm$ 7,36 <sup>Ab</sup>	224,09 $\pm$ 14,84 <sup>Ac</sup>
Captan	-	373,55 $\pm$ 3,38 <sup>Ba</sup>	224,21 $\pm$ 6,52 <sup>Ab</sup>
ABA	-	405,06 $\pm$ 1,30 <sup>Ca</sup>	278,87 $\pm$ 11,62 <sup>Bb</sup>
<b>Flavonoides</b>			
Controle	358,18 $\pm$ 4,08 <sup>a</sup>	191,35 $\pm$ 3,45 <sup>Ab</sup>	188,07 $\pm$ 4,12 <sup>Ab</sup>
Captan		191,48 $\pm$ 2,72 <sup>Aa</sup>	174,12 $\pm$ 3,25 <sup>Bb</sup>
ABA		214,35 $\pm$ 6,60 <sup>Ba</sup>	189,01 $\pm$ 2,60 <sup>Ab</sup>

#### 4.5 Caracterização ultraestrutural das células cotiledonares de *E. uniflora* (Experimento I)

As células cotiledonares das sementes de *E. uniflora* apresentaram grande quantidade de grãos de amido. Foram observadas diferenças entre as sementes recém-coletas (Fig. 4A) e as sementes que foram armazenadas por

135 dias (Fig. 4B, 4C e 4D). As sementes que passaram por armazenamento mostraram-se deterioradas, com danos à estrutura da parede celular, e desaglomeração dos grãos de amido. Este polissacarídeo é uma das mais importantes formas de reserva de carbono nas sementes, sendo utilizado durante o desenvolvimento da plântula (Buckeridge *et al.*, 2004). Embora os grãos de amido continuem visíveis após 135 dias de armazenamento, observaram-se diferenças no tamanho dos grãos de amido em função do tempo de armazenamento.

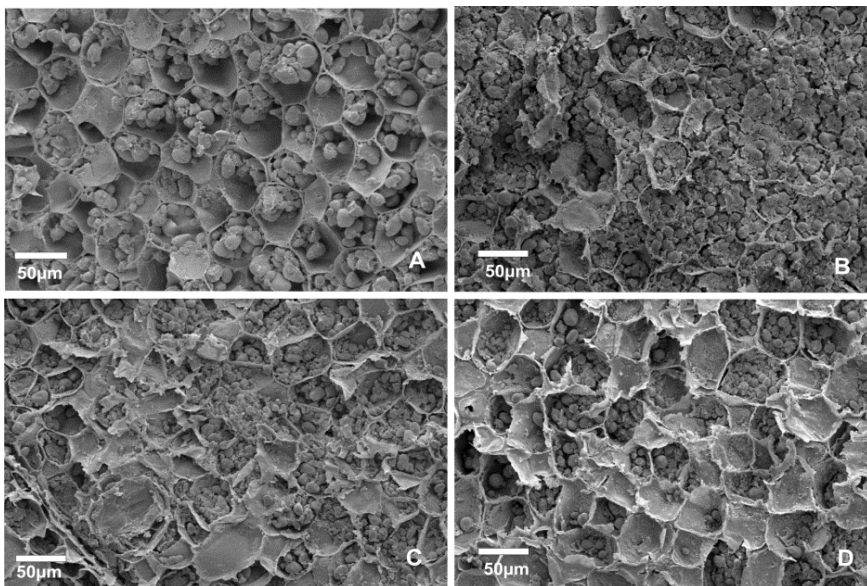


Figura 4 - Eletromicrografia de varredura de células cotiledonares de *E. uniflora* contendo grãos de amido. A- Células cotiledonares do tratamento controle; B- Células cotiledonares do tratamento controle após 135 dias de armazenamento; C- Células cotiledonares do tratamento com Captan após 135 dias de armazenamento; D- Células cotiledonares de sementes tratadas com ABA após 135 dias de armazenamento.

Observaram-se detalhes dos grãos de amido em sementes de *E. uniflora* recém coletadas e armazenadas durante 135 dias (Fig. 5A, 5B e 5C).

Estas células apresentaram também células com vacúolos volumosos, característicos de sementes recalcitrantes, durante o processo de desidratação excessiva a perda de água destes vacúolos provoca plasmólise nas células, esta característica representa uma limitação à tolerância à dessecação, pois durante a secagem pode ocorrer estresse mecânico sobre as células (Pammenter & Berjack, 1999). As células cotiledonares das sementes armazenadas por 135 dias apresentaram redução no tamanho dos vacúolos e os grãos de amido aparentemente exibiram perda de características de birrefringência, evidenciada pela alternância das lamelas cristalinas e amorfas do grão de amido), porém ainda mantendo sua integridade granular, sugerindo-se o processo de degradação destes compostos. Segundo Biliaderis (1992), as áreas cristalinas do amido são responsáveis por manter a estrutura do grânulo, controlando seu comportamento na presença de água e a resistência aos ataques enzimáticos ou químicos. A fase amorfa dos grânulos é representada pelas lamelas menos densas no grânulo, onde as moléculas se encontram mais distantes umas das outras, resultando numa região mais frágil e que absorve mais água em temperaturas abaixo da de gelatinização. Aggarwal & Dollimore (1998) afirmam que durante o processo de hidrólise enzimática, pode-se observar a alteração de cristalinidade do amido. Segundo Pammenter *et al.* (1984), o metabolismo não é interrompido durante o armazenamento das sementes recalcitrantes, podendo apresentar processos celulares metabólicos similares aos que ocorrem durante a germinação. No presente estudo a alteração na cristalinidade do grânulo foi observada nas células cotiledonares das sementes armazenadas por 135 dias (Fig. 5B, 5C e 5E), provavelmente relacionada ao metabolismo ativo e o consumo do amido durante o armazenamento.

Depósitos de compostos fenólicos foram observados em células das sementes recém-coletadas e armazenadas durante 135 dias (Fig. 5D, 5E, e 5F). Estes metabólitos têm reconhecidamente a função de inibir herbívoros, pois em altas concentrações, folhas, frutos e sementes e demais tecidos jovens tornam-se impalatáveis aos fitófagos, além de combinados a algumas proteínas, estes tecidos resistem fortemente à putrefação (Volz & Clausen, 2001). Além dos compostos fenólicos estarem associados à prevenção ao ataque de herbívoros e ao de outros microrganismos, estes antioxidantes atuam retardando ou prevenindo a oxidação do substrato envolvido nos processos oxidativos impedindo a formação de radicais livres (Halliwell *et al.*, 1995). Este aparato pode estar relacionado à defesa da semente ao ser dispersa da planta mãe e estar mais propensa ao ataque de microrganismos e patógenos no solo pelo seu elevado teor de água. Nas sementes recém-coletadas as mitocôndrias encontram-se aparentemente em estado de conservação, evidenciando a morfologia das cristas (Fig. 5G) comparando-se com as mitocôndrias aparentemente deformadas nas sementes armazenadas durante 135 dias (Fig. 5H e 5I). Estresses celulares em sementes refrigeradas podem alterar o consumo de oxigênio, produzir espécies reativas ao oxigênio (ERO), perturbando a eficiência nas rotas da cadeia transportadora de elétrons, diminuindo a produção de ATP. As sementes secas que já atingiram sua maturação possuem mitocôndrias diferenciadas, que durante a embebição evoluem para organelas totalmente funcionais em termos de estrutura, atividade enzimática e complementação proteica (Morohashi & Bewley, 1980). A exposição às baixas temperaturas nesta fase pode provocar danos fisiológicos, bioquímicos e causar modificações nos aspectos ultraestruturais da biogênese mitocondrial. Yin *et al.* (2009), em



estudo sobre danos nas mitocôndrias de sementes de soja durante embebição em temperatura de 4°C, observou redução na quantidade de organelas além de alterações na estrutura das mitocôndrias, em comparação às sementes controle. Nas plantas, o número de mitocôndrias por célula está diretamente relacionado com a atividade metabólica do tecido, refletindo o papel da mitocôndria no metabolismo e na energia celular. Como o embrião das sementes não contém cloroplastos, a fosforilação oxidativa mitocondrial é a principal via para fornecimento de energia durante a embebição, portanto a produção de ATP depende das mitocôndrias nas sementes, a redução ou deformação e perda de funcionalidade destas organelas, afeta diretamente na produção de ATP para germinação destas sementes, reduzindo assim sua viabilidade (Day *et al.*, 2004). No presente trabalho, notou-se que as sementes que passaram por armazenamento por 135 dias em temperatura de  $8^{\circ} \pm 2C$  apresentaram alterações no aspecto morfológico das mitocôndrias, incluindo também perda das cristas mitocondriais. Este fato pode estar relacionado com a diminuição da germinabilidade das sementes que foram armazenadas por 135 dias, comparado com a porcentagem inicial de germinabilidade destas sementes. Em relação às células das sementes recém-colhidas (Figura 5J), ocorreu uma progressiva desestruturação das paredes celulares, as quais se tornaram mais delgadas e com estrutura fibrilar frouxa e menos densa (Fig. 5K e 5L) após o armazenamento de 135 dias. Pode-se notar que a membrana celular se desintegrou, perdendo continuidade com a parede celular (Figura 5K). Berjack & Pammenter (2000), enfatizaram que eventos com efeitos sobre a arquitetura intracelular podem ter profundas consequências sobre o funcionamento da célula, pois o citoesqueleto é uma estrutura tridimensional dinâmica, responsável pela manutenção das posições

intracelulares das organelas umas em relação às outras. Se estes danos estruturais não forem reparados, a célula irá perder sua funcionalidade.

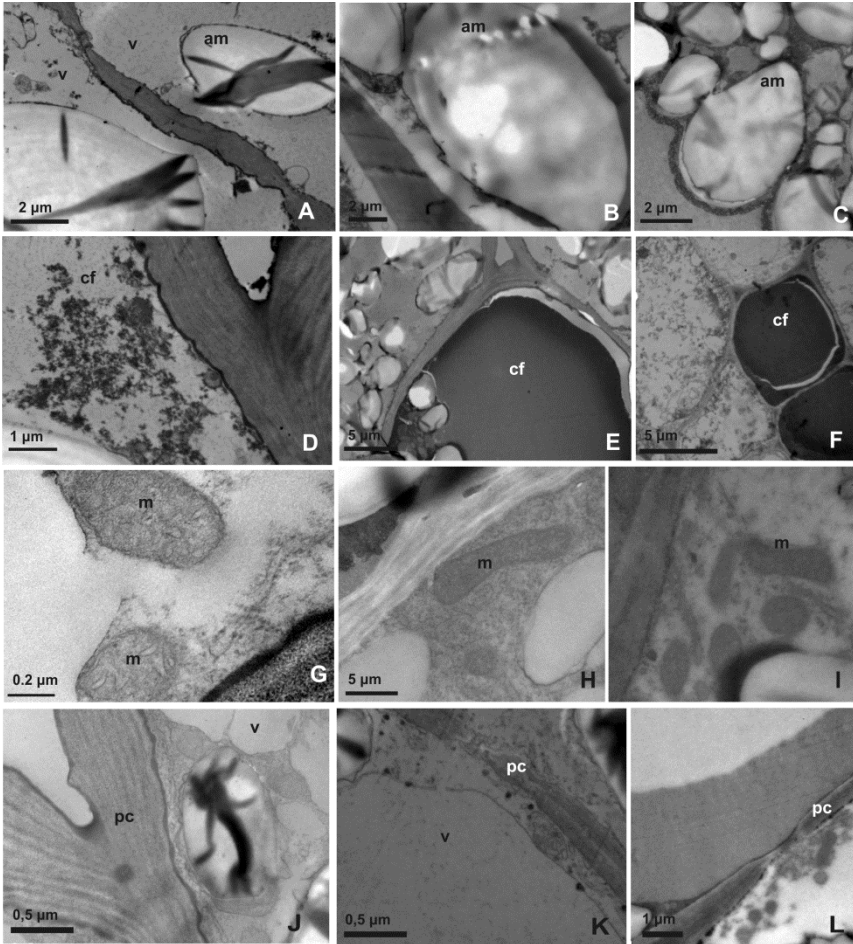


Figura 5– Eletromicrografia de transmissão das células cotilédonares da semente de *E. uniflora* A, D, G e J- Células cotilédonares de semente controle. B, C, E, F, H, I, K e L- Sementes após 135 dias de armazenamento. **am**: grãos de amido; **cf**: compostos fenólicos. **pc**: parede celular; **v**: vacúolo; **m**: mitocôndria.

#### **4.6 Teor de água inicial, germinação, IVG, condutividade elétrica e atividade da enzima catalase de sementes de *E. uniflora* após dessecação (Experimento II)**

As sementes de *E. uniflora* utilizadas para os testes de dessecação, apresentaram umidade inicial de 55,45%. As sementes deste gênero possuem teor de água bastante elevado com variações entre 40% e 70% de água, consideradas sensíveis à dessecação, assim como observado nas espécies *Eugenia involucrata*, *Eugenia stipitata*, *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia pyriformis* e *Eugenia dysenterica* (Barbedo *et al.*, 1998; Anjos & Ferraz, 1999; Barbedo *et al.*, 1998; Andrade & Ferreira, 2000; Andrade *et al.*, 2003; Delgado & Barbedo, 2007; Calvi, 2015).

A secagem contínua das sementes de *E. uniflora* em estufa a 40° C prejudicou a germinabilidade, sendo que as mesmas apresentaram diminuição do percentual de germinação à medida que perderam umidade (Tabela 7). Isto ocorreu até a perda completa de viabilidade, que foi observada no teor de água mais baixo de dessecação (22, 66%) (Tabela 7), podendo ser considerado “grau de umidade letal”, sendo o limite à causa da perda integral da viabilidade da semente (Walters *et al.*, 2000). Delgado & Brabedo (2007), em estudo com dessecação de sementes de *Eugenia* spp. também evidenciaram que a redução do teor de água prejudicou a germinabilidade, como também a produção de plântulas normais.

O índice de velocidade de germinação (Tabela 7) mostrou que o decréscimo da viabilidade também é acompanhado de uma velocidade de germinação mais lenta. Este resultado é importante, pois se refere à capacidade de estabelecimento dessas plântulas em condições de campo.

Tabela 7 - Porcentagem de germinação e IVG de sementes de *E. uniflora* em função do teor de umidade inicial e após dessecação em estufa a 40° C Médias seguidas de desvio padrão (n=4). Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos. Letras iguais não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Teor de umidade (%)	Germinação (%)	IVG
55,45	93,00 ± 8,24 <sup>A</sup>	4,34 ± 0,92 <sup>A</sup>
46,06	58,00 ± 8,32 <sup>B</sup>	1,51 ± 0,23 <sup>B</sup>
40,73	42,00 ± 7,65 <sup>B</sup>	1,08 ± 0,40 <sup>B</sup>
22,66	0 <sup>C</sup>	0 <sup>C</sup>

O teste de condutividade elétrica foi utilizado para corroborar as demais análises de vigor das sementes durante a desidratação, 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 variou de 2,76  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  nas sementes que não foram dessecadas a 13,23  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  nas sementes com o teor mais baixo de umidade (Tabela 8). Nas condições em que as sementes passaram por secagem em estufa, o lixiviado da condutividade elétrica foi maior quando as sementes perderam completamente seu poder de germinação. Isto evidenciou o aumento de valores na condutividade elétrica com a progressão da secagem, liberando maiores exsudatos das sementes com teores de umidade reduzidos. A dessecação provocou mudanças na composição química das membranas, indicadas através deste teste. Resultados semelhantes a este também foram observados por Andrade & Ferreira (2000) em estudos com sementes de uvaia. A lixiviação de solutos é indicativa da desestruturação de membranas

celulares em sementes recalcitrantes submetidas à dessecação (Becwar *et al.*, 1982), sendo observado para diferentes espécies.

Tabela 8 - Condutividade elétrica ( $\mu\text{S cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ) de sementes de *E. uniflora* em função do teor de umidade inicial e após dessecação em estufa a  $40^\circ\text{C}$ . Médias seguidas de desvio padrão ( $n=4$ ). Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos. Letras iguais não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Teor de umidade (%)	Condutividade Elétrica
55,45	$2,76 \pm 0,49^A$
46,06	$3,55 \pm 0,4752^A$
40,73	$4,52 \pm 1,86^A$
22,66	$13,23 \pm 5,74^B$

No presente trabalho não se observou atividade da enzima catalase nas sementes recém-colhidas de *E. uniflora*. As sementes que foram submetidas à dessecação moderada, apresentaram atividade de enzima, porém a atividade dessa enzima foi totalmente inibida em sementes submetidas aos níveis severos de dessecação (Tabela 9). Um fator que pode estar envolvido com a perda da viabilidade das sementes recalcitrantes é a formação de radicais livres, sendo citotóxicos, podem reagir com  $\text{H}_2\text{O}_2$  para a produção de oxigênio e radicais hidroxilas (OH), altamente oxidativos, que podem destruir grandes polímeros, incluindo fosfolipídios de membrana (Bewley *et al.*, 2013). É possível que, durante a dessecação destas sementes o equilíbrio entre radicais livres e a produção de sistemas enzimáticos protetores seja perturbado em favor do primeiro, levando a uma inativação das enzimas e desnaturação de outras proteínas, e por este motivo não foi detectada a atividade desta enzima neste ensaio. Embora existam

mecanismos antioxidantes nas sementes recalcitrantes, estes também se tornam inativos com a desidratação severa, associando-se com acumulação de EROS e com a perda de viabilidade (Bailly, 2004; Pukacka & Ratajczak, 2007). No entanto, algumas publicações apontam que o acúmulo de EROS e a peroxidação só ocorrem após a morte celular (Kibinza *et al.*, 2006; Roach *et al.*, 2008). Chen & Arora (2011), comentam que a atividade do sistema antioxidante pode ser inibida ou reduzida nos estágios iniciais da germinação e segundo Bailly (2004), com a hidratação da semente e início dos processos preparatórios para a germinação, ocorre um aumento da atividade respiratória intensificando a produção de radicais livres. Tal fato foi observado por Guimarães (2014), que ao avaliar a atividade da enzima catalase em células radiculares de sementes desidratadas e durante a embebição, observou que no tempo 0 hora, a atividade era muito baixa, mostrando-se maior e constante após a embebição. Portanto as sementes de *E. uniflora* que não passaram por desidratação neste trabalho, podem ter ausência ou uma atividade muito baixa desta enzima, não sendo possível detectar sua atividade. Porém, além da CAT exercer a função de regular o nível de  $H_2O_2$  nas células, existem também peroxidases exercendo esta função (Blokina *et al.*, 2003). Estas peroxidases como a ascorbato peroxidase, podem estar presentes em pelo menos quatro compartimentos celulares (Chagas, 2007), podendo ter maior afinidade pelo  $H_2O_2$ , e ser um indicativo de que outras enzimas possam atuar na eliminação do peróxido de hidrogênio. Por sua vez a CAT se tornaria mais importante em condições mais elevadas do  $H_2O_2$ .

Tabela 9 - Atividade enzimática da catalase ( $\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$  de proteína) de sementes de *E. uniflora* em função do teor de umidade inicial e após dessecação em estufa a 40°C. Médias seguidas de desvio padrão (n=4). Letras maiúsculas representam diferenças estatisticamente significativas entre tratamentos. Letras iguais não diferiram estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

<b>Teor de umidade (%)</b>	<b>Atividade da enzima Catalase</b>
55,45	0 <sup>A</sup>
46,06	4,43 ± 3,38 <sup>B</sup>
40,73	6,47 ± 2,68 <sup>B</sup>
22,66	0 <sup>A</sup>

Vale ressaltar que não foi possível a quantificação das enzimas superóxido dismutase e guaiacol peroxidase. Os protocolos aplicados e as alterações feitas nos mesmos não foram eficientes para avaliação do padrão enzimático destas.

## 5. CONCLUSÕES

- As sementes de pitangueira diminuíram seu vigor e sua viabilidade armazenadas durante 135 e 190 dias sob temperatura de 8°C em condições de refrigerador;
- As sementes mantiveram um teor de umidade estável durante o período de armazenamento até os 135 dias de armazenamento. Desta forma, o teor de umidade não foi um fator preponderante para a perda de vigor e viabilidade das sementes desta espécie;
- O armazenamento das sementes de *E. uniflora* a 8°C por 135 dias e 190 dias não inibiu a hidrólise dos metabólitos de reserva, havendo diminuição dos teores de metabólitos primários, como o amido e dos secundários, como os compostos fenólicos e flavonoides;
- A aplicação do fungicida Captan em sementes de *E. uniflora* não impediu a perda da viabilidade e vigor de sementes armazenadas por 135 e 190 dias;
- A aplicação de ABA em sementes de *E. uniflora* não inibiu ou retardou a perda de viabilidade e a perda de vigor, tanto aos 135 como aos 190 dias de armazenamento;
- Sementes de *E. uniflora* armazenadas sob refrigeração durante 135 dias apresentaram aspecto vacuolizado em células cotiledonares;
- Danos mecânicos ocorreram após o armazenamento de sementes: aparente diminuição dos grãos de amido, danos às organelas e desorganização das paredes celulares foram evidenciadas em células cotiledonares após o armazenamento de 135 dias;



- Sementes dessecadas de *E.uniflora* perderam totalmente sua viabilidade e não suportaram teores de umidade inferiores a 22,6% de água;
- Houve aumento da atividade da enzima catalase, nas sementes de *E.uniflora* que passaram por dessecação moderada, mas que se mantiveram viáveis, revelando-se um importante papel no processo metabólico deteriorativos de sementes recalcitrantes.
- O uso de ABA durante o armazenamento poderia ser testado em outras doses associado à soluções osmóticas protetoras.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGGARWAL, P; DOLLIMORE, D. (1998) **A thermal analysis investigation of partially hydrolyzed starch**. Thermochemica Acta, v. 319, n. 1, p. 17-25.

ALPERT, P; OLIVER, M.J. (2002). **Drying without dying. Desiccation and survival in plants: Drying without dying**. CAB International p. 3-43.

ANDRADE, A.C.S; CUNHA, R; SOUZA, A.F; REIS, R.B. & ALMEIDA, K.L. (2003). **Physiological and morphological aspects of seed viability of a neotropical savannah tree, Eugenia dysenterica DC**. Seed Science & Tecnology. 31: 125-137

ANDADRE. R.N.B; FERREIRA, A.G. (2000). **Germinação e armazenamento de sementes de uvaia (Eugenia pyriformis Camb.) – Myrtaceae**. Revista Brasileira de Sementes, 22 (2): 118-125

ANGELOVICI, R; GALILI G; FERNIE A.R; FAIT A. (2010) **Seed desiccation: a bridge between maturation and germination**. Trends in plant Science 15, 4, 211-218.

ANJOS, A.M.G; FERRAZ, I.D.K. (1999). **Morfologia, germinação e teor de água das sementes de araçá-boi (Eugenia stipitata ssp. sororia)**. Acta Amazônica, Manaus, 29 (3): 337-348

BAILLY, C. (2004). **Active oxygen species and antioxidants in seed biology**. Seed Science Research 4: 93-107.

BARBEDO, C.J.; CICERO, S.M. **Effects of initial quality, low temperature and ABA on the storage of seeds of Inga uruguensis, a tropical species with recalcitrant seeds**. Seed Science and Technology, v. 28, n. 3, p. 793-808, 2000.

BARBEDO, C.J.; KOHAMA, S.; MALUF, A.M; BILIA, D.A.C. (1998). **Germinação e armazenamento de diásporos de cerejeira (Eugenia**

**involucrata DC. - Myrtaceae) em função do teor de água.** Revista Brasileira de Sementes, Brasília, 20 (10): 184-188

BARBEDO, C.J.; Marcos-Filho, J. (1998). **Tolerância à dessecação de sementes.** Acta Botanica Brasilica, São Paulo, 12 (2): 145-164

BARROSO, G.M. (2002). **Sistemática de angiospermas do Brasil.** 2. ed. Viçosa, UFV, 309p.

BERJAK, P. (2005). **Protector of the seeds: seminal reflections from southern Africa.** Science 307:47-49.

BERJAK, P. (2006). **Unifying perspectives of some mechanisms basic to desiccation tolerance across life forms.** Science 16: 1-15.

BERJAK, P; MYCOCK, D. J. (2004). **Calcium, with magnesium, is essential for normal seedling development from partially-dehydrated recalcitrant axes: a study on trichilia dregeana Sond.** Seed Science Research 14: 217-231.

BERJAK, P; PAMMENTER, N. W. (1994). **Recalcitrance is not an all-or-nothing situation.** Seed Science Research 4: 263-264.

BERJAK, P; WALKER, M., WATT, M. P; MYCOCK, D. J. (1999). **Experimental parameters underlying failure or success in plant germplasm conservation: a case study on zygotic axes of Quercus robur L.** CryoLetters 20: 251-262.

BERJAK, P; PAMMENTER, N. W. (2000). **What ultrastructure has told us about recalcitrant seeds.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal 12: 22-55.

BERJAK, P; PAMMENTER, N. W. (2004). **Recalcitrant seeds.** In: **Benech-Arnold, R. L. and Sánchez, R. A. (Editors). Handbook of seed physiology: application to agriculture.** Harworth Press, New York. pp. 305-345.

BERJAK, P; PAMMENTER, N. W. (2008). **From Avicennia to Zizania: seed recalcitrance in perspective.** Annals of Botany 101: 213-218.

BECWAR, M. R; STANWOOD, P. C; ROOS, E. E. (1982) **Dehydration effects on imbibitional leakage from desiccation sensitive seeds.** Plant Physiology, Rockville, 69, p. 1132-1135.

BEWLEY, J. D. (1979). **Physiological aspects of desiccation tolerance.** Annual Review of Plant Physiology 30: 195-238.

BEWLEY, J. D. (1997). **Seed germination and dormancy.** Plant Cell 30, 1055-1066

BEWLEY, J. D; BLACK, M. (1994). **Seed physiology of development and germination, (2nd edition).** Plenum Press, New York

BEWLEY, J. D; et al.(2013) **Longevity, storage, and deterioration.** Seeds. Springer New York, p. 341-376.

BEWLEY, J. D; BLACK, M. (1978) **Physiology and biochemistry of seeds. In. Development, germination and growth.** Berlin: Springer-Verlag, 572p.

BILIADERIS, C.G. (1992) **Structures and Phase Transitions of Starch in Food Systems.** Food Technology 46, 98-109.

BLOKHINA, O; VIROLAINEN, E; FAGERSTEDT, K.V. (2003) **Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review.** Ann. Bot. 91, 179.

BONOME, L.T. da S. (2006) **Alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares em sementes de seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. Ex Ahr. de Juss.) Muell. Arg.) durante o armazenamento.** 124f. Tese (Doutorado em Agronomia) Departamento de Agronomia, Universidade Federal de Lavras.

BORDIGNON, M. V. (2000) **Análise Morfofisiológica em Sementes de Eugenia uniflora L. e Campomanesia xanthocarpa Berg. (Myrtaceae).** Dissertação. UNICAMP, Campinas.

BRASIL (1976) **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Brasília: Divisão de Sementes e Mudanças, 188p

BRASIL (2009) **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, pp 399.

BUCKERIDGE, M.D; AIDAR, M.P.M; SANTOS H.P; TINÉ, M.A.S. (2004). **Acúmulo de reservas**. In: **A. G. Ferreira & F. Borghetti (eds.)**. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre, Artmed, pp. 31-50.

CALVI, G.P (2015) **Armazenamento das sementes recalcitrantes de Eugenia stipitata McVaugh: aspectos tecnológicos e fisiológicos**. PhD Thesis, National Institute for Amazonian Research – INPA, Manaus, Brazil: 89 pp.

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

CARVALHO, N.M; NAKAGAWA, J. (2000) **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4.ed. Campinas: Fundação Cargill, 588p.

CASTRO, E. R.; GALETTI, M. (2004) **Frugivoria e dispersão de sementes pelo lagarto teiú Tupinambis merianae (Reptília: Teiidae)**. Papéis Avulsos de Zoologia, São Paulo, SP, v. 44, n. 6, p. 91-97.

CASTRO, R.D., BRADFORD, K.J. & HILHORST, H.W.M. (2004). **Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água**. In **Germinação: do básico ao aplicado** (A.G. Ferreira & F. Borghetti, orgs.). Artmed, Porto Alegre. p.51-67. 323p.

CHAGAS; R. M. (2007) **Alterações fotossintéticas e respostas oxidativas em plantas de cana-de-açúcar (Saccharum officinarum L.) tratadas com paraquat**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz.

CEBALLOS, L; MCKEY M.H.; MCKEY, D; ANDARY, C. (1998) **Rapid deployment of allelochemicals in exudates of germinating seeds of Sesbania (Fabaceae): roles of seed anatomy and histolocalization of**

**polyphenolic compounds in antipathogen defense of seedlings.** *Chemoecology* 8:141–151.

CHEN, K.; ARORA, R. (2011) **Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*).** *Plant Science*, 180, n. 2, p. 212-220

CHOUREY, P.S.; CHENG, W-H.; TALIERCIO, E.W.; IM, K.H (1995). **Genetic aspects of sucrose metabolizing enzymes in developing maize seed. In Carbon Partitioning and Sucrose-Sink Interactions in Plants.** M.A. Madore and W.J. Luca, eds Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists, pp. 239-245.

CLOSE, T.J. (1997). **Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature.** *Physiologia Plantarum* 100: 291–296.

COUTINHO, W.M; SILVA-MANN, R; VIEIRA, M.G.G.C; MACHADO, C.F; MACHADO, J.C. (2007). **Qualidade sanitária e fisiológica de sementes de milho submetidas a termoterapia e condicionamento fisiológico.** *Fitopatologia Brasileira*, 32:458- 464.

CRONQUIST, A. (1981). **An integrated system of classification of flowering plants.** Columbia Univ. Press, New York. 1262 p.

DAWS, M. I; GAMENE, C. S; GLIDEWELL, S. M; PRITCHARD, H. W. (2004a). **Seed massvarioation masks a single critical water content in recalcitrant seeds.** *Seed Science Research* 14: 185-195.

DAWS, M. I; LYDALL, E; CHMIELARZ, P; LEPRINCE, O; MATTHEWS, S; THAMOS, C. A; PRITCHARD, H. W. (2004). **Developmental heat sum influences recalcitrant seed traits in *Aesculus hippocastum* across Europe.** *New Phytologist* 162: 157-166.

DAWS, M. I; CLELAND, H; CHMIELARZ, P; GORIAN, F; LEPRINCE, O; MULLINS, C. E; THANOS, C. A; VANDVIK, V; PRITCHARD, H. W. (2006). **Variable desiccation tolerance in *Acerpseudolanatus* seeds in**

**relation to developmental conditions: a case of phenotypic recalcitrance?**  
Functional Plant Biology 33: 59-66.

DAWS, M.I; GARWOOD, N.C; PRITCHARD, H.W. (2006). **Prediction of desiccation sensitivity in seeds of woody species: a probabilistic model based on two seed traits in 104 species.** Annals of Botany 97: 667-674.

DAY, D; MILLAR, A. Harvey; WHELAN, J. (2004) **Plant mitochondria: from genome to function.** Springer Science & Business Media.

DELGADO, L,F; BARBEDO, C.J. (2007) **Tolerância à dessecação de sementes de espécies de Eugenia.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v. 42, n. 2, p. 265-272

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

DIETRICH, S.M; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R.C.L; CHU, E.P; BUCKERIDGE, M.S. (1988) **O açúcar das plantas.** Ciência Hoje 7(39): 42-48.

DONADIO, L.C; MÔRO, F.V; SERVIDONE, A.A. (2002) **Frutas Brasileiras.** Jaboticabal: Novos Talentos, 288p.

DREW, P. J; PAMMENTER, N. W; BERJAK, P. (2000) **'Sub-imbibed' storage is not an option for extending longevity of recalcitrant seeds of the tropical species, *Trichilia dregeana* Sond.** Seed Science Research, Wallingford, v. 10, n. 3, p. 355-363.

FARRANT, J. M. (2000) **A comparison of mechanisms of desiccation tolerance among three angiosperm resurrection plant species.** Plant Ecology, v. 151, n. 1, p. 29-39..

FINKELSTEIN, R.(2013) **Abscisic acid synthesis and response.** The Arabidopsis Book, v. 11, p. e0166.

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

FRANCINI, A; GALLESCHI, L; SAVIOZZI, F; PINZINO, C; IZZO, R; SGHERRI, C; NAVARI-IZZO, F. (2006). **Enzymatic and non-enzymatic protective mechanisms in recalcitrant seeds of Araucaria bidwilli subjected to desiccation**. Plant Physiology and Biochemistry 44:556-563.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA. **Relatório anual 2015**. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/> Acesso em: 27 nov. 2016.

GARCIARRUBIO, A; LEGARIA, J.P; COVARRUBIOS, A.A.(1997) **Abscisic acid inhibits germination the availability of energy and nutrients**. Planta, Berlim, v.203, n.2. p.182-187

GUERIN, J; CARBONERO, P. (1997) **The spatial distribution of sucrose synthase isozymes in barley**. Plant Physiology, v. 114, p. 55-62,

GUIMARÃES, C. C. (2014). **Aspectos moleculares, bioquímicos e anatômicos da tolerância à dessecação em sementes de Peltophorum dubium (Spreng.) Taub.** 123 p.Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Lavras.

GARCIA, C. (2012). **Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de Araucaria angustifolia (Bertoloni) Otto Kuntze sob condições controladas de armazenamento. [Physiological and biochemical changes in Araucaria angustifolia (Bertoloni) Otto Kuntze seeds during control conditions of storage]**. Thesis (Master in Plant Genetic Resources) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

GENTIL, D.F.O; FERREIRA, S.A.N. (1999) **Viabilidade e superação da dormência em sementes de araçá-boi (Eugenia stipitata ssp. sororia)**. Acta Amazonica, v.29, p.21-31

HALLIWELL, B. et al. (1995) **The characterization of antioxidants**. Food and Chemical Toxicology, v. 33, n. 7, p. 601-617.



HERMAN, E.M; LARKINS, B.A. (1999) **Protein storage bodies and vacuoles**. *The Plant Cell* 11, 601-613.

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

JIANG. L; KERMODE. A. R. (1994) **Role of desiccation in the germination of expression of genes for storage proteins**. *Seed Science Research* 4: 149-173.

KHAN, A.A. et al. (1977). **Osmotic conditioning of seeds: physiological and biochemical changes**. In: *Symposium on Seed Problems in Horticulture* 83. p. 267-278.

KERMODE, A. R. (1990). **Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination**. *Critical reviews in Plant Sciences* 9: 155-195.

KERMODE, A. R. (1995). **Regulatory mechanisms involved in the transition from seed development to germination: interactions between the embryo and the seed environment**. In: Kigel, J. and Galili, G. (Editors). *Seed development and germination*. Marcel Dekker, New York. pp. 273-332.

KERMODE, A. R; FINCH-SAVAGE, W. E. (2002). **Desiccation sensitivity in orthodox and recalcitrant seeds in relation to development. Desiccation and survival in plants: drying without dying**. CABI Publishing, Wallingford, Oxford. pp. 149-184.

KIBINZA, S. (2006) **Sunflower seed deterioration as related to moisture content during ageing, energy metabolism and active oxygen species scavenging**. *Physiologia Plantarum*, 128, 3, p. 496-506.

KOHAMA, S; MALUF, A.M; BILIA, D.A.C; BARBEDO, C.J. (2006) **Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira)**. *Revista Brasileira de Sementes*, v.28, p.72-78. <http://www.scielo.br/pdf/rbs/v28n1/a10v28n1.pdf>

KOORNNEEF, M; BENTSINK, L; HILHORST, H. (2002) **Seed dormancy and germination.** Current opinion in plant biology, v. 5, n. 1, p. 33-36.

LANDRY, .L G.; CHAPPLE; L., ROBERT,L.(1995) **Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage.** Plant physiology, v. 109, n. 4, p. 1159-1166.

LANDRUM, L. R; KAWASAKI, M. L. (1997) **The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys.** Brittonia, Nova York, v. 49, n. 4, p. 508-536,

LANDRUM, L. R; STEVENSON, D. (1986) **Variability of embryos in subtribe Myrtinae. (Myrtaceae).** Systematic Botany, Kent, v. 11, n. 1, p. 155-162, Jan./Mar.

LEPRINCE, O; BRONCHART, R; DELTOUR, R. (1990) **The role of free radicals and radical processing systems in loss of desiccation tolerance in germinating maize (Zea Mays L.).** New Phytologist, Cambridge, v. 116, p. 573-580.

LORENZI, H. (1992) **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** Nova Odessa: Instituto Plantarum.368 p. v.1.

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

McCREADY, R.M; Guggolz, J; Silviera, V; Owens, H.S. (1950). **Determination of starch and amylose in vegetables. Application to peas.** Analytical Chemistry 22: 1156-1158.

MALUF, A.M; BILIA D.A.C; BARBEDO, C.J (2003) **Drying and storage of Eugenia involucrata DC. Seeds."** Scientia Agricola 60.3 (2003): 471-475.

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

- MELLO, J.I.O. (2008) **Compostos de reserva de sementes e suas relações com diferentes níveis de sensibilidade à dessecação e ao congelamento.** Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo, 117f.
- MOROHASHI, Y; BEWLEY, J.D. (1980) **Development of mitochondrial activities in pea cotyledons during and following germination of the axis.** Plant Physiol. 66, 70-73.
- NAMIKI, M. (1990) **Antioxidants /antimutagens in food.** CRC-Crit. Rev. Food Sci. Nutr., Philadelphia, v.29, p.273-300.
- NTULI, T.M. (2011). **Some biochemical studies on respiratory metabolism.** In: Ntuli T. M. Aspects of the influence of drying rate and wet storage on the physiology and biochemistry of embryonic axes from desiccation-sensitive seeds. VBM Verlag Publishing, Beau- Bassin, Mauritius. pp. 95-114.
- OLIVER, M.J; CUSHMAN J.C; KOSTER, K.L. (2010) **Dehydration tolerance in plants.** Plant stress tolerance. Humana Press, 3-24.
- OLIVEIRA, C.F; OLIVEIRA, D.C; PARISI, J.J.D; BARBEDO, C.J. (2011). **Deterioração de sementes de espécies brasileiras de Eugenia em função da incidência e do controle de fungos.** Revista Brasileira de Sementes 33: 520-532.
- PAMMENTER, N. W; BERJAK, P. (1999) **A review of recalcitrant seed physiology in relation to desiccation-tolerance mechanisms.** Seed Science Research, v. 9, n. 01, p. 13-37.
- POPINIGIS, F.(1985) **Fisiologia da semente.** Brasília: Ministério da Agricultura; AGIPLAN. 289 p
- PUKACKA, S; RATAJCZAK, E. (2007) **Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of orthodox and recalcitrant seeds of the genus Acer.** Functional Plant Biology, 34, 7, p. 601-613.

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

RICE-EVANS, C.A; MILLER N.J; PAGANGA, G.(1997) **Antioxidant properties of phenolic compounds**. Trends in plant science, v. 2, p.152-159.

ROACH, T. (2008) **An oxidative burst of superoxide in embryonic axes of recalcitrant sweet chestnut seeds as induced by excision and desiccation**. Physiologia plantarum. 133, 131–139.

ROBERTS, E. H. (1973) **Predicting the storage life of seeds**. In: **Proceedings**.

RODRIGUES, M.O.C (2005) **Influência do armazenamento nos teores de açúcares solúveis totais e redutores em sementes de Syagrus coronata (Martius) Beccari (Arecaceae)**. Sitientibus Série Ciências Biológicas, v. 5, n. 2, p. 72-75.

ROSA, D. V. F. S. (2005) **Enzimas removedoras de radicais livres e proteínas LEA associadas à tolerância de sementes de milho à alta temperatura de secagem**. Revista Brasileira de Sementes, Londrina, v. 27, n. 2, p. 91-101.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W. (1978). **The photosynthesis-transpiration compromise**. Plant physiology, v. 4, p. 66-92.

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

SCANDALIOS, J. G.; GUAN, L; POLIDOROS, A. N. (1997) **Catalases in plants: gene structure, properties, regulation, and expression**. Cold Spring Harbor Monograph Series, v. 34, p. 343-406.

SCHIAVON, M; MORO, I; PILON-SMITS, E.A.H; MATOZZO, V; MALAGOLI, M; DALLA VECCHIA, F. (2012) **Accumulation of selenium in Ulva sp. and effects on morphology, ultrastructure and antioxidant enzymes and metabolites**. Aquatic toxicology, 122, p. 222-231.

SCHMIDT, E. C et al. (2009) **Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* (Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure.** *Micron*, v. 40, n. 8, p. 860-869.

SCOTT, P. (2000) **Resurrection plants and the secrets of eternal leaf.** *Annals of Botany*, 85, 2, p. 159-166.

SHAHIDI, F; NACZK, M. (2006) **Phenolics in food and nutraceuticals.** CRC Press, London, 566 p.

SHANNON, J. C. (1968) **A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels.** *Purdue Univ. Res. Bull.* No. 842.4, Lafayette, IN.

SHIRLEY, B.W (1998) **Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis.** *Seed Science Research*, v. 8, n. 04, p. 415-422.

SMITH, M.T; BERJAK, P. (1995) **Deteriorative changes associated with the loss of viability of stored desiccations of seed associated Mycoflora During storage.** In: K. Jaime & G. Galili (eds.). *Seed development and germination.* New York-Basel: Hang Yong, pp.701-746.

SPURR, A.R. (1969) **A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy.** *J Ultrastruct Res* 26: 31-43

SUDA, N. K. C.; GIORGINI, J. F. (2000) **Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, n. 3, p. 226-245.

TAIZ, L; ZEIGER, E. (2004) **Fisiologia vegetal.** 3 ed. Porto Alegre: Artmed, p. 719.

UMBREIT, W. W; BURRIS R.H. (1964) **Manometric techniques: a manual describing methods applicable to the study of tissue**

**metabolismo.** No. QP88 U5. Burgess Publishing Co., Minneapolis, Minn, ed. 4, 305 pp.

VAN WYK, A. E.; BOTHA, R (1984). **The genus Eugenia (Myrtaceae) in southern Africa: ontogeny and taxonomic value of the seed.** South African Journal of Botany, v. 3, n. 1, p. 63-80.

VIEIRA, A.H; MARTINS, E.P; PEQUENO, P.L.L; LOCATELLI, M; SOUZA, M.G. (2001) **Técnicas de produção de sementes florestais.** CT/205, EMBRAPA-CPAF, Rondônia. p.2-4.

VERTUCCI, C.W; FARRANT, J.M. (1995) **Acquisition and loss of desiccation tolerance.** Seed development and germination, p. 237-271.

VERTUCCI, C.W; FARRANT, J.M. (1995) **Acquisition and loss of desiccation tolerance.** In J Kigel, G Galil, eds, Seed Development and Germination. Marcel Dekker, New York, pp 237-272.

VERTUCCI, C.W; LEOPOLD, A.C. (1984) **Bound water in soybean seed and its relation to respiration and imbibitional damage.** Plant Physiology, v. 75, n. 1, p. 114-117.

VOLZ, T. J., & CLAUSEN, T. P. (2001). **Tannins in Puccinellia arctica: Possible deterrents to herbivory by Canada geese.** Journal of chemical ecology, 27(4), 725-732.

WALTER, M.; SILVA, L. P.; EMANUELLI, T (2005). **Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação.** Ciência rural, 35(4):219-226.

WALTERS, C. (2000) **Levels of recalcitrance in seeds.** Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal. Vol. 12. Edição Especial. Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal.

WISE, J.M; TUNNACLIFFE, A. (2004) **POPP the question: what do LEA proteins do?** Trends in Plant Science, London, v. 9, p. 13-17.

WOLKERS, W. F. et al. (2001) **Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro.** Biochimica et

Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, v. 1544, n. 1, p. 196-206.

YIN, G; SUN, H; XIN, X; QIN, G; LIANG, Z; JING, X. (2009) **Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures.** Plant and cell physiology, 50, 7, p. 1305-1318.

ZACARIAS, A.A; MORESCO, H.H; HORST, H; BRIGHENTE, I.M.C; MARQUES, M.C.A; PIZZOLLATI, M.G. (2007) **Determinação do teor de fenólicos e flavonoides no extrato e frações de *Tabebuia 170 heptaphylla*.** In: 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Santa Maria, Rio Grande do Sul. Setembro/1999.

ZENGQI, L.et al.( 2012)**The synthesis and storage sites of phenolic compounds in the root and rhizome of *Echinacea purpurea*.** American Journal of Plant Sciences.