

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AGRÁRIAS – AGRONOMIA

QUALIDADE DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* Desf.
SOB EFEITOS DE TRATAMENTOS PRÉ-GERMINATIVOS

Autor: Renato Vieira Medeiros
Orientadora: Prof^ª. Dra. Juliana de Fátima Sales

RIO VERDE - GO
Setembro - 2022

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA

QUALIDADE DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* Desf.
SOB EFEITOS DE TRATAMENTOS PRÉ-GERMINATIVOS

Autor: Renato Vieira Medeiros
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana de Fátima Sales
Coorientadores: Prof. Dr. Jacson Zuchi
Prof. Dr. Osvaldo Resende

Tese apresentada como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - AGRONOMIA, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias - Agronomia - do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde – (Tecnologias sustentáveis em sistemas de produção e uso do solo e água).

RIO VERDE - GO
Setembro – 2022

Ficha catalográfica (Elaborada pela Bilbioteca)

Sistema desenvolvido pelo ICMC/USP
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas - Instituto Federal Goiano

MR394q Medeiros, Renato Vieira
QUALIDADE DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii*
Desf. SOB EFEITOS DE TRATAMENTOS PRÉ-GERMINATIVOS /
Renato Vieira Medeiros; orientadora Juliana de
Fátima Sales; co-orientadora Osvaldo Resende. -- Rio
Verde, 2022.
98 p.

Tese (Doutorado em Programa de Pós-Graduação em
Ciências Agrárias) -- Instituto Federal Goiano,
Campus Rio Verde, 2022.

1. Copaíba. 2. Enzimas. 3. Germinação. 4. Raios X.
5. Superação de dormência. I. Sales, Juliana de
Fátima, orient. II. Resende, Osvaldo, co-orient.
III. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SECRETARIA DE EDUCAÇÃO PROFISSIONAL E TECNOLÓGICA
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA GOIANO

Documentos 96/2022 - SREPG/CMPR/CPG-RV/DPGPI-RV/CMPRV/IFGOIANO

QUALIDADE DE SEMENTES DE *Copaifera langsdorffii* Desf. SOB EFEITOS DE TRATAMENTOS PRÉ-GERMINATIVOS

Autor: Renato Vieira Medeiros
Orientadora: Prof^a. Dra. Juliana de Fátima Sales

TITULAÇÃO: Doutorado em Ciências Agrárias-Agronomia, Área de Concentração em Produção Vegetal Sustentável no Cerrado

APROVADO em, 20 de setembro de 2022.

Prof^a. Dra. Juliana de Fátima Sales (Presidente)

Prof. Dr. Fernando Higino de Lima e Silva (Avaliador interno)

Prof^a. Dra. Heloisa Oliveira dos Santos (Avaliadora externa)

Prof. Dr. Arthur Almeida Rodrigues (Avaliador interno)

Prof^a. Dra. Carla Gomes Machado (Avaliadora externa)

Documento assinado eletronicamente por:

- Carla Gomes Machado, Carla Gomes Machado - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal de Goiás (01567601000143), em 22/09/2022 18:12:20.
- Heloisa Oliveira dos Santos, Heloisa Oliveira dos Santos - Professor Avaliador de Banca - Universidade Federal de Lavras (22078679000174), em 20/09/2022 21:00:58.
- Fernando Higino de Lima e Silva, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 20/09/2022 15:52:34.
- Arthur Almeida Rodrigues, Arthur Almeida Rodrigues - Professor Avaliador de Banca - Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde (10651417000500), em 20/09/2022 14:24:40.
- Juliana de Fatima Sales, PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO, em 20/09/2022 10:35:38.

Este documento foi emitido pelo SUAP em 19/09/2022. Para comprovar sua autenticidade, faça a leitura do QRCode ao lado ou acesse <https://suap.ifgoiano.edu.br/autenticar-documento/> e forneça os dados abaixo:

Código Verificador: 426663
Código de Autenticação: 2c94155120



INSTITUTO FEDERAL GOIANO

Campus Rio Verde Rodovia Sul Goiana, Km 01, Zona Rural, None, None, RIO VERDE / GO, CEP 75901-

970

(64) 3620-5600

A minha esposa Flaviani, pelo incentivo, apoio e compreensão durante as pesquisas,
ao meu filho Benício, minha fonte de inspiração e
a minha mãe Luzia como exemplo de superação,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que, em nossas conversas e desabafo, me deu a força que necessitava para vencer o cansaço dos trabalhos exaustivos, pela paciência e serenidade quando algo dava errado. Obrigado por ter me concedido essa experiência de vida!

À minha esposa Flaviani Maciel Ferreira Medeiros e meu filho Benício Maciel Medeiros, ambos são meu alicerce e motivação, unidos pelo amor para enfrentar a dura batalha de ser professor e doutorando.

À minha mãe Luzia Vieira da Silva Medeiros, pela educação e todo apoio desde a infância até o presente momento.

Ao meu pai, *in memoriam*, pois sou um homem honesto, humilde e dedicado, graças ao senhor, onde quer que esteja.

À minha irmã Flávia Vieira Medeiros, *in memoriam*, pelos curtos, mas importantes anos que convivemos.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Juliana de Fátima Sales, pela orientação, paciência, conselhos e acompanhamento no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Osvaldo Resende e Prof. Dr. Jacson Zuchi, pelo acompanhamento do trabalho e atenção tirando todas as minhas dúvidas na experimentação.

Ao amigo, Prof. Dr. Arthur Almeida Rodrigues, pelas orientações e auxílio nas análises anatômicas, histoquímicas e de imagens radiográficas.

Aos estudantes de iniciação científica e monitores do Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, pelo apoio e auxílio na condução dos ensaios.

A secretária do Programa de Pós - Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia – Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde – GO, Vanilda, pela presteza e bom atendimento.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias –

Agronomia do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, pelos preciosos ensinamentos.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado!

BIOGRAFIA DA AUTOR

Renato Vieira Medeiros, filho de Luzia Vieira da Silva Medeiros e Ismael Medeiros Costa, nasceu no dia 20 de maio de 1988, em Santa Helena de Goiás. Em 2007, ingressou no Curso de Ciências Biológicas da UniRV – Universidade de Rio Verde – GO, graduando-se no ano de 2010. Tem especialização *Lato Sensu* em Biologia Vegetal pela Universidade Cândido Mendes no ano de 2014. É professor efetivo nível IV nas disciplinas de Biologia e Ciências da Natureza, da Secretaria de Estado da Educação de Goiás (SEDUC-GO). Iniciou o curso de mestrado em Produção Vegetal pela UniRV – Universidade de Rio Verde – GO em fevereiro de 2016, defendendo a dissertação no dia 07 de março de 2018. Em agosto de 2018, foi aprovado para iniciar o curso de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias – Agronomia, na área de Tecnologia de Sementes, submetendo-se à defesa de tese para obtenção do título de Doutor em Ciências Agrárias – Agronomia em setembro de 2022.

RESUMO

MEDEIROS, RENATO VIEIRA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde – GO, setembro de 2022. **Qualidade de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. sob efeitos de tratamentos pré-germinativos.** Orientadora: Prof^a Dr^a. Juliana de Fátima Sales. Coorientadores: Prof. Dr. Jacson Zuchi. Prof. Dr. Osvaldo Resende.

A copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) é uma espécie vegetal arbórea de ampla distribuição no Brasil e grande variabilidade genética. Suas sementes são de cor preta, ovoides e apresentam dormência tegumentar por possuírem estruturas que impedem a difusão de água e gases para o interior do tecido embrionário, sendo necessário tratamentos pré-germinativos para superação da dormência, o que proporciona uma germinação rápida e uniforme. Devido ao fato de a espécie apresentar ampla variabilidade genética e suas sementes apresentarem dormência tegumentar, faz-se necessário investigar nas sementes as características físicas, fisiológicas, bioquímicas e histoquímicas de diferentes lotes, coletadas em diferentes matrizes e em sementes submetidas a tratamentos de superação de dormência com a finalidade de relacioná-las à qualidade fisiológica das sementes. Objetivou-se avaliar as características fisiológicas, físicas, bioquímicas e histoquímicas em lotes de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. de diferentes matrizes e em sementes sob efeitos de tratamentos pré-germinativos para superação da dormência tegumentar. Assim, foram conduzidos dois experimentos utilizando sementes de *C. langsdorffii* coletadas diariamente no bioma cerrado após recente dispersão dos frutos de cinco matrizes. No primeiro experimento, sementes de uma única matriz (neutralizando a interferência genética) foram submetidas a dezessete tratamentos pré-germinativos, compreendendo escarificação mecânica do lado oposto do embrião, embebição em água destilada por seis horas, embebição em água destilada por doze horas, embebição em água destilada por dezoito horas, embebição em água destilada

por vinte quatro horas, escarificação mecânica e embebição em água destilada por seis horas, escarificação mecânica e embebição em água destilada por doze horas, escarificação mecânica e embebição em água destilada por dezoito horas, escarificação mecânica e embebição em água destilada por vinte e quatro horas, escarificação química com ácido sulfúrico por quarenta e cinco minutos, escarificação química com ácido sulfúrico por noventa minutos, escarificação térmica com água destilada a 90°C por um minuto, escarificação térmica com água destilada a 90°C por três minutos, choque térmico com um minuto em água destilada a 90°C e posterior imersão em água destilada a 0°C por um minuto, imersão em álcool etílico 70% por dez minutos, imersão em álcool etílico 70% por vinte minutos, imersão em álcool etílico 70% por trinta minutos mais o controle (sem tratamento pré-germinativo). No segundo experimento, sementes coletadas de cinco matrizes formaram os tratamentos dos lotes de sementes. Os dois experimentos foram submetidos a avaliações de qualidade física, fisiológica, bioquímica e histoquímica. A dormência das sementes de *C. langsdorffii* é superada de forma eficaz com escarificação mecânica do lado oposto do embrião. O tratamento pré-germinativo com escarificação química com ácido sulfúrico por noventa minutos produziu alterações celulares deletérias às sementes, menor atividade das enzimas α -amilase e β -amilase, as quais estão associadas à qualidade de germinação e ao aumento do estresse pela detecção elevada das enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT, APX, POX e PPO, além níveis elevados de MDA, detectados em sementes em processo de deterioração em razão da peroxidação de lipídios. Ao comparar lotes de sementes, o lote 2 originário da matriz 2 tem qualidade fisiológica, física, bioquímica e histoquímica inferior em relação aos lotes provenientes das outras matrizes, considerando as análises de imagens radiográficas, de germinação, do índice de velocidade de germinação, dos baixos níveis das enzimas α -amilase e β -amilase e da elevada detecção das enzimas SOD, CAT, APX, POX e PPO e do conteúdo de MDA.

Palavras-chave: Copaíba. Enzimas. Germinação. Raios X. Superação de dormência.

ABSTRACT

MEDEIROS, RENATO VIEIRA. Federal Institute of Education, Science, and Technology of Goiás, Rio Verde Campus, Goiás State (GO), Brazil, September 2022. **Seed quality of *Copaifera langsdorffii* Desf. under the effects of pre-germination treatments.** Advisor: Prof. Dr. Sales, Juliana de Fatima. Co-advisors: Prof. Dr. Zuchi, Jacson. Prof. Dr. Resende, Osvaldo.

Copaiba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) is a tree species with a wide distribution in Brazil and great genetic variability. Its seeds are black in color, ovoid, and have integumentary dormancy because they have structures that prevent the diffusion of water and gases into the embryonic tissue, requiring pre-germination treatments to overcome dormancy, which provides rapid and uniform germination. Considering that the species presents wide genetic variability and its seeds present tegumentary dormancy, it is needed to investigate the physical, physiological, biochemical, and histochemical characteristics in the seeds of different batches collected in different matrices, as well as in the seeds submitted to treatments to overcome dormancy relating them to the seed physiological quality. This study aimed to evaluate the physiological, physical, biochemical, and histochemical characteristics of seed batches of *Copaifera langsdorffii* Desf. from different matrices and in seeds under effects of pre-germination treatments to overcome tegumentary dormancy. Thus, two experiments were carried out using *C. langsdorffii* seeds collected daily in the Cerrado biome (Brazilian Savannah) after the recent fruit dispersion from five matrices; In the first experiment, seeds from a single matrix (neutralizing genetic interference) were subjected to seventeen pre-germination treatments, comprising: (a) mechanical scarification of the embryo opposite side, soaking in distilled water for 6 h, 12 h, 18 h, s and 24 h; (b) mechanical scarification and soaking in distilled water for 6 h, 12 h, 18 h, and 24 h; (c) chemical scarification with sulfuric acid for 45 min and 90 min; (d) thermal scarification with distilled water at 90 °C for 1 min and 3 min; (e) thermal shock for 1

min in distilled water at 90 °C and subsequent immersion in distilled water at 0 °C for 1 min; (f) immersion in 70% ethyl alcohol for 10 min, 20 min, and 30 min plus the control (without pre-germination treatment). In the second experiment, seeds collected from five matrices formed the seed batch treatments. Both experiments were submitted to physical, physiological, biochemical, and histochemical quality evaluations. The seed dormancy of *C. langsdorffii* is successfully overcome with mechanical scarification of the embryo opposite side. The pre-germination treatment with chemical scarification with sulfuric acid for 90 min produced deleterious cellular changes to the seeds, lower activity of α -amylase and β -amylase enzymes, which are associated with germination quality and with increased stress due to the high detection of enzymes of the antioxidant system superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX), and polyphenol oxidase (PPO), in addition to high levels of the malondialdehyde enzyme (MDA) detected in seeds in deterioration process due to lipid peroxidation. The batch 2 originating from matrix 2 showed inferior physiological, physical, biochemical, and histochemical quality compared to batches from other matrices, considering the analysis of radiographic images, germination, germination speed index, low levels of α -amylase and β -amylase enzymes, high detection of SOD, CAT, APX, POX, and PPO enzymes, and high detection of the MDA content.

Keywords: Copaiba. Dormancy overcoming. Enzymes. Germination. X rays.

LISTA DE QUADRO E TABELA

Quadro	Tratamentos pré-germinativos para superação de dormência utilizados nas sementes de <i>C. langsdorffii</i>	17
Tabela	Teor de água dos lotes de sementes de <i>C. langsdorffii</i> Desf.....	49

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 3.1 Ganho de massa de sementes de <i>Copaifera langsdorffii</i> , em função do tempo de embebição sob diferentes tratamentos pré-germinativos.....	23
Figura 3.2 (A) % Germinação no 8º Dia Após a Semeadura (Germination (%) 8th day), (B) % Germinação no 17º Dia Aps a Semeadura (Germination (%) 17th day) e (C) % Germinação no 25º Dia Após a Semeadura (Germination (%) 25th day), para sementes de <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf. submetidas aos tratamentos pré-germinativos Controle (Control), Escarificação Mecânica (Mechanical Scarification), Embebidas 6h (Soaked 6h), Embebidas 12 h (Soaked 12 h), Embebidas 18 h (Soaked 18 h), Embebidas 24 h (Soaked 24 h), Escarificação Mecânica + Embebição 6h (Mechanical Scarification + Soaking 6 h), Escarificação Mecânica + Embebição 12 h (Mechanical Scarification + Soaking 12 h), Escarificação Mecânica + Embebição 18h (Mechanical Scarification + Soaking 18h), Escarificação Mecânica + Embebição 24 h (Mechanical Scarification + Soaking 24 h), H ₂ SO ₄ 45' (H ₂ SO ₄ "45"), H ₂ SO ₄ 90' (H ₂ SO ₄ "90"), Escarificação Térmica 1' (Thermal Scarification "1"), Escarificação Térmica 3' (Thermal Scarification "3"), Choque Térmico (Thermal Shock), Etanol 70% 10' (Ethanol "10"), Etanol 70% 20' (Ethanol "20") e Etanol 70% 30' (Ethanol "30").....	24-25
Figura 3.3 (A) % de Sementes Não Germinadas (Non germinated seeds (%)),	26-27

(B) % Sementes Mortas (Dead seeds (%)), (C) % de Plântulas Normais (Normal Seedlings (%)), (D) % de Plântulas Anormais (Abnormal Seedlings (%)) e (E) IVG (GSI), para sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos tratamentos pré-germinativos Controle (Control), Escarificação Mecânica (Mechanical Scarification), Embebidas 6h (Soaked 6 h), Embebidas 12 h (Soaked 12 h), Embebidas 18h (Soaked 18 h), Embebidas 24 h (Soaked 24h), Escarificação Mecânica + Embebição 6h (Mechanical Scarification + Soaking 6h), Escarificação Mecânica + Embebição 12 h (Mechanical Scarification + Soaking 12 h), Escarificação Mecânica + Embebição 18 h (Mechanical Scarification + Soaking 18 h), Escarificação Mecânica + Embebição 24h (Mechanical Scarification + Soaking 24 h), H₂SO₄ 45' (H₂SO₄ "45"), H₂SO₄ 90' (H₂SO₄ "90"), Escarificação Térmica 1' (Thermal Scarification "1"), Escarificação Térmica 3' (Thermal Scarification "3"), Choque Térmico (Thermal Shock), Etanol 70% 10' (Ethanol "10"), Etanol 70% 20' (Ethanol "20") e Etanol 70% 30' (Ethanol "30").....

Figura 3.4 Caracterização anatômica de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos principais tratamentos pré-germinativos para superação de dormência. (A) Controle, (B) Esc. Mecânica, (C) Esc./Emb.6 h, (D) Esc./Emb.12 h, (E) H₂SO₄ 45', (F-G) H₂SO₄ 90'. Setas vermelhas indicam alterações na estrutura celular..... 28

Figura 3.5 Acúmulo de proteínas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos principais tratamentos pré-germinativos para superação de dormência. (A) Controle, (B) Esc. Mecânica, (C) Esc./Emb.6h, (D) Esc./Emb.12h, (E) H₂SO₄ 45', (F-G) H₂SO₄ 90'. Setas amarelas indicam acúmulo de proteínas..... 29

Figura 3.6 (A) Malondialdeído (MDA), (B) Superóxido Dismutase (SOD), (C) Catalase (CAT), (D) Peroxidase do Ascorbato (APX), (E) Peroxidase Inespecífica (POX) e (F) Polifenoloxidase (PPO), para 31-32

sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos tratamentos pré-germinativos Controle (Control), Escarificação Mecânica (Mechanical Scarification), Embebidas 6h (Soaked 6 h), Embebidas 12 h (Soaked 12 h), Embebidas 18h (Soaked 18 h), Embebidas 24 h (Soaked 24 h), Escarificação Mecânica + Embebição 6h (Mechanical Scarification + Soaking 6 h), Escarificação Mecânica + Embebição 12 h (Mechanical Scarification + Soaking 12 h), Escarificação Mecânica + Embebição 18 h (Mechanical Scarification + Soaking 18 h), Escarificação Mecânica + Embebição 24 h (Mechanical Scarification + Soaking 24 h), H₂SO₄ 45' (H₂SO₄ "45"), H₂SO₄ 90' (H₂SO₄ "90"), Escarificação Térmica 1' (Thermal Scarification "1"), Escarificação Térmica 3' (Thermal Scarification "3"), Choque Térmico (Thermal Shock), Etanol 70% 10' (Ethanol "10"), Etanol 70% 20' (Ethanol "20") e Etanol 70% 30' (Ethanol "30").....

Figura 3.7 Atividade das enzimas (A) Alfa Amilase e (B) Beta Amilase, e conteúdo (C) Proteínas Totais, para sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos tratamentos pré-germinativos Controle (Control), Escarificação Mecânica (Mechanical Scarification), Embebidas 6h (Soaked 6 h), Embebidas 12h (Soaked 12 h), Embebidas 18 h (Soaked 18 h), Embebidas 24h (Soaked 24 h), Escarificação Mecânica + Embebição 6h (Mechanical Scarification + Soaking 6 h), Escarificação Mecânica + Embebição 12 h (Mechanical Scarification + Soaking 12 h), Escarificação Mecânica + Embebição 18h (Mechanical Scarification + Soaking 18 h), Escarificação Mecânica + Embebição 24 h (Mechanical Scarification + Soaking 24h), H₂SO₄ 45' (H₂SO₄ "45"), H₂SO₄ 90' (H₂SO₄ "90"), Escarificação Térmica 1' (Thermal Scarification "1"), Escarificação Térmica 3' (Thermal Scarification "3"), Choque Térmico (Thermal Shock), Etanol 70% 10' (Ethanol "10"), Etanol 70% 20' (Ethanol "20") e Etanol 70% 30' (Ethanol "30").....

- Figura 3.8 Gráfico *Heatmap* da correlação de Pearsons para todas as variáveis. Germ. (%) 8 DAS (porcentagem de germinação aos oito dias após a semeadura), Germ. (%) 17 DAS (porcentagem de germinação aos dezessete dias após a semeadura), Germ. (%) 25 DAS (porcentagem de germinação aos vinte e cinco dias após a semeadura), Not Germ. (%) (porcentagem de não germinadas), Dead Seeds (%) (porcentagem de sementes mortas), Normal Seedlings (%) (porcentagem de plântulas normais), Abnormal Seedlings (%) (porcentagem de plântulas anormais), GSI (índice de velocidade de germinação), SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), APX (ascorbato peroxidase), POX (peroxidase inespecífica), PPO (polifenol oxidase), MDA (Malondialdeído), Total Proteins (proteínas totais), Alpha Amylase (alfa amilase) e Beta Amylase (beta amilase) em diferentes lotes de *C. langsdorffii*..... 34-35
- Figura 4.1 Ganho de massa em sementes de diferentes lotes de *Copaifera langsdorffii*, em função do tempo de embebição..... 54
- Figura 4.2 (A) Porcentagem de germinação aos 4 dias após a semeadura (Germ. (%) 4 DAS), (B) porcentagem de germinação aos 10 dias após a semeadura (Germ. (%) 10DAS), (C) porcentagem de germinação aos 15 dias após a semeadura (Germ. (%) 15 DAS), (D) porcentagem de sementes não germinadas (Not Germ. (%)), (E) porcentagem de sementes mortas [Dead Seeds (%)], (F) porcentagem de plântulas normais (Normal Seedling (%)), porcentagem de plântulas anormais [Abnormal Seedling (%) e índice de velocidade de germinação (GSI)] em diferentes lotes de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf..... 56
- Figura 4.3 Imagens radiográficas de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. -(A, B e C) sementes da matriz 1; (D, E e F) sementes da matriz 2; (G, H e I) sementes da matriz 3; (J, K e L) sementes da matriz 4; (M, N e O) sementes da matriz 5..... 58
- Figura 4.4 (A) Área (Area), (B) perímetro (Perimeter), (C) circularidade 59

- (Circularity), (D) densidade relativa (Relative Density), (E) média de cinza (Median Gray) e (F) preenchimento (Filling) em diferentes lotes de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf.....
- Figura 4.5 Caracterização anatômica e acúmulo de proteínas em sementes de cinco matrizes de *Copaifera langsdorffii* Desf. - (A-B) matriz 1; (C-D) matriz 2; (E-F) matriz 3; (G-H) matriz 4; (I-J) matriz 5; Setas amarelas indicam acúmulo de proteínas..... 61
- Figura 4.6 Conteúdos de (A) malondialdeído (MDA), (B) superóxido dismutase (SOD), (C) catalase (CAT), (D) peroxidase do ascorbato (APX), (E) peroxidase (POX), (F) polifenoloxidase (PPO), (G) alfa amilase, (H) beta amilase e (I) total de proteínas nos diferentes lotes de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf..... 63
- Figura 4.7 Gráfico *Heatmap* da correlação de Pearson para todas as variáveis. Germ. (%) 4 DAS (porcentagem de germinação aos quatro dias após a semeadura), Germ. (%) 10 DAS (porcentagem de germinação aos dez dias após a semeadura), Germ. (%) 15 DAS (porcentagem de germinação aos quinze dias após a semeadura), Not Germ. (%) (porcentagem de não germinadas), Dead Seeds (%) (porcentagem de sementes mortas), Normal Seedlings (%) (porcentagem de plântulas normais), Abnormal Seedlings (%) (porcentagem de plântulas anormais), GSI (índice de velocidade de germinação), Area (área), Perimeter (perímetro), Circularity (circularidade), Relative Density (densidade relativa), Integrated Density (Densidade Integral), Median Gray (Median Gray), SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), APX (ascorbato peroxidase), POX (peroxidase inespecífica), PPO (polifenol oxidase), MDA (Malondialdeído), Alpha Amylase (alfa amilase), Beta Amylase (beta amilase) e Total Proteins (proteínas totais) em diferentes lotes de *C. langsdorffii*..... 64

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

α	Alfa
B.....	Beta
SOD.....	Superóxido dismutase
CAT.....	Catalase
APX.....	Peroxidase do ascorbato
POX.....	Peroxidase inespecífica
PPO.....	Polifenoloxidase
MDA.....	Malondialdeído
PROT....	Proteína
DIC.....	Delineamento inteiramente casualizado
IVG.....	Índice de velocidade de germinação
G.....	Germinação
SNG.....	Sementes não germinadas
SM.....	Sementes mortas
PN.....	Plântulas normais
PA.....	Plântulas anormais
PMSF....	Fenilmetilsulfônico
PVP.....	Polivinilpirrodidona
EDTA....	Etilenodiaminotetracético
DNS.....	Ácido 3,5 dinitrosalicílico
NBT.....	Azul de p-nitro-tetrazólio
TCA.....	Ácido tricloroacético
L.....	Litros
Mg.....	Miligramas
μ	Micro
ml.....	Mililitros

%..... Porcentagem

°C..... Graus Celsius

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 <i>Copaifera Langsdorffii</i> DESF.....	1
1.2 Dormência nas sementes de <i>Copaifera Langsdorffii</i> DESF.....	2
1.3 Qualidade fisiológica em sementes	3
1.4 Imagens radiográficas em sementes	4
1.5 Análise bioquímica	5
1.6 Referências.....	6
2 OBJETIVO GERAL	12
3 CAPÍTULO I.....	13
3.1 Introdução.....	15
3.2 Material e métodos	16
3.2.1 Coleta.....	16
3.2.2 Teor de água.....	17
3.2.3 Imagens radiográficas.....	17
3.2.4 Tratamentos Pré-germinativos.....	17
3.2.5 Curva de embebição.....	18
3.2.6 Testes fisiológicos	18
3.2.7 Caracterização morfoanatômica das sementes	19
3.2.8 Determinação da atividade das enzimas α -amilase e β -amilase, enzimas do sistema antioxidativo e conteúdo de proteínas	19

3.2.9	Análise estatística	22
3.3	Resultados	22
3.3.1	Curva de embebição	22
3.3.2	Teste de germinação	23
3.3.3	Caracterização anatômica e histoquímica das sementes	27
3.3.4	Análise bioquímica.....	29
3.3.5	Correlação de Pearson's	34
3.4	Discussão	35
3.5	Conclusões.....	37
3.6	Referências.....	37
4	CAPÍTULO II.....	45
4.1	Introdução.....	47
4.2	Material e métodos	48
4.2.1	Coleta	48
4.2.2	Teor de água.....	48
4.2.3	Curva de embebição	49
4.2.4	Testes fisiológicos	49
4.2.5	Imagens radiográficas.....	50
4.2.6	Caracterização morfoanatômica das sementes	50
4.2.7	Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidativo	51
4.2.8	Análise estatística	53
4.3	Resultados	54
4.3.1	Curva de embebição	54
4.3.2	Teste de germinação	54
4.3.3	Imagens radiográficas.....	56
4.3.4	Caracterização anatômica e histoquímica das sementes	59
4.3.5	Análises bioquímicas	61
4.3.6	Correlação de Pearson's	64
4.4	Discussão	65

4.5	Conclusões.....	66
4.6	Referências.....	67
5	CONCLUSÃO GERAL	74

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 *Copaifera langsdorffii* Desf.

A espécie arbórea *Copaifera langsdorffii* Desf. pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinoideae, pode ser denominada popularmente de copaíba, pau-de-óleo ou óleo, dependendo da região do Brasil (Arruda *et al.*, 2019; Carvalho, C. *et al.*, 2021). As árvores de copaíba têm altura entre dez e quarenta metros, sendo encontrada em grande parte do território brasileiro e em países vizinhos como a Argentina e Paraguai (Lorenzi e Matos, 2002; Arruda *et al.*, 2019).

Seu florescimento ocorre entre os meses de dezembro e março, com reprodução alógama e frutos amadurecendo de agosto a setembro com a planta quase que totalmente sem folhagem (Pedroni *et al.*, 2002). Sua frutificação é supra-anual, com anos de intensa produção, seguidos por anos de pouca produção (Newstrom *et al.*, 1994; Pedroni *et al.*, 2002), sendo essa tendência trienal (Dias, 1995). Essa variação no ciclo reprodutivo causa flutuações no tamanho das populações, apesar de a espécie manter um banco de plantas jovens que garante a autorregeneração dessas populações (Schiavini, *et al.*, 2001).

O fruto da *C. langsdorffii* é do tipo legume, deiscente, ovoides, castanho claro quando maduro, contendo uma ou duas sementes. As sementes são ovoides, de tegumento preto e cobertas por um arilo em grande parte da sua área. O arilo é mucilaginoso, composto por carboidratos e lipídios, de cor que varia do amarelo ao alaranjado (Rodrigues *et al.*, 2000).

É uma espécie de grande interesse comercial para extração de madeira empregada na construção civil como vigas, ripas, batentes e forros e fabricação de móveis e na extração do óleo-resina (óleo de copaíba), o qual é matéria-prima para produção de verniz, tintas e produtos medicinais ou ainda utilizado como biodiesel (Santana, S. *et al.*, 2014). É utilizado na medicina popular como cicatrizante, laxante, no tratamento de hemorroidas, antiviral, anticancerígeno, tendo propriedades de anestesia local, citotóxica,

inseticida e bactericida (Arruda *et al.*, 2019).

A maior parte dos estudos com *C. langsdorffii* foram realizados com foco nas propriedades fitoquímicas presentes nas diversas partes da planta, encontrando vários compostos utilizados para produção de medicamentos. Estudo recente utilizando o extrato da sua casca como corante natural de tecidos demonstrou que seu extrato proporciona boa solidez da cor à fricção e à lavagem (Silva, P. *et al.*, 2022). São, portanto, poucos os estudos relativos da qualidade fisiológica, física, bioquímica e histoquímica nas sementes de *C. langsdorffii*.

Por ter reprodução alógama e ampla distribuição no Brasil, a *C. langsdorffii* tem alta variabilidade genética, o que torna necessário investigar a qualidade física, fisiológica, bioquímica e histoquímica em diferentes lotes de sementes produzidas por diferentes matrizes.

1.2 Dormência nas sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf.

As espécies vegetais pertencentes família *Fabaceae*, subfamília *Caesalpinioideae*, produzem sementes com tegumento composto de uma camada externa com células epidérmicas esclerificadas e cobertas por uma cutícula na parte mais interna, a hipoderme é formada por osteoesclereídeos e camadas de células parenquimáticas com paredes bastante espessas (Gunn, 1981; Crestana e Beltrati, 1988). Essas estruturas que formam o tegumento das sementes de *C. langsdorffii* impedem a difusão de água e gases para o interior do tecido embrionário (Rolston, 1978; Souza e Marcos Filho, 2001). Essas características asseguram que as sementes de copaíba possuem dormência tegumentar (Noletto *et al.*, 2010).

Como a germinação das sementes de copaíba é lenta (dependendo do grau de dormência pode ser superior a vinte dias) e não uniforme (assíncrona) recomenda-se a necessidade de técnicas de superação de dormência, para promover uma germinação sincronizada das sementes, produzindo mudas uniformes, o que é importante na produção de viveiros (Sano *et al.*, 2008; Bezerra *et al.*, 2012).

Entre os tratamentos pré-germinativos sugeridos por estudos, estão a escarificação mecânica do lado oposto do embrião, realizado por meio de lixas (Machado *et al.*, 1992), escarificação química com imersão em ácido sulfúrico em tempo reduzido, somente para escarificação do tegumento (Bezerra *et al.*, 2012), pré-embebição em água destilada por setenta de duas horas (Borges *et al.*, 1982) e imersão em hipoclorito de sódio

(Noletto *et al.*, 2010). De acordo com Noletto *et al.* (2010), trabalhos com tratamentos pré-germinativos em sementes de copaíba ainda carecem de informações mais detalhadas sobre o processo germinativo ao longo do tempo.

1.3 Qualidade fisiológica em sementes

A qualidade das sementes é um fator de grande importância, pois consiste em determinar lotes de sementes com potencial de produzir plântulas com vigor. As sementes alcançam o grau máximo de qualidade quando atingem sua maturação fisiológica, paralelamente ao desligamento com a planta-mãe, sendo iniciado em seguida o processo de deterioração (Marcos Filho, 2005; Ramos *et al.*, 2021). Dessa maneira, testes fisiológicos são necessários, como os testes de teor de água, de germinação, de vigor e do índice de velocidade de germinação, para que se possa conhecer a qualidade das sementes pós-colheita (Marcos Filho, 2005; Brasil, 2009).

Níveis elevados de água nas sementes podem acelerar sua deterioração. Identificar o conteúdo de água das sementes pelo teste de teor de água permite prever o tempo que a semente suporta entre o período da colheita e a semeadura, sem que a deterioração comprometa a germinação e o vigor (Goldfarb e Queiroga, 2013). Além disso, a determinação da massa de água nas sementes é a base dos programas de controle de qualidade, pois este índice tem relação direta com a qualidade fisiológica das sementes (Sarmiento *et al.*, 2015). De acordo com Brasil (2009), a determinação do teste de teor de água das sementes consiste na diferença das pesagens iniciais e finais após um período de 24 h em estufa a 105 ± 3 °C.

No geral, após atingir a maturidade fisiológica, as sementes ortodoxas apresentam baixo conteúdo de água em relação a sementes recalcitrantes e podem tolerar dessecação para baixos níveis de água (entre 5% e 7%), podendo ser conservadas por períodos longos sem grandes prejuízos para sua qualidade (Goldfarb e Queiroga, 2013).

Assim como a determinação da massa de água, o teste de germinação é essencial para indicar a qualidade de lotes de sementes. Em síntese, o teste de germinação consiste em determinar o potencial máximo de germinação de um lote de sementes em ambiente controlado, com temperatura, umidade e fotoperíodo adequados para cada espécie, comparando com a qualidade de outros lotes (Bewley *et al.*, 2013).

Em paralelo ao teste de germinação, o vigor das sementes é atestado pela

capacidade de germinação e produção de plântulas normais, detectando diferenças na qualidade entre lotes de sementes que apresentam taxas de germinação semelhantes, permitindo, assim, classificá-los em alto e baixo vigor, identificando com precisão lotes que apresentam processo avançado de deterioração (Marcos Filho, 2005).

O número diário de sementes que germinaram dividido pelo número de dias decorridos após a semeadura determina o índice de velocidade de germinação (IVG) dos lotes de sementes. O IVG permite comparar qual lote de sementes germinou em menor período (Maguire, 1962). Assim, quanto maior o valor do índice, mais rápido será o estabelecimento das plântulas no ambiente, suportando melhor as condições adversas de clima em relação a lotes de sementes com valor baixo de IVG.

1.4 Imagens radiográficas em sementes

As imagens radiográficas em sementes consistem em uma técnica simples e rápida que fornece com precisão informações da integridade física da semente, contribuindo para a seleção de lotes em programas de controle de qualidade (Medeiros, A. *et al.*, 2020; Medeiros, R. *et al.* 2022).

Os diferentes tecidos das sementes absorvem quantidades distintas de raios X, os quais irão depender da espessura, da densidade do tecido e da composição, relacionado com o comprimento de onda da radiação (Simak, 1991; Bino *et al.*, 1993; ISTA, 1999, 2004). Após o teste de raios X, as imagens geradas podem ser processadas no *software* ImageJ[®]. A utilização desse *software* permite quantificar a qualidade das sementes através da densidade do tecido em cinza por pixel, em que níveis elevados de cinza indicam maior viabilidade e vigor (Medeiros, A. *et al.*, 2020; Medeiros, R. *et al.* 2022). Áreas escuras na imagem radiográfica correspondem a partes em que os raios X penetram mais facilmente, enquanto áreas mais claras representam as partes mais densas da semente (Simak, 1991).

A metodologia de avaliação de sementes por imagens radiográficas fornece informações precisas sobre parâmetros físicos sem que haja destruição das sementes. Esses parâmetros podem ser utilizados para atestar a qualidade fisiológica de lotes de sementes, uma vez que os testes de germinação e vigor confirmam a robustez da metodologia (Medeiros, A. *et al.*, 2020; Medeiros, R. *et al.* 2022).

1.5 Análise bioquímica

Na germinação de sementes ortodoxas como as de *C. langsdorffii*, enzimas hidrolases são responsáveis pela degradação de copos proteicos (Zienkiewicz *et al.*, 2014; Mazzottini-dos-Santos *et al.*, 2017). Células vivas da camada de aleurona do endosperma produzem essa variedade de enzimas, as quais são responsáveis pela mobilização de reservas do endosperma para o embrião (Bewley *et al.*, 2013).

Durante o processo de germinação, o embrião da semente produz hormônios geberelinas, que, por sua vez, promovem a síntese das enzimas α -amilase e β -amilase. Essas enzimas hidrolisam carboidratos do tecido de reserva da semente, utilizados pelo embrião em processo de desenvolvimento (Oliveira *et al.*, 2013). Assim, sementes com melhor qualidade de germinação apresentam maior atividade das enzimas α -amilase e β -amilase (Medeiros, R. *et al.*, 2022).

Quando a planta passa por um período de estresse, a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos do conteúdo elevado de espécies reativas de oxigênio (EROs) é a metaloenzima do sistema antioxidante enzimático intracelular, superóxido dismutase (SOD) (Mittler, 2002; Gill e Tuteja, 2010). Sua importância está relacionada à tolerância do estresse em vegetais, porém sua atividade gera um subproduto, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, por sua vez, é nocivo às células. Enzimas armazenadas nos glioxissomos e peroxissomos convertem o H_2O_2 em moléculas de água e gás oxigênio, sendo a catalase a principal enzima envolvida nesse processo (Scandalios, 2005). Assim, sementes que apresentam maior atividade de SOD consequentemente apresentam maior conteúdo de catalase (CAT) (Medeiros, R. *et al.*, 2022).

Além da atividade da CAT, as enzimas peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase inespecífica (POX) também atuam eliminando o H_2O_2 do conteúdo celular (Bailly, 2004; Freitas *et al.*, 2008). A APX está presente nos cloroplastos, no citoplasma, mitocôndrias, peroxissomas e apoplastos, eliminando H_2O_2 através do ciclo glutationa-ascorbato (Bailly, 2004), sendo sua presença relacionada à capacidade de desenvolver meios de tolerar o estresse pelas espécies vegetais, especialmente para eliminação de EROs (Comlekcioglu *et al.*, 2022; Mei e Song, 2010). Por outra via, a POX catalisa reações oxidativas em plantas ao utilizar o H_2O_2 como substrato, ou o O_2 como aceptor de hidrogênio, tendo sua atividade aumentada quando em estresse (Freitas *et al.*, 2008; Medeiros, R. *et al.*, 2022).

Danos no sistema de membranas das células e de suas organelas citoplasmáticas alteram os constituintes celulares, promovendo a oxidação de compostos fenólicos armazenados nos vacúolos pelo contato da enzima polifenoloxidase (PPO), exclusiva de plastídios, convertendo-o a quinonas, que, por sua vez, podem reagir com proteínas ou com a própria PPO (Amorim e Josephson, 1975).

Sementes em processo de deterioração têm níveis elevados de malondialdeído (MDA), produto da peroxidação de lipídios (Deuner *et al.*, 2011). O maior acúmulo de MDA foi identificado em sementes *Pterodon pubescens* em processo de deterioração dentro do fruto seco indeiscente da espécie (Medeiros, R. *et al.*, 2022).

Portanto as enzimas α -amilase, β -amilase, SOD, CAT, APX, POX, PPO e o conteúdo de MDA são importantes na investigação da qualidade de sementes de copaíba em associação com as imagens radiográficas e testes fisiológicos e histoquímicos.

1.5 Referências

Amorim, H.V., Josephson, R.V., 1975. Water-soluble protein and non-protein components of brasilian green coffes beans. J. Food Sci. 40, 1179-1185. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb01047.x> Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1975.tb01047.x> Acesso em: 5 ago. 2020.

Arruda, C. *et al.*, 2019. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on Copaifera genus-a review. Biomed. Pharmacother 109, 1-20. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.030 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30396065/> Acesso em: 1 ago. 2020.

Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res. 14(2), 93-107. Cambridge University Press 2004. DOI: <https://doi.org/10.1079/SSR2004159> Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/seed-science-research/article/abs/active-oxygen-species-and-antioxidants-in-seed-biology/5B6F78DF50B59FAEC17E35D968E546E5> Acesso em: 18 set. 2020.

Bewley, J.D. *et al.*, 2013. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 392p. DOI:10.1007/978-1-4614-4693-4 Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4614-4693-4> Acesso em: 3 maio 2020.

Bezerra, A.M.E. *et al.*, 2012. Germinação e desenvolvimento de plântulas de copaíba em função do tamanho e da imersão da semente em ácido sulfúrico. Revista Ciência Agronômica 33, 79-84. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/8631> Acesso em: 3 maio 2020.

Bino, R.J. *et al.*, 1993. Nondestructive X-ray of Arabidopsis embryo mutants. Seed

Science Research 3(3), 167-170. Cambridge University Press 1993. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0960258500001744>[Opens in a new window] Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/seed-science-research/article/abs/nondestructive-xray-analysis-of-arabidopsis-embryo-mutants/A37788D0E2108A7911ADDF595F41FDE1> Acesso em: 18 maio 2020.

Borges, E.E.L. *et al.*, 1982. Comparação de métodos de quebra de dormência em sementes de copaíba. Revista Brasileira de Sementes 4, 9-12. Disponível em: <https://www.abrates.org.br/artigo-cientifico/209/comparison-of-dormancy-breaking-methods-in-copaiba-icopaifera-langsdorffii-seeds> Acesso em: 18 maio 2020.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2009. Regras para análise de Sementes. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 399p. ISBN 978-85-99851-70-8. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf Acesso em: 2 fev. 2020.

Carvalho, C.R. de *et al.*, 2021. Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi associated with the neotropical ethnomedicinal plants *Copaifera langsdorffii* and *Copaifera pubiflora*. South African Journal of Botany 142, 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629921002362?via%3Dihub> Acesso em: 18 set. 2022.

Crestana, C.M., Beltrati, C.M., 1988. Morfologia e anatomia das sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae). Naturalia 13, 45-54:il.. ISSN : 0101-1944. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302660851> Acesso em: 4 abr. 2021.

Deuner, C. *et al.*, 2011. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. Rev. bras. sementes 33(4). <https://doi.org/10.1590/S0101-31222011000400013> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbs/a/MYtp9LbrNycRyHqYYPczmTS/?format=html&lang=pt> Acesso em: 18 maio 2020.

Dias, H.C.T., 1995. Fenologia de quatro espécies arbóreas de uma floresta estacional semidecídua em Lavras, MG. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/35479> Acesso em: 4 ago. 2020.

Freitas, A.A. de *et al.*, 2008. Activities of peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) enzymes in benitaka and rubi grapes and in their juices and jellies. Food Sci. Technol. 28(1), 172-177. DOI:<https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100025> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/gcvMmfMjn4nrsQWj9MpNk8c/?lang=pt> Acesso em: 2 fev. 2020.

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in

abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48(12), 909-930.
DOI:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016> Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942810001798?via%3Dihub>
Acesso em: 2 fev. 2020.

Goldfarb, M., Queiroga, V.de P., 2013. Considerações sobre o armazenamento de sementes. *Tecnol. Ciên. Agropec.* 7(3), 71-74. Disponível em:
<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/982507> Acesso em: 8 ago. 2020.

Gunn, C.R., 1981. Seeds of leguminosae. *In*: Pohill, R.M., Raven, P.H. (Eds.). *Advances in Legume Systematics*. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew, 1.050p. pp.913-925.

ISTA. 1999. International Rules of Seed. Testing (Supplement rules), *Seed Science and Technology*, 27, pp.25-30. Disponível em:
<https://www.seedtest.org/en/publications/international-rules-seed-testing-1168.html>
Acesso em: 4 fev. 2020.

ISTA. 2004. International Seed Testing Association. Germination. *In*: ISTA. *International Rules for Seed Testing* Bassersdorf: ISTA 5p. 1-5; 5A. 1-5A. 50.
Disponível em: <https://www.seedtest.org/en/publications/international-rules-seed-testing-1168.html> Acesso em: 4 fev. 2020.

Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 512 p. ISBN: 9788586714184, 8586714186

Machado, J.W.B. *et al.*, 1992. *Árvores de Brasília*. Brasília, DF: GDF. 100p.

Maguire, J.D., 1962. Speed of germination in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2(2), 176-177.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183x000200020033x> Disponível em:
<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x> Acesso em: 4 abr. 2020.

Marcos Filho, J., 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ 495p. ISBN: 8571330387. Disponível em:
<https://repositorio.usp.br/item/001445389> Acesso em: 4 abr. 2020.

Mazzottini-dos-Santos, H.C. *et al.*, 2017. Roles of the haustorium and endosperm during the development of seedlings of *Acrocomia aculeata* (*Arecaceae*): Dynamics of reserve mobilization and accumulation. *Protoplasma* 254, 1563-1578.
<https://doi.org/10.1007/s00709-016-1048-x> Disponível em:
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00709-016-1048-x#citeas> Acesso em: 5 maio 2020.

Medeiros, A.D. *et al.*, 2020. Quality classification of *Jatropha curcas* seeds using radiographic images and machine learning. *Industrial Crops and Products* 146, 112162.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112162>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020300789?via%3Dihub>

[b](#) Acesso em: 2 fev. 2021.

Medeiros, R.V. *et al.*, 2022. Associations between Integument Color and Physical and Physiological Quality in *Pterodon pubescens* Seeds. *Plants* 11, 1302. <https://doi.org/10.3390/plants11101302> Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/10/1302> Acesso em: 18 set.m2022.

Mei, Y-q., Song, S-q., 2010. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 11(12), 965-972. doi:10.1631/jzus.B1000147. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21121076/> Acesso em: 2 fev. 2021.

Sano, S.M. *et al.*, 2008. *Cerrado: Ecologia e Flora*. Embrapa Cerrados. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 1.279p.: il.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9), 405-410. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9) Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12234732/> Acesso em: 21 mar. 2021.

Newstrom, L.E. *et al.*, 1994. A new classification for plant phenology based on flowering patterns in lowland tropical forest trees at La Selva, Costa Rica. *Biotropica* 26(2), 141-159. DOI: 10.2307/2388804 Disponível em: <http://europepmc.org/article/AGR/IND20408848> Acesso em: 21 mar. 2021.

Noletto, L.G. *et al.*, 2010. Alterações estruturais e fisiológicas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. - leguminosae-caesalpinioideae submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Sementes* 32, 45-52. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000100005> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbs/a/HYy3hmgzLxYwvWTJhk4qyQm/?lang=pt> Acesso em: 21 mar. 2021.

Oliveira, G.E. *et al.*, 2013. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras* 37(1) 40-48. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542013000100005> Acesso em: 2 dez. 2022.

Pedroni *et al.*, jun. 2002. Fenologia da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf. -- *Leguminosae, Caesalpinioideae*) em uma floresta semidecídua no sudeste do Brasil. *Braz. J. Bot.* 25(2). <https://doi.org/10.1590/S0100-84042002000200007> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbb/a/3tTCNhmHy6wCtf5WG7GWqmM/abstract/?lang=pt> Acesso em: 20 mar. 2020.

Polo, M., Paes, J.P.A., 1994. Compostos cumarínicos em sementes imaturas de copaíba vermelha (*Copaifera langsdorffii* Desf.). *Revista da Universidade de Alfenas.* 1, 26-29. Comlekcioglu, S. *et al.*, 2022. Biochemical Characterization of Six Traditional Olive Cultivars: A Comparative Study. *Horticulturae* 8(5), 416 <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050416> Acesso em: 2 dez. 2022.

Ramos, C.A.S. *et al.*, 2021. Influence of maturity stage on physical and chemical characteristics of fruit and physiological quality of seeds of *Physalis angulata* L. *Scientia Horticulturae* 284 110124. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2021.110124>

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0304423821002314?via%3Dihub> Acesso em: 2 fev. 2022.

Rodrigues, M. *et al.*, 2000. O tucanuçu (*Ramphastos toco*) como agente dispersor de sementes de copaíba. *Melopsittacus* 3(1), 6-11. Disponível em:

<https://eurekamag.com/research/003/596/003596258.php> Acesso em: 2 fev. 2022.

Rolston, M.P., 1978. Water impermeable seed dormancy. *The Botanical Review (USA)*. (44(3), 365-396. ISSN: 0006-8101. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19800494141> Acesso em: 2 fev. 2022.

Santana, S.R. *et al.*, 2014. Uso medicinal do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) por pessoas da melhor idade no município de Presidente Médici, Rondônia, Brasil. *Acta Agronômica [S.l.]*, 63(4), 361-366. doi:10.15446/acag.v63n4.39111 Disponível em: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/39111. Acesso em: 15 maio 2020.

Sarmiento, H.G.S. *et al.*, 2015. Determinação do teor de água em sementes de milho, feijão e pinhão-mansinho por métodos alternativos. *Revista energia na agricultura* 30(3), 250-256 <https://doi.org/10.17224/EnergAgric.2015v30n3p250-256> Disponível em: <https://revistas.fca.unesp.br/index.php/energia/article/view/1005> Acesso em: 18 ago. 2020.

Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(7), 995-1014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003>

<https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003> Disponível em:

<https://www.scielo.br/j/bjmb/a/fw8z3bKNGjStKPRDBYqtNCJ/?lang=en> Acesso em: 2 fev. 2022.

Schiavini, I. *et al.*, 2001. Dinâmica de populações de espécies arbóreas em mata de galeria e mata mesófila na margem do ribeirão Panga, MG. *In: Ribeiro, J. F. et al.* (Eds.), *Cerrado: caracterização e recuperação de matas de galeria*. Planaltina: Embrapa Cerrados, 899p.:il. (algumas color.). pp.267-302. ISBN 85-7075-015-3. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cerrados/busca-de-publicacoes/-/publicacao/556930/cerrado-caracterizacao-e-recuperacao-de-matas-de-galeria> Acesso em: 2 fev. 2022.

Silva, P.M.dos S. *et al.*, 2022. *Copaifera langsdorffii* Desf. bark extract: optimisation of dyeing conditions to wool and colour fastness properties. *Natural Product Research* 36(14), 3744-3749. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1872567>. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1872567> Acesso em: 2 fev. 2022.

Simak, M., 1991. Testing of forest tree and shrub seeds by X-radiography. *In: Gordon, A.G. et al.* (Eds.), *Tree and shrub seed handbook*. Zurich: ISTA, 1-28.

Souza, F.H.D., Marcos Filho, J., 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationship in Fabaceae. *Revista Brasileira de Botânica* 24(4), 365-375. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042001000400002> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbb/a/w5NQDvSKyXsXWkbSNYg5bZN/?lang=en> Acesso em:

7 fev. 2022.

Zienkiewicz, A. *et al.*, 2014. Olive seed protein bodies store degrading enzymes involved in mobilization of oil bodies. *J. Exp. Bot.* 65(1), 103-115.

<https://doi.org/10.1093/jxb/ert355> Disponível em:

<https://academic.oup.com/jxb/article/65/1/103/428348> Acesso em: 7 fev. 2022.

2 OBJETIVO GERAL

Este estudo visa avaliar as características fisiológicas, físicas, bioquímicas e histoquímicas em lotes de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. de diferentes matrizes e em sementes sob efeito de tratamentos pré-germinativos para superação da dormência tegumentar

3 CAPÍTULO I

Efeitos de tratamentos pré-germinativos em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf.

(Normas de acordo com o periódico South African Journal of Botany)

RESUMO: *Copaifera langsdorffii* é uma espécie vegetal arbórea, pertencente à família Fabaceae, extensamente explorada pelo seu interesse comercial e medicinal. Suas sementes apresentam dormência tegumentar, portanto, é necessário investigar métodos de tratamentos pré-germinativos para superação desse tipo de dormência, principalmente para a produção de mudas e recomposição da sua população. Objetivou-se com este trabalho investigar a eficiência dos tratamentos pré-germinativos na superação de dormência em sementes de *C. langsdorffii* e relacioná-los com a caracterização anatômica e histoquímica, testes fisiológicos e atividade das enzimas relacionadas à qualidade fisiológica e de defesa do sistema antioxidante. Sementes de *C. langsdorffii* foram submetidas a dezessete tratamentos pré-germinativos mais um controle (sem tratamento pré-germinativo). Foram feitas curva de embebição, análise fisiológica e bioquímica e a caracterização morfoanatômica e histoquímica para todos os tratamentos pré-germinativos. Os tratamentos escarificação das sementes do lado oposto do embrião ou escarificação das sementes do lado oposto do embrião, associados à imersão em água por, no mínimo, seis horas, proporcionaram as maiores porcentagens de germinação e índice de velocidade de germinação (IVG). O tratamento com H₂SO₄ por quarenta e cinco minutos também se mostrou eficiente, porém o H₂SO₄ não é acessível e traz risco à saúde de quem o manuseia por ser um produto altamente corrosivo. Já o tratamento com a imersão das sementes em H₂SO₄ por noventa minutos produziu alterações na estrutura das células das sementes, diminuição do conteúdo de proteínas, menor atividade das enzimas α -amilase e β -amilase, as quais estão relacionadas ao poder germinativo,

aumento do estresse pela detecção elevada das enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT, APX, POX e PPO e maior conteúdo de MDA. Assim, para agilizar e viabilizar a produção de mudas dessa espécie, recomenda-se como tratamento pré-germinativo de superação de dormência a escarificação das sementes do lado oposto do embrião por ser um método simples e eficaz para produção de mudas em curto período.

Palavras-chave: Copaíba, superação de dormência, anatomia, histoquímica, bioquímica.

3 CHAPTER I

Effects of pre-germination treatments on *Copaifera langsdorffii* Desf. seeds

(Standards according to the journal Plants)

Abstract: *C. langsdorffii* is an arboreal plant species, belonging to the *Fabaceae* family and is extensively exploited for its commercial and medicinal interest. Its seeds have integumentary dormancy; therefore, methods should be investigated for pre-germination treatments to overcome this kind of dormancy, mainly for seedling production and for its population rearrangement. This paper aimed to investigate the efficiency of pre-germination treatments in overcoming dormancy in *C. langsdorffii* seeds and relate them to the anatomical and histochemical characterization, to physiological tests, and to enzyme activity regarding the physiological quality and defense of the antioxidant system. *C. langsdorffii* seeds were submitted to seventeen pre-germination treatments plus one control (no pre-germination treatment). The soaking curve, biochemical and physiological analysis, and morphoanatomical and histochemical characterization were carried out for all pre-germination treatments. Seed scarification treatments on the embryo opposite side or seed scarification treatments on the embryo opposite side associated with immersion in water for at least 6 h provided the highest germination percentages and the highest germination speed index (GSI). Treatment with H₂SO₄ for 45 min was also efficient but H₂SO₄ is not accessible and poses a health risk to those who handle it as it is a highly corrosive product. The treatment by immersing the seeds in H₂SO₄ for 90 min produced changes in the seed cell structure, a decrease in the protein content, lower activity of the α -amylase and β -amylase enzymes, which are related to the germination power, increased stress by high detection of antioxidant system enzymes superoxide dismutase SOD, catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase

(POX), polyphenol oxidase (PPO), and higher malondialdehyde enzyme (MDA) content. Thus, seed scarification on the opposite side of the embryo is recommended as a pre-germination treatment to overcome dormancy, for being a simple and effective method for producing seedlings in a short period, speeding up and facilitating the production of seedlings of this species.

Keywords: Anatomy. Biochemistry. Copaiba. Dormancy overcoming. Histochemistry.

3.1 Introdução

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, extensamente rico em biodiversidade, com mais de onze mil espécies de plantas nativas catalogadas. Depois da Mata Atlântica, esse bioma é o que mais sofre com alterações advindas das ações antrópicas, particularmente pela abertura de novas áreas, visando a atividades agropecuárias (ICMBio, 2021; Brasil, 2021). Nesse bioma, muitas espécies vegetais nativas não estão em áreas protegidas, por isso correm risco iminente de extinção (Guidoni-Martins *et al.*, 2021).

A espécie *Copaifera langsdorffii* Desf. pertence à família Fabaceae, subfamília Caesalpinoideae. É popularmente conhecida por “copaíba”, “pau-de-óleo” ou apenas “óleo” (Arruda *et al.*, 2019; Carvalho, C. *et al.*, 2021). Sua copa pode atingir de dez a quarenta metros de altura, estando distribuída em grande parte do território brasileiro, principalmente no Cerrado, sendo encontrada também nos países vizinhos Argentina e Paraguai (Lorenzi e Matos, 2002; Arruda *et al.*, 2019). A copaíba tem sido alvo de intensa exploração principalmente pelo interesse da madeira pela construção civil e extração de óleo, óleo de copaíba, utilizado como matéria-prima na indústria de verniz e tintas, em produtos medicinais e na composição do biodiesel (Santana, S. *et al.*, 2014).

As sementes de copaíba são ovoides, com tegumento de cor preta, composto por uma camada externa com células epidérmicas esclerificadas cobertas por uma cutícula. Na parte mais interna, a hipoderme é formada por osteoesclereídeos e camadas de células parenquimáticas com paredes bastante espessadas (Gunn, 1981; Crestana e Beltrati, 1988). Essas estruturas que formam o tegumento impedem a difusão de água e gases para o interior do tecido embrionário (Rolston, 1978; Souza e Marcos Filho, 2001). Esses componentes do tegumento confirmam que as sementes de copaíba têm dormência tegumentar (Noletto *et al.*, 2010).

A velocidade de germinação das sementes de copaíba é lenta e assíncrona, podendo ser superior a vinte dias, sendo, portanto, características negativas para produção de mudas em viveiros para reflorestamentos. Dessa forma, é recomendado a aplicação de técnicas de superação de dormência para promover a germinação sincronizada e produção de mudas uniformes, importantes na produção de viveiros (Sano *et al.*, 2008; Bezerra *et al.*, 2012).

Como tratamentos pré-germinativos sugeridos por estudos, estão a escarificação mecânica com lixa do lado oposto do embrião (Machado *et al.*, 1992), a escarificação química com imersão em ácido sulfúrico (Bezerra *et al.*, 2012), a pré-embebição em água destilada por setenta de duas horas (Borges *et al.*, 1982) e a imersão em hipoclorito de sódio (Noletto *et al.*, 2010). Porém, é necessário atenção ao escolher o tratamento pré-germinativo para superação de dormência em sementes, pois danos no endosperma e no embrião das sementes podem ser causados pela escolha errada da metodologia (Chaodumrikul *et al.*, 2016; Liang *et al.*, 2020). Ainda que existam estudos com tratamentos pré-germinativos em sementes de copaíba, os trabalhos se limitam a comparar poucas metodologias e não as relacionam com análises morfoanatomias, histoquímicas e atividades enzimáticas, carecendo assim de informações mais detalhadas sobre os métodos de superação de dormência.

Nesse sentido, o objetivou-se investigar a eficiência dos tratamentos pré-germinativos na superação de dormência em sementes de *C. langsdorffii* e relacioná-los com a caracterização anatômica e histoquímica, testes fisiológicos e atividade das enzimas relacionadas com a qualidade fisiológica e de defesa do sistema antioxidante.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Coleta

A coleta das sementes de *C. langsdorffii* foi feita diariamente após recente dispersão dos frutos de uma matriz em novembro de 2020 no município de Rio Verde – GO a 17°52'27.65" S e 50°58'01.42" O. Após a coleta, as sementes foram encaminhadas para o Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano – Campos Rio Verde.

3.2.2 Teor de água

Após a coleta, determinou-se a massa inicial de água pelo método de estufa a 105 ± 3 °C por 24 h, de acordo com Brasil (2009), com duas repetições de cinco sementes, o correspondente a aproximadamente dez gramas. O teor de água apresentado em base úmida foi de 11,33%.

3.2.3 Imagens radiográficas

As imagens radiográficas das sementes foram obtidas com auxílio do aparelho LX-60 da Faxitron X-Ray Corporation, modelo 43855A. As sementes foram previamente fixadas em papel transparência com fita dupla face e numeradas sequencialmente, perfazendo um total de vinte sementes para cada folha transparência. Duzentas folhas transparência foram radiografadas com intensidade de 30 Kvs por 10 s, totalizando quatro mil sementes. Através das imagens radiográficas, foram selecionadas apenas sementes sem danos no tegumento e na parte interna, com embrião intacto e preenchimento satisfatório, padronizando as sementes utilizadas no estudo.

3.2.4 Tratamentos Pré-germinativos

Foram realizados dezessete tratamentos pré-germinativos mais o controle (sementes sem tratamentos pré-germinativos) (Quadro).

Quadro - Tratamentos pré-germinativos para superação de dormência utilizados nas sementes de *C. langsdorffii*

Nº	TRATAMENTOS PRÉ-GERMINATIVOS
1	Controle (sem tratamento pré-germinativo);
2	Escarificação mecânica (com folha de lixa número 120) do lado oposto do embrião;
3	Embebição em água destilada por seis horas;
4	Embebição em água destilada por doze horas;
5	Embebição em água destilada por dezoito horas;
6	Embebição em água destilada por vinte quatro horas;
7	Escarificação mecânica e embebição em água destilada por seis horas;
8	Escarificação mecânica e embebição em água destilada por doze horas;
9	Escarificação mecânica e embebição em água destilada por dezoito horas;
10	Escarificação mecânica e embebição em água destilada por vinte e quatro horas;
11	Escarificação química com embebição no ácido sulfúrico por quarenta e cinco minutos;
12	Escarificação química com embebição no ácido sulfúrico por noventa minutos;
13	Escarificação térmica com água destilada a 90°C por um minuto;
14	Escarificação térmica com água destilada a 90°C por três minutos;
15	Choque térmico com um minuto em água destilada a 90°C e posterior imersão em água destilada a temperatura aproximada de 0°C por um minuto;
16	Imersão em álcool etílico a 70% por dez minutos;
17	Imersão em álcool etílico a 70% por vinte minutos;
18	Imersão em álcool etílico a 70% por trinta minutos.

3.2.5 Curva de embebição

O comportamento de embebição das sementes de *C. langsdorffii* submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos foi feito para todos os tratamentos. A curva de embebição foi realizada com pesagem sistemática de quatro repetições de vinte e cinco sementes em intervalos de três em três horas das, 6 a zero h, não tendo sido feita pesagem entre zero e 6 h. As sementes foram dispostas sobre duas folhas de papel *germitest* e cobertas por uma terceira folha previamente umedecida com água destilada no volume de 2,5 vezes a massa do papel. Em seguida, procedeu-se à produção de rolos de papel, colocados em sacos plásticos e depositados em câmara de germinação a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. As pesagens foram finalizadas após vinte dias do início do teste, quando 50% das sementes do tratamento controle apresentaram protrusão radicular com pelo menos um milímetro de radícula. Os resultados foram expressos em ganho de massa na forma de gráfico.

3.2.6 Testes fisiológicos

A germinação das sementes submetidas aos diferentes tratamentos pré-germinativos, foi feita em rolos de papéis *germitest* com vinte e cinco sementes em cada um. De acordo com BRASIL (2009), as folhas de papel *germitest* foram previamente umedecidas com água destilada, no volume de 2,5 vezes a massa do papel. Em seguida, as sementes foram dispostas sobre duas folhas do papel *germitest* e cobertas por uma terceira folha para a confecção dos rolos de papel, os quais foram colocados em sacos plásticos com quatro rolos cada, constituindo as repetições, organizados em delineamento inteiramente casualizado (DIC). Cada saco plástico era representado por um tratamento pré-germinativo, sendo esses sacos depositados em câmara de germinação a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. Adotou-se como critério de germinação a semente cuja radícula apresentava um milímetro comprimento. As avaliações das sementes germinadas e não germinadas ocorreram no 8º e 17º dia após a semeadura (DAS), sendo a avaliação final feita no 25º DAS, por meio das avaliações de sementes germinadas e não germinadas, sementes mortas, plântulas normais e anormais.

Com o teste de germinação finalizado, foi calculado o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) pelo somatório de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo

número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com Maguire (1962).

3.2.7 Caracterização morfoanatômica das sementes

A caracterização morfoanatômica das sementes de *C. langsdorffii* submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos foi feita coletando amostras de 2 cm² da região do endosperma das sementes. O material vegetal foi fixado em Karnovsky (1965) por 24 h. Após esse período, foram feitas nas amostras pré-lavagem em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2), desidratação em série etílica crescente (30% a 100%), pré-infiltração e infiltração em historesina (Leica, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram seccionadas transversalmente a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen Scientific, China) e os cortes, corados com azul de toluidina - coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien *et al.*, 1964). A detecção de proteínas totais foi feita com coloração de Xylidine ponceau (XP) (O'Brien & McCully 1981). As imagens foram produzidas pelo microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão), acoplado a uma câmera DP-72, utilizando opção de campo claro.

3.2.8 Determinação da atividade das enzimas α -amilase e β -amilase, enzimas do sistema antioxidativo e conteúdo de proteínas

Amostras contendo aproximadamente metade da semente de *C. langsdorffii* dos diferentes tratamentos pré-germinativos foram armazenadas individualmente em papel alumínio e emergidas em nitrogênio (N₂) líquido para congelamento instantâneo e armazenamento para posterior análise.

O extrato enzimático utilizados para determinar a atividade das enzimas α -amilase (EC 3.2.1.1) e β -amilase (EC 3.2.1.2), superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase do ascorbato (APX) C 1.11.1.11), e peroxidases (POX) (EC 1.11.1.7), polifenolóxidase (PPO) (EC 1.10.3.1) foi extraído de aproximadamente 0,300 gramas de sementes, as quais foram maceradas com N₂ líquido e homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF)

1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 5% (m/v). Realizado o procedimento de extração, os homogeneizados foram centrifugados a $12000 \times g$, por 15 min, a 4 °C e os sobrenadantes, utilizados para determinações enzimáticas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições para cada enzima.

Para determinar a atividade da α -amilase, foi adicionado de 250 μ L do sobrenadante obtido, adicionado a um meio de reação contendo 150 μ L de CaCl_2 3 mM, incubado a 70 °C por 5 min, para inativação da β -amilase. Uma alíquota de 250 μ L de extrato de inativação da β -amilase foi adicionada a 500 μ L de tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 μ L de solução de amido a 1 %, incubados a 30 °C. Após 5 min, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL do reagente de leitura [ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% (DNS), NaOH 2M, tartarato de sódio e potássio] e aquecida a 50 °C por 5 min, em seguida, diluída em 4 mL de água destilada (Bernfeld, 1955; Tárrago e Nicolás, 1976; Kishorekumar *et al.*, 2007).

A atividade da enzima β -amilase foi determinada adicionando 180 μ L de extrato enzimático a um meio de reação contendo 110 μ L de EDTA 0,1 M para inativação de α -amilase. Uma alíquota de 250 μ L de extrato de inativação da α -amilase foi adicionada a 500 μ L de tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 μ L de solução de amido a 1%, incubados a 30 °C por 5 min. Após, foram adicionados 2 mL de reação de leitura [ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% (DNS), NaOH 2M, tartarato de sódio e potássio] e aquecido a 5 °C por 5 min, e em seguida, diluído conforme descrito acima.

A formação de açúcares redutores produzidos pela ação da α - e β -amilase foi quantificada pela leitura da absorbância em 540 nm e os cálculos, feitos utilizando a curva padrão de maltose 0,5 mg/mL (Bernfeld, 1955; Tárrago e Nicolás, 1976; Kishorekumar *et al.*, 2007).

A determinação da atividade da SOD foi feita adicionando 60 μ L do extrato de sementes a uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT) 75 μ M, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μ M (Del Longo *et al.*, 1993), totalizando 2 mL. A reação ocorreu a 25 °C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 10 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotoredução do NBT, foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA), a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade da SOD foi expressa em unidade de SOD/min/mg de

maltose/mg de proteína.

A metodologia de Cakmak e Marschner (1992) foi aplicada para determinação da atividade da catalase (CAT), utilizando um coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Anderson *et al.*, 1995). A atividade da CAT foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

O método de Nakano e Asada (1981) foi empregado para determinação da atividade da APX, cuja mistura de reação foi constituída por um tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), H_2O_2 1 mM e ascorbato 0,8 mM em um volume de 1 mL. Foi iniciada a reação com adição de 15 μL do extrato obtido da semente, e a atividade foi medida pela oxidação do H_2O_2 dependente do ascorbato a 290 nm, durante um minuto, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Nakano e Asada, 1981) foi usado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

Para determinação da atividade da enzima peroxidase (POX) pela oxidação do pirogalol, seguiu-se a metodologia proposta por Kar e Mishra (1976), cuja mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H_2O_2 20 mM em um volume de 2 mL. Foi iniciada a reação pela adição de 15 μL do extrato obtido das sementes, e a atividade foi determinada pelo consumo de H_2O_2 a 420 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, a qual foi expressa em μmol de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína. A atividade da PFO foi determinada da mesma forma que a da POX, com exceção do H_2O_2 , que foi omitido da mistura de reação.

A atividade do polifenolóxido (PPO) foi determinada de acordo com Kar e Mishra (1976). Um coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e Maehley 1955) foi usado para calcular a atividade de PPO, que foi expressa como μmol de purpurogalina produzida $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

As concentrações de proteínas totais de cada amostra foram determinadas pela adição de 10 μL dos extratos brutos usados para determinar as atividades enzimáticas da semente em 1190 μL de solução de Bradford, seguido por determinações de absorbância a 595 nm (Bradford, 1976), expressa em mg g^{-1} de massa fresca.

A deterioração das sementes juntamente com os danos celulares foram avaliados através da peroxidação de lipídeos por meio de MDA, conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). Cerca de 0.200 mg das amostras de sementes de cada repetição foram

maceradas em almofariz em N₂ líquido até a obtenção de um pó fino, o qual foi homogeneizado em 2 mL constituído de ácido tricloroacético (TCA) 1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12000 × g, durante 15 min, a 4 °C. Após centrifugação, 0,5 mL do sobrenadante foram adicionados a 1,5 mL da solução de ácido tiobarbitúrico 0,5% (m/v) (preparado em 20% (m/v) de TCA) e incubado em banho maria a 95 °C, por 30 min. Após esse período, a reação foi parada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a 9000 × g, por 10 min, e a absorbância específica do sobrenadante foi determinada a 532 nm. A absorbância inespecífica foi mensurada a 600 nm e subtraída do valor da absorbância específica. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de 155 mM⁻¹ cm⁻¹ e expressa em nmol g⁻¹ de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

3.2.9 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e quando foram observados efeitos significativos procedeu-se à comparação das médias pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$) com auxílio do software estatístico Sisvar (Ferreira, 2019). O gráfico da curva de embebição foi elaborado pelo *software* computacional SigmaPlot 12.0® (Systat Software Inc., Califórnia, EUA). Foi aplicada a correlação de Pearson para todas as variáveis e gerado gráfico *heatmap* com o *software* computacional GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Inc., Califórnia, EUA).

3.3 Resultados

3.3.1 Curva de embebição

Analisando a curva de embebição das sementes com tratamentos pré-germinativos de *C. langsdorffii*, observou-se maior ganho de massa nas sementes com escarificação mecânica do lado oposto do embrião, seguido pelos tratamentos com escarificação mecânica e embebição por 6, 12, 18 e 24 h, ambos com germinação em, aproximadamente, 7 dias. O tratamento com imersão em H₂SO₄ por quarenta e cinco minutos proporcionou o maior ganho de massa em relação ao tempo, com sementes germinadas em cinco dias. A imersão em H₂SO₄ por noventa minutos proporcionou

rápido ganho de massa inicial, porém, após dez dias, as sementes começaram a perder água, caracterizando sua morte. O tratamento controle levou cerca de vinte dias para ter 50% das sementes germinadas, evidenciando a dormência tegumentar das sementes da espécie (Fig. 3.1).

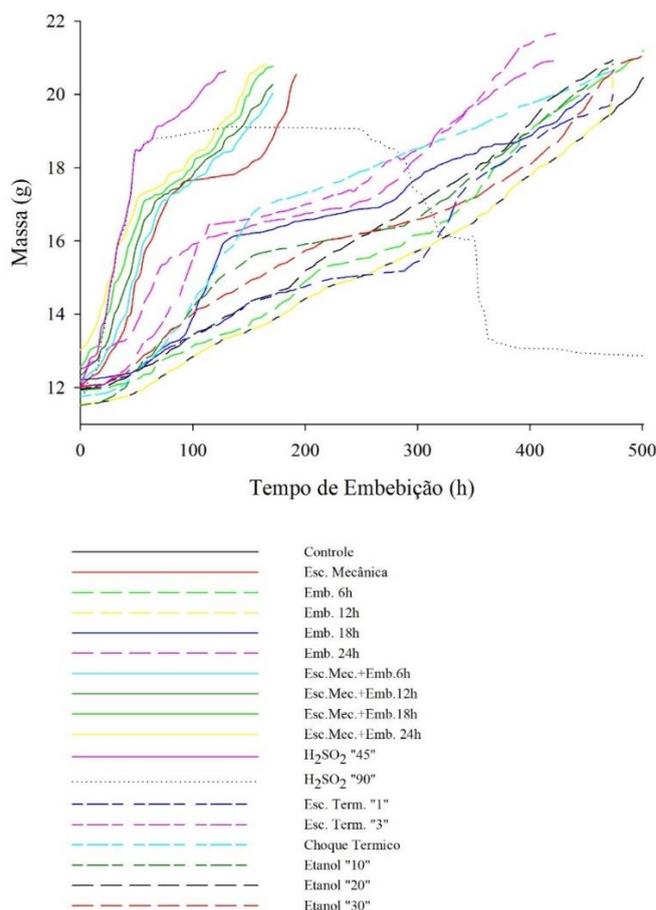


Figura 3.1- Ganho de massa de sementes de *Copaifera langsdorffii*, em função do tempo de embebição sob diferentes tratamentos pré-germinativos

3.3.2 Teste de germinação

O teste de germinação de sementes de *C. langsdorffii* submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos apresentou diferenças entre as médias para todas as variáveis analisadas. Aos oito dias após a semeadura (8 DAS), os tratamentos escarificação mecânica com embebição por 6 h (Esc./Emb. 6 h), escarificação mecânica com embebição por 12 h (Esc./Emb. 12 h), escarificação mecânica com embebição por dezoito horas (Esc./Emb. 18 h), escarificação mecânica com embebição por 24 h (Esc./Emb. 24 h) e escarificação química com ácido sulfúrico por 45 min (H₂SO₄ 45')

destacaram-se com as maiores médias entre os tratamentos testados, observando, respectivamente, 98,97%, 98,97%, 98,97%, 98,98% e 98,99% de germinação superior ao tratamento controle. O tratamento de sementes com escarificação mecânica do lado oposto do embrião (Esc. Mecânica) não esteve entre as maiores médias, porém apresentando 98,57% de germinação em relação ao tratamento controle (Fig. 3.2A).

Nas avaliações aos dezessete e aos vinte e cinco dias após a semeadura (17 e 25 DAS), os tratamentos Esc. Mecânica, Esc./Emb. 6h, Esc./Emb. 12 h, Esc./Emb. 18 h, Esc./Emb. 24 h e H₂SO₄ 45' tiveram médias superiores, e o tratamento com escarificação química utilizando ácido sulfúrico por noventa minutos (H₂SO₄ 90') apresentou média inferior entre os tratamentos pré-germinativos (Fig. 3.2B e 3.2C).

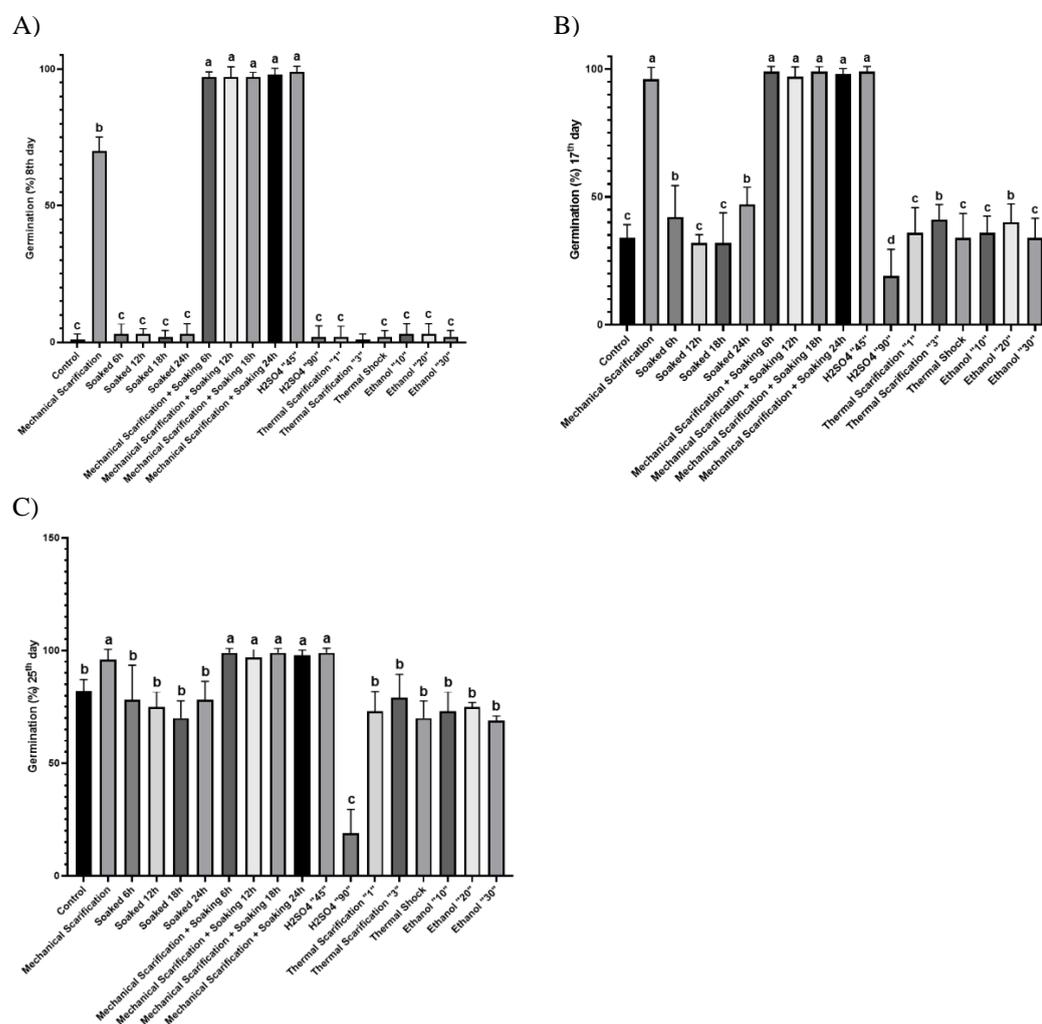


Figura 3.2- Média \pm EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferiram entre si à 5% (*) de significância pelo teste de Scott-Knott. (A) % Germinação no 8º Dia Após a Semeadura (Germination (%) 8th day), (B) % Germinação no 17º Dia Após a Semeadura (Germination (%) 17th day) e (C) % Germinação no 25º Dia Após a Semeadura (Germination (%) 25th day), para sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos tratamentos pré-germinativos Controle (Control), Escarificação Mecânica (Mechanical Scarification), Embebidas 6 h (Soaked 6 h), Embebidas 12 h (Soaked 12 h), Embebidas 18 h (Soaked 18h), Embebidas 24 h (Soaked 24 h), Escarificação Mecânica + Embebição 6h (Mechanical Scarification + Soaking 6h), Escarificação Mecânica + Embebição 12 h (Mechanical Scarification + Soaking 12 h), Escarificação Mecânica + Embebição 18 h (Mechanical Scarification +

Soaking 18 h), Escarificação Mecânica + Embebição 24h (Mechanical Scarification + Soaking 24 h), H₂SO₄ 45' (H₂SO₄ "45"), H₂SO₄ 90' (H₂SO₄ "90"), Escarificação Térmica 1' (Thermal Scarification "1"), Escarificação Térmica 3' (Thermal Scarification "3"), Choque Térmico (Thermal Shock), Etanol 70% 10' (Ethanol "10"), Etanol 70% 20' (Ethanol "20") e Etanol 70% 30' (Ethanol "30").

Os tratamentos de sementes embebidas em água destilada por 6 horas, sementes embebidas em água destilada por doze horas, sementes embebidas em água destilada por 18 horas, sementes embebidas em água destilada por 24 horas, sementes com escarificação térmica por 1 minuto, sementes com escarificação térmica por 3 minutos, sementes submetidas a choque térmico, sementes embebidas em etanol com concentração de setenta por cento por 10 minutos, sementes embebidas em etanol com concentração de 70% por 20 minutos e sementes embebidas em etanol com concentração de 70% por 30 minutos não diferiram em porcentagem de germinação aos 25 DAS em comparação com o tratamento controle (Fig. 3.2C).

Foram consideradas sementes não germinadas (SNG), as sementes duras que não se embeberam. Nesse sentido, os tratamentos de Esc. Mecânica, Esc./Emb. 6 h, Esc./Emb. 18h, Esc./Emb. 24 h, H₂SO₄ 45' e H₂SO₄ 90' não apresentaram sementes não germinadas (SNG), e o tratamento Esc./Emb. 12 h obteve apenas 1% de SNG. Esses tratamentos se diferenciaram de todos os outros tratamentos para a variável porcentagem de sementes não germinadas (SNG%) (Fig. 3.3A).

Todas as sementes que germinaram do tratamento com H₂SO₄ 90' resultaram em plântulas anormais, proporcionando grande diferença em comparação com os outros tratamentos. (Fig. 3.3D). Todas as sementes tratadas com H₂SO₄ 90', que não germinaram, foram consideradas mortas por apresentarem extravasamento de líquidos intracelulares. Dessa forma, o tratamento H₂SO₄ 90' apresentou a maior média para porcentagem de sementes mortas (SM%), diferindo de todos os outros tratamentos, tendo se mostrado muito corrosivo, com possíveis danos ao embrião, ocasionando a morte da semente (Fig. 3.3B).

Os tratamentos Esc./Emb. 6 h, Esc./Emb. 18 h, Esc./Emb. 24 h, H₂SO₄ 45' e Esc. Térmica 3' não apresentaram diferenças entre si para a variável porcentagens de plântulas normais (PN%), porém, com médias intermediárias, ou seja, não obtiveram nem as melhores e nem as piores médias entre os outros tratamentos pré-germinativos (Fig. 3.3C).

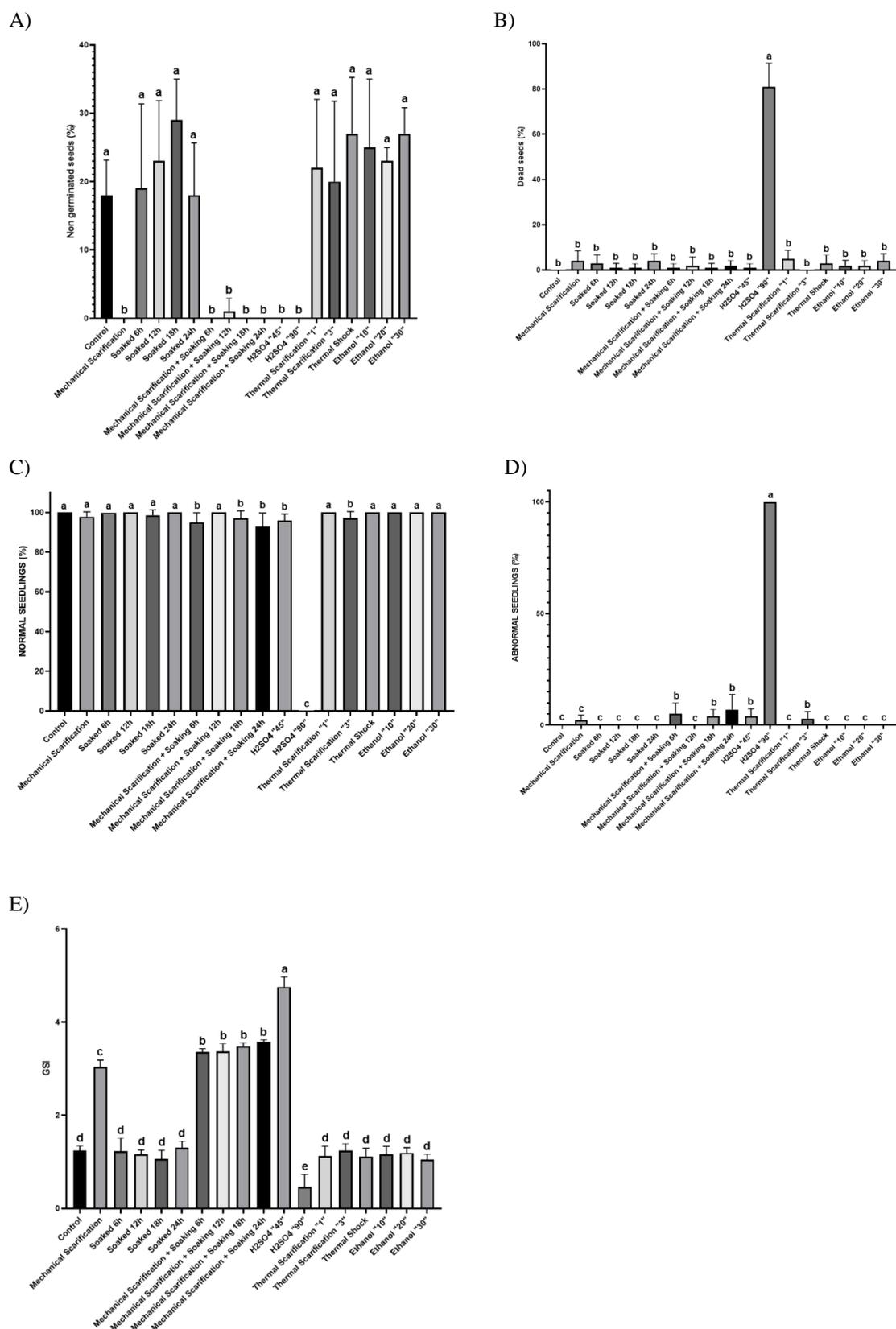


Figura 3.3 - Média \pm EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferiram entre si à 5% (*) de significância pelo teste de Scott-Knott. (A) % de Sementes Não Germinadas (Non germinated seeds (%)), (B) % Sementes Mortas (Dead seeds (%)), (C) % de Plântulas Normais (Normal Seedlings (%)), (D) % de Plântulas Anormais (Abnormal Seedlings (%)) e (E) IVG (GSI), para sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos tratamentos pré-germinativos Controle (Control), Escarificação Mecânica (Mechanical Scarification), Embebidas 6 h (Soaked 6h), Embebidas 12 h (Soaked 12 h), Embebidas 18 h (Soaked 18 h), Embebidas 24h (Soaked 24 h), Escarificação Mecânica + Embebição 6 h (Mechanical Scarification + Soaking 6 h), Escarificação Mecânica + Embebição 12 h (Mechanical Scarification + Soaking 12 h), Escarificação Mecânica + Embebição 18 h (Mechanical Scarification + Soaking 18h),

Escarificação Mecânica + Embebição 24 h (Mechanical Scarification + Soaking 24 h), H₂SO₄ 45' (H₂SO₄ "45"), H₂SO₄ 90' (H₂SO₄ "90"), Escarificação Térmica 1' (Thermal Scarification "1"), Escarificação Térmica 3' (Thermal Scarification "3"), Choque Térmico (Thermal Shock), Etanol 70% 10' (Ethanol "10"), Etanol 70% 20' (Ethanol "20") e Etanol 70% 30' (Ethanol "30")

A maior média para índice de velocidade de germinação (IVG) foi do tratamento com H₂SO₄ 45', observando ser 73,74% superior ao tratamento controle. Os tratamentos Esc./Emb. 6 h, Esc./Emb. 12 h, Esc./Emb. 18 h, Esc./Emb. 24 h tiveram as segundas maiores médias com 62,80%, 62,57%, 64,08% e 64,99%, respectivamente, a mais de IVG em comparação com o tratamento controle. A escarificação mecânica do lado oposto do embrião proporcionou média intermediária, estando com 58,89% a mais de IVG que o tratamento controle (Tabela). O tratamento com H₂SO₄ 90' resultou na menor média, diferindo dos demais tratamentos, tendo 97,28% de IVG inferior ao tratamento controle. Os demais tratamentos não diferiram em relação ao tratamento controle (Fig. 3.3E).

3.3.3 Caracterização anatômica e histoquímica das sementes

De acordo com a caracterização anatômica das sementes de *C. langsdorffii* submetidas a diferentes tratamentos pré-germinativos, as células do endosperma das sementes tratadas com H₂SO₄ por noventa minutos apresentaram alterações na estrutura celular (Fig. 3.4F e 3.4G), o que não foi observado para sementes dos tratamentos controle (Fig. 3.4A), escarificação mecânica (Fig. 3.4B), escarificação com embebição em água destilada por seis horas (Fig. 3.4C), escarificação com embebição em água destilada por doze horas (Fig. 3.4C) e escarificação química com H₂SO₄ por quarenta e cinco minutos (Fig. 3.4D), como para as células das sementes submetidas aos outros tratamentos pré-germinativos.

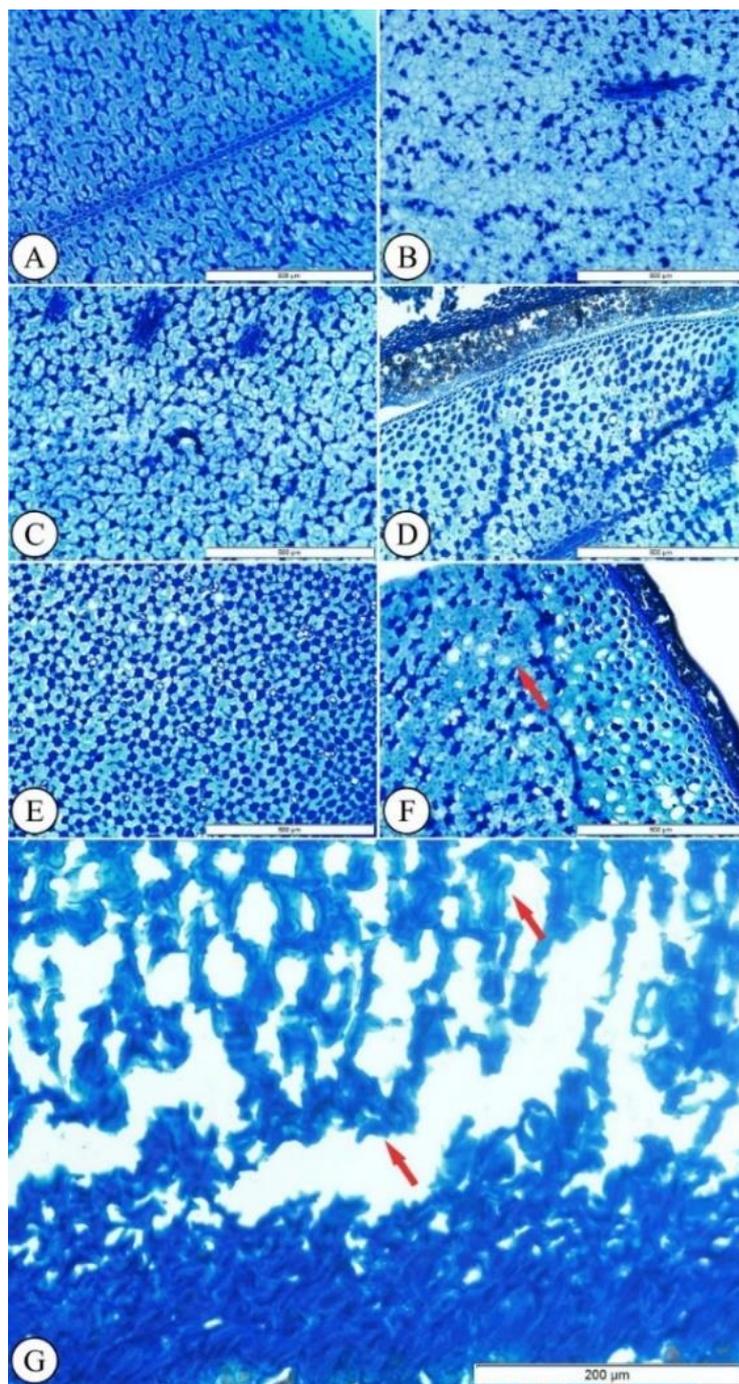


Figura 3.4 - Caracterização anatômica de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos principais tratamentos pré-germinativos para superação de dormência. (A) Controle, (B) Esc. Mecânica, (C) Esc./Emb.6 h, (D) Esc./Emb.12 h, (E) H₂SO₄ 45', (F-G) H₂SO₄ 90'. Nota: Setas vermelhas indicam alterações na estrutura celular.

Além de provocar alterações celulares no endosperma das sementes de *C. langsdorffii*, o H₂SO₄ em contato com as sementes por noventa minutos provavelmente promoveu o extravasamento de conteúdos intracelulares e a desnaturação de proteínas, o que foi evidenciado pelo menor acúmulo de proteínas nas células endospermas (Fig. 3.5F e 3.5G) em comparação com sementes dos tratamentos controle, escarificação

mecânica, escarificação com embebição por seis horas, escarificação com embebição por doze horas e escarificação química com H_2SO_4 por quarenta e cinco minutos (Fig. 3.5A, 3.5B, 3.5C, 3.5D e 3.5E), respectivamente.

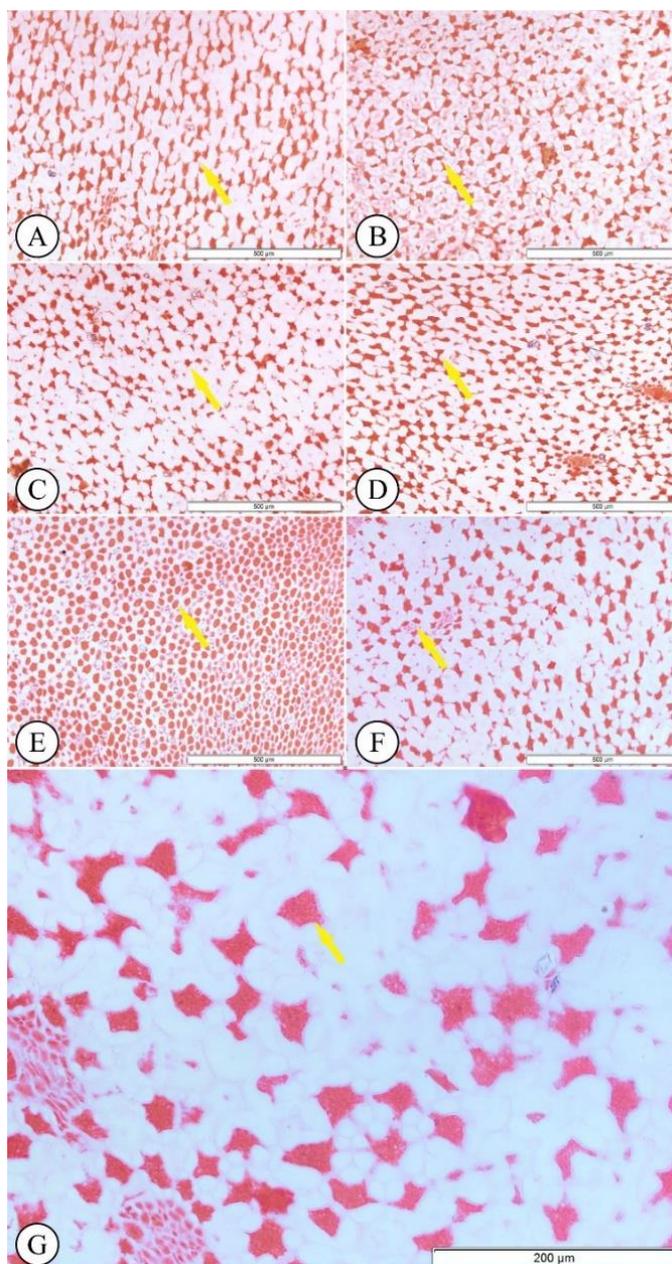


Figura 3.5 - Acúmulo de proteínas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos principais tratamentos pré-germinativos para superação de dormência. (A) Controle, (B) Esc. Mecânica, (C) Esc./Emb.6h, (D) Esc./Emb.12h, (E) H_2SO_4 45', (F-G) H_2SO_4 90'. Setas amarelas indicam acúmulo de proteínas

3.3.4 Análise bioquímica

As sementes de *C. langsdorffii* submetidas ao tratamento pré-germinativo com H_2SO_4 por noventa minutos apresentaram maior conteúdo de malondialdeído (MDA), apresentando 40,45% mais MDA que as sementes do tratamento controle. O nível mais

elevado de MDA nas sementes tratadas com H_2SO_4 por noventa minutos provavelmente ocorreu pela peroxidação de lipídios provocada pela deterioração das sementes (Fig. 3.6A).

Em relação às enzimas do sistema antioxidante, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO), as quais estão relacionadas ao estresse fisiológico, houve diferença significativa entre as médias dos tratamentos, tendo o tratamento H_2SO_4 por 90 min apresentado atividade mais elevada em relação aos demais tratamentos pré-germinativos nas sementes de *C. langsdorffii*. Todos os outros tratamentos pré-germinativos apresentaram baixa atividade de enzimas do sistema antioxidante (Fig. 3.6B, 3.6C, 3.6D, 3.6E e 3.6F). Os dados sugerem que sementes submetidas ao tratamento com H_2SO_4 por noventa minutos possam estar sob estresses ocasionados pelos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROs).

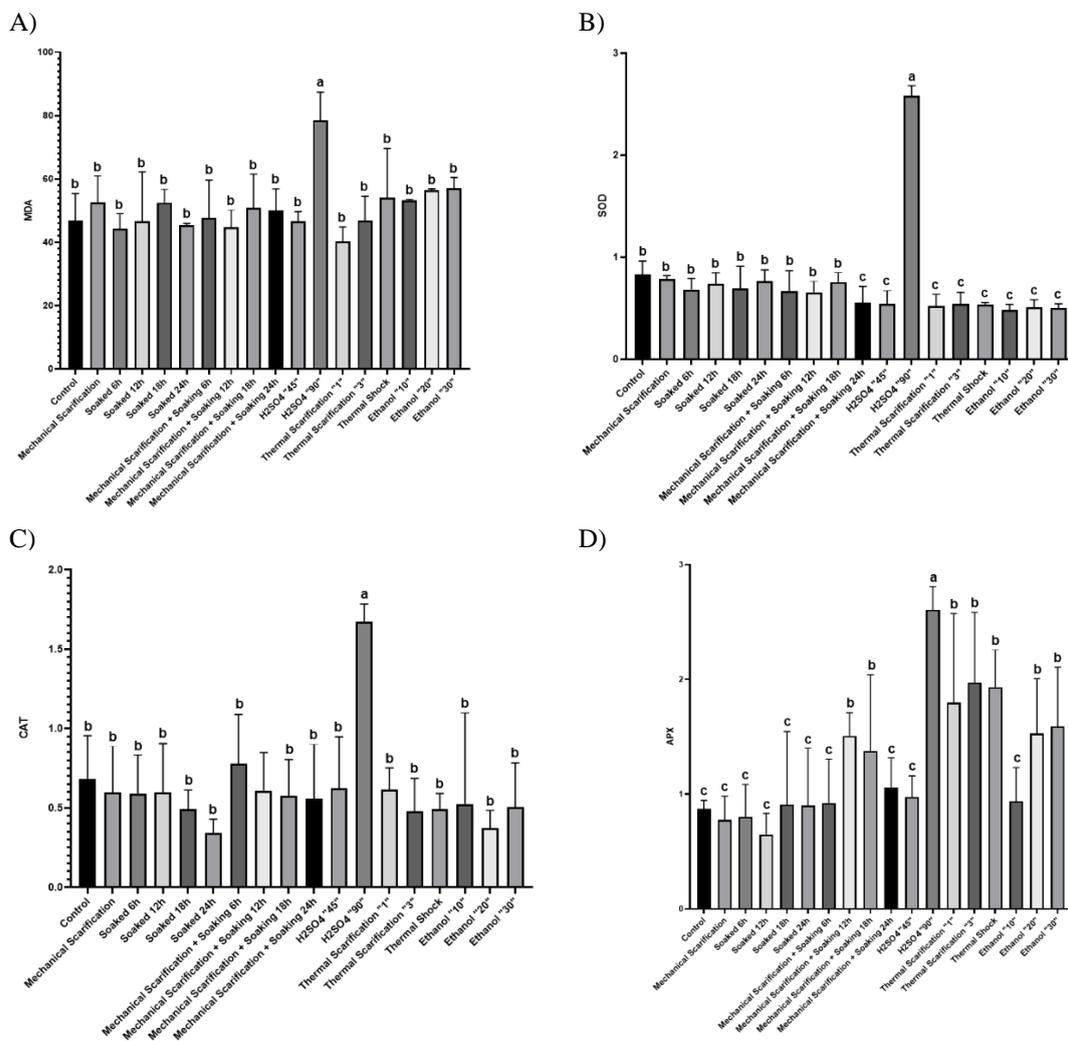
Foi observado que as sementes de *C. langsdorffii*, quando submetidas ao tratamento pré-germinativo com H_2SO_4 por noventa minutos, apresentaram atividade de SOD superior 67,83% que o tratamento controle e 79,07% que o tratamento com H_2SO_4 por quarenta e cinco minutos (Fig. 3.6B). Fica claro que tempo superior a quarenta e cinco minutos de escarificação química no ácido sulfúrico eleva o estresse na semente.

A dismutação de íons peróxido gera o subproduto peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o qual é tóxico para as células. A enzima catalase é então responsável pela neutralização do H_2O_2 produzido pela atuação da SOD (Das e Roychoudhury, 2014; Wang, Y. *et al.*, 2017). Foi observado que o aumento da atividade da SOD em sementes com escarificação química com H_2SO_4 por 90 min proporcionou índices mais elevados da atividade da CAT, sendo 59,28% maior que o tratamento controle (Fig. 3.6C).

A atividade da enzima APX também esteve mais elevada em sementes tratadas com H_2SO_4 por noventa minutos, sendo superior 66,67% e 62,45% às sementes do tratamento controle e H_2SO_4 por quarenta e cinco minutos, respectivamente (Fig. 3.6D).

A atividade mais elevada da POX nas sementes tratadas com H_2SO_4 por noventa minutos em comparação com os outros tratamentos indica que a POX está catalisando a oxidação de algum substrato, como, por exemplo, compostos fenólicos e o aminoácido tirosina, utilizando o poder oxidante do H_2O_2 . A atividade da POX nas sementes tratadas com H_2SO_4 por 90 min foi 91,82%, 93,64%, 94,54%, 96,36% e 96,36% superior às sementes tratadas H_2SO_4 por 45 min, escarificação térmica por 3 min, embebidas no etanol por 10, 20 e 30 min, respectivamente (Fig. 3.6E).

Armazenadas nos vacúolos, a enzima PPO catalisa reações de escurecimento enzimático nos processos de deterioração das células vegetais. Assim como para as outras enzimas do sistema antioxidante, sementes tratadas com H_2SO_4 por 90 min obtiveram a maior média para a atividade da PPO, sendo 70,09% superior às sementes do tratamento controle (Fig. 3.6F).



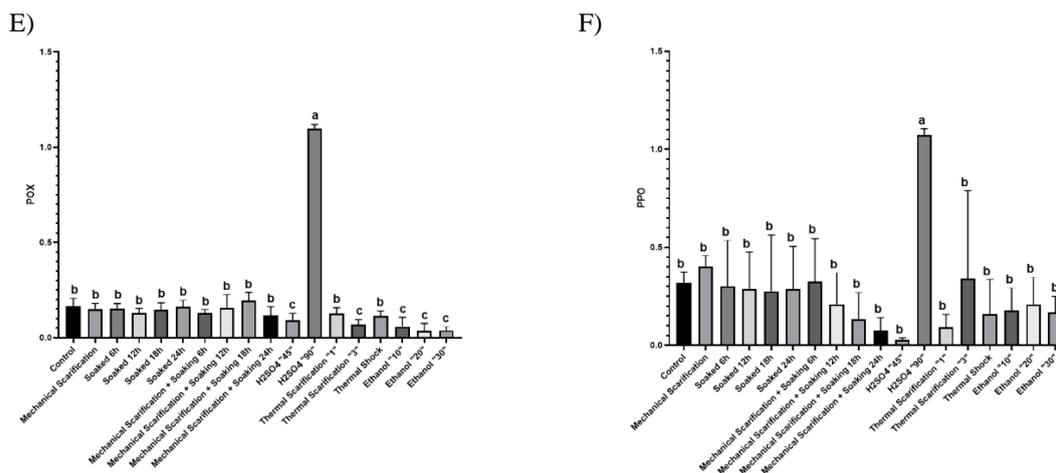


Figura 3.6 - Média \pm EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferiram entre si à 5% (*) de significância pelo teste de Scott-Knott. (A) Malondialdeído (MDA), (B) Superóxido Dismutase (SOD), (C) Catalase (CAT), (D) Peroxidase do Ascorbato (APX), (E) Peroxidase Inespecífica (POX) e (F) Polifenoloxidase (PPO), para sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. submetidas aos tratamentos pré-germinativos Controle (Control), Escarificação Mecânica (Mechanical Scarification), Embebidas 6h (Soaked 6 h), Embebidas 12 h (Soaked 12 h), Embebidas 18 h (Soaked 18 h), Embebidas 24 h (Soaked 24 h), Escarificação Mecânica + Embebição 6h (Mechanical Scarification + Soaking 6 h), Escarificação Mecânica + Embebição 12 h (Mechanical Scarification + Soaking 12 h), Escarificação Mecânica + Embebição 18 h (Mechanical Scarification + Soaking 18 h), Escarificação Mecânica + Embebição 24 h (Mechanical Scarification + Soaking 24 h), H₂SO₄ 45' (H₂SO₄ "45"), H₂SO₄ 90' (H₂SO₄ "90"), Escarificação Térmica 1' (Thermal Scarification "1"), Escarificação Térmica 3' (Thermal Scarification "3"), Choque Térmico (Thermal Shock), Etanol 70% 10' (Ethanol "10"), Etanol 70% 20' (Ethanol "20") e Etanol 70% 30' (Ethanol "30")

Foi constatado que, para a atividade das enzimas hidrolíticas α -amilase e β -amilase, houve diferença significativa, com o tratamento controle obtendo a maior média entre os tratamentos pré-germinativos. Os dados sugerem que, utilizando qualquer um dos métodos de superação de dormência, ocorre diminuição das atividades de α -amilase e β -amilase (Fig. 3.7A e 3.7B).

A escarificação química com H₂SO₄ por noventa minutos apresentou as menores médias para a atividade de α -amilase, sendo inferior 64,54%, 53,30%, 50,67% e 54,33% ao comparar com as médias dos tratamentos pré-germinativos com escarificação mecânica, escarificação mecânica com embebição em água destilada por 6 h, 12 h e 18 h, respectivamente, os quais tiveram desempenho superior entre os tratamentos com exceção do controle (Fig. 3.7A).

Comportamento parecido foi observado para atividade da enzima β -amilase, em que o tratamento pré-germinativo com H₂SO₄ por noventa minutos teve as menores médias entre os tratamentos, apresentando 66,97%, 47,59%, 51,61%, 58,85%, 53,78% e 58,67% em comparação com as médias dos tratamentos de escarificação mecânica, escarificação mecânica com embebição em água destilada por 6 h, 12 h, 18 h e 24 h e o

H₂SO₄ por 45 min, respectivamente (Fig. 3.7B). Esses tratamentos foram utilizados para comparação com o tratamento H₂SO₄ por 90 min por terem os melhores desempenhos no teste de germinação (Fig. 3.2A, 3.2B e 3.2C; 3.3A, 3.3B, 3.3C, 3.3D e 3.3E).

As sementes submetidas ao H₂SO₄ por 90 min. apresentaram a menor quantidade de proteínas, 62.82% inferior às sementes do tratamento controle (Fig. 3.7C). Resultado que corrobora a imagem feita no teste de histoquímica para o acúmulo de proteínas, em que sementes tratadas com H₂SO₄ por 90 min apresentaram conteúdo menor de proteínas (Fig. 3.5F e 3.5G) em relação às imagens das células endospermicas de sementes dos tratamentos controle (Fig. 3.5A), escarificação mecânica (Fig. 3.5B), escarificação com embebição por 6 h (Fig. 3.5C), escarificação com embebição por 12 h (Fig. 3.5D) e escarificação química com H₂SO₄ por 45 min (Fig. 3.5E).

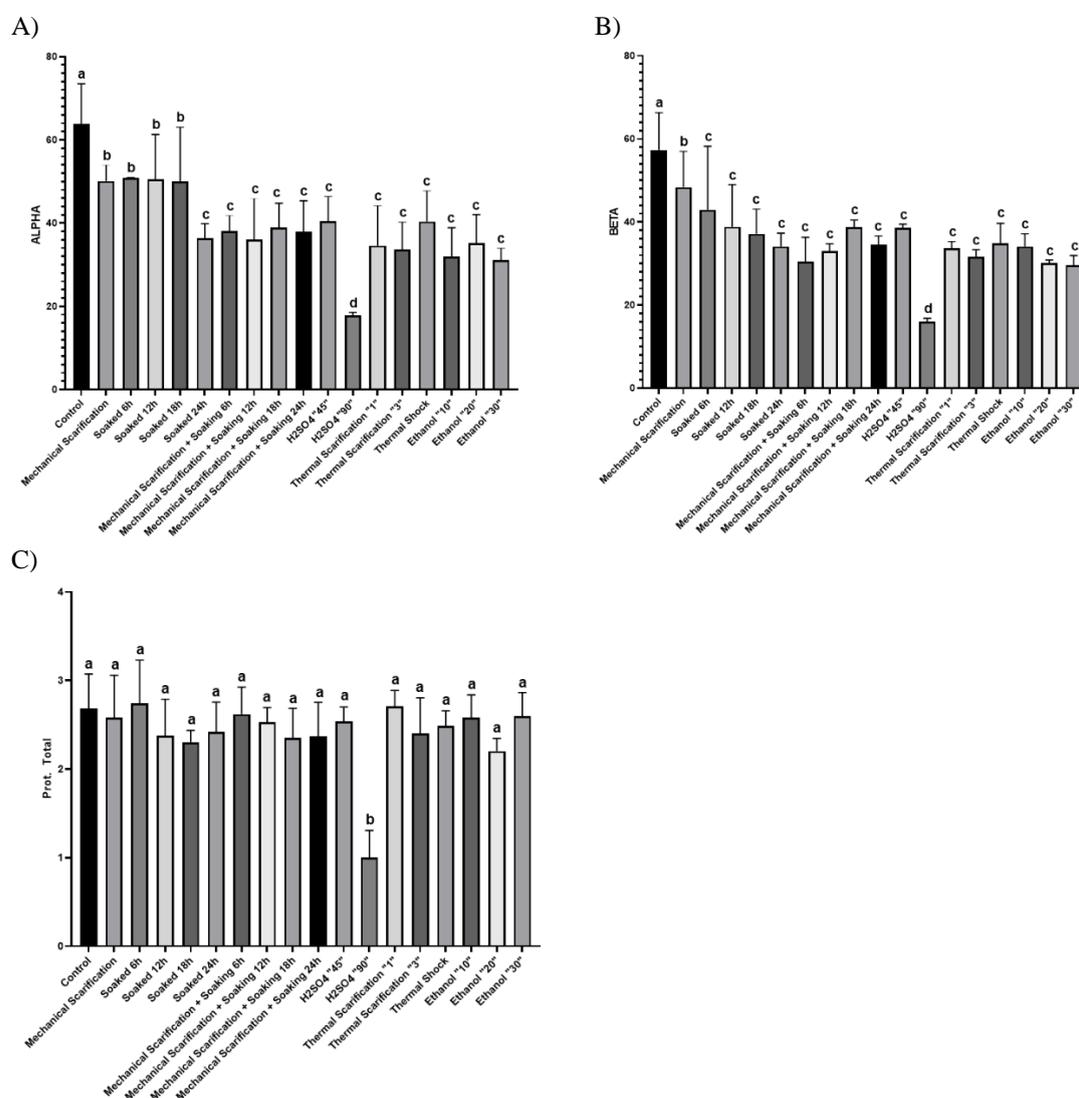


Figura 3.7- Média \pm EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferiram entre si à 5% (*) de significância pelo teste de Scott-Knott. Atividade das enzimas (A) Alfa Amilase e (B) Beta Amilase, e conteúdo (C) Proteínas Totais, para sementes de *Copaifera langsdorffii*

Desf. submetidas aos tratamentos pré-germinativos Controle (Control), Escarificação Mecânica (Mechanical Scarification), Embebidas 6 h (Soaked 6 h), Embebidas 12 h (Soaked 12 h), Embebidas 18 h (Soaked 18 h), Embebidas 24 h (Soaked 24 h), Escarificação Mecânica + Embebição 6h (Mechanical Scarification + Soaking 6h), Escarificação Mecânica + Embebição 12 h (Mechanical Scarification + Soaking 12 h), Escarificação Mecânica + Embebição 18 h (Mechanical Scarification + Soaking 18 h), Escarificação Mecânica + Embebição 24 h (Mechanical Scarification + Soaking 24 h), H₂SO₄ 45' (H₂SO₄ "45"), H₂SO₄ 90' (H₂SO₄ "90"), Escarificação Térmica 1' (Thermal Scarification "1"), Escarificação Térmica 3' (Thermal Scarification "3"), Choque Térmico (Thermal Shock), Etanol 70% 10' (Ethanol "10"), Etanol 70% 20' (Ethanol "20") e Etanol 70% 30' (Ethanol "30")

3.3.5 Correlação de Pearson's

O gráfico *Heatmap* indica que quanto maiores os valores de germinação aos 8, 17 e 25 DAS e IVG maiores serão as taxas de plântulas normais, proteínas totais, α -amilase e β -amilase. Esses parâmetros são inversamente proporcionais a sementes não germinadas, sementes mortas, sementes anormais, plântulas anormais, SOD, CAT, APX, POX, PPO e MDA (Fig. 3.8). Assim, as sementes de todos os tratamentos pré-germinativos, exceto o tratamento com ácido sulfúrico por 90 min apresentaram menor atividade enzimática associada ao estresse e à deterioração lipídica.

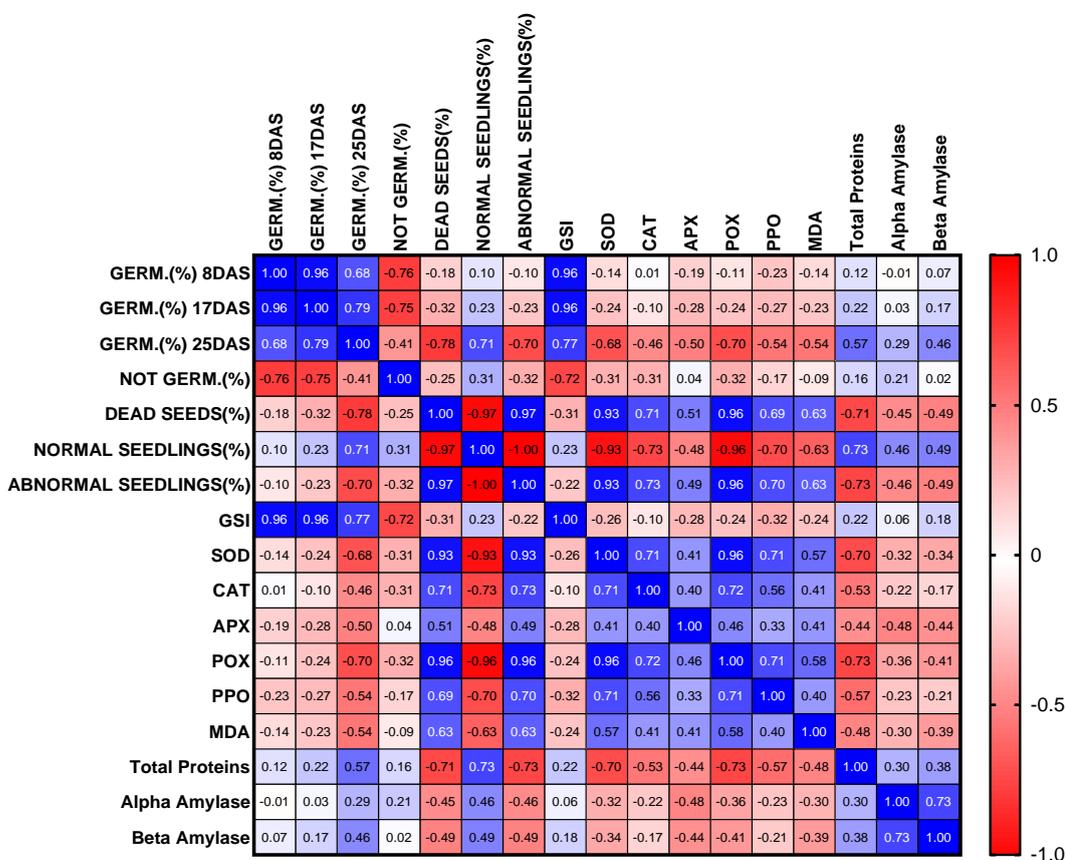


Figura 3.8 - Gráfico *Heatmap* da correlação de Pearsons para todas as variáveis. Germ. (%) 8 DAS (porcentagem de germinação aos oito dias após a semeadura), Germ. (%) 17 DAS

(porcentagem de germinação aos dezessete dias após a semeadura), Germ. (%) 25 DAS (porcentagem de germinação aos vinte e cinco dias após a semeadura), Not Germ. (%) (porcentagem de não germinadas), Dead Seeds (%) (porcentagem de sementes mortas), Normal Seedlings (%) (porcentagem de plântulas normais), Abnormal Seedlings (%) (porcentagem de plântulas anormais), GSI (índice de velocidade de germinação), SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), APX (ascorbato peroxidase), POX (peroxidase inespecífica), PPO (polifenol oxidase), MDA (Malondialdeído), Total Proteins (proteínas totais), Alpha Amylase (alfa amilase) e Beta Amylase (beta amilase) em diferentes lotes de *C. langsdorffii*

3.4 Discussão

As pesquisas indicam que a maioria das espécies ortodoxas apresenta um padrão trifásico para germinação, sendo a fase I caracterizada pela rápida embebição e ganho de massa pela semente, fase II com redução da hidratação e pouco ganho de massa e fase III, caracterizada por discreta retomada na absorção de água e ganho de massa, finalizando com a protrusão radicular (Bewley *et al.*, 2013; Marcos Filho, 2015; Leão-Araújo *et al.*, 2020; Medeiros, R. *et al.*, 2022). Sementes de *C. langsdorffii* são ortodoxas e quando submetidas ao tratamento pré-germinativo de escarificação mecânica do lado oposto do embrião (lixa) e apresentam o padrão trifásico observado pela curva de embebição (Pereira, W. *et al.*, 2022).

A germinação de sementes de um mesmo lote de *C. langsdorffii* não é uniforme, sendo baixa a probabilidade germinarem em um mesmo intervalo de tempo (Pereira, R. *et al.*, 2009; Santana, D. *et al.*, 2016). Tratamentos pré-germinativos promovem uniformização da germinação em sementes de *C. langsdorffii* em um período menor (Santana, D. *et al.*, 2016).

A escarificação mecânica do lado oposto do embrião proporciona maiores porcentagens de germinação em sementes com dormência tegumentar, pois facilita o processo de embebição pela semente, processo primordial para o processo germinativo (Santana, D. *et al.*, 2016; Silva, R. *et al.*, 2021; Medeiros, R. *et al.*, 2022).

A imersão em ácido sulfúrico em período curto proporciona aumento das porcentagens de germinação e IVG (Guerra *et al.*, 2006; Bezerra *et al.*, 2012). O presente estudo concorda com os autores anteriores, pois a imersão em ácido sulfúrico por quarenta e cinco minutos proporcionou porcentagens de germinação e IVG superiores entre os tratamentos pré-germinativos testados.

Sementes em processo de deterioração apresentam aumento do conteúdo de malondialdeído (MDA), pois o MDA é um produto da peroxidação de lipídios (Deuner

et. al., 2011; Medeiros, R. *et al.*, 2022). Os dados desse estudo referentes ao conteúdo de MDA indicam aumento da peroxidação de lipídios e, conseqüentemente, do conteúdo de MDA em razão da deterioração das sementes de *C. langsdorffii* provocadas pelo H₂SO₄ em tempo prolongado.

Sementes que apresentaram aumento do conteúdo de SOD apresentam maiores níveis de CAT (Medeiros, R. *et al.*, 2022). A enzima superóxido dismutase (SOD) atua como primeira linha de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Mittler, 2002; Gill e Tuteja, 2010). Porém, com a atividade da SOD, é produzido o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o qual é nocivo para as células. A enzima catalase (CAT) eleva sua atividade para eliminar o H₂O₂, convertendo-o em moléculas de água e gás oxigênio (Scandalios, 2005).

As enzimas peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase inespecífica (POX) também atuam eliminando o H₂O₂ do conteúdo celular (Bailly, 2004; Freitas *et al.*, 2008). A APX elimina o H₂O₂ através do ciclo glutaciona-ascorbato (Bailly, 2004), e sua presença está relacionada com a capacidade de as plantas desenvolverem meios de tolerar o estresse, especialmente pela eliminação de EROs (Comlekcioglu *et al.*, 2022; Mei e Song, 2010). A POX atua catalisando reações oxidativas em plantas ao utilizar o H₂O₂ como substrato, ou o O₂ como acceptor de hidrogênio (Freitas *et al.*, 2008; Medeiros, R. *et al.*, 2022). Nosso estudo também demonstrou que com o aumento da SOD a atividades das enzimas CAT, APX e POX aumentam para eliminar o H₂O₂ do conteúdo celular

A enzima polifenoloxidase (PPO), promovendo a oxidação de compostos fenólicos, convertendo-os em quinonas (Amorim e Josephson, 1975). O presente estudo concorda com os autores anteriores, sendo observada maior atividade da PPO no tratamento com imersão das sementes em H₂SO₄ por noventa minutos.

As atividades das enzimas α -amilase e β -amilase hidrolisam os carboidratos do tecido de reserva da semente, disponibilizando substâncias para o embrião em desenvolvimento (Oliveira *et al.*, 2013). Sementes com maior atividade dessas enzimas apresentam maior poder de germinação e qualidade fisiológica superior (Medeiros, R. *et al.*, 2022). A imersão em ácido sulfúrico em tempo prolongado reduz a qualidade de germinação das sementes de *C. langsdorffii* por apresentar menor atividade de α -amilase e β -amilase.

3.5 Conclusões

A dormência das sementes de *C. langsdorffii* pode ser superada de forma eficaz com sua escarificação do lado oposto do embrião, agilizando e viabilizando a produção de mudas para reflorestamento e recuperação de áreas degradadas.

A escarificação química com a imersão das sementes em H₂SO₄ por quarenta e cinco minutos também se mostrou eficiente, porém o H₂SO₄ não é acessível e traz risco à saúde de quem o manuseia por ser um produto altamente corrosivo.

A escarificação química com a imersão das sementes em H₂SO₄ por noventa minutos produziu alterações celulares deletérias às sementes, com diminuição do conteúdo de proteínas, menor atividade das enzimas α -amilase e β -amilase, as quais estão relacionadas ao poder de germinação, aumento do estresse pela detecção elevada das enzimas do sistema antioxidante SOD, CAT, APX, POX e PPO e elevado conteúdo de MDA, formado pela peroxidação de lipídios.

Portanto, as enzimas α -amilase, β -amilase, SOD, CAT, APX, POX e PPO e o conteúdo de MDA são importantes indicadores de qualidade em sementes após tratamentos pré-germinativos.

3.6 Referências

Amorim, H.V., Josephson, R.V., 1975. Water-soluble protein and non-protein components of brasilian green coffes beans. J. Food Sci. 40, 1179-1185. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1975.tb01047.x> Disponível em: <https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1975.tb01047.x> Acesso em: 5 ago. 2020.

Anderson, M.D. *et al.*, 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. Plant Physiol. 109, 1247-1257. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247> Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/109/4/1247/6069971> Acesso em: 18 jun. 2021.

Arruda, C. *et al.*, 2019. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on Copaifera genus-a review. Biomed. Pharmacother 109, 1-20. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.030 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30396065/> Acesso em: 1 ago. 2020.

Bailly, C., 2004. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. Seed Sci. Res. 14(2), 93-107. Cambridge University Press 2004. DOI: <https://doi.org/10.1079/SSR2004159> Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/seed-science-research/article/abs/active-oxygen-species-and-antioxidants-in-seed-biology/5B6F78DF50B59FAEC17E35D968E546E5> Acesso em: 18 set. 2020.

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269771903708?via%3Dihub> Acesso em: 18 set. 2020.

Bernfeld, P., 1955. Amylase α and β . *Methods Enzymol.* 1, 149-158. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0076687955010215?via%3Dihub> Acesso em: 15 set. 2020.

Bewley, J.D. *et al.*, 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 392p. DOI:10.1007/978-1-4614-4693-4 Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4614-4693-4> Acesso em: 3 maio 2020.

Bezerra, A.M.E. *et al.*, 2012. Germinação e desenvolvimento de plântulas de copaíba em função do tamanho e da imersão da semente em ácido sulfúrico. *Revista Ciência Agronômica* 33, 79-84. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/8631> Acesso em: 3 maio 2020.

Borges, E.E.L. *et al.*, 1982. Comparação de métodos de quebra de dormência em sementes de copaíba. *Revista Brasileira de Sementes* 4, 9-12. Disponível em: <https://www.abrates.org.br/artigo-cientifico/209/comparison-of-dormancy-breaking-methods-in-copaiba-icopaifera-langsdorffiii-seeds> Acesso em: 18 maio 2020.

Bradford, M.N., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273?via%3Dihub> Acesso em: 3 maio 2020.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2009. *Regras para análise de Sementes*. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 399p. ISBN 978-85-99851-70-8. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf Acesso em: 2 fev. 2020.

Brasil. Ministério do Meio Ambiente, 2021. *O Bioma Cerrado*. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biomas/cerrado.html> Acesso em: 16 out. 2021.

Cakmak, I., Horst, W.J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant* 83(3), 463-468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x> Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x> Acesso em: 2 junho 2020.

- Cakmak, I., Marschner, H., 1992. Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in Bean Leaves. *Plant Physiol.* 98, 1222-1227.
<https://doi.org/10.1104/pp.98.4.1222>. Disponível em:
<https://academic.oup.com/plphys/article/98/4/1222/6087256> Acesso em: 2 jun. 2020.
- Carvalho, C.R. de *et al.*, 2021. Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi associated with the neotropical ethnomedicinal plants *Copaifera langsdorffii* and *Copaifera pubiflora*. *South African Journal of Botany* 142, 305-315.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.021>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629921002362?via%3Dihub> Acesso em: 18 set. 2022.
- Chance, B., Maehly, A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8) Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687955023008?via%3Dihub> Acesso em: 13 ago. 2020.
- Chaodumrikul, S. *et al.*, 2016. Breaking seed dormancy in smooth loofah (*Luffa cylindrica* (L.) M. Roem.) using scarification and dry heat treatment. *Agriculture and Natural Resources* 50, 85-88. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2015.09.003>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452316X16300102?via%3Dihub> Acesso em: 13 fev. 2022.
- Crestana, C.M., Beltrati, C.M., 1988. Morfologia e anatomia das sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. (Leguminosae - Caesalpinioideae). *Naturalia* 13, 45-54:il.. ISSN : 0101-1944. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201302660851> Acesso em: 4 abril 2021.
- Das, K., Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2 1-13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053> Disponível em:
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2014.00053/full> Acesso em: 21 abr. 2020.
- Del Longo, O.T. *et al.*, 1993. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol.* 34(7), 1023-1028.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078515> Disponível em:
<https://academic.oup.com/pcp/article-abstract/34/7/1023/1810685?redirectedFrom=fulltext> Acesso em: 15 ago. 2020.
- Deuner, C. *et al.*, 2011. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. *Rev. bras. sementes* 33(4).
<https://doi.org/10.1590/S0101-31222011000400013> Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/rbs/a/MYtp9LbrNycRyHqYYPczmTS/?format=html&lang=pt> Acesso em: 18 maio 2020.
- Ferreira, D.F., 2019. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot

type designs. Braz. J. Biom. 37(4), 529-535. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>. Disponível em: <https://biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450> Acesso em: 10 jan. 2020.

Freitas, A.A. de *et al.*, 2008. Activities of peroxidase (POD) and polyphenoloxidase (PPO) enzymes in benitaka and rubi grapes and in their juices and jellies. Food Sci. Technol. 28(1), 172-177. DOI:<https://doi.org/10.1590/S0101-20612008000100025> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cta/a/gcvMmfMjn4nrsQWj9MpNk8c/?lang=pt> Acesso em: 2 fev. 2020.

Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol. 59, 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309> Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/59/2/309/6075837> Acesso em: 2 maio 2020.

Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. Plant Physiol. Biochem. 48(12), 909-930. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0981942810001798?via%3Dihub> Acesso em: 2 fev. 2020.

Guerra, M.E.de C. *et al.*, 2006. Effect of temperature and light on *Copaifera langsdorfii* Desf. seed germination. Revista Caatinga, Mossoró, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Brasil 19(1), 39-43. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.redalyc.org/pdf/2371/237117486005.pdf> Acesso em: 18 ago. 2020.

Guidoni-Martins, K.G. *et al.*, 2021. Annual fires reduce local species richness but do not homogenize the composition of savanna woody species. Flora 281, 151868. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151868> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367253021001079?via%3Dihub> Acesso em: 16 fev. 2022.

Gunn, C.R., 1981. Seeds of leguminosae. In: Pohill, R.M., Raven, P.H. (Eds.). Advances in Legume Systematics. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew, 1.050p. pp.913-925.

Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. Arch. Biochem. Biophys. 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003986168906541?via%3Dihub> Acesso em: 11 fev. 2022.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (Brasil), 2021. Biodiversidade do Cerrado. Disponível em: <https://www.icmbio.gov.br/cbc/conservacao-da-biodiversidade/biodiversidade.html> Acesso em: 16 out. 2021.

Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. Plant Physiol. 57(2), 315-319.

<https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315> Disponível em:
<https://academic.oup.com/plphys/article/57/2/315/6075023> Acesso em: 20 ago. 2020.

Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. *J. Cell Biol.* 27(2), 1A-149A. Published by: The Rockefeller University Press Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1604673>
 Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/244955881_A_Formaldehyde-Glutaraldehyde_Fixative_of_High_Osmolality_for_Use_in_Electron_Microscopy
 Acesso em: 25 ago. 2020.

Kishorekumar, A. *et al.*, 2007. Comparative effects of different triazole compounds on growth, photosynthetic pigments and carbohydrate metabolism of *Solenostemon rotundifolius*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60(2), 207-212.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.008>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776507002482?via%3Dihub>
 Acesso em: 22 out. 2020.

Leão-Araújo, E.F. *et al.*, 2020. Seed and fruit size affect soaking and physiological seed quality in *Campomanesia adamantium*? *J. Seed Sci.* 42 e202042035.
<https://doi.org/10.1590/2317-1545v42233684> Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/jss/a/qC9NFYXWYwqzkTNjDD9qnQm/?lang=en> Acesso em:
 15 nov. 2021.

Liang, H. *et al.*, 2020. Effective breaking of dormancy of *Scaevola sericea* seeds with seawater, improved germination, and reliable viability testing with 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride. *South African Journal of Botany* 132, 73-78.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.04.018> Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254629920301629?via%3Dihub>
 Acesso em: 18 nov. 2021.

Lorenzi, H., 1992. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa, SP: Editora Plantarum. 385p. Disponível em:
 chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/http://aeaesp.com.br/wp-content/uploads/2019/09/%C3%81rvores-Brasileiras-Lorenzi-volume-1-compactado.pdf Acesso em: 2 ago. 2020.

Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 512 p. ISBN: 9788586714184, 8586714186

Machado, J.W.B. *et al.*, 1992. *Árvores de Brasília*. Brasília, DF: GDF. 100p.

Maguire, J.D., 1962. Speed of germination in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2(2), 176-177.
<https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183x000200020033x> Disponível em:
<https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x> Acesso em: 4 abr. 2020.

Marcos Filho, J., 2005. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicaba: FEALQ 495p. ISBN: 8571330387. Disponível em:

<https://repositorio.usp.br/item/001445389> Acesso em: 4 abr. 2020.

Marcos Filho, 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Londrina: Abrates. 659p. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002724502> Acesso em: 4 abr. 2020.

Medeiros, R.V. *et al.*, 2022. Associations between Integument Color and Physical and Physiological Quality in *Pterodon pubescens* Seeds. *Plants* 11, 1302. <https://doi.org/10.3390/plants11101302> Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/10/1302> Acesso em: 18 set. 2022.

Mei, Y-q., Song, S-q., 2010. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 11(12), 965-972. doi:10.1631/jzus.B1000147. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21121076/> Acesso em: 2 fev. 2021.

Sano, S.M. *et al.*, 2008. Cerrado: Ecologia e Flora. Embrapa Cerrados. – Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 1.279p.: il.

Mittler, R., 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* 7(9), 405-410. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9) Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12234732/> Acesso em: 21 mar. 2021.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22, 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232> Disponível em: <https://academic.oup.com/pcp/article-abstract/22/5/867/1835201?redirectedFrom=fulltext> Acesso em: 3 mar. 2020.

Noletto, L.G. *et al.*, 2010. Alterações estruturais e fisiológicas em sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. - leguminosae-caesalpinioideae submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Sementes* 32, 45-52. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000100005> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbs/a/HYy3hmgzLxYwvWTJhk4qyQm/?lang=pt> Acesso em: 17 abr. 2022.

O'Brien, T.P. *et al.*, 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01248568> Acesso em: 13 maio 2022.

O'Brien, T.P., Mccully, M.E., 1981. *The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods*; Termarcarphi Pty Ltd.: Melbourne, Australia. 357p.:il.

Oliveira, G.E. *et al.*, 2013. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras* 37(1) 40-48. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-70542013000100005> Acesso em: 2 dez. 2022.

Pereira, R.S. *et al.*, 2009. Seedling emergence from newly-collected and storage seeds of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinioideae), Triângulo Mineiro, Brazil. *Revista Árvore, Viçosa* 33(4) 643-652. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/<https://www.scielo.br/j/rarv/a/pFCzxgrC>

p3H9XZ4QJghWjWJ/?lang=pt&format=pdf Acesso em: 21 maio 2022.

Pereira, W.V.S. *et al.*, 2022. Imbibition curve in forest tree seeds and the triphasic pattern: theory versus practice. *South African Journal of Botany* 144, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.032> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629921003549?via%3Dihub> Acesso em: 21 maio 2022.

Comlekcioglu, S. *et al.*, 2022. Biochemical Characterization of Six Traditional Olive Cultivars: A Comparative Study. *Horticulturae* 8(5), 416. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8050416> Disponível em: <https://www.mdpi.com/2311-7524/8/5/416> Acesso em: 2 dez. 2022.

Rolston, M.P., 1978. Water impermeable seed dormancy. *The Botanical Review (USA)*. (44(3), 365-396. ISSN: 0006-8101. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19800494141> Acesso em: 2 fev. 2022.

Santana, S.R. *et al.*, 2014. Uso medicinal do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) por pessoas da melhor idade no município de Presidente Médici, Rondônia, Brasil. *Acta Agronômica [S.l.]*, 63(4), 361-366. doi:10.15446/acag.v63n4.39111 Disponível em: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/39111. Acesso em: 15 maio 2020.

Santana, D.G. *et al.*, 2016. Robustness of Germination Analysis Methods for *Copaifera langsdorffii* desf. (*fabaceae*) Seeds. *Bioscience Journal* 32(1), 160-171. <https://doi.org/10.14393/BJ-v32n1a2016-29425> Disponível em: <https://seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/29425/17763> Acesso em: 9 jul. 2020.

Scandalios, J.G., 2005. Oxidative stress: Molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38(7), 995-1014. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjmb/a/fw8z3bKNgJStKPRDBYqtNCJ/?lang=en> Acesso em: 2 fev. 2022.

Silva, R.C. *et al.*, 2021. Overcoming dormancy in seeds of *Pterodon pubescens* (Benth.) Benth. (Leguminosae, Papilionoideae). *Research, Society and Development* 10(1), e3221019144. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i1.9144> Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/9144> Acesso em: 11 maio 2022.

Souza, F.H.D., Marcos Filho, J., 2001. The seed coat as a modulator of seed-environment relationship in Fabaceae. *Revista Brasileira de Botânica* 24(4), 365-375. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042001000400002> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbb/a/w5NQDvSKyXsXWkbSNYg5bZN/?lang=en> Acesso em: 7 fev. 2022.

Tárrago, J.F., Nicolás, G., 1976. Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. *Plant Physiol.* 58(5), 618-621. <https://doi.org/10.1104/pp.58.5.618> Disponível

em: <https://academic.oup.com/plphys/article/58/5/618/6075193> Acesso em: 18 ago. 2020.

Wang, Y. *et al.*, 2017. Antioxidant metabolism variation associated with salt tolerance of six maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Acta Ecol. Sin.* 37(6), 368-372.
<https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.007> Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S187220321630141X> Acesso em: 1 fev. 2022.

4 CAPÍTULO II

Relação entre qualidade física, fisiológica, histoquímica e bioquímica em sementes de diferentes matrizes de *Copaifera langsdorffii* Desf.

(Normas de acordo com o periódico South African Journal of Botany)

RESUMO: *Copaifera langsdorffii* Desf. é uma espécie arbórea pertencente à família Fabaceae. As matrizes da espécie podem produzir lotes de sementes distintos, sendo influenciadas pela genética ou por fatores externos, podendo apresentar uma associação direta com a qualidade fisiológica relacionada a maiores taxas percentuais de germinação, vigor e índice de velocidade de germinação (IVG). Portanto, são necessários métodos de seleção e avaliação sobre a qualidade das sementes *C. langsdorffii* para a preservação desta espécie. Nesse contexto, objetivou-se investigar diferenças na qualidade fisiológica em lotes de sementes de *C. langsdorffii* produzidas por diferentes matrizes e comparar com as características físicas, histoquímicas e bioquímicas. As imagens radiográficas mostraram que cerca de 18% das sementes do lote 2 estavam parasitadas por larvas de insetos e que o estresse provocado pela infestação reduziu a qualidade do lote de sementes, sendo comprovado pelos ensaios fisiológicos, obtendo germinação, plântulas normais e IVG inferiores aos do lote de sementes produzidas pelas outras matrizes. A caracterização anatômica indicou células aumentadas no endosperma do lote 2, uma característica de resposta à infestação e à quantidade reduzida de proteínas na caracterização histoquímica. A redução da qualidade das sementes do lote 2 foi reforçada com os testes bioquímicos, com menor atividade das enzimas α -amilase e β -amilase, as quais estão relacionadas ao poder germinativo em sementes, atividade superior das enzimas do sistema antioxidante superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) e maior atividade da enzima malondialdeído (MDA), responsável pela peroxidação de lipídios, resultados que indicam estresse fisiológico. Assim, os lotes de sementes das matrizes que

não apresentaram infestação por larvas de insetos apresentaram melhor qualidade, atestada pelas imagens radiográficas, teste fisiológico, testes de caráter anatômico, histoquímico e bioquímico. Evitar utilizar sementes provenientes de matrizes com intensa infestação por larvas de insetos garante maiores taxas de germinação e vigor de novas plantas e produção de mudas vigorosas em viveiros destinados à recomposição da população de *C. langsdorffii*.

Palavras-chave: Copaíba, germinação, estresse, raios-X, enzimas.

4 CHAPTER II

Relationship among physical, physiological, histochemical, and biochemical quality in seeds from different matrices of *Copaifera langsdorffii* Desf.

(Standards according to the journal Plants)

Abstract: *Copaifera langsdorffii* Desf. is an arboreal plant species belonging to the *Fabaceae* family. The species matrices can produce different seed batches, being influenced by genetics or by external factors, and may present a direct association with the physiological quality related to higher percentage rates of germination, vigor, and germination speed index (GSI), selection and evaluation methods of the *C. langsdorffii* seed quality are needed for preserving this species. In this context, this paper aimed to investigate differences in physiological quality in batches of *C. langsdorffii* seeds produced by different matrices and to compare them with the physical, histochemical, and biochemical characteristics. The radiographic images showed that about 18% of the batch 2 seeds were parasitized by insect larvae and that the stress caused by the infestation reduced the quality of the seed batch, as confirmed by the physiological tests, obtaining germination, normal seedlings, and germination speed index (GSI) lower than those of the seed batch produced by the other matrices. The anatomical characterization indicated increased cells in the batch 2 endosperm, a response characteristic to infestation and to reduced amount of proteins in the histochemical characterization. The seed quality reduction from batch 2 was reinforced with biochemical tests with lower activity of α -amylase and β -amylase enzymes, which are related to germination power in seeds, higher enzyme activity of the antioxidant system superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX), peroxidase (POX), and polyphenol oxidase (PPO), and

increased activity of the malondialdehyde enzyme (MDA), responsible for lipid peroxidation, results that indicate physiological stress. Therefore, the seed batches from the matrices that did not show infestation by insect larvae showed higher quality confirmed by radiographic images, physiological, anatomical, histochemical, and biochemical tests. Avoiding the use of seeds from matrices with intense infestation by insect larvae ensures higher germination and vigor rates of new plants and the production of vigorous seedlings in nurseries destined to recompose the *C. langsdorffii* population.

Keywords: Copaiba. Enzymes. Germination. X-rays. Stress.

4.1 Introdução

A *Copaifera langsdorffii* Desf. é uma espécie arbórea neotropical conhecida popularmente por “copaíba”, “pau-de-óleo” ou apenas “óleo (Arruda *et al.*, 2019; Carvalho, *et al.*, 2021). É uma espécie muito explorada pelo interesse comercial pela madeira e óleos resina utilizado como matéria-prima para indústrias farmacêuticas e de tintas, e que combinado com a alta frequência do fogo no bioma do cerrado sua população tem sido reduzida no Brasil (Santana, *et al.*, 2014; Guidoni-Martins *et al.*, 2021).

A *C. langsdorffii* possui preferência pela reprodução alógama, produzindo frutos do tipo legume com uma ou duas sementes. As sementes são ovóides e de cor preta (Rodrigues *et al.*, 2000). É uma espécie de ampla distribuição no Brasil, podendo ser encontrada também em países fronteira como a Argentina e Paraguai (Lorenzi e Matos, 2002; Arruda *et al.*, 2019). Espécies tipicamente alógamas e com ampla distribuição, produzem alta variabilidade genética, a qual resulta em diferentes aspectos morfofisiológicos, definindo o comportamento ecológico dos indivíduos de mesma espécie, o que não se observa com espécies exóticas (Botrel e Carvalho, 2004).

Os diferentes aspectos morfofisiológicos resultantes da diversidade genética de espécies nativas, produzem lotes distintos de sementes, os quais apresentam diferenças na sua qualidade fisiológica (Botrel e Carvalho, 2004). Além disso, clima, nutrição da planta, infestação de insetos, conteúdo de água da semente e tempo de armazenamento, são fatores que contribuem para diferença de qualidade ao comparar diferentes lotes (Bhatia, *et al.*, 2010; Li 2011; Wang, *et al.*, 2012).

A tecnologia de raios-X tem sido utilizada na investigação das características físicas internas das sementes, de maneira eficaz e não destrutiva (Xia *et al.*, 2019; Medeiros, A. *et al.*, 2020). Imagem radiográfica em sementes é uma importante

ferramenta na seleção de lotes de sementes de qualidade, podendo associá-las a aspectos fisiológicos, anatômicos, histoquímicos e bioquímicos (Medeiros, R. *et al.*, 2022).

O potencial econômico das espécies nativas impõe sérias ameaças aos recursos genéticos florestais em razão das atividades humanas, que incluem alterações no uso do solo, desintegração de florestas e admissão de espécies invasoras (Woods *et al.*, 2016; Wang, T. *et al.*, 2020). Desse modo, métodos de seleção de sementes de qualidade são importantes para a formação de lotes de alto padrão para produção de mudas, possibilitando o reflorestamento e a recomposição da população de *C. langsdorffii*.

Nesse sentido, objetivou-se investigar diferenças na qualidade fisiológica em lotes de sementes de *C. langsdorffii* produzidas por diferentes matrizes e comparar com as características físicas, histoquímicas e bioquímicas.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Coleta

As sementes de *C. langsdorffii* foram coletadas diariamente após a dispersão de cinco matrizes em novembro de 2020, localizadas no município de Rio Verde – GO, 17°52'27.65" S e 50°58'01.42" O. Após a coleta, as sementes foram encaminhadas para o Laboratório de Sementes do Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde onde foi feita uma seleção visual, descartando sementes pequenas, com trincas e mal preenchidas. As sementes coletadas das cinco matrizes formaram cinco lotes de sementes, denominados lote 1, lote 2, lote 3, lote 4 e lote 5.

4.2.2 Teor de água

Após a coleta, determinou-se o teor de água inicial das sementes pelo método de estufa a 105 ± 3 °C por 24 h, de acordo com BRASIL (2009), com duas repetições por lote de sementes, o correspondente a, aproximadamente, 10 g.

Tabela - Teor de água dos lotes de sementes de *C. langsdorffii* Desf.

Lote	% de teor de água em base úmida
1	10,82
2	10,22
3	11,70
4	8,86
5	10,19

4.2.3 Curva de embebição

Para compreender o comportamento de embebição das sementes de *C. langsdorffii*, foi feito o teste de curva de embebição com as sementes produzidas pelas cinco matrizes. A curva de embebição foi feita com quatro repetições contendo vinte e cinco sementes acondicionadas sobre duas folhas do papel *germitest* e cobertas por uma terceira folha previamente umedecidas com água destilada no volume de 2,5 vezes a massa do papel. Em seguida, foi feita a confecção dos rolos de papel, que foram colocados em sacos plásticos e depositados em câmara de germinação a 25 °C, com fotoperíodo de 12 h. Procedeu-se então a uma curva de embebição com pesagem sistemática em balança analítica com três casas decimais, de três em três horas, das 6 a zero h, não sendo feitas pesagens entre zero e 6 h. As pesagens foram finalizadas após 294 h do início do teste, quando 50% das sementes apresentaram protrusão radicular com pelo menos um milímetro de radícula. Os resultados foram expressos em ganho de massa na forma de gráfico.

4.2.4 Testes fisiológicos

Como tratamento pré-germinativo, foi feita a escarificação das sementes do lado oposto do embrião com auxílio de folha de lixa número 120, uma vez que as sementes de *C. langsdorffii* apresentam dormência tegumentar observada em estudos anteriores. A germinação das sementes foi feita em rolos de papéis *germitest*, contendo vinte sementes cada. As folhas de papel *germitest* foram umedecidas com água destilada, no volume de 2,5 vezes a massa do papel (Brasil, 2009). Em seguida, as sementes foram acondicionadas sobre duas folhas do papel *germitest* e cobertas por uma terceira folha para a confecção dos rolos de papel. O teste de germinação foi feito em delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Cada repetição consistia em um saco plástico com quatro rolos de papel, que foram depositados em câmara de germinação a 25 °C, com

fotoperíodo de 12 h. O critério adotado para o cálculo de sementes germinadas foi quando a radícula da semente apresentava um milímetro de comprimento. Os tratamentos foram avaliados no 4º e no 10º dia após a semeadura para sementes germinadas e sementes não germinadas e no 15º dia após a semeadura para sementes germinadas, sementes não germinadas, sementes mortas, plântulas normais e plântulas anormais.

Calculou-se o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) pelo somatório de sementes germinadas a cada dia, dividido pelo número de dias decorridos entre a semeadura e a germinação, de acordo com Maguire (1962).

4.2.5 Imagens radiográficas

As imagens radiográficas foram feitas com o aparelho LX-60 da Faxitron X-Ray Corporation, modelo 43855A. As sementes produzidas pelas cinco matrizes de *C. langsdorffii* foram previamente fixadas em folha transparência com fita dupla face e numeradas sequencialmente, perfazendo 20 sementes em cada folha transparência. Foram confeccionadas 55 transparências, totalizando 1100 sementes radiografadas com intensidade de 30 Kvs por 10 s. As imagens salvas foram analisadas pelo software ImageJ® para mensuração da área, perímetro, circularidade, densidade relativa, níveis de cinza e preenchimento. O teste de raios-X foi feito empregando o delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições

4.2.6 Caracterização morfoanatômica das sementes

Para a análise morfoanatômica, foram coletadas amostras de 2 cm² da região do endosperma das sementes de *C. langsdorffii* de quatro repetições das sementes oriundas das cinco matrizes. O material vegetal foi fixado em Karnovsky (1965), por 24 h. Após esse período, as amostras foram pré-lavadas em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,2) e desidratadas em série etílica crescente (30% a 100%), pré-infiltradas e infiltradas em historesina (Leica, Alemanha), conforme recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras foram seccionadas transversalmente a 5 µm de espessura em micrótomo rotativo (Modelo 1508R, Logen Scientific, China) e os cortes, corados com azul de toluidina - coloração policromática (0,05% tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8) (O'Brien *et al.*, 1964). A detecção de proteínas totais foi feita com coloração de Xylidine ponceau (XP)

(O'Brien e McCully, 1981). As imagens foram obtidas pelo microscópio Olympus (BX61, Tokyo, Japão), acoplado a uma câmera DP-72, utilizando opção de campo claro.

4.2.7 Determinação da atividade de enzimas do sistema antioxidativo

Amostras contendo aproximadamente metade da semente de *C. langsdorffii* das cinco matrizes progenitoras foram armazenadas individualmente em papel alumínio e imersas em nitrogênio (N₂) líquido para congelamento instantâneo e armazenamento para posterior análise.

Para a extração do extrato enzimático utilizado para determinar a atividade das enzimas α -amilase (EC 3.2.1.1) e β -amilase (EC 3.2.1.2), superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), peroxidase do ascorbato (APX) (EC 1.11.1.11), e peroxidases (POX) (EC 1.11.1.7), polifenoloxidase (PPO) (EC 1.10.3.1), 0,300 g de sementes foram maceradas com N₂ líquido e homogeneizadas em 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpirrolidona (PVP) 5% (m/v). Após o procedimento de extração, os homogeneizados foram centrifugados a 12000 \times g, por 15 min, a 4 °C, e os sobrenadantes utilizados como extrato para as determinações enzimáticas. O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com quatro repetições para cada enzima.

A atividade da α -amilase foi determinada com a adição de 250 μ L do sobrenadante obtido adicionado a um meio de reação contendo 150 μ L de CaCl₂ 3 mM, incubado a 70 °C por 5 min, para inativação da β -amilase. Uma alíquota de 250 μ L de extrato de inativação da β -amilase foi adicionada a 500 μ L de tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 μ L de solução de amido a 1 %, incubados a 30 °C. Após 5 min, a reação foi interrompida pela adição de 2 mL do reagente de leitura [ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% (DNS), NaOH 2M, tartarato de sódio e potássio] e aquecida a 50 °C por 5 min e, em seguida, diluído em 4 mL de água destilada (Tárrago e Nicolás, 1976; Bernfeld, 1955; Kishorekumar *et al.*, 2007).

A determinação da atividade da enzima β -amilase foi iniciada pela adição de 180 μ L de extrato enzimático a um meio de reação contendo 110 μ L de EDTA 0,1 M para inativação de α -amilase. Uma alíquota de 250 μ L de extrato de inativação da α -amilase foi adicionada a 500 μ L de tampão citrato de sódio 100 mM, pH 5,0 e 250 μ L de solução

de amido a 1%, incubados a 30 °C por 5 min. Após, foram adicionados 2 mL de reação de leitura [ácido 3,5-dinitrosalicílico 1% (DNS), NaOH 2M, tartarato de sódio e potássio] e aquecido a 50 °C por 5 min e, em seguida, diluído conforme descrito acima.

Os açúcares redutores formados pela ação da α - e β -amilase foram quantificados pela leitura da absorbância em 540 nm. e os cálculos, feitos utilizando a curva padrão de maltose 0,5 mg/mL (Tárrago e Nicolás, 1976; Bernfeld, 1955; Kishorekumar *et al.*, 2007).

A atividade da SOD foi determinada pela adição de 60 μ L do extrato de sementes em uma mistura de reação constituída de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), metionina 13 mM, azul de *p*-nitro-tetrazólio (NBT) 75 μ M, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 μ M (Del Longo *et al.*, 1993), totalizando 2 mL. A reação ocorreu a 25 °C sob iluminação de lâmpadas de 15 W. Após 10 min de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul produzida pela fotoredução do NBT foi medida em espectrofotômetro (Evolution 60, Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts - EUA), a 560 nm (Giannopolitis e Ries, 1977). Uma unidade da SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade da SOD foi expressa em unidade de SOD/min/mg de maltose/mg de proteína.

A atividade da catalase (CAT) foi determinada de acordo com Cakmak e Marschner (1992), usando um coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson *et al.*, 1995). A atividade da CAT foi expressa em μ mol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da APX foi determinada pelo método de Nakano e Asada (1981). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,8), H₂O₂ 1 mM e ascorbato 0,8 mM, em um volume de 1 mL. A reação foi iniciada pela adição de 15 μ L do extrato obtido da semente, e a atividade foi medida pela oxidação do H₂O₂ dependente do ascorbato a 290 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,8 mM⁻¹ cm⁻¹ (Nakano e Asada, 1981) foi utilizado para calcular a atividade da APX, a qual foi expressa em μ mol min⁻¹ mg⁻¹ de proteína.

A atividade da enzima peroxidase (POX) foi determinada pela oxidação do pirogalol, de acordo com a metodologia proposta por Kar e Mishra (1976). A mistura de reação foi constituída de tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), pirogalol 20 mM e H₂O₂ 20 mM em um volume de 2 mL. A reação foi iniciada pela adição de 15 μ L do extrato obtido das sementes e a atividade foi determinada pelo consumo de H₂O₂ a 420 nm, durante 1 min, a 25 °C. O coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehley, 1955) foi usado para calcular a atividade da POX, a qual foi expressa em μ mol

de purpurogalina produzida $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteína. A atividade da PFO foi determinada da mesma forma que a da POX, com exceção do H_2O_2 , que foi omitido da mistura de reação.

A atividade do polifenolóxido se (PPO) foi determinada de acordo com Kar e Mishra (1976). Um coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (Chance e Maehley 1955) foi usado para calcular a atividade de PPO, que foi expressa como μmol de purpurogalina produzida $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ de proteína.

As concentrações de proteínas totais em cada amostra foram determinadas pela adição de $10 \mu\text{L}$ dos extratos brutos usados para determinar as atividades enzimáticas da semente em $1190 \mu\text{L}$ de solução de Bradford, seguido por determinações de absorvância a 595 nm (Bradford 1976), expressa em mg g^{-1} de massa fresca.

Os danos celulares foram avaliados pela peroxidação de lipídeos por meio de MDA, conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). Amostras de sementes de cada repetição foram maceradas em almofariz em N_2 líquido até a obtenção de um pó fino. O pó obtido foi homogeneizado em 2 mL constituído de ácido tricloroacético (TCA) 1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a $12000 \times g$, durante 15 min , a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Após centrifugação, $0,5 \text{ mL}$ do sobrenadante foi adicionado a $1,5 \text{ mL}$ da solução de ácido tiobarbitúrico $0,5\%$ (m/v) (preparado em 20% (m/v) de TCA) e incubado em banho maria a $95 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 min . Após esse período, a reação foi parada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a $9000 \times g$, por 10 min e a absorvância específica do sobrenadante foi determinada a 532 nm . A absorvância inespecífica foi mensurada a 600 nm e subtraída do valor da absorvância específica. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e foi expressa em nmol g^{-1} de massa fresca (Heath e Packer, 1968).

4.2.8 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e quando foram observados efeitos significativos procedeu-se à comparação das médias pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$) com auxílio do software estatístico Sisvar (Ferreira, 2019). Os gráficos da curva de embebição, do teste de germinação, das variáveis fornecidas pelas imagens radiográficas e da bioquímica foram feitos pelo *software* computacional SigmaPlot 12.0[®] (Systat Software Inc., Califórnia, EUA). Foi aplicada a correlação de Pearson para todas

as variáveis e gerado gráfico *heatmap* com o *software* computacional GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Prism Inc., Califórnia, EUA).

4.3 Resultados

4.3.1 Curva de embebição

A curva de embebição dos lotes de sementes de *C. langsdorffii* demonstrou o padrão trifásico do processo germinativo, havendo um maior ganho de massa nas primeiras horas (fase I), fase II (estacionária) com pouco ganho em massa e fase III com novo aumento de massa, finalizando com protrusão radicular. Foi observado que nas sementes do lote 2 o ganho em massa foi mais lento (Fig. 4.1).

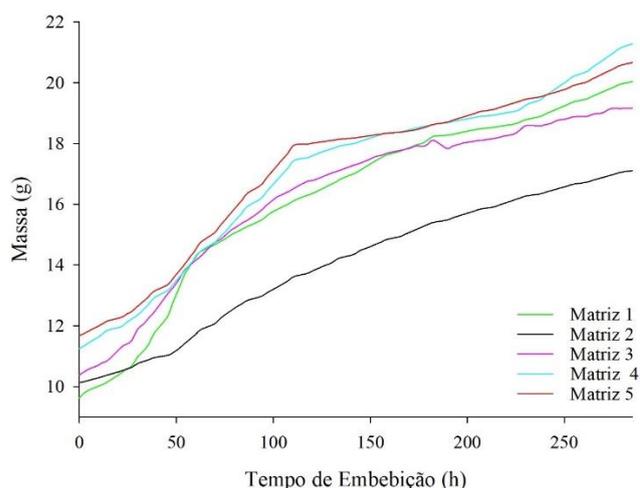


Figura 4.1- Ganho de massa em sementes de diferentes lotes de *Copaifera langsdorffii*, em função do tempo de embebição

4.3.2 Teste de germinação

As médias de germinação dos lotes de sementes não apresentaram alterações na porcentagem de germinação aos quatro dias após a semeadura (G% 4 DAS), porém quando foi avaliada a porcentagem de germinação aos dez dias após a semeadura (G% 10 DAS) e aos 15 dias após a semeadura (G% 15 DAS), houve diferenças, tendo o lote 2 obtido a menor média aos 10 e 15 DAS em relação aos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 4.2A, 4.2B e 4.2C).

Além da porcentagem de germinação aos 15 DAS, foram avaliadas também a

porcentagem de sementes não germinadas (SNG%), porcentagem de sementes mortas (SM%), porcentagem de plântulas normais (PN%) e porcentagem de plântulas anormais (PA%) (Fig. 2D, 2E e 2F). Mesmo com o procedimento de escarificação mecânica do lado oposto do embrião, persiste uma média de 8% de sementes com dormência no lote 2, diferindo dos outros lotes, que não apresentaram sementes não germinadas (Fig. 4.2D).

Foram observadas sementes mortas com extravasamento do conteúdo intracelular para todas as árvores de *C. langsdorffii*, no entanto, não houve diferença para a variável SM%, porém, foram observadas no lote 2, 23,08%, 19,23%, 38,46% e 42,31% mais sementes mortas que os lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 4.2E). Para a variável plântulas normais, as médias apresentaram diferença, tendo o lote 2 apresentado 42,82%, 40,06%, 42,65% e 47,21% em relação aos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 4.2F). Assim como observado para plântulas normais, as médias da variável plântulas anormais também indicaram diferença, tendo o lote 2 apresentado a maior média em comparação com os lotes 1, 3, 4 e 5, que obtiveram 75,70%, 68,22%, 75,23% e 89,25% mais plântulas anormais, respectivamente (Fig. 4.2G).

Houve também diferença para variável índice de velocidade de germinação (IVG). O lote 2 teve média 16,76%, 18,30%, 24,14% e 25,24% inferior em relação aos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 4.2H). O teste de germinação indica que o lote 2 tem sementes com qualidade fisiológica inferior em relação aos outros lotes de sementes de *C. langsdorffii*.

Os lotes de sementes de *C. langsdorffii* foram coletados de matrizes localizadas na mesma região, experimentando, portando, o mesmo tipo de solo e as mesmas condições climáticas, estando aparentemente saudáveis, assim o desempenho fisiológico inferior observado no teste de germinação (Fig. 4.2A, 4.2B, 4.2C, 4.2D, 4.2E, 4.2F, 4.2G e 4.2H) pode ter sido causado pela diferença genética entre as matrizes.

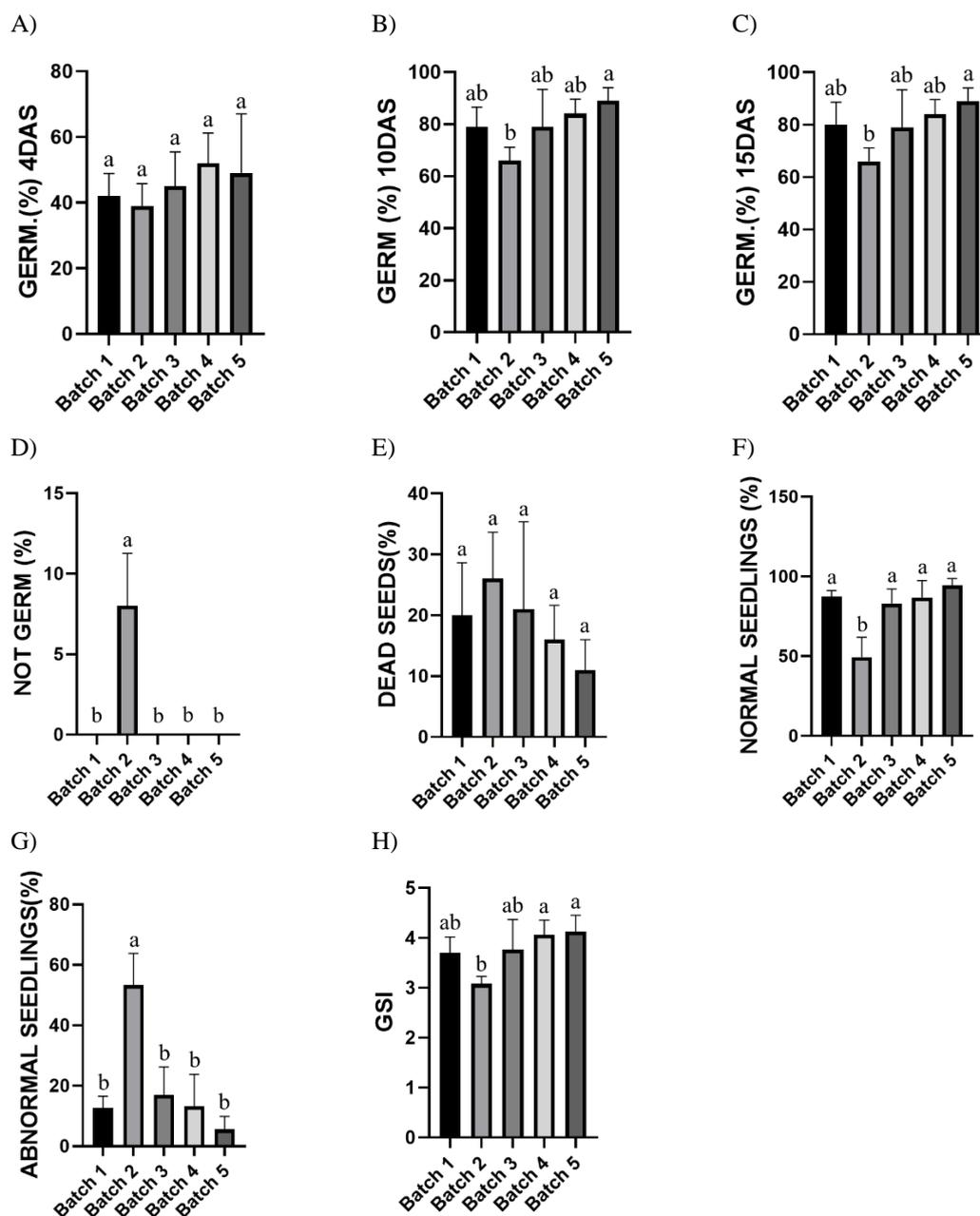


Figura 4.2 - Média \pm EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferiram entre si à 5% (*) de significância pelo teste de Tukey. (A) Porcentagem de germinação aos 4 dias após a semeadura (Germ. (%) 4 DAS), (B) porcentagem de germinação aos 10 dias após a semeadura (Germ. (%) 10 DAS), (C) porcentagem de germinação aos 15 dias após a semeadura (Germ. (%) 15 DAS), (D) porcentagem de sementes não germinadas (Not Germ. (%)), (E) porcentagem de sementes mortas [Dead Seeds (%)], (F) porcentagem de plântulas normais (Normal Seedling (%)), (G) porcentagem de plântulas anormais (Abnormal Seedling (%)) e índice de velocidade de germinação (GSI) em diferentes lotes de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf

4.3.3 Imagens radiográficas

A Figura 4.3 mostra as imagens radiográficas das sementes provenientes das cinco matrizes de *C. langsdorffii*. As setas amarelas nas Figuras 4.3D, 4.3E, 4.3F, 4.3J,

4.3K e 4.3M indicam uma infestação de larvas de insetos do gênero *Coleoptera*, parasitando cerca de 18% das sementes radiografadas do lote 2 (Fig. 4.3D, 4.3E e 4.3F) e danos morfológicos (Fig. 4.3H). As sementes do lote 2 apresentaram baixa densidade relativa e níveis de cinza (Fig. 4.4D e 4.4E), afetando sua qualidade fisiológica, o que é explicado pelo baixo desempenho no teste de germinação (Fig. 4.2A, 4.2B, 4.2C, 4.2D, 4.2E, 4.2F, 4.2G e 4.2H).

Os dados da variável área apontaram que as sementes do lote 3 apresentam área superior em relação aos lotes 1, 2, 4 e 5, sendo que o lote 1 diferiu dos outros lotes com a menor área, sendo observada área 23,99% inferior ao lote 3 (Fig. 4.4A).

Resultados similares foram observados para a variável perímetro das sementes, em que sementes do lote 3 apresentaram 7,48%, 7,67% e 7,02% perímetro superior em relação aos lotes 2, 4 e 5, respectivamente. As sementes do lote 1 destacaram-se por apresentar o menor perímetro em relação aos outros lotes, 12,96% inferior ao lote 3 (Fig. 4.4B).

As sementes dos lotes 1, 3 e 5 mostraram-se mais próximas a um círculo, sendo superiores aos lotes 2 e 4. As sementes oriundas do lote 2 divergiram das sementes dos outros lotes, apresentando serem menos circulares, sendo 1,85%, 1,74% e 1,74% inferior em circularidade que as sementes dos lotes 1, 3 e 5, respectivamente (Fig. 4C).

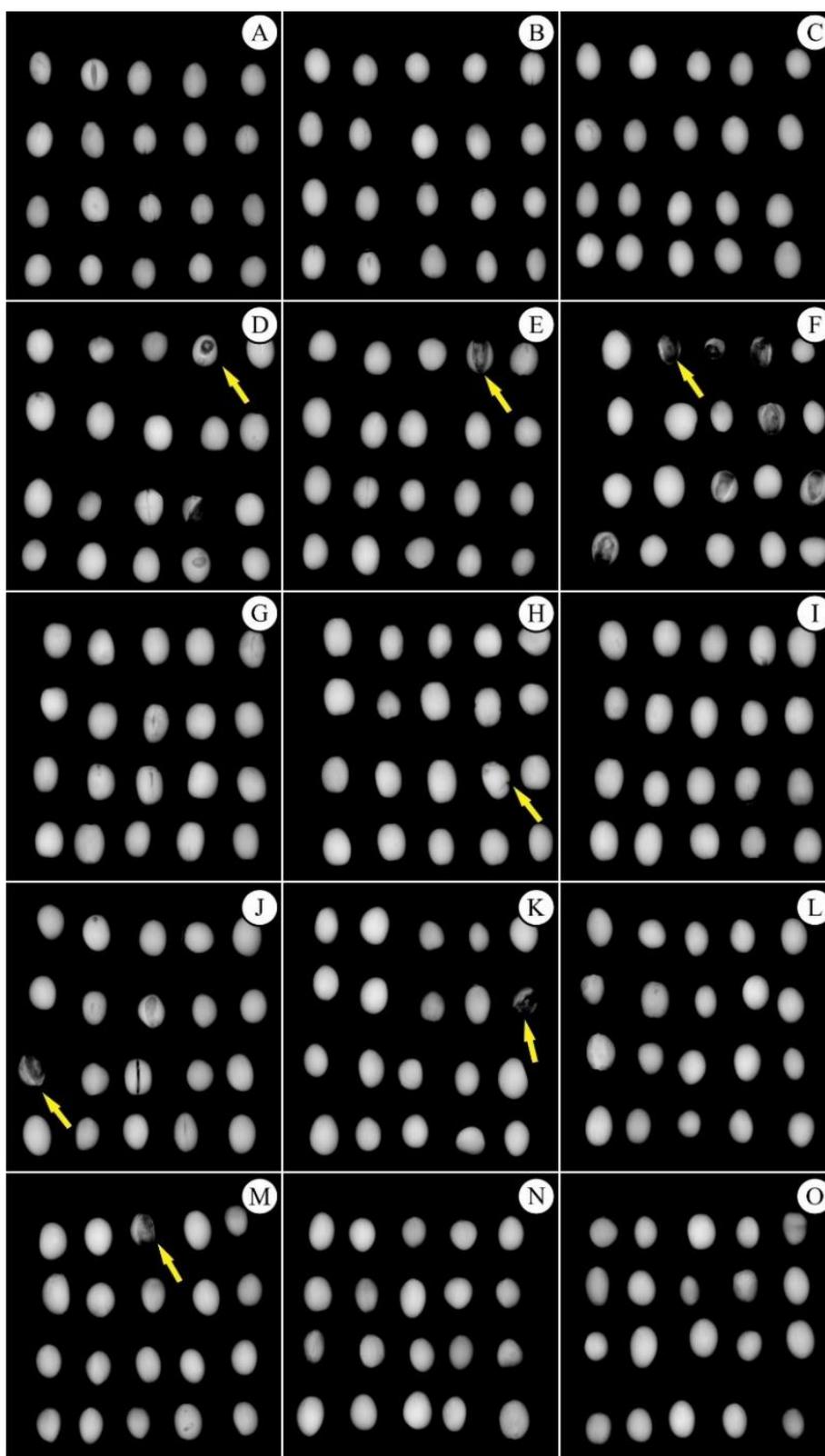


Figura 4.3 - Imagens radiográficas de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. - (A, B e C) sementes da matriz 1; (D, E e F) sementes da matriz 2; (G, H e I) sementes da matriz 3; (J, K e L) sementes da matriz 4; (M, N e O) sementes da matriz 5

O lote de sementes 1 foi superior para as variáveis densidade relativa, níveis de cinza e preenchimento. Este lote se apresentou superior 12,39%, 12,70% e 16,92% para

densidade relativa, 18,04%, 18,25% e 21,59% % para os níveis de cinza e 2,08%, 2,28% e 2,60%% para o preenchimento das sementes em comparação aos lotes 3, 4 e 5 (Fig. 4.4D, 4.4E e 4.4F).

O lote 2 diferiu dos outros lotes, sendo inferior para as variáveis densidade relativa, níveis de cinza e preenchimento. Para essas variáveis, o lote 2 foi inferior 38,67% para densidade relativa, 45,66% para os níveis de cinza e 14,42% para o preenchimento das sementes, em comparação com o lote 1, que foi superior aos outros lotes (Fig. 4.4D, 4.4E e 4.4F).

As variáveis densidade relativa, níveis de cinza e preenchimento de semente estão relacionados com a qualidade física das sementes. Os dados dessas variáveis indicaram que o lote 2 apresenta baixa qualidade física, o que foi provado com o teste de germinação, em que as sementes do lote 2 tiveram desempenho inferior (Fig. 4.2A, 4.2B, 4.2C, 4.2D, 4.2E, 4.2F, 4.2G e 4.2H).

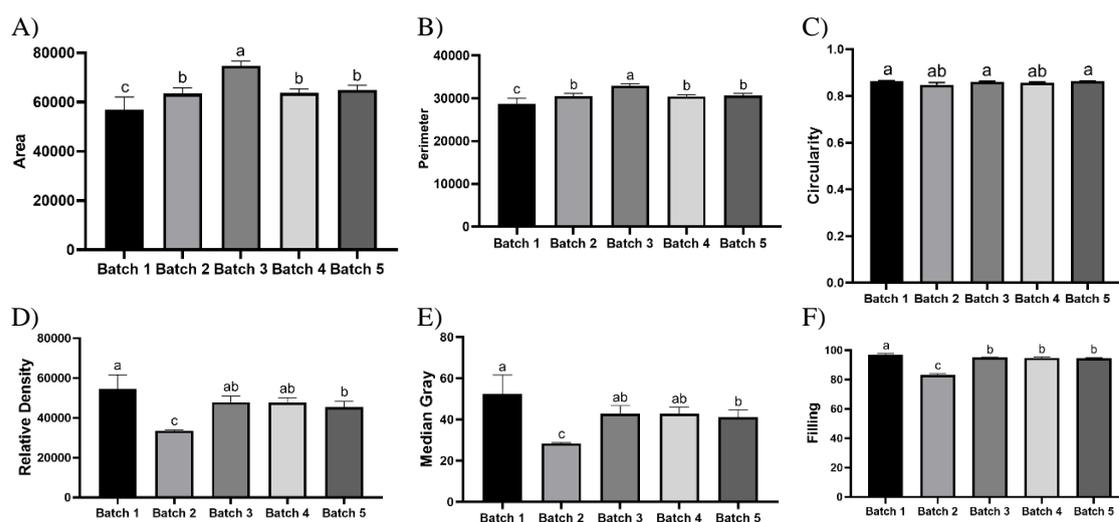


Figura 4.4 - Média \pm EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferiram entre si à 5% (*) de significância pelo teste de Tukey. (A) Área (Area), (B) perímetro (Perimeter), (C) circularidade (Circularity), (D) densidade relativa (Relative Density), (E) média de cinza (Median Gray) e (F) preenchimento (Filling) em diferentes lotes de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf

4.3.4 Caracterização anatômica e histoquímica das sementes

Foi observado em campo que a matriz que formou o lote 2 de sementes de *C. langsdorffii* sofreu intensa infestação de larvas de insetos, promovendo estresse no período da maturação de suas sementes, o que produziu alterações significativas nas células do endosperma (Fig. 4.5C), quando comparadas com os lotes 1, 3, 4 e 5 (Fig. 4.5A, 4.5E, 4.5G e 4.5I). Na caracterização anatômica, as células das sementes do lote 2

apresentam-se maiores (Fig. 4.5C), sendo este sintoma característico de uma infecção provocada pela defesa do organismo ao estresse.

O teste de proteína também demonstrou que os lotes 1, 3, 4 e 5 apresentaram maior acúmulo de proteínas nas células (Fig. 4.5B, 4.5F, 4.5H e 4.5J), sendo que as células endospermicas do lote 2 mostraram menor acúmulo de proteínas (Fig. 4.5D). Logo, é evidente que as sementes do lote 2 têm qualidade inferior, comprovado pela caracterização anatômica e pelo acúmulo de proteínas (Fig. 4.5C e 4.5D), o que confirma os resultados do teste de germinação (Fig. 4.2A, 4.2B, 4.2C, 4.2D, 4.2E, 4.2F, 4.2G e 4.2H) e dos dados fornecidos pelo software ImageJ[®] (Fig. 4.4A, 4.4B, 4.4C, 4.4D, 4.4E e 4.4F).

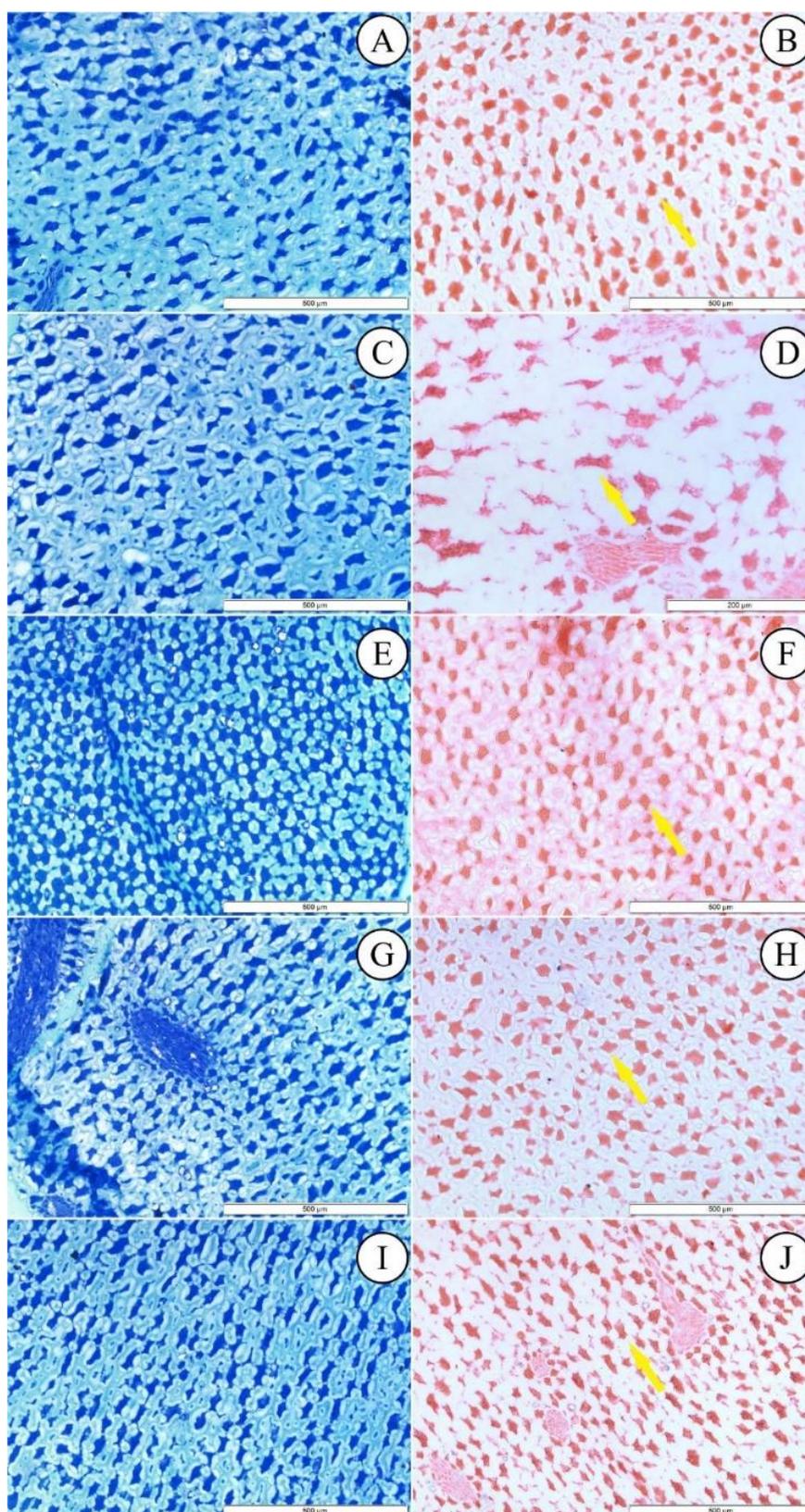


Figura 4.5 - Caracterização anatômica e acúmulo de proteínas em sementes de cinco matrizes de *Copaifera langsdorffii* Desf. - (A-B) matriz 1; (C-D) matriz 2; (E-F) matriz 3; (G-H) matriz 4; (I-J) matriz 5; Setas amarelas indicam acúmulo de proteínas

4.3.5 Análises bioquímicas

O conteúdo de malondialdeído (MDA) no lote 2 foi superior em 49,59%, 54,89%, 32,45% e 46,57% em relação ao conteúdo dos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 4.6A). O nível mais elevado de MDA no lote 2 provavelmente ocorreu em razão da peroxidação de lipídios. Dessa forma, caracteriza processo de deterioração nas sementes do lote 2, que foram submetidas a estresse oxidativo.

O conteúdo das enzimas do sistema antioxidante, superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase do ascorbato (APX), peroxidase (POX) e polifenoloxidase (PPO) mostrou diferença entre as médias dos lotes de sementes, tendo o lote 2 apresentado mais conteúdo dessas enzimas em comparação com os outros lotes (Fig. 4.6B, 4.6C, 4.6D, 4.6E e 4.6F). Estes dados indicam que o lote 2 passou por estresses ocasionados pelos efeitos deletérios das espécies reativas de oxigênio (EROs).

Os níveis da enzima SOD, responsável pela eliminação da toxicidade promovida pelas EROs, foram superiores 85,04%, 77,91%, 73,63% e 77,67% aos níveis detectados dos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 6B). À medida que a SOD atua eliminando a toxicidade das EROs, sua atividade gera o subproduto peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo a CAT responsável pela sua eliminação, convertendo-o em moléculas de água, comportamento observado pela alta atividade da CAT no lote 2, sendo maior 79,72%, 59,23%, 90,67% e 81,54% que o conteúdo observado nos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 4.6C).

A APX também é responsável pela eliminação de H_2O_2 , com detecção 73,70%, 66,76%, 84,68% e 75,14% maior que as sementes dos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente, o que pode estar relacionado ao armazenamento dessas enzimas em compartimentos celulares para eliminação de H_2O_2 quando sob estresse (Fig. 4.6D).

No lote 2 foi detectado 63,54%, 89,50%, 90,05% e 88,95% mais conteúdo da enzima POX ao comparar com os lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente. Esse conteúdo elevado da POX indica que esta enzima está catalisando a oxidação de algum substrato, como, por exemplo, compostos fenólicos e o aminoácido tirosina, utilizando o poder oxidante do H_2O_2 (Fig. 4.6E).

A enzima PPO encontra-se armazenada nos vacúolos e em processo da deterioração catalisa reações de escurecimento enzimático. Foi observado que no lote 2 os níveis da PPO foram superiores 74,41%, 91,47%, 91,94% e 86,73% aos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 4.6F).

Foi observado que o lote 2 apresentou menor conteúdo para as enzimas α -amilase e β -amilase, sendo inferior 54,24%, 49,12%, 48,84% e 47,94% em comparação

com o conteúdo de α -amilase dos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente e inferior 59,07%, 56,35%, 56,40% e 50,67% em relação ao conteúdo de β -amilase para os lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 4.6G e 4.6H). Essas enzimas hidrolíticas estão intimamente relacionadas com a qualidade fisiológica e o poder germinativo das sementes, portanto, os resultados do baixo conteúdo de α -amilase e β -amilase (Fig. 4.6G e 4.6H) confirmam a qualidade inferior do lote 2 ao comparar com os outros lotes investigados nesse estudo.

A menor quantidade de proteínas foi novamente detectada nas sementes do lote 2, sendo 41,30%, 44,87%, 43,05% e 53,76% inferior à quantidade encontrada nas sementes nos lotes 1, 3, 4 e 5, respectivamente (Fig. 4.6I), resultado esse que confirma a imagem da Figura 4.5D, mostrando células com menor conteúdo em comparação com as células das sementes dos lotes 1 (Fig. 4.5B), 3 (Fig. 4.5F), 4 (Fig. 4.5H) e 5 (Fig. 4.5J).

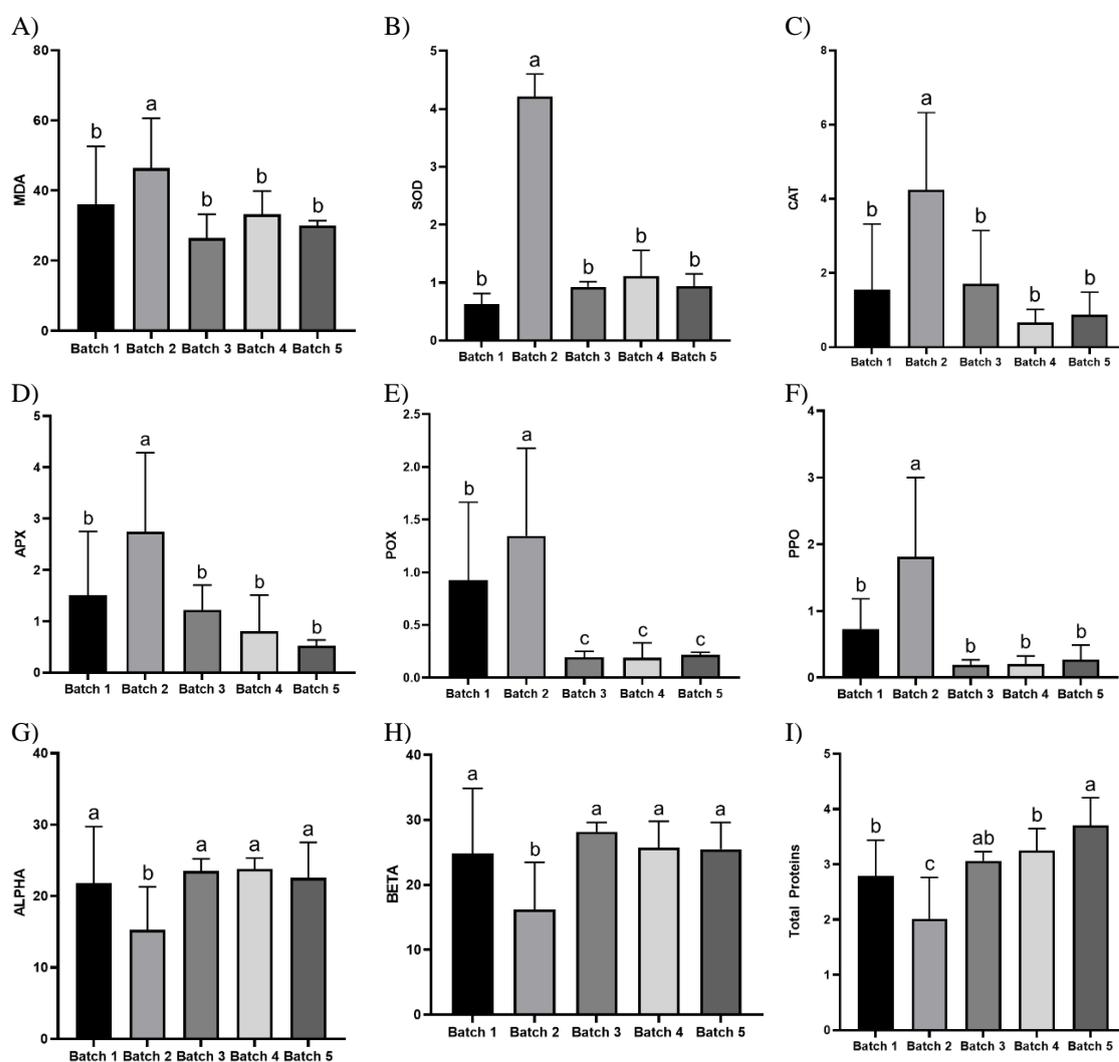


Figura 4.6 - Média \pm EP (n = 4), Médias seguidas das mesmas letras minúsculas não diferiram entre si à 5% (*) de significância pelo teste de Tukey. (A) malondialdeído (MDA), (B) superóxido dismutase (SOD), (C) catalase (CAT), (D) peroxidase do ascorbato (APX), (E) peroxidase (POX), (F) polifenoloxidase (PPO), (G) alfa amilase, (H) beta amilase e (I) total de proteínas nos diferentes lotes de sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf.

4.3.6 Correlação de Pearson's

O gráfico *Heatmap* (Fig. 4.7) indica que, quanto maior os valores de germinação aos 4, 10 e 15 DAS, maiores serão as taxas de plântulas normais, IVG, área perímetro, circularidade, densidade relativa, média de cinzas, preenchimento, α -amilase, β -amilase e proteínas totais. Esses parâmetros são inversamente proporcionais a sementes não germinadas, sementes mortas, plântulas anormais, SOD, CAT, APX, POX, PPO e MDA (Fig. 4.7). Assim, o lote 2 de sementes de *C. langsdorffii* apresentou maior conteúdo de enzimas associadas ao estresse e à deterioração lipídica.

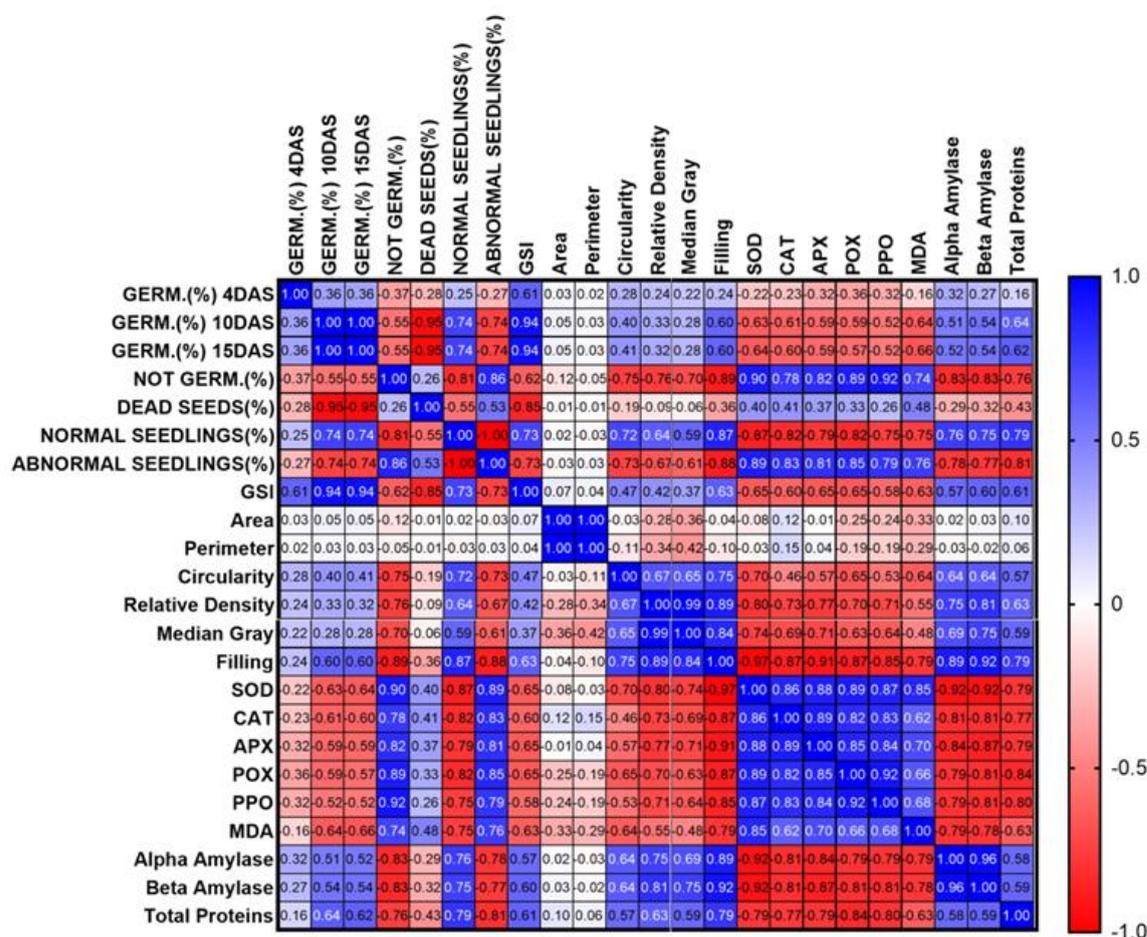


Figura 4.7- Gráfico *Heatmap* da correlação de Pearson para todas as variáveis. Germ. (%) 4 DAS (porcentagem de germinação aos quatro dias após a semeadura), Germ. (%) 10 DAS (porcentagem de germinação aos dez dias após a semeadura), Germ. (%) 15 DAS (porcentagem de germinação aos quinze dias após a semeadura), Not Germ. (%) (porcentagem de não germinadas), Dead Seeds (%) (porcentagem de sementes mortas), Normal Seedlings (%) (porcentagem de plântulas normais), Abnormal Seedlings (%) (porcentagem de plântulas anormais), GSI (índice de velocidade de germinação), Area (área), Perimeter (perímetro), Circularity (circularidade), Relative Density (densidade relativa), Median Gray (Median Gray), SOD (superóxido dismutase), CAT (catalase), APX (ascorbato peroxidase), POX (peroxidase inespecífica), PPO (polifenol oxidase), MDA (Malondialdeído), Alpha Amylase (alfa amilase), Beta Amylase (beta amilase) e Total Proteins (proteínas totais) em diferentes lotes de *C. langsdorffii*

4.4 Discussão

Sementes de *C. langsdorffii* apresentam o padrão trifásico do processo germinativo, assim como a maioria das espécies ortodoxas (Perreira *et al.*, 2022). O padrão trifásico de germinação também foi observado no presente estudo para diferentes lotes de sementes produzido por diferentes matrizes.

Lotes de sementes de *C. langsdorffii* apresentam diferenças em sua qualidade devido a variabilidade genética entre os indivíduos de uma população (Pinto *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2010). O estresse provocado por fatores bióticos ou abióticos no ecossistema em plantas no período de maturação das sementes, pode ter um impacto devastador, reduzindo a qualidade fisiológica das sementes (Bhatia *et al.*, 2010; Li 2011; Wang *et al.*, 2012).

Deng *et al.*, (2022) observou que o estresse biótico em plantas produz sementes de aparência anormal e inferior, além de conterem menos reservas de armazenamento, como proteínas e polissacarídeos. O mesmo foi observado no presente estudo, onde a matriz 2 que forneceu sementes do lote 2 estava sob estresse biótico provocado pela infestação de larvas de insetos em seus frutos e sementes, resultando em alterações celulares e pouca reserva de proteínas nas células das sementes (Figs. 5C e D) e (Fig. 6I).

Infestações causadas por microrganismos ou insetos provocam alterações celulares e dos compostos histoquímicos (Parisi *et al.*, 2018). Essas alterações podem ser observadas através da caracterização anatômica e histoquímica, a qual é uma importante ferramenta para caracterizar a qualidade estrutural das sementes (Medeiros *et al.*, 2022). A preservação das estruturas celulares e do conteúdo de proteínas nas células está relacionado com a maiores taxas de germinação em lotes de sementes (Parisi *et al.*, 2018).

As imagens de raios X de sementes, processadas e analisadas pelo *software* ImageJ®, identificam sementes com maior qualidade física, através da densidade do tecido em cinza por pixel, em que níveis elevados de cinza podem ser relacionados com a maior viabilidade e vigor (Medeiros, A. *et al.*, 2020; Medeiros, R. *et al.*, 2022). A metodologia de avaliação de sementes por imagens radiográficas é rápida e não destrutiva, fornecendo informações importantes sobre parâmetros físicos e fisiológicos (Medeiros, A. *et al.*, 2020; Medeiros R. *et al.*, 2022). Desse modo, sementes infestadas por larvas de insetos do lote 2 com alterações morfoanatomicas (Fig. 4.3D, 4.3E e 4.3F) foram identificadas de forma rápida e eficaz.

As enzimas α -amilase e β -amilase estão relacionadas à qualidade das sementes e são responsáveis pela mobilização de reservas do endosperma para o embrião por meio da hidrólise de carboidratos (Oliveira *et al.*, 2013; Bewley *et al.*, 2013). Medeiros, R. *et al.* (2022) relatam que sementes com mais poder germinativo apresentam maior atividade dessas enzimas. As sementes do lote 2 produzidas sob estresse biótico pela matriz 2 têm menos conteúdo de enzimas α -amilase e β -amilase (Fig. 6G e 6H), sendo observada menor porcentagem de germinação (Fig. 4.2A, 4.2B, 4.2C, 4.2D, 4.2E, 4.2F, 4.2G e 4.2H).

As sementes sob estresse oxidativo apresentam maior conteúdo da enzima superóxido dismutase (SOD), sendo essa enzima a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos das espécies reativas de oxigênio (EROs). Por outro lado, a atividade da SOD em desfavor das EROs gera um subproduto, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, por sua vez, é nocivo para as células. As enzimas catalases (CAT), peroxidase do ascorbato (APX) e peroxidase inespecífica (POX) elevam sua atividade para eliminar o H_2O_2 produzido pela atividade da SOD (Das e Roychoudhury, 2014; Wang, Y. *et al.*, 2017). Nosso estudo mostrou que o aumento dos níveis da SOD proporcionou aumento do conteúdo das enzimas CAT, APX e POX (Fig. 4.6C, 4.6D e 4.6E).

Ao lado do aumento dessas enzimas, a enzima polifenoloxidase (PPO) atua como defesa secundária ao regular polifenóis. É um mecanismo de desintoxicação e age contra a produção exagerada de espécies reativas de oxigênio (ROS). A PPO promove a oxidação de compostos fenólicos, convertendo-os em quinonas, sendo, portanto, agentes redutores de compostos tóxicos (Tattini *et al.*, 2004; Hichem *et al.*, 2009).

O malondialdeído (MDA) é produto da peroxidação de lipídios, sendo encontrado em mais quantidade nas sementes em processo de deterioração (Deuner *et al.*, 2011; Medeiros, R. *et al.*, 2022). Os dados desse estudo indicam que as sementes de *C. langsdorffii* do lote 2 podem estar em processo de peroxidação de lipídios por ter maiores concentrações de MDA (Fig. 4.6A).

4.5 Conclusões

A correlação de Pearsons indica que a integralidade física atestada pelo teste de raios X está diretamente associada a melhores aspectos fisiológico, anatômicos e bioquímicos das sementes. Um importante indicador de germinação é o maior conteúdo

das enzimas hidrolíticas α -amilase e β -amilase encontradas nas sementes dos lotes 1, 3, 4 e 5. Atividades elevadas das enzimas SOD, CAT, APX, POX, PPO e conteúdo de MDA são importantes indicadores de estresse em lotes de sementes.

Em suma, este estudo revelou importantes descobertas sobre a preservação e sobrevivência de *C. langsdorffii*. É importante notar que evitar utilizar sementes provenientes de matrizes infestadas por larvas de insetos que se alimentam e desenvolvem dentro das sementes no estágio larval garante maiores taxas de germinação e vigor de novas plantas, produção de mudas vigorosas em viveiros destinados à recomposição desta espécie.

4.6 Referências

Anderson, M.D. *et al.*, 1995. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiol.* 109(4), 1247-1257. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247> Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/109/4/1247/6069971> Acesso em: 18 jun. 2021.

Arruda, C. *et al.*, 2019. Occurrence, chemical composition, biological activities and analytical methods on Copaifera genus-a review. *Biomed. Pharmacother* 109, 1-20. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.10.030 Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30396065/> Acesso em: 1 ago. 2020.

Beauchamp, C., Fridovich, I., 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analyt. Biochem.* 44(1), 276-287. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269771903708?via%3Dihub> Acesso em: 18 set. 2020.

Bernfeld, P., 1955. Amylase α and β . *Methods Enzymol.* 1, 149-158. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(55\)01021-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(55)01021-5). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0076687955010215?via%3Dihub> Acesso em: 15 set. 2020.

Bewley, J.D. *et al.*, 2013. *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*, 3rd ed.; Springer: New York, NY, USA, 392p. DOI:10.1007/978-1-4614-4693-4 Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4614-4693-4> Acesso em: 3 maio 2020.

Bhatia, V. *et al.*, 2010. Field deterioration of soybean seed: Role of oxidative stress and antioxidant defense mechanism. *Journal of Plant Biology* 32, 179-190. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Kanchan_Jumrani/publication/263004071_Field_Deterioration_of_Soybean_Seed_Role_of_Oxidative_Stresses_and_Antioxidant_Defense_Mechanism/links/00b7d53984615ea017000000/Field-Deterioration-of-Soybean-Seed-Role-of-Oxidative-Stresses-and-Antioxidant-Defense-Mechanism.pdf Acesso em: 20 de mai. de 2021.

Botrel, M. C. G., Carvalho, D., 2004. Variabilidade isoenzimática em populações

naturais de jacarandá paulista (*Machaerium villosum* Vog.). Braz. J. Bot. 27, 621-627. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000400002> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbb/a/LgPjBSS8qVPhNMNHWWtQnQC/?lang=pt> Acesso em: 04 dez. 2022.

Bradford, M.N., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72(1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003269776905273?via%3Dihub> Acesso em: 3 maio 2020.

Brasil. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2009. Regras para análise de Sementes. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Brasília: Mapa/ACS, 399p. ISBN 978-85-99851-70-8. Disponível em: chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/arquivos-publicacoes-insumos/2946_regras_analise__sementes.pdf Acesso em: 2 fev. 2020.

Cakmak, I., Horst, W.J., 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiol. Plant* 83(3), 463-468. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x> Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1399-3054.1991.tb00121.x> Acesso em: 2 jun. 2020.

Cakmak, I., Marschner, H., 1992. Magnesium Deficiency and High Light Intensity Enhance Activities of Superoxide Dismutase, Ascorbate Peroxidase, and Glutathione Reductase in Bean Leaves. *Plant Physiol.* 98(4), 1222-1227. <https://doi.org/10.1104/pp.98.4.1222>. Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/98/4/1222/6087256> Acesso em: 2 jun. 2020.

Carvalho, A.C.M. de et al., 2010. Genetic diversity, inbreeding and gene flow in a small fragmented population of *Copaifera langsdorffii*. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, 33(4), 599-606. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042010000400008> Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.scielo.br/j/rbb/a/bBgjqHcM6YRPKhcqvQ94x7n/?lang=pt&format=pdf> Acesso em: 28 maio 2021.

Carvalho, C.R. de et al., 2021. Diversity and antimicrobial activity of culturable endophytic fungi associated with the neotropical ethnomedicinal plants *Copaifera langsdorffii* and *Copaifera pubiflora*. *South African Journal of Botany* 142, 305-315. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.06.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629921002362?via%3Dihub> Acesso em: 18 set. 2022.

Chance, B., Maehly, A.C., 1955. Assay of catalases and peroxidases. *Methods Enzymol.* 2, 764-775. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(55\)02300-8](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(55)02300-8) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0076687955023008?via%3Dihub> Acesso em: 13 ago. 2020.

Costa, M. C. et al., 2012. Alometria e arquitetura de *Copaifera langsdorffii* (Desf.) Kuntze (Fabaceae) em fisionomias neotropicais no sudeste do Brasil. *Ciência Florestal*

- 22(2), 223-240. <https://doi.org/10.5902/198050985729> Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/cienciaflorestal/article/view/5729> Acesso em: 14 ago. 2020.
- Das, K., Roychoudhury, A., 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 2 1-13. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053> Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2014.00053/full> Acesso em: 21 abr. 2020.
- Del Longo, O.T. *et al.*, 1993. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant Cell Physiol.* 34(7), 1023-1028. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078515> Disponível em: <https://academic.oup.com/pcp/article-abstract/34/7/1023/1810685?redirectedFrom=fulltext> Acesso em: 15 ago. 2020.
- Deng, J. *et al.*, 2022. Field mold stress induced catabolism of storage reserves in soybean seed and the resulting deterioration of seed quality in the field. *Journal of Integrative Agriculture* 21 336-350. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(20\)63594-8](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(20)63594-8) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095311920635948?via%3Dihub> Acesso em: 8 set. 2021.
- Deuner, C. *et al.*, 2011. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. *Rev. bras. sementes* 33(4). <https://doi.org/10.1590/S0101-31222011000400013> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbs/a/MYtp9LbrNycRyHqYYPczmTS/?format=html&lang=pt> Acesso em: 18 de mai. de 2020.
- Ferreira, D.F., 2019. SISVAR: A computer analysis system to fixed effects split plot type designs. *Braz. J. Biom.* 37(4), 529-535. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>. Disponível em: <https://biometria.ufla.br/index.php/BBJ/article/view/450> Acesso em: 10 jan. 2020.
- Giannopolitis, C.N., Ries, S.K., 1977. Superoxide dismutases I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiol.* 59, 309-314. <https://doi.org/10.1104/pp.59.2.309> Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/59/2/309/6075837> Acesso em: 2 maio 2020.
- Guidoni-Martins, K.G. *et al.*, 2021. Annual fires reduce local species richness but do not homogenize the composition of savanna woody species. *Flora* 281, 151868. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2021.151868> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0367253021001079?via%3Dihub> Acesso em: 16 fev. 2022.
- Heath, R.L., Packer, L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125(1), 189-198. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90654-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90654-1) Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003986168906541?via%3Dihub> Acesso em: 11 fev. 2022.

- Hichem, H. *et al.*, 2009. Differential responses of two maize (*Zea mays* L.) varieties to salt stress: changes on polyphenols composition of foliage and oxidative damages. *Ind Crops Prod.* 30(1), 144-151. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.03.003> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669009000466?via%3Dihub> Acesso em: 8 jan. 2021.
- Kar, M., Mishra, D., 1976. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. *Plant Physiol.* 57(2), 315-319. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315> Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/57/2/315/6075023> Acesso em: 20 ago. 2020.
- Karnovsky, M.J., 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron-microscopy. *J. Cell Biol.* 27(2), 1A-149A. Published by: The Rockefeller University Press Stable URL: <http://www.jstor.org/stable/1604673> Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/244955881_A_Formaldehyde-Glutaraldehyde_Fixative_of_High_Osmolality_for_Use_in_Electron_Microscopy Acesso em: 25 ago. 2020.
- Kishorekumar, A. *et al.*, 2007. Comparative effects of different triazole compounds on growth, photosynthetic pigments and carbohydrate metabolism of *Solenostemon rotundifolius*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 60(2), 207-212. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2007.06.008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927776507002482?via%3Dihub> Acesso em: 22 out. 2020.
- Leão-Araújo, E.F. *et al.*, 2020. Seed and fruit size affect soaking and physiological seed quality in *Campomanesia adamantium*? *J. Seed Sci.* 42 e202042035. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v42233684> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/jss/a/qC9NFYXWYwqzkTNjDD9qnQm/?lang=en> Acesso em: 15 nov. 2021.
- Li, S., 2011. Phomopsis seed decay of soybean: Soybean-Molecular Aspects of Breeding. Intech Publisher, Vienna 277-292. DOI: 10.5772/15688 Disponível em: <https://www.intechopen.com/chapters/14938> Acesso em: 10 nov. 2021.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora. 512 p. ISBN: 9788586714184, 8586714186
- Maguire, J.D., 1962. Speed of germination in selection and evaluation of seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2(2), 176-177. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183x000200020033x> Disponível em: <https://access.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x> Acesso em: 4 abr. 2020.
- Marcos Filho, J., 2005. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Piracicaba: FEALQ 495p. ISBN: 8571330387. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/001445389> Acesso em: 4 abr. 2020.

Marcos Filho, 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. Londrina: Abrates. 659p. Disponível em: <https://repositorio.usp.br/item/002724502> Acesso em: 4 abr. 2020.

Medeiros, A.D. *et al.*, 2020. Quality classification of *Jatropha curcas* seeds using radiographic images and machine learning. *Industrial Crops and Products* 146, 112162. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112162>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669020300789?via%3DiHub> Acesso em: 2 fe. 2021.

Medeiros, R.V. *et al.*, 2022. Associations between Integument Color and Physical and Physiological Quality in *Pterodon pubescens* Seeds. *Plants* 11, 1302. <https://doi.org/10.3390/plants11101302> Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/11/10/1302> Acesso em: 18 set. 2022.

Nakano, Y., Asada, K., 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22(5), 867-880. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232> Disponível em: <https://academic.oup.com/pcp/article-abstract/22/5/867/1835201?redirectedFrom=fulltext> Acesso em: 3 mar. 2020.

O'Brien, T.P. *et al.*, 1964. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma* 59, 368-373. <https://doi.org/10.1007/BF01248568> Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF01248568> Acesso em: 13 maio 2022.

O'Brien, T.P., Mccully, M.E., 1981. *The Study of Plant Structure Principles and Selected Methods*; Termarcarphi Pty Ltd.: Melbourne, Australia. 357p.:il.

Oliveira, G.E. *et al.*, 2013. Physiological quality and amylase enzyme expression in maize seeds. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras 37(10) 40-48. Editora da Universidade Federal de Lavras <https://doi.org/10.1590/S1413-70542013000100005> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/JJpGvzwnJkQ9Zx5JLQRN9xR/?lang=en> Acesso em: 2 dez 2022.

Parisi, J.J.D. *et al.*, 2019. Patologia de Sementes Florestais: Danos, Detecção e Controle, uma revisão. *Summa Phytopathologica* 45(2), 129-133. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/188545> Disponível em: <https://www.scielo.br/j/sp/a/4WM35Ms9gwkMsHZvF4y4kcc/?lang=pt> Acesso em: 9 dez. 2021.

Pereira, R.S. *et al.*, 2009. Seedling emergence from newly-collected and storage seeds of *Copaifera langsdorffii* Desf. (Caesalpinoideae), Triângulo Mineiro, Brazil. *Revista Árvore*, Viçosa 33(4) 643-652. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.scielo.br/j/rarv/a/pFCzxrCp3H9XZ4QJghWjWJ/?lang=pt&format=pdf> Acesso em: 21 maio 2022.

Pereira, W.V.S. *et al.*, 2022. Imbibition curve in forest tree seeds and the triphasic pattern: theory versus practice. *South African Journal of Botany* 144, 105-114. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.08.032> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0254629921003549?via%3DiHub> Acesso em: 21 maio 2022.

Pinto, S.I.C. *et al.*, 2004. Variabilidade genética por isoenzimas em populações de *Copaifera langsdorffii* Desf. em dois fragmentos de mata ciliar. *Scientia Forestalis* 65 40-48. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.ipef.br/publicacoes/scientia/nr65/cap04.pdf> Acesso em: 16 maio 2020.

Rodrigues, M. *et al.*, 2000. O tucanuçu (*Ramphastos toco*) como agente dispersor de sementes de copaíba. *Melopsittacus* 3(1), 6-11.

Santana, S.R. *et al.*, 2014. Uso medicinal do óleo de copaíba (*Copaifera* sp.) por pessoas da melhor idade no município de Presidente Médici, Rondônia, Brasil. *Acta Agronómica [S.l.]*, 63(4), 361-366. doi:10.15446/acag.v63n4.39111 Disponível em: https://revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/view/39111. Acesso em: 15 maio 2020.

Tárrago, J.F., Nicolás, G., 1976. Starch degradation in the cotyledons of germinating lentils. *Plant Physiol.* 58(5), 618-621. <https://doi.org/10.1104/pp.58.5.618> Disponível em: <https://academic.oup.com/plphys/article/58/5/618/6075193> Acesso em: 18 ago. 2020.

Tattini, M. *et al.*, 2004. Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytol.* 163(3), 547-561. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01126.x> Disponível em: <https://nph.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1469-8137.2004.01126.x> Acesso em: 14 ago. 2020.

Wang, L. *et al.*, 2012. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. *Journal of Proteomics* 75(7), 2109-2127. DOI: 10.1016/j.jprot.2012.01.007 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874391912000243?via%3Dihub> Acesso em: 9 jan. 2022.

Wang, Y. *et al.*, 2017. Antioxidant metabolism variation associated with salt tolerance of six maize (*Zea mays* L.) cultivars. *Acta Ecol. Sin.* 37(6), 368-372. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2017.08.007> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S187220321630141X> Acesso em: 1 fev. 2022.

Wang, T. *et al.*, 2020. Conservation status of native tree species in British Columbia. *Global Ecology and Conservation* 24 e01362. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01362> Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2351989420309033?via%3Dihub> Acesso em: 1 fev. 2022.

Woods, A.J. *et al.*, 2016. Dothistroma needle blight, weather and possible climatic triggers for the disease's recent emergence. *Forest Pathology* 46(5), 443-452. <https://doi.org/10.1111/efp.12248> Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/efp.12248> Acesso em: 13 fev. 2022.

Xia, Y. *et al.*, 2019. Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: a review. *Artif. Intell. Agric.* 1 35-47.

<https://doi.org/10.1016/j.ajia.2019.05.001> Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2589721719300054?via%3Dihub>

Acesso em: 9 jan. 2022.

5 CONCLUSÃO GERAL

Considerando os achados neste estudo, conclui-se que:

- a) a escarificação do lado oposto do embrião ou escarificação do lado oposto do embrião associado à imersão em água por no mínimo seis horas em sementes de copaíba supera sua dormência de forma eficaz;
- b) escarificação química com H_2SO_4 por tempo prolongado gera estresse oxidativo nas sementes;
- c) a infestação de larvas de insetos durante período de maturação nas sementes de *Copaifera langsdorffii* Desf. pode estar associado ao nível elevado de estresse fisiológico e físico;
- d) as imagens radiográficas das sementes compreendem uma importante ferramenta na seleção de lotes de sementes;
- e) as enzimas α -amilase e β -amilase são indicadoras de qualidade de germinação;
- f) as enzimas SOD, CAT, APX, POX, PPO aumentam sua atividade em sementes sob estresse; e
- g) o conteúdo de MDA indica degradação das sementes por meio da peroxidação de lipídios.