



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOFÍSICA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**



THAMIRES SOARES RICARDO JESUS

**QUALIDADE DE SEMENTES DE *Ricinus communis* L. SUBMETIDAS AO
ENVELHECIMENTO: PERFIL METABOLÔMICO, TRANSCRIPTÔMICO,
ENZIMÁTICO E FISIOLÓGICO**

SALVADOR

2022

THAMIRES SOARES RICARDO JESUS

QUALIDADE DE SEMENTES DE *Ricinus communis* L. SUBMETIDAS AO ENVELHECIMENTO: PERFIL METABOLÔMICO, TRANSCRIPTÔMICO, ENZIMÁTICO E FISIOLÓGICO

Tese apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM/SBBq/UFBA), como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Bioquímica e Biologia Molecular pela Universidade Federal da Bahia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Luzimar Gonzaga Fernandez

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta

SALVADOR

2022

J58 Jesus, Thamires Soares Ricardo.

Qualidade de sementes de *Ricinus communis L.* submetidas ao envelhecimento: perfil metabolômico, transcriptômico, enzimático e fisiológico/Thamires Soares Ricardo Jesus. – Salvador, 2022.
362 f.: il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Luzimar Gonzaga Fernandez; Coorientador:
Prof. Dr. Carlos Takeshi Hotta.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Inclui referências e anexo.

1. Cultivar BRS 188 Paraguaçu. 2. Cultivar BRS 149 Nordestina.
3. Vigor de sementes. 4. Metabolismo energético. I. Fernandez, Luzimar Gonzaga. II. Hotta, Carlos Takeshi. III. Universidade Federal da Bahia.
IV. Título.

CDU 606



TERMO DE APROVAÇÃO DA DEFESA DE TESE

THAMIRES SOARES RICARDO JESUS

QUALIDADE DE SEMENTES DE *RICINUS COMMUNIS* L. SUBMETIDAS AO ENVELHECIMENTO: PERFIL METABOLÔMICO, TRANSCRIPTÔMICO, ENZIMÁTICO E FISIOLÓGICO.

Salvador, Bahia, 04 de março de 2022.

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dra. Luzimar Gonzaga Fernandez (Orientadora/UFBA)
Presidente

Prof. Dr. Luiz Eduardo Vieira Del Bem
Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)

Prof. Dra. Renata Silva-Mann
Universidade Federal de Sergipe (UFS)

Prof. Dra. Allivia Rouse Carregosa Rabbani
Instituto Federal da Bahia (IFBA)

Prof. Dr. Rafael da Conceição Simões
Universidade Federal do Oeste da Bahia (UFOB)

Dedico esta tese aos meus pais, José Carlos e Jaimilza, e ao meu irmão, Rodrigo, que sempre me deram apoio, amor, carinho, dedicação, incentivo durante toda a minha vida. Gratidão por tudo, vocês são a razão desta conquista. Vocês são as pessoas mais extraordinárias desse mundo!

AGRADECIMENTOS

A Deus por tudo que ele representa em minha vida.

Aos meus pais José Carlos da Silva e Jaimilza Soares por serem pessoas fantásticas com quem eu sempre pude contar com o apoio, amor incondicional, incentivo e presença.

Ao melhor irmão do mundo Rodrigo Soares, por toda ajuda, amor, parceria. Obrigada por tudo que você fez por mim nos momentos felizes e tristes.

À Tércio Jorge Nascimento Paixão, pelo apoio, pela parceria, amizade, alegria, companhia, leveza, carinho.

À minha família por todas as orações e ajuda. Gostaria de agradecer em especial a Ramine Lopes, Átila Lopes, Jailda Soares, Espedito Lopes, Sandra Soares, Juliana Soares, Amaro da Silva, Lorival da Silva e Jaquito Soares. Por tudo que vocês fizeram por mim na época da graduação e alguns no mestrado e no doutorado. Muito obrigada por tudo, se não fosse a ajuda de vocês eu nem sei se hoje estaria no doutorado.

Meu agradecimento especial a Professora Luzimar Gonzaga Fernandez, minha orientadora, uma pessoa por quem eu tenho muita gratidão pelas oportunidades, pelos aprendizados e pela presença como orientadora durante meu mestrado e doutorado. Esses quase seis anos ao seu lado foram de muito aprendizado para a minha vida, sou grata por tudo. E te desejo o melhor sempre!

Ao professor Henk Hilhorst, um dos meus orientadores internacionais. Uma pessoa amor, que tenho imensa gratidão por toda a sua ajuda e orientação. Uma honra ter tido a oportunidade de dispor de todo o seu profissionalismo. Ao professor Wilco Ligterink, eu sou muito, muito grata por tudo! Você foi um dos melhores professores da minha vida. Sou grata por sua paciência, por suas orientações por tudo que o senhor fez por mim durante meu um ano de doutorado sanduíche.

Ao professor Carlos Takeshi Hotta, meu coorientador no programa, pela disponibilidade e parceria.

Às minhas irmãs de vida Juliana Souza e Milena Anjos, que foram minha família e grandes amigas com quem pude contar na alegria e na tristeza.

À Carol Santos, pela amizade e irmandade. Essa é uma pessoa de luz com quem eu pude contar nos meus momentos mais difíceis, durante meu doutorado foi meu número de emergência para onde eu ligava durante todo momento para buscar aquela terapia gratuita. Carol foi meu ombro amigo, onde eu sempre ia chorar principalmente no mestrado e no doutorado. Como nem só de tristeza vive o ser humano, compartilhamos boas risadas também.

À Silvia Santos, por toda a amizade, acolhimento e parceria, obrigada por tudo.

Ao Danilo Alvez, um amigo sempre presente na minha vida, com quem sempre pude contar, principalmente nos meus processos de mudanças. Obrigada por tudo.

Ao Eduardo Silva e Thiago de Jesus, grandes amigos que eu amo muito e me acompanham desde a graduação. É sempre bom estar com vocês.

À Jéssica Laís, minha eterna Bel. Obrigada por toda amizade e apoio sempre, pelas ótimas risadas e a melhor parceria de congresso. À Adriana Carvalho, Edvan Sampaio, Clarinha Sampaio, Pâmela Daltro e Brysa Gonçalves, meus grandes amigos da pós-graduação e da vida.

À Jéssica Duarte, uma grande amiga que eu conheci no programa de pós-graduação e que me ajudou com dicas valiosas para a construção da minha tese, gratidão por tudo.

À Fabine Passos, grande amiga e parceira que eu amo estar junto, sempre acontecem boas risadas e as histórias mais loucas ao seu lado. E à Adenilma Duranes, uma grande amiga/terapeuta holística de dom divino, tenho tanta gratidão a você, por tantas coisas. Desejo tudo de mais lindo dessa vida e a realização de todos os seus sonhos.

Às minhas amigas e irmãs de Valença Ingrid Brito e Isabele Menezes, estar com vocês é sempre bom.

A Laizo Santos, Isabele Bispo, Bianca Alves e Ana Paula Almeida, essas foram pessoas incríveis que eu tive o prazer de conviver durante um tempo na pesquisa, nos anos de meu mestrado. E tiveram minha tutoria durante o desenvolvimento de suas bolsas de iniciação científica e marcaram muito a minha vida de forma grandiosa, sou grata por cada ajuda e amizade de cada um de vocês. Que as portas do sucesso e da prosperidade sempre estejam abertas para vocês. Gostaria de fazer um

agradecimento especial a Ana Paula que durante todo o meu doutorado se tornou uma grande amiga presente e com palavras de muita sabedoria, obrigada por tudo.

Caio Cruz e Dominique Galvão, foram meus professores de inglês durante meu intercâmbio na Holanda. Além de excelentes profissionais são pessoais incríveis que eu tive o grande prazer de conhecer, que me ajudaram em vários momentos com suas sabedorias e seus grandes conselhos. Gratidão meus amores.

À Geovana Reis, a primeira grande amizade que eu fiz na Holanda, Geovana foi uma inspiração de força e determinação. Tão nova, porém tão forte e cheia de sabedoria! Ao seu lado exploramos Wageningen, Amsterdam, Arnhem, Londres. Quando Geovana foi embora, nossa como foi difícil! Gostaria de te agradecer por tudo, toda paciência, amizade, parceria, conselhos e ouvidos. Te desejo o mundo, que você continue expandindo sempre.

À Carol Mosca pelas melhores conversas de toda a minha vida, Carol foi uma pessoa muito iluminada que eu conheci na Holanda. Ela aprendeu a ver a vida de uma forma diferente da maioria, a qual, nós estamos neste plano para evoluir da melhor forma e não importa a opção que você escolheu seguir. O importante é o caminho e a leveza com que você conduz sua vida.

À Isabela Fernandes, o ser de luz mais lindo do universo! Só sua voz emana luz! Isabela entrou na minha vida bem aleatoriamente, nossa amizade iniciou em uma festa com a frase: Miga que creme você usa no cabelo neste lugar? E esse foi o início. Isabela me inspirou de uma forma que palavras não são suficientes para descrever, com ela eu aprendi a ser grata, só em existir. Nós tínhamos muitas conversas sobre a vida e o retorno da energia do universo. Além disso, Isabela foi minha amiga para todos os momentos literalmente na alegria e na tristeza.

À Marília de Souza Bento o exemplo de fé e amor. Marilhinha é uma pessoa muito determinada e inspiradora que tive o prazer de ser amiga. A única lamentação que eu tenho é que ela ficou por pouco tempo na Holanda. Mas é uma amizade que eu trouxe comigo para vida.

À Vanja Viana, mais conhecida como Vanjinha. Vanjinha era como se fosse uma mãe uma amiga, um combo completo. Eu dizia que eu era a agregada da casa de Vanjinha, porque lá literalmente era meu segundo lar. Sinto tanta saudade e gratidão por tudo.

À Daniele Angioletti e Gabi Angioletti, mãe e filha uns amores. Elas são um exemplo de força, garra e determinação. Muito obrigada por tudo meninas, vocês moram no meu coração.

À Gina Pontes, por toda receptividade amor e dedicação. Pense em uma pessoa amor, que emana amor ao seu redor. Uma grande mulher, esposa e mãe. Obrigada pela sua amizade e carinho.

Ao meu amigo mais lindo Renan Pardal. Ele é um exemplo de alegria, charme e elegância. Eu, Isabela e Renan éramos um trio quase que inseparável. Oh garoto...muito obrigada por tudo!

À Debóra Camillo e Laura Piai, o casal mais lindo do mundo, outro encontro aleatório que eu quero levar para a vida. Eu conheci as meninas, quando eu estava ciclando nas ruas de Wageningen com meus cabelos esvoaçantes e conversando com Geovana. E do nada elas gritaram "brasileiras!" e a gente começou a gritar, quase uma cena de filme. Sou muito grata por ter conhecido vocês e ter construído uma amizade.

Gostaria de agradecer aos Holandeses mais amor que passaram pela minha vida, ao casal mais amor, Ineke e Martins, pessoas incríveis com um amor pela arte e pela vida, pessoas que me ajudaram tanto, gratidão é pouco para vocês! Foram eles que conseguiram a casa da Tineke e Arnst, outro casal amor que me alugou um quarto na residência deles durante todo o meu intercâmbio. Vocês foram muito incríveis e me ajudaram muito.

À Mariana Artu, uma luz que eu encontrei no Radix. Eu tenho muita gratidão a você e que você continue a florescer neste mundo de meu Deus com toda a sua simpatia e luz.

À Eirine Pegiou minha irmã grega mais linda e mais amor do universo! Eirine é a pessoa mais amor que eu conheci, internacionalmente falando. Ela tem uma alma tão brasileira, que as vezes me deixava em dúvida se ela realmente era grega. Ela entrou na minha vida como um anjo! Eu divido muito minha vida no Radix antes de Eirine e depois que ela chegou. O meu processo de ter amigos internacional foi difícil, para começar porque eu falava inglês com sotaque de baiana e ironicamente, só uma grega me entendia de forma completa! Ela alavancou minhas relações sociais durante os

almoços e confraternizações de laboratório, eu me sentia a rainha do inglês com ela por perto, porque eu conversava pelos cotovelos em inglês, normalmente quase ninguém entendia e eu pedia ajuda a minha intérprete internacional. Muito amor por esse ser de luz, muita saudade.

Ao Umidjon Shapulatov um grande amigo do Cazaquistão. Eu o via como um grande gênio na ciência, eu o chamava de rei da clonagem e do RNAi. Ele sabia fazer tudo. Eu o considerava como um tutor, ele foi literalmente meu professor na clonagem. Obrigada por tudo, onde quer que você vá que você seja próspero. Porque eu tenho certeza de que você será um excelente professor.

Aos meus colegas do laboratório do Fisiologia Vegetal no Radix, da Universidade de Wageningen: Manjunath Cholanayakanahalli, Nikita Sajeev, Carmen Diez, Shuang Song, Ralf Dace, Bing Bai, Jessica Meyer, Yutao Zou, Eva van, Jasper Lamers, Yanxia Zhang, Rumyana Karlova gostaria de agradecer por toda ajuda e paciência de todos comigo. Gostaria de agradecer também aos técnicos Leo Willems e Lídia Sergeeva, por toda ajuda e paciência sempre. E a professora Leonie Bentsink pela paciência e contribuições durante as reuniões de laboratório.

Aos meus companheiros e amigos do Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos – LBBB/ICS/UFBA pela grande amizade, ajuda, bons conselhos e parceria: Flávia Rodrigues, Elis dos Reis, Brenda Antunes, Laure Laiane, Amanda Átila, Diego da Silva, Gabriel Medrado, Leila Rodrigues, Camilo Jonas Barbosa, Bianca Lins, Honório Dias, Carlos Lemos, Luís Gustavo Araújo. E em especial a Marcos Vinicius, Jair Júnior, Maria Cecília Oliveira, Thales Guimarães e Patrícia Campos, são pessoas que eu tenho muita gratidão por tudo que fizeram por mim, por toda parceria e amizade.

Aos professores do laboratório LBBB/ICS/UFBA por todo suporte e ajuda diária, ao Professor Renato Delmondez pela grande oportunidade que mudou minha vida e a professora Daniele Takahashi por toda paciência e ajuda intelectual. Em especial a professora Marta Bruno que me acompanha desde a graduação em Biotecnologia, pessoa que eu sou muito grata por toda ajuda, pelas boas conversas e os bons conselhos. Gostaria também de agradecer aos professores colaboradores Paulo Ribeiro e Luiz Del Bem por toda ajuda e colaboração.

A Cristiane Brito uma pessoa de muita luz, que durante seus anos de trabalho no LBBB já foi luz na vida e nos trabalhos de muita gente! Eu tenho tanta gratidão por você, na Holanda você foi como um anjo na minha vida pessoal e profissional. Eu vejo muito de você em mim e as vezes pagamos um preço caro pela nossa sensibilidade ao mundo, mas eu acredito que tudo que nos acontece por pior e mais difícil que seja é para um propósito muito maior, para a nossa evolução enquanto seres humanos incríveis. Eu te desejo expansão, que você flua com muita leveza e explore esse mundo de meu Deus mostrando os seus talentos, porque você é incrível e extraordinária! E ao Arno Brichta o seu marido, eu sou muito grata por tudo que ele fez por mim também, ele é uma pessoa incrível e de muita luz. Gratidão a vocês.

Ao Luiz Henrique um dos profissionais mais incrível, ético e sensato desse mundo, eu só tenho a agradecer muito a você por tudo. A conclusão deste doutorado eu devo isso a você e a José Barbosa, outro excelente profissional.

À Íris Pirajá, minha arte terapeuta mais incrível, uma inspiração em talento artístico, como pessoa e como profissional, gratidão por tudo.

À Universidade Federal da Bahia, por me acolher na minha graduação em Biotecnologia, no meu Mestrado e no meu Doutorado. A coordenação do PMBqBM-UFBA, sendo a nossa atual coordenadora Profa. Luzimar G. Fernandez, além de orientadora, por todo trabalho realizado e a Profa. Simone Garcia, vice coordenadora. Gostaria de agradecer também ao ex-secretário do programa, Pedro Paulo, por toda ajuda e suporte que ele me deu durante todo o meu mestrado e doutorado no programa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa da Bahia – FAPESB, pelo apoio financeiro concedendo a minha bolsa. Ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações-CNPq pela minha bolsa de doutorado sanduíche, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES/PNPD e PETROBRÁS pelo recurso liberado para os projetos do laboratório.

“Existem pessoas certas em momentos errados, existem pessoas erradas em momentos certos, existem pessoas certas em momentos certos. Tudo é questão de tempo e espaço, tudo é questão de destino”.

JULIANO GOUVÊA

RESUMO

Para avaliar o vigor das sementes, é possível realizar o envelhecimento acelerado (EA), que consiste em submeter as sementes a alta temperatura e umidade. Além disso, esse teste permite avaliar o comportamento das sementes a nível fisiológico, bioquímico e molecular. Objetivou-se nesse estudo avaliar o comportamento de sementes das cultivares BRS 188 Paraguaçu e BRS 149 Nordestina de *Ricinus communis* L. antes e após serem submetidas ao EA quanto perfil metabolômico, transcriptômico, enzimático e fisiológico. Foram realizadas as seguintes análises: caracterização inicial das sementes, padronização do EA, grau de umidade das sementes, teste de germinação, determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato, teste de tetrazólio, peroxidação lipídica (níveis de malonaldeído – MDA), determinação das atividades das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase – SOD, catalase – CAT, ascorbato peroxidase – APX, monodehidroascorbato redutase – MDHAR, dehidroascorbato redutase – DHAR, glutatona redutase – GR, glutatona peroxidase – GPX e glutatona S-transferase – GST). Realizou-se a avaliação de metabólitos primários e secundários por metabolômica, e a produção dos transcritos através do teste de RNA-seq para as sementes de BRS 188 Paraguaçu. Nas sementes BRS 188 Paraguaçu após o EA, ocorreu perda de vigor, aumento da condutividade elétrica, alteração na produção de metabólitos primários (galactinol, mio-inositol, melibiose, ácido glioxílico, sorbitol, inositol, xilose, sacarose e ribitol) e secundários das classes dos terpenos, compostos fenólicos e alcaloides, e maior expressão de genes, principalmente do metabolismo energético. Em resposta a EA, o aumento da concentração de MDA e da atividade de APX e CAT só foi significativo na semente inteira, enquanto a SOD e a DHAR foram enzimas que apresentaram aumento significativo da atividade na semente inteira e no embrião. A alteração de atividade de GST e GPX foi significativa apenas em amostras dos embriões. Já a cultivar BRS 149 Nordestina, apresentou após o EA redução significativa na viabilidade, com danos de membrana e aumento da peroxidação lipídica. O aumento da atividade de SOD, APX e DHAR foram significativos nas sementes inteiras e no embrião, enquanto a atividade da CAT teve aumento na semente inteira. MDHAR, GR e GPX, aumentou significativamente apenas no embrião. Ao analisar os mecanismos fisiológico, bioquímico e molecular das sementes após o EA, MDA, SOD e DHAR, e o aumento de eletrólitos no exsudado são biomarcadores bioquímicos para a avaliação da qualidade das sementes, assim como, os genes importantes para o metabolismo energético são biomarcadores adequados para avaliação de qualidade de sementes desta espécie.

Palavras-chaves: Cultivar BRS 188 Paraguaçu, Cultivar 149 Nordestina; Viabilidade, Vigor, Metabolismo energético.

ABSTRACT

To assess seed vigor, it is possible to perform accelerated aging (AA), which consists of submitting the seeds to high temperature and humidity. In addition, this test makes it possible to evaluate the behavior of seeds at a physiological, biochemical and molecular level. The objective of this study was to evaluate the behavior of seeds of cultivars BRS 188 Paraguaçu and BRS 149 Nordestina of *Ricinus communis* L. before and after being submitted to AA regarding the metabolomic, transcriptomic, enzymatic and physiological profile. The following analyzes were carried out: initial characterization of seeds, AA standardization, seed moisture content, germination test, determination of electrical conductivity and pH exudate, tetrazolium test, lipid peroxidation (malonaldehyde levels - MDA), determination of the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase – SOD, catalase – CAT, ascorbate peroxidase – APX, monodehydroascorbate reductase – MDHAR, dehydroascorbate reductase – DHAR, glutathione reductase – GR, glutathione peroxidase – GPX and glutathione S-transferase – GST). The evaluation of primary and secondary metabolites by metabolomics, and the production of transcripts through the RNA-seq test for the seeds of BRS 188 Paraguaçu. In the BRS 188 Paraguaçu seeds after the AA, there was a loss of vigor, increase in electrical conductivity, alteration in the production of primary (galactinol, myo-inositol, melibiose, glyoxylic acid, sorbitol, inositol, xylose, sucrose and ribitol) and secondary metabolites of the terpene, phenolic and alkaloid classes, and greater gene expression, especially energy metabolism. In response to AA, the increase in MDA concentration and APX and CAT activity was only significant in the whole seed, while SOD and DHAR were enzymes that showed a significant increase in activity in the whole seed and in the embryo. The change in GST and GPX activity was significant only in embryo samples. The cultivar BRS 149 Nordestina, showed after AA a significant reduction in viability, with membrane damage and increased lipid peroxidation. The increase in SOD activity, APX and DHAR were significant in whole seeds and the embryo, while CAT activity in the whole seed. MDHAR, GR and GPX, activity increased significantly only in the embryo. When analyzing the physiological, biochemical and molecular mechanisms of seeds after AE, that MDA, SOD and DHAR, and the increase of electrolytes in the exudate are biochemical biomarkers for the evaluation of seed quality, even as, the genes important for energy metabolism are suitable biomarkers for evaluating the quality of seeds of this species.

Keywords: Cultivar BRS 188 Paraguaçu, Cultivar 149 Nordestina; Viability, Stamina, Energy metabolism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Fluxograma das análises iniciais realizadas com as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu e BRS 149 Nordestina (*Ricinus communis* L.).....45
- Figura 2** – Ajuste de protocolo para o tratamento de envelhecimento acelerado realizado com cinco, dez e quinze dias. Uso de incubador (IK-7) com sal de sulfato de zinco, a 40°C e 85% UR.....46
- Figura 3** – Análises das sementes submetidas ao EA e não envelhecidas da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* L.....47
- Figura 4** – Análises das sementes submetidas ao EA e não envelhecidas da cultivar BRS 149 Nordestina de *Ricinus communis* L.....48
- Figura 5** - Teste de tetrazólio em sementes da cultivar 188 BRS Paraguaçu de *Ricinus communis*. (A e B) sementes inviáveis, (C) semente viável.....51
- Figura 6** – Representação da atividade da Superóxido dismutase (SOD). A luz causa fotólise na riboflavina, que supre um elétron para o oxigênio do ambiente (O₂), resultando no íon superóxido (O₂^{•-}). O superóxido atua reduzindo NBT a formazan (produto de coloração roxa) (A). Na presença de SOD, a reação é inibida e não ocorre produção de formazan. Esta inibição é utilizada para determinar atividade enzimática da SOD (B).....60
- Figura 7** - Procedimentos pré-germinativos para sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*. Sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE), germinação máxima – Gmax (%), tempo para alcançar 50% da germinação - T50 (horas), índice de uniformidade da germinação - U8416 (horas), área abaixo da curva de germinação – AAC (adimensional).....75
- Figura 8** - Curvas de embebição de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*. Sementes inteiras (SI), sementes sem tegumentos (SST) e sementes escarificadas (SE).....78
- Figura 9** – (A) Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e (B) pH de exsudato das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*, durante o período de três, seis, doze e vinte e quatro horas.....80
- Figura 10** – Resultados do teste de tetrazólio em lote de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*. (A). Comparação entre a porcentagem de Sementes Viáveis (SV) com Germinação Sementes Inteiras (GSI), Germinação Sementes Sem Tegumentos (GSST), Germinação Sementes Escarificadas (GSE), Plântulas Normais Sementes Inteiras (PNSI), Plântulas Normais Sementes Sem Tegumentos (PNSST) e Plântulas Normais Sementes Escarificadas (PNSE).....82
- Figura 11** - Germinação das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* antes (controle) e após a submissão ao teste de envelhecimento acelerado (EA) durante o período de 5, 10 e 15 dias a 40°C e 85% UR.....84
- Figura 12** - Sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* apresentaram mudança na coloração no tegumento das sementes submetidas ao EA durante dez e quinze dias de EA. (A) Semente da cultivar Paraguaçu antes do EA; (B)

Tegumento das sementes submetidas ao EA por dez dias; (C) Sementes de dez dias de TEA, submetidas a germinação, coloração do papel germitest após 7 dias de germinação.....86

Figura 13 - Germinação de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *R. communis* não submetidas e submetidas ao teste envelhecimento acelerado, durante dez dias a 40°C e 85% UR. (A) Germinação máxima – Gmax, (B) Tempo para alcançar 50% de germinação – T50, (C) Área abaixo da curva de germinação – AAC, (D) Uniformidade de germinação (medindo-se o intervalo de tempo em horas entre 84% e 16% de germinação de sementes - U8416).....90

Figura 14 - (A) Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e (B) pH do exsudado á das sementes do cultivar BRS Paraguaçu de *R. communis* controle e sementes após serem submetidas ao EA. As sementes foram imersas em 75 mL de água ultrapura durante diferentes períodos de embebição (3, 6, 12 e 24 horas).....95

Figura 15 - Teste de Tetrazólio do lote das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *R. communis* controle e sementes após serem submetidas ao EA, valor de semente viável e inviável.....97

Figura 16 - Representação dos resultados das análises do RNA-seq das sementes submetidas ao EA versus o controle utilizando figuras de *Mxa plot*. (A) representa o resultado global, integrando a variação de expressão e a média de expressão para todas as 31.171 sequências. (B) representa as mesmas sequências da figura A, após a remover o ruído da análise; (C) representa o contraste das bibliotecas, correspondendo a um *plot de Log2 de* transcritos por milhão (*TPM*). Os pontos em vermelho correspondem as sequências significativas que têm um *p*adj menor que 0.1.....100

Figura 17 – Total de sequências expressas (31.171), total de sequências significativas (494) que codificam para proteínas hipotéticas ou não.....101

Figura 18 – Identificação das sequencias (494) de acordo com a sua função molecular, processos biológicos e componentes celulares.....102

Figura 19 – Mapa de calor com os metabólitos primários identificados no embrião das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* L. na condição controle e após envelhecimento acelerado.....110

Figura 20 – Biomarcadores de qualidade de sementes de *Ricinus communis* cultivar BRS 188 Paraguaçu e a via de biossíntese de galactinol, rafinose e estaquiose (Adaptado de NISHIZAWA, YABUTA & SHIGEOKA, 2008; DOMERGUE *et al.*, 2019).....111

Figura 21 - Análise de componentes principais dos metabólitos secundários das amostras de Embrião e Tegumento do Controle e EA.....120

Figura 22 - Representação do mapa de calor dos metabólitos identificados de embrião e tegumento na condição controle e após EA de *R. communis* com base em análise de identificação LC–MS.....122

- Figura 23** – Determinação de malonaldeído (μM de MDA g^{-1}MS) em sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu, nas condições controle e após EA. (A) Sementes inteiras sem tegumento e (B) Embrião. (MS) massa seca.....128
- Figura 24** – Atividade da Superóxido dismutase (U SOD. mg^{-1} de proteína) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.....130
- Figura 25** – Atividade da Catalase (H_2O_2 $\text{min}^{-1}.\mu\text{g}^{-1}\text{prot}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.....132
- Figura 26** – Atividade da ascorbato peroxidase ($\text{mmol ASA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.....134
- Figura 27**– Atividade da Monodehidroascorbato redutase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.....136
- Figura 28** – Atividade da Dehidroascorbato redutase ($\text{mM GSSG min}^{-1} . \mu\text{g}$ de prot) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.....137
- Figura 29** – Atividade da Glutaciona redutase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.....139
- Figura 30** – Atividade da Glutaciona peroxidase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.....141
- Figura 31** – Atividade da Glutaciona S-transferase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.....142
- Figura 32** - Procedimentos pré-germinativos para sementes de mamona cultivar BRS 149 Nordeste. Sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE), germinação máxima – G_{max} (%), tempo para alcançar 50% da germinação - T50 (horas), índice de uniformidade da germinação - U8416 (horas), área abaixo da curva de germinação – AAC (adimensional).....179
- Figura 33** - Curvas de embebição das sementes da cultivar BRS 149 Nordeste de *R. communis*. Sementes inteiras (SI), sementes sem tegumentos (SST) e sementes escarificadas (SE).....181
- Figura 34** - Condutividade elétrica ($\mu\text{S.cm}^{-1}.\text{g}^{-1}$) e pH de exsudato das sementes da cultivar BRS 149 Nordeste de *R. communis*, durante o período de três, seis, doze e vinte e quatro horas.....183
- Figura 35** - Resultados do teste de tetrazólio em lote de das sementes da cultivar BRS 149 Nordeste de *R. communis*. (A). Comparação entre a porcentagem de Sementes Viáveis (SV) com Germinação Sementes Inteiras (GSI), Germinação Sementes Sem Tegumentos (GSST), Germinação Sementes Escarificadas (GSE), Plântulas Normais

Sementes Inteiras (PNSI), Plântulas Normais Sementes Sem Tegumentos (PNSST) e Plântulas Normais Sementes Escarificadas (PNSE) (B).....185

Figura 36 - Germinação de sementes da cultivar BRS 144 Nordestina de *R. communis* do controle e sementes após serem submetidas ao envelhecimento acelerado durante dez dias a 40°C e 85% UR. (A) Germinação máxima – Gmax, (B) Tempo para alcançar 50% de germinação – T50, (C) área abaixo da curva de germinação – AAC, (D) Uniformidade de germinação medindo-se o intervalo de tempo em horas entre 84% e 16% de germinação de sementes - U8416.....187

Figura 37 - (A) Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) do exsudato das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* do controle e sementes após serem submetidas ao EA durante dez dias a 40°C e 85% UR, imersas em 75 mL de água ultrapura, após diferentes períodos de embebição: 3, 6, 12 e 24 horas; (B) Valores do pH do exsudato das sementes medido no pHmetro durante os períodos de 3, 6, 12 e 24 horas.....190

Figura 38 - Teste de Tetrazólio do lote das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* do controle e após serem submetidas ao EA durante dez dias a 40°C e 85% UR. (A) Porcentagem de sementes viáveis; (B) Coloração das sementes viáveis e (C) Coloração das sementes inviáveis.....192

Figura 39 – Determinação de malonaldeído (MDA) na cultivar BRS 149 Nordestina nas condições controle e após EA. (A) semente inteira sem tegumento e (B) Em embrião. (MS) massa seca.....193

Figura 40 – Atividade da Superóxido dismutase (U SOD.mg⁻¹ de proteína) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento e (B) Em embrião.....195

Figura 41 – Atividade da Catalase (H₂O₂ min⁻¹. μg^{-1} prot) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*, nas condições controle e após EA (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.....196

Figura 42 – Atividade da ascorbato peroxidase (mmol ASA min⁻¹ μg^{-1} prot) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.....197

Figura 43 – Atividade da Monodehidroascorbato redutase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ prot) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião..... 198

Figura 44 – Atividade da Dehidroascorbato redutase (mM GSSG min⁻¹. μg de prot) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.....199

Figura 45 – Atividade da Glutathiona redutase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ prot) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.....200

Figura 46 – Atividade da Glutathiona peroxidase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ prot) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.....202

Figura 47 – Atividade da Glutathione S-transferase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.....203

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas (%), número de sementes não germinadas (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g) de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*, em sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST), sementes escarificadas (SE).....76
- Tabela 2** – Grau de umidade da semente (%), temperatura (°C) e umidade relativa (UR) do ambiente (%), antes (controle) e após as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* serem submetidas ao teste envelhecimento acelerado (TEA) a 40 °C e 85% de umidade, durante o período de 5, 10 e 15 dias.....84
- Tabela 3** - Germinação das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* antes (controle) e após a submissão ao envelhecimento acelerado durante o período de 5, 10 e 15 dias a 40°C e 85% UR. Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), número de sementes não germinadas (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g).....85
- Tabela 4** – Comparação entre as condições controle e após EA das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*, durante o período de dez dias, nas condições: umidade interna das sementes e do ambiente (temperatura e umidade relativa).....88
- Tabela 5** - Germinação das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *R. communis* não submetidas e submetidas ao envelhecimento acelerado, durante dez dias a 40°C e 85% UR. Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), número de sementes não germinadas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g).....92
- Tabela 6** – Identificação dos 42 genes mais significativos.....104
- Tabela 7** – Metabólitos identificados com base em análise de identificação LC–MS, com o uso do programa METLIN.....121
- Tabela 8** – Classificação e estrutura dos metabólitos encontrados.....123
- Tabela 9** – Correlação de Pearson entre os dados das enzimas antioxidantes da cultivar BRS 188 Paraguaçu. Glutathione S-transferase (GST), Monodehidro ascorbato redutase (MDHAR), Superóxido dismutase (SOD), Glutathione redutase (GR), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), Ascorbato peroxidase (APX), Dehidroascorbato redutase (DHAR).....144

Tabela 10 - Parâmetros da germinação das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*: germinação realizadas com sementes inteira com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST), sementes escarificadas (SE). Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas (%), número de sementes não germinadas (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g).....180

Tabela 11 - Comparação entre as condições controle e após EA das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*, durante o período de dez dias, nas condições: umidade interna das sementes e do ambiente (temperatura e umidade relativa).....186

Tabela 12 - Germinação das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *Ricinus communis* do controle (não submetidas ao EA) e sementes após serem submetidas ao envelhecimento acelerado durante dez dias a 40°C e 85% UR. Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), número de sementes não germinadas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g).....188

Tabela 13 – Correlação de Pearson entre os dados das enzimas antioxidantes das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*. Glutathione S-transferase (GST), Monodehidro ascorbato redutase (MDHAR), Superóxido dismutase (SOD), Glutathione redutase (GR), Catalase (CAT), Glutathione peroxidase (GPX), Ascorbato peroxidase (APX), Dehidroascorbato redutase (DHAR).....204

LISTA DE SIGLAS

$^1\text{O}_2$ -	Oxigênio singlete
AAC -	Área Abaixo da Curva
ABA -	Ácido abscísico
AGL -	Ácido graxo livre
AGPI -	Ácido graxo poliinsaturado
AGS -	Ácido graxo saturado
ANA -	Agência Nacional de Água
APX -	Ascorbato peroxidase
AR -	Aldose redutase
AsA -	Ascorbato
AsA-GSH -	Ciclo ascorbato glutationa
Asc $^{\cdot}$ -	Radical ascorbila
AscH $^-$ -	Ácido ascórbico
ATP -	Trifosfato de adenosina
BOD -	Demanda biológica de oxigênio
BSA -	Albumina de soro bovino
Ca $^{2+}$ -	Cálcio
cAPX -	Ascorbato peroxidase citosólica
CAT -	Catalase
cDNA -	DNA complementar
CDNB -	1-cloro-2,4-dinitrobenzoico
CH $_2$ -	Grupo metileno
CHCl $_3$ -	Ácido nonadecanóico metil ester
CIS -	Isomeria, os grupos ligantes iguais ficam do mesmo lado
CO $_2$ H -	Ácido carboxílico
CO $_3^{\cdot-}$ -	Radical ânion carbonato
Coenzima Q10 -	Ubiquinol ou ubiquinona
Cu -	Cobre
Cu/Zn-SOD -	Cobre/ zinco superóxido dismutase
Cu $^{n+}$ -	Íon de cobre
DAG -	1,2 -diacilglicerol

DEPC -	Dicarbonato de dietila
DHAR -	Dehidroascorbato redutase
DIC -	Delineamento inteiramente casualizado
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
DTNB -	Ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico
DTT -	1,4 ditiotreitól
e ⁻ -	Elétron
EC -	No inglês Enzyme Commission Numbers
EA -	Envelhecimento acelerado
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-ácetico
EMBRAPA -	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERN -	Espécie reativa de nitrogênio
ERO -	Espécie reativa de oxigênio
F -	Fator de diluição
FAD -	Dinucleótido de flavina e adenina
FAO STAT -	Food and Agriculture Organization of the United Nations
Fe -	Ferro
Fe ²⁺ / Fe ⁿ⁺ -	Íon ferroso
Fe-SOD -	Ferro superóxido dismutase
GA -	Ácido giberélico
GC-MS -	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
GEE -	Gases do efeito estufa
gmAPX -	Ascorbato peroxidase de membrana de glioxissomos
Gmax -	Germinação máxima
GMD -	Banco de dados Golm Metabolome
GPX -	Glutationa peroxidase
GR -	Glutationa redutase
GSH -	Glutationa reduzida
GSSG -	Glutationa oxidada
GST -	Glutationa S-transferase
H ₂ O -	Água
H ₂ O ₂ -	Peróxido de hidrogênio
HO	Hidroxila

HO [•] -	Radical hidroxila
HO ² -	Hidroperóxidos/ Hidroperoxila
HOCl -	Ácido hipocloroso
HOO [•] -	Radical peroxila
KCl -	Cloreto de potássio
L [•] -	Radical alquila
LC-MS -	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
LH -	Ácido graxo
LiCl -	Cloreto de lítio
LIF -	Fluorescência induzida por laser
LO [•] -	Radical lipídico
LOO [•] -	Radical peróxila
LOOH -	Hidroperóxidos lipídicos
MAG -	Monoacilglicerol
mAPX -	Ascorbato peroxidase mitocondrial
MDA -	Malonaldeído
MDHAR -	Monodehidroascorbato redutase
MeOH -	Metanol
MI -	Ministério da Integração
miRNA -	RNA de interferência
MMS -	Massa de mil sementes
Mn -	Manganês
Mn-SOD -	Manganês superóxido dismutase
mRNA -	Ácido ribonucleico mensageiro
MS -	Massa seca
NaBr -	Brometo de sódio
NaCl -	Cloreto de sódio
NADPH + H ⁺ -	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NADH -	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
Na-DOC -	Desoxicolato de sódio
NADP ⁺ -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
NBT -	Cloreto de tetrazólio nitroazul
NCBI -	National Center for Biotechnology Information

ncRNA -	RNA não codificante
Ni -	Níquel
NI-SOD -	Níquel superóxido dismutase
O ₂ -	Oxigênio molecular
O ₂ ^{•-} -	Superóxido
O ₃ -	Ozônio
¹ O ₂ -	Oxigênio singlete
PCA -	Análise de Componentes Principais
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi -	Fosfato inorgânico
PIR -	Proteínas inativadoras de ribossomos
PNPB -	Programa Nacional de Produção de Biodiesel
POX -	Peroxidase
PT -	Proteínas totais
PVP -	Polivinilpirrolidona
R -	Pode ser grupos alifáticos, aromáticos ou heterocíclico
R1/R2 -	Radicais
RAS -	Regras de análise de semente
Read -	Fragmento sequenciado
RFO -	Oligossacarídeos da família rafinose
RNA-	Ácido ribonucleico
RO [•] -	Radical alcóxila
ROO [•] -	Radical alquiperóxila/ Radical peróxila
ROOH -	Hidroperóxido orgânicos
sAPX -	Ascorbato peroxidase estromal
SDS -	Dodecil sulfato de sódio
SE -	Semente escarificada
SH -	Sulfidril
SI -	Semente inteira com tegumento, mas sem carúncula
SOD -	Superóxido dismutase
SST -	Semente sem tegumento
T -	Temperatura
T50 -	Tempo para alcançar 50% de germinação

TA -	Temperatura ambiente
TAG -	Triacilglicerol
tAPX -	Ascorbato peroxidase tilacoidal
TBA -	Ácido tiobarbitúrico
TCA -	Ácido tricloroacético
TDC -	Teste de deterioração controlado
TNB -	Ânion tiolato
TRANS -	Isomeria, os grupos ligantes iguais ficam de lados opostos
Um -	Umidade da semente
U -	Unidade de atividade (SOD e CAT)
U8416 -	Uniformidade de germinação medindo-se o intervalo de tempo em horas 84% e 16% de germinação de sementes
UR -	Umidade relativa
URTAL -	Umidade relativa e temperatura do ambiente de laboratório
UV -	Ultravioleta
Vitamina A -	Retinol
Vitamina C -	Ácido ascórbico
Vitamina E -	Tocoferol
X -	Pode ser sulfato, nitrito, haletos
Zn -	Zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	33
2. OBJETIVOS.....	37
2. 1 Objetivo geral	37
2. 2 Objetivos específicos.....	37
3. Referências	38
Capítulo 1: <i>Ricinus communis</i> L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo.....	43
CAPÍTULO 02: Métodos e técnicas utilizadas para análise de sementes e avaliação do perfil fisiológico, bioquímico, metabolômico e transcriptômico... ..	44
1. Material biológico e condução do experimento	44
2. Biometria das sementes	49
3. Peso de mil sementes	49
4. Determinação do grau de umidade.....	49
5. Monitoramento da umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA)...	50
6. Teste de germinação.....	50
7. Condutividade elétrica e avaliação do pH do exsudato das sementes	51
8. Teste de tetrazólio	51
9. Curva de embebição	52
10. Envelhecimento acelerado (EA).....	52
11. Embebição das sementes.....	52
12. Extração de RNA total.....	53
13. RNA-seq	54
14. Análises metabolômicas.....	55
14.1 Metabólitos primários	55
14.2 Metabólitos secundários	56

15. Determinação de malonaldeído (MDA).....	57
16. Extração e quantificação de proteínas totais	58
17. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes.....	59
17.1 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	59
17.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	61
17.3 Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1)	61
17.4 Monodehidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4)	61
17.5 Glutaciona redutase (GR, EC 1.6.4.2)	62
17.6 Dehidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1)	62
17.7 Glutaciona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9).....	63
17.8 Glutaciona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)	63
18. Análise dos dados.....	63
19. REFERÊNCIAS.....	64
CAPÍTULO 03: Efeito do envelhecimento acelerado no perfil fisiológico, bioquímico e molecular em sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de <i>Ricinus communis</i> L.	68
RESUMO.....	68
1. INTRODUÇÃO.....	69
2. MATERIAIS E METÓDOS	71
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
3.1 Determinação da qualidade inicial das sementes de mamona da cultivar BRS 188 Paraguaçu	72
3.1.1 Biometria, peso de mil sementes, determinação do grau de umidade das sementes, determinação da umidade relativa e temperatura do ambiente.....	72
3.1.2 Procedimentos pré-germinativos em sementes empregadas no teste de germinação: sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE).....	74
3.1.3 Curva de embebição para sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE)	77

3.1.4 Determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato	79
3.1.5 Teste de tetrazólio	81
3.2 Sementes submetidas a tratamento de envelhecimento acelerado	83
3.3 Análises das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de <i>Ricinus communis</i> L. submetidas ao EA	87
3.3.1 Determinação do grau de umidade da semente, UR (%) e TA (°C)	87
3.3.2 Teste de germinação.....	89
3.3.3 Determinação da condutividade elétrica e pH exsudado das sementes...	93
3.3.4 Teste de tetrazólio	96
3.3.5 RNA-seq	99
3.3.6 Análises Metabolômicas.....	110
3.3.6.1 Determinação dos metabólitos primários dos embriões das sementes por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)	110
3.3.6.2 Determinação dos metabólitos secundários dos embriões das sementes e do tegumento das sementes (LC-MS)	120
3.3.7 Peroxidação lipídica das sementes inteiras (sem tegumento) e embrião através da determinação de malonaldeído (MDA).....	125
3.3.8 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes:.....	129
3.3.8.1 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	129
3.3.9.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	131
3.3.9.3 Enzimas do ciclo do ascorbato-glutationa.....	134
3.3.9.4 Glutationa peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9)	140
3.3.9.5 Glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)	142
3.3.10 Correlação entre as enzimas antioxidantes	143
4. CONCLUSÃO	145
5. REFERÊNCIAS.....	148
CAPÍTULO 04: Efeito do envelhecimento acelerado (EA) em sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de <i>Ricinus communis</i> L.	173

RESUMO.....	173
1. INTRODUÇÃO.....	174
2. MATERIAL E METÓDO.....	176
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	176
3.1 Determinação da qualidade inicial de sementes de mamona da cultivar BRS 149 Nordestina Paraguaçu.....	176
3.1.1 Biometria, peso de mil sementes (MMS) determinação do grau de umidade das sementes (U), determinação da umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA).....	176
3.1.2 Procedimentos pré-germinativos em sementes empregadas no teste de germinação: sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE).....	178
3.1.5 Curva de embebição: Semente inteira com tegumento (SI), semente sem tegumento (SST), semente escarificada (SE).....	180
3.1.3 Determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato das sementes.....	182
3.1.4 Teste de tetrazólio.....	184
3.2 Análises das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina (<i>Ricinus communis</i> L.): controle e das submetidas ao EA.....	185
3.2.1 Determinação do grau de umidade da semente, UR e TA.....	186
3.2.2 Teste de germinação.....	186
3.2.3 Determinação da condutividade elétrica e pH exsudato das sementes...189	189
3.2.4 Teste de tetrazólio.....	191
3.3 Peroxidação lipídica das sementes inteiras (sem tegumento) e embrião através da determinação de malonaldeído (MDA).....	192
3.4 Determinação da atividade enzimática das enzimas antioxidantes.....	194
3.4.1 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	194
3.4.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	196
3.4.3 Enzimas do ciclo do ascorbato/glutationa.....	197
3.4.4 Glutationa peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9).....	201

3.4.5 Glutathiona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)	202
3.5 Correlação entre as enzimas antioxidantes	203
4. CONCLUSÃO	204
5. REFERÊNCIA	205
CONSIDERAÇÕES FINAIS	216
ANEXO.....	217

1. INTRODUÇÃO GERAL

Ricinus communis L., conhecida vulgarmente como mamona, é uma oleaginosa pertencente à família Euphorbiaceae. Esta espécie distribui-se pelos trópicos e subtropicais, sendo bem adaptada às regiões tropicais. Seu óleo têm uma vasta aplicabilidade industrial, pode ser utilizado como insumo na fabricação de tintas e vernizes, lubrificantes utilizados em aeronaves, fluidos hidráulicos, plásticos, próteses ósseas e de vidro à prova de balas, produção de cosméticos e produtos usados na medicina, dentre outras aplicações (OGUNNIYI, 2006; SUJATHA *et al.*, 2008; HAJRAH *et al.*, 2019).

R. communis, além de possuir uma grande importância econômica, apresenta relevância social, principalmente para o semiárido nordestino, devido às suas características, por ser relativamente bem adaptada em condições de baixa precipitação pluviométrica, apresentar baixo custo de produção, fácil manejo e mercado consumidor. Também pode ser consorciada com outras culturas, tornando-se assim uma excelente opção para a agricultura familiar desta região brasileira (BELTRÃO *et al.*, 2003; CÉSAR e BATALHA, 2010; VASCONCELLOS, 2012).

O óleo de mamona é extraído de sementes, apresenta variabilidade em sua cor, cheiro e sabor e é constituído em sua maioria (85-90%) de óleo de rícino, caracteristicamente constituído do ácido ricinoleico (12-hidroxi-cis-9-octadecenóico) que possui a presença de hidroxila e insaturação. O grupo hidroxila confere propriedades incomuns ao óleo de mamona, como alta viscosidade, alta densidade e solubilidade em álcool. Estes índices físicos e químicos que caracterizam o óleo variam de acordo com a localização, plantio, entre outros (MESSETTI *et al.*, 2010; RIOS *et al.*, 2019; HAO *et al.*, 2020; MISHRA *et al.*, 2020; RAMAIAH *et al.*, 2020).

Principalmente, por ser uma semente oleaginosa, a longevidade das suas sementes é um fator chave, complexo, de importância ecológica e agrônômica. As sementes passam por processos de envelhecimento que limitam sua viabilidade, acabam causando danos ao DNA, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. Estes, em geral, são considerados como os maiores contribuidores para a deterioração de sementes, sendo capazes de causar perda da propriedade básica da semente, ou seja, a capacidade de germinar. O envelhecimento das sementes é uma questão econômica e científica vital, relacionada

à resistência das sementes que depende de fatores internos (genéticos, estruturais e fisiológicos) e externos (bióticos e abióticos) (BAILLY, 2004; HUANG *et al.*, 2015; KUREK *et al.*, 2019; MIRA *et al.*, 2020).

O desempenho de sementes de um determinado lote depende da qualidade de suas sementes, que por sua vez está relacionada a fatores intrínsecos como genética, pureza, sanidade. Além de fatores extrínsecos, como condições de armazenamento, temperatura, umidade, dentre outros (HUANG *et al.*, 2015; RAHMAN e CHO, 2016; MEDEIROS *et al.*, 2020). A qualidade também pode ser influenciada pelas condições da planta mãe na formação das sementes, colheita, beneficiamento, bem como presença de patógenos.

A viabilidade da semente refere-se ao estágio em que uma semente é metabolicamente ativa e contém enzimas capazes de catalisar as reações necessárias para a germinação e crescimento da plântula. O vigor é definido como a propriedade da semente que determina o potencial para emergência uniforme, rápida e o desenvolvimento de plântulas normais sob ampla gama de condições de campo, ou seja, a combinação de características que determinam o potencial de alto desempenho após a sementeira (MARCOS-FILHO, 2015b; SINGH *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2017).

Fatores como o grau de umidade, danos mecânicos, pesticidas, embalagens, envelhecimento, temperatura e umidade relativa (UR) são responsáveis pelo declínio da qualidade de sementes durante o armazenamento (TRZECIAK, 2012; SINGH *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2017). Condições adequadas de armazenamento são importantes, para garantir a qualidade quanto aos aspectos físicos, fisiológicos e sanitários, que permitirão manter a qualidade e a viabilidade da semente por um maior período (MARCOS-FILHO, 2015b; SINGH *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2017; DRUMOND *et al.*, 2020).

Altas temperaturas e elevada umidade relativa causam uma rápida deterioração nas sementes, principalmente em sementes oleaginosas por apresentarem altos teores de lipídeos e serem mais susceptíveis a deterioração. Isto porque estes fatores levam a alterações bioquímicas como o aumento da atividade hidrolítica, aumento da respiração, danos à membrana celular, peroxidação lipídica e, conseqüentemente, a geração de subprodutos tóxicos, causando uma redução da

viabilidade e do vigor. Acontecem também, alterações enzimáticas, como degradação e inativação de enzimas importantes para o desenvolvimento de diferentes processos metabólicos (SHARMA *et al.*, 2012; TRZECIAK, 2012; ABREU *et al.*, 2013; MARCOS-FILHO, 2015b).

O envelhecimento das sementes pode ocorrer naturalmente ou artificialmente. Visando avaliar o vigor podem ser realizados tratamentos, nos quais as sementes são submetidas a condições adversas, com alta umidade e temperatura, artificialmente obtidas. O envelhecimento acelerado (EA), é considerado um teste de vigor, simula condições de estresse em sementes, que pode levar ao aumento da taxa de respiração celular, aumentando o estresse oxidativo e acelerando os processos metabólicos que levam a deterioração. Como os testes de vigor são medidas relativas, pode-se comparar o vigor de sementes com diferentes níveis de qualidade fisiológica, antes e após serem submetidas a condições que afetam processos metabólicos e levam a deterioração (TESNIER *et al.*, 2002; PIÑA-RODRIGUES *et al.*, 2004; RAJJOU *et al.*, 2008; LAKSHMI; JIJEEESH; SEETHALAKSHMI, 2021; LOURENÇO e DE SÁ, 2021).

Todos os organismos aeróbicos produzem espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), esta produção pode ser natural da célula ou devido a desequilíbrio que gera acúmulo dessas moléculas. Em baixas concentrações, ERO podem atuar como sinalizador celular, na quebra da dormência e germinação das sementes, bem como nas defesas celulares contra estresses bióticos e abióticos. As ERO desempenham papéis importantes em todas as fases da vida das sementes, desde germinação (embriogênese) até a morte celular (morte programada), com produção dependente do estado metabólico e fisiológico da semente (SOARES e MACHADO, 2007; AHMAD *et al.*, 2008; SHABAN, 2013; RATAJCZAK *et al.*, 2019).

Quando as ERO são produzidas de forma exacerbada, geralmente devido a estresse abiótico, biótico e/ou envelhecimento celular, ocorrem danos às células (VENKATESWARLU *et al.*, 2013; SEWELAM *et al.*, 2016; BAILLY, 2019). As ERO podem iniciar e levar ao envelhecimento das sementes, com conseqüente degradação dos fosfolipídios de membrana celular e deterioração estrutural e funcional de lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, afetando consideravelmente a viabilidade e o vigor (BAILLY, 2004; COSTA e HUANG, 2007; SHARMA *et al.*, 2012; RATAJCZAK *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2015; SINGH *et al.*, 2017; RATAJCZAK *et al.*, 2019). A

peroxidação lipídica modifica a permeabilidade da membrana, sendo considerado como o principal processo associado ao envelhecimento e diminuição da viabilidade das sementes (RATAJCZAK *et al.*, 2015).

A proteção contra as ERO, envolve mecanismo de ação enzimática e não enzimática (RIBEIRO *et al.*, 2005; VENKATESWARLU *et al.*, 2013). Enzimas que possuem papel fundamental durante o estresse oxidativo evidenciam a atuação da planta frente a um estresse. A resposta celular é iniciada através de um processo multifatorial; e tem como função inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais (BAILLY, 2004; BARBOSA *et al.*, 2010; BAILLY, 2019). O acúmulo das ERO induzido por estresse é combatido por um sistema antioxidante enzimático que inclui uma variedade de enzimas, tais como: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutatona peroxidase (GPX), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST) e metabólitos não enzimáticos, tais como: ascorbato, glutatona, tocoferol, compostos fenólicos, alcalóides, carotenoides, aminoácidos (GILL e TUJETA, 2010; VENKATESWARLU *et al.*, 2012; DAS *et al.*, 2015).

A qualidade de sementes de mamona submetida ao envelhecimento acelerado pode ser relacionada com dados fisiológicos, bioquímicos, genéticos e moleculares, que permitem a identificação de marcadores de qualidade, importantes para conferir a prevenção e/ou a identificação do estresse oxidativo e deterioração das sementes, garantindo assim o uso de lotes de sementes com qualidade e vigor para o plantio, evitando gastos na produção com sementes inviáveis (SANTOS *et al.*, 2016; DRUMOND *et al.*, 2020; ÖNDER *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2021).

A perda de viabilidade e vigor devido ao envelhecimento das sementes representa um grande desafio para o armazenamento, principalmente quando envolve bancos de sementes, visando proteção da variabilidade do material genético. Portanto, é preciso avaliar os mecanismos que regulam o envelhecimento das sementes para identificar possíveis marcadores bioquímicos, fisiológicos, moleculares e genéticos associados a deterioração das sementes durante o armazenamento em curto e longo prazos (WALTERS *et al.*, 1998; CORBINEAU *et al.*, 2002; KRANNER *et al.*, 2006; BIRTI *et al.*, 2011; HU *et al.*, 2012; YAO *et al.*, 2012; NAGEL *et al.*, 2014). Neste contexto, este estudo visa avaliar o efeito de condições de envelhecimento

acelerado nas características fisiológicas, bioquímicas e moleculares de sementes das cultivares BRS 188 Paraguaçu e BRS 149 Nordestina, visando identificar marcadores bioquímicos, fisiológicos, moleculares e genéticos informativos da deterioração das sementes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar marcadores fisiológicos, bioquímicos e moleculares para avaliar a qualidade de sementes para cultivares BRS 188 Paraguaçu e BRS 149 Nordestina de *Ricinus communis* L. quando submetidas ao envelhecimento acelerado (EA).

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a qualidade inicial das sementes das cultivares, através da avaliação da biometria, peso de mil sementes, teste de germinação, curva de embebição, umidade, tetrazólio, condutividade elétrica e pH do exsudato das sementes;
- Comparar o comportamento fisiológico das sementes das cultivares, antes e após a condição de envelhecimento acelerado, através dos testes de germinação, tetrazólio, condutividade elétrica e pH do exsudato das sementes;
- Identificar a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), dehidroascorbato redutase (DHAR), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPX) e glutatona S-Transferase (GST)) nas sementes inteiras e em embrião das cultivares;
- Verificar a peroxidação lipídica nas sementes inteiras e no embrião das cultivares;
- Avaliar o perfil de metabólitos primários (nos embriões) e secundários (nos embriões e tegumentos) das sementes submetidas a condição de envelhecimento acelerado da cultivar BRS 188 Paraguaçu, assim como os transcritos pela técnica de RNA-seq;
- Identificar marcadores fisiológicos, bioquímicos e moleculares de qualidade em sementes de *R. communis*, quanto ao vigor, viabilidade e deterioração.

3. Referências

- ABREU, L. A. S.; CARVALHO, M. L. M.; GOMES PINTO, C. A.; KATAOKA, V. Y.; SILVA, T. T. A. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 240-247, 2013.
- AHMAD, P.; SARWAT, M; SHARMA, S. Reactive Oxygen Species, Antioxidants and Signaling in Plants. **Journal of Plant Biology**, v. 51, n. 3, p.167-173, 2008.
- BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 02, p. 93-107, 2004.
- BAILLY, C. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. **Biochemical Journal**, v. 476, p. 3019–3032, 2019.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BELTRÃO, N. E. M.; MELO, F.B.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S. Mamona: Árvore do Conhecimento e Sistemas de Produção para o Semi-árido Brasileiro. Campina Grande, PB: MAPA, 2003. 19 p
- BIRTI C´, S.; COLVILLE, L.; PRITCHARD, H. W.; PEARCE, S. R.; KRANNER, I. Mathematically combined half-cell reduction potentials of low-molecular-weight thiols as markers of seed ageing. **Free Radical Research**, v. 45, n. 9, p. 1093–1102, 2011.
- CARVALHO, E. R.; OLIVEIRA, J. A. M.; DENILSON, P. D.; SILVA, H. W. L.; CASSIANO G. M. Pre-packing cooling and types of packages in maintaining physiological quality of soybean seeds during storage. **Journal of Seed Science**, v. 38, n. 2, 129-139, 2016.
- CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O. Biodiesel production from castor oil in Brazil: A difficult reality, **Energy Policy**, v. 38, p. 4031–4039, 2010.
- CORBINEAU, F.; GAY-MATHIEU, C.; VINEL, D. Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. **Physiologia Plantarum**, v. 116, p. 489–496, 2002.
- COSTA, M.; HUANG, B. Changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation for Bentgrass species in repose to drought stress. **American Society for Horticultural Science**, v. 132, n. 3, p. 319-32, 2007.
- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactiveoxy genspecies (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. **Frontiers in environmental Science**, v. 2, n. 53, p. 01-13, 2014.
- DRUMOND, A. A. L.; SALES, J. de F.; Zuchi, J.; R, Osvaldo; Camelo, G. N.; Souza, M. M. V. Physiological quality of castor bean seed genotypes stored at two temperatures. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 42, p. 01-10, 2020.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909-930, 2010.

- HAJRAH, N. H; ABDUL, W. M; AL-GARNI, S. M.; SHEIKH, A.; AHMED, M. M. M.; HALL, N.; SAINI, K. S.; SABIR, J. S. M.; BORA, R. S. Gene expression profiling to elucidate the pharmacological and toxicological effects of *Ricinus communis* L. leaf extract in mammalian cells. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.33, n. 1, p. 397-407, 2019.
- HAO, P.; SUN, B.; CHU, X.; SUN, Y.; XING, X.; LIU, S.; TANG, E.; XU, X. Effect of castor oil based urethane oligomer on properties of UV-curable pressure sensitive adhesive for peelable wafer dicing tape. **Journal of Adhesion Science and Technology**, p. 01-12, 2020.
- HASANUZZAMAN, M. HOSSAIN, M. A. SILVA, J. A. T. S. FUJITA, M. Plant Response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In: VENKATESWARLU, B; SHANKER, A. K.; SHAKER, C.; MAHESWARI, M. **Crop stress and its management: perspectives and strategies**. New York: Springer; 2012. p. 261-301.
- HU, X.; HAO, C.; CHENG, Z-M.; ZHONG, Y. Genome-Wide Identification, Characterization, and Expression Analysis of the Grapevine Superoxide Dismutase (SOD) Family. **International Journal of Genomics**, p. 01-13, 2019.
- HUANG, M.; WANG, Q. G.; ZHU, Q. B.; QIN, J. W.; HUANG, G. Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. **Seed Science & Technology**, v. 43, p. 337-366, 2015.
- KRANNER, I.; BIRTIC, S; ANDERSON, K. M.; PRITCHARD, H. W. Glutathione halfcell reduction potential: A universal stress marker and modulator of programmed cell death? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 40, p. 2155–2165, 2006.
- KUREK, K.; PLITTA-MICHALAK, B.; RATAJCZAK, E. Reactive Oxygen Species as Potential Drivers of the Seed Aging Process. **Plants**, v. 8, n. 174, 2019.
- LAKSHMI, C. J.; JIJESH, C. M.; SEETHALAKSHMI, K. K. Impact of accelerated aging process on seed quality and biochemical changes of *Dendrocalamus sikkimensis* Gamble. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 43, n. 34, p. 1- 9, 2021.
- LOURENÇO, F. M. DOS S; DE SÁ, M. E. Accelerated Aging Test in Thyme Seeds (*Thymus vulgaris* L.). **Journal of Agricultural Studies**, v. 9, n. 1, p. 32-43, 2021.
- MARCOS-FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015b.
- MEDEIROS, A. D.; PINHEIRO, D. T.; XAVIER, W. A.; DA SILVA, L. J.; DIAS, D. C. F. DOS S. Quality classification of *Jatropha curcas* seeds using radiographic images and machine learning. **Industrial Crops & Products**, v.146, p. 01-07, 2020.
- MESSETTI, M. A.; DOS SANTOS, A. M.; DE ANGELIS, D. F.; CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Estudo do derivado do óleo de *Ricinus communis* L. (mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.77, n. 02, p. 301-308, 2010.

- MIRA, S.; PIRREDDA, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, M.; MARCHESSI, J. E.; MARTÍN, C. DNA methylation and integrity in aged seeds and regenerated plants. **Seed Science Research**, p. 01-09, 2020.
- MISHRA, B.; CHANDC, S.; SANGWANA, N. S. ROS management is mediated by ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in co-ordination with secondary metabolic pathway under cadmium stress in *Withania somnifera*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 620–629, 2019.
- NAGEL, M.; KRANNER, I.; NEUMANN, K.; ROLLETSCHEK, H.; SEAL, C.; COLVILLE, L.; FERNÁNDEZ-MARÍN, B.; BÖRNER, A. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental condition in barley. **Plant, Cell & Environment**, v. 38, n. 6, p. 1011–1022, 2014.
- OGUNNIYI, D. S. Castor oil: a vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 1086–1091. 2006.
- ÖNDER, S.; TONGUÇ, M.; GÜVERCİN, D.; KARAKURT, Y. Biochemical changes stimulated by accelerated aging in safflower seeds (*Carthamus tinctorius* L.). **Journal of Seed Science**, v.42, p 1-12, 2020.
- PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 283-297.
- RAHMAN, A.; CHO, B. K. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. **Seed Science Research**, v. 26, p. 285–305, 2016.
- RAJJOU, L.; LOVIGNY, Y.; GROOT, S. P. C.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; JOB, D. Proteome-Wide Characterization of Seed Aging in Arabidopsis: A Comparison between Artificial and Natural Aging Protocols[W][OA]. **Plant Physiology**, v. 148, p. 620–641, 2008.
- RAMAIAH, K. P.; MISHRA, K.; ATKAR, A.; SRIDHAR, S. Pervaporation Separation of Chlorinated Environmental Pollutants from Aqueous Solutions by Castor Oil Interpenetrating Network Membranes. **Journal Pre-proofs**, p. 01-42, 2020.
- RATAJCZAK, E.; MAŁECKA, A.; BAGNIEWSKA-ZADWORNIA, A.; KALEMBA, E.M. The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. **Journal Plant Physiology**, v. 174, 147–156, 2015.
- RATAJCZAK, E.; MAŁECKA, A.; CIERESZKO, I.; STASZAK, A. M. Mitochondria Are Important Determinants of the Aging of Seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, p. 01-12, 2019.
- RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.
- RIOS, I. C.; CORDEIRO, J. P.; ARRUDA, T. B. M. G.; RODRIGUES, E. A.; UCHOA, A. F. J.; LUNAC, M. T.; CALVALCANTE, C. L.; RICARDO, N. M. P. S. Chemical

- modification of castor oil fatty acids (*Ricinus communis*) for biolubricant applications: An alternative for Brazil's green Market. **Industrial Crops & Products**, p. 01-08, 2019.
- SANTOS, H. O.; De CARVALHO, M. L. M.; CALDEIRA, C. M.; COELHO, S. V. B.; PINHO, E. V. de R. V.; OLIVEIRA, J. A. Physiological and biochemical aspects of castor beans seeds deterioration stored in different packaging conditions and temperatures. **Journal of Seed Science**, v.38 n.3, p.241-247, 2016.
- SHABAN, B. Aging in orthodox seeds is a problem. **International journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 1, n. 11, p. 1296-1301, 2013.
- SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of Botany**, p. 01-26, 2012.
- SINGH, A. S.; KUMARI, S.; MODI, A. R.; GAJERA, B. B.; NARAYANAN, S.; KUMAR, N. Role of conventional and biotechnological approaches in genetic improvement of castor (*Ricinus communis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 55-62, 2015.
- SINGH, J.; PAROHA, S.; MISHRA, R. P. Factors Affecting Oilseed Quality during Storage with Special Reference to Soybean (*Glycine max*) and Niger (*Guizotia abyssinica*) Seeds. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n.10, p. 2215-2226, 2017.
- SOARES, A. M. dos S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 1, n. 1, p. 01-11, 2007.
- SUJATHA, M.; REDDY, T. P.; MAHASI, M. J. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 424–435, 2008.
- TESNIER, k.; STROOKMAN-DONKERS, H. M.; VAN PIJLEN, J. G.; VAN DER GEEST, A. H. M.; BINO, R. J.; GROOT, S. P. C. **Seed Science & technology**, v. 30, p. 149-165, 2002.
- TRZECIAK, Mário Bórges. **Formação de semente de soja: aspectos físicos, fisiológicos e bioquímicos**. 2012, 131f. Tese – Apresentada a Pós- Graduação em Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Piracicaba, 2012.
- VASCONCELLOS, Andreia. **Qualidade fisiológica de sementes de mamona e gengilim provenientes do consórcio**. 2012, 18f. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Departamento de Agroecologia e Agropecuária, Universidade Estadual da Paraíba, Lagoa Seca, 2012.
- WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging, **Seed Science Renault**, v. 8, p. 223-244, 1998.
- YAO, Z.; LIU, L.; GAO, F.; RAMPITSCH, C.; REINECKE, D. M.; OZGA, J. A.; AYELE, B. T. Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. **Journal Plant Physiology**, v.169, p. 1477–1488, 2012.

ZHANG, K.; ZHANG, Y.; SUN, J.; MENG, J.; TAO, J. Deterioration of orthodox seeds during ageing: Influencing factors, physiological alterations and the role of reactive oxygen species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, 475–485, 2021.

Capítulo 1: *Ricinus communis* L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo

O Capítulo 1 é o referencial teórico desta tese, foi publicado no formato de livro, com o título: *Ricinus communis* L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo, pela EDUFBA. Organizadoras: Luzimar Gonzaga Fernandez, Thamires Soares Ricardo Jesus, Patrícia Campos Santos.

Disponível como anexo no final desta tese e no link:

https://repositorio.ufba.br/handle/ri/34561?mode=full&submit_simple=Mostrar+registr

CAPÍTULO 02: Métodos e técnicas utilizadas para análise de sementes e avaliação do perfil fisiológico, bioquímico, metabolômico e transcriptômico.

1. Material biológico e condução do experimento

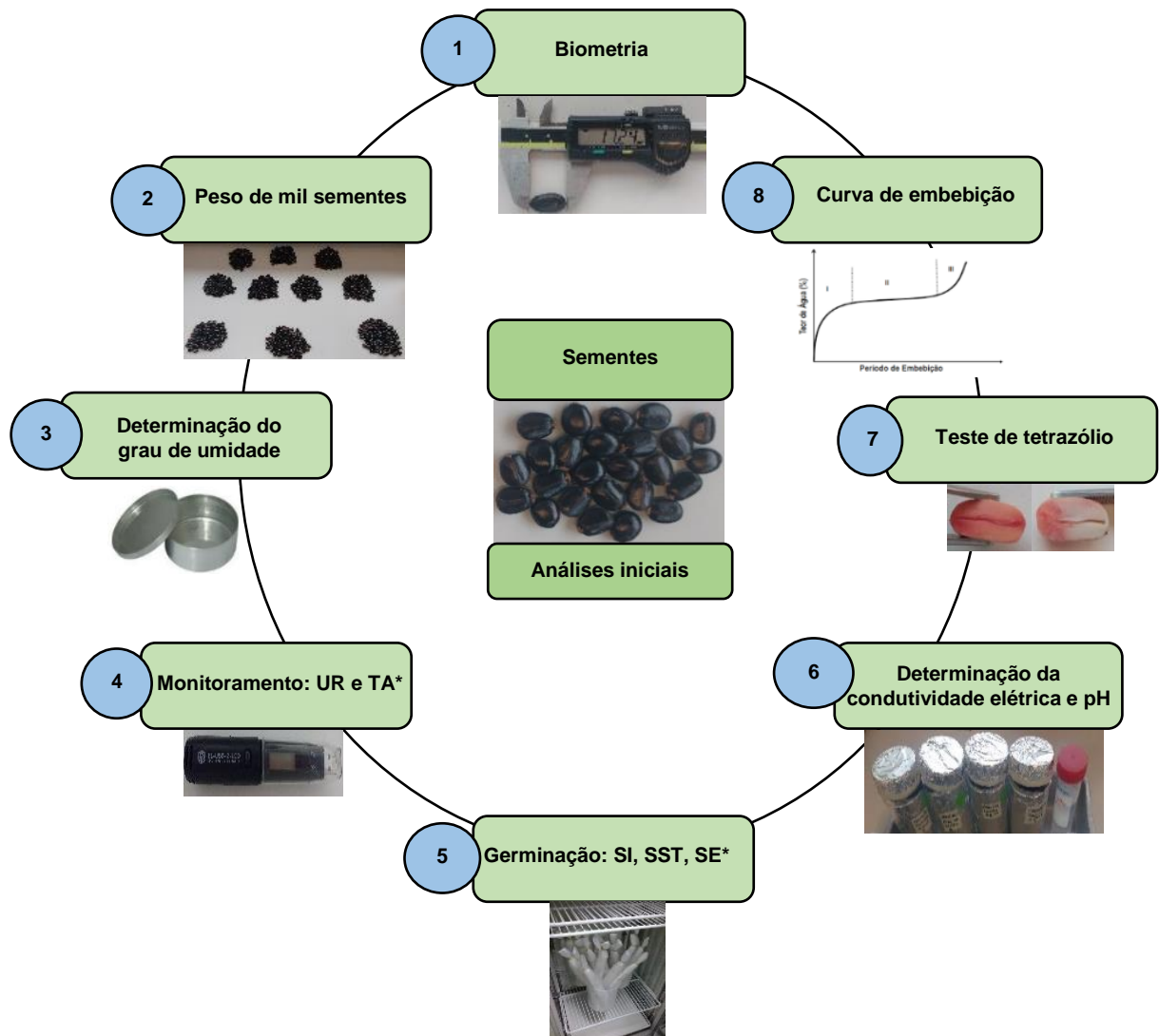
Os experimentos foram realizados no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos-LBBB/ICS/UFBA, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e na Universidade de Wageningen, no Radix no Laboratório de Planta e Fisiologia em Wageningen, Holanda.

Sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu, colhidas de plantas cultivadas em propriedade particular, na localidade Fazenda Gameleirinha no Campo da Fazenda/ Unidade Experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola (EBDA) no município de Iraquara-BA (latitude: 12° 14' 55"S e longitude: 41° 37' 10"W), foram utilizadas neste trabalho. O plantio das sementes foi realizado em dezembro de 2016 e a colheita entre julho e agosto de 2017. E sementes da cultivar BRS 149 Nordestina foram obtidas do plantio realizado pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), da safra de 15 de agosto de 2014. O plantio foi realizado no Campo Experimental de Montes Claro (CEMC) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG). O CEMC está localizado em Montes Claros em Minas Gerais, com as seguintes características fisiográficas: altitude de 602 m, paralelo de 16° 66', latitude sul de meridiano de 43° 73', longitude oeste de Greenwich. Ambas as sementes foram armazenadas no Brasil a $24,74 \pm 1,50$ °C e $53,26 \pm 8,30$ UR (%).

Inicialmente foram realizados experimentos de caracterização das sementes através das análises biométricas e peso de mil sementes de acordo como descrito na Regra para análise de sementes (Brasil, 2009). Em seguida foram realizadas as seguintes análises (Figura 1 e 2): teste de germinação, determinação do grau de umidade, Monitoramento da umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA), teste de tetrazólio, teste de condutividade elétrica, determinação do pH do exsudato das sementes, curva de embebição, padronização do teste de envelhecimento acelerado, de acordo com o descrito por Delouche (1965), Tesnier *et al.* (2002), Lima *et al.* (2007), Brasil (2009), Gaspar-Oliveira *et al.* (2009), Souza *et al.* (2009), Braga

Junior *et al.* (2011), Santos *et al.* (2011), Zuchi *et al.* (2012), David *et al.* (2013), Teles (2013), Araldi e Coelho (2015), Fogaça *et al.* (2017), com adaptações.

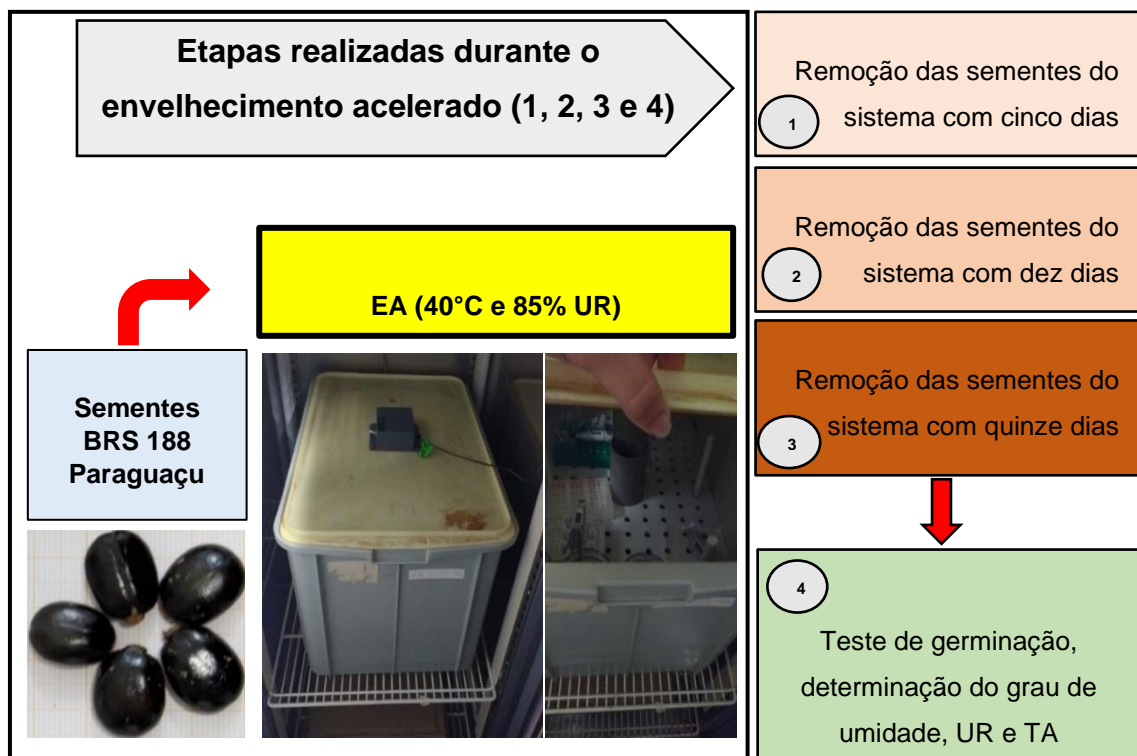
Figura 1 – Fluxograma das análises iniciais realizadas com as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu e BRS 149 Nordestina (*Ricinus communis* L.).



*Determinação da biometria das sementes (1); peso de mil sementes (2); determinação do grau de umidade das sementes (3); Monitoramento da umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA) (4). Realização da padronização do teste de germinação (sementes sem carúnculas) (5): semente inteira com tegumento (SI), semente sem tegumento (SST), semente escarificada (SE). Determinação da condutividade elétrica e pH exsudado das sementes (6); teste de tetrazólio (7), curva de embebição (sementes sem carúnculas) (8): Semente inteira com tegumento (SI), semente sem tegumento (SST), semente escarificada (SE).

As sementes foram submetidas a condição de envelhecimento acelerado de acordo com Delouche (1965), Braga Junior *et al.* (2011) e David *et al.* (2013), com adaptações. As sementes que não foram submetidas ao EA, foram consideradas como controle. Após o EA, as sementes foram submetidas a diversas análises, dentre eles: teste de germinação; determinação do grau de umidade das sementes; Monitoramento da UR e TA; de condutividade elétrica e pH do exsudato das sementes e teste de tetrazólio. Para realizar as análises bioquímicas, metabolômicas e transcriptômicas, as sementes foram colocadas para embeber em água pelo período de seis horas a 30°C. As análises metabolômicas e transcriptômicas foram realizadas apenas nas sementes da cultivar Paraguaçu.

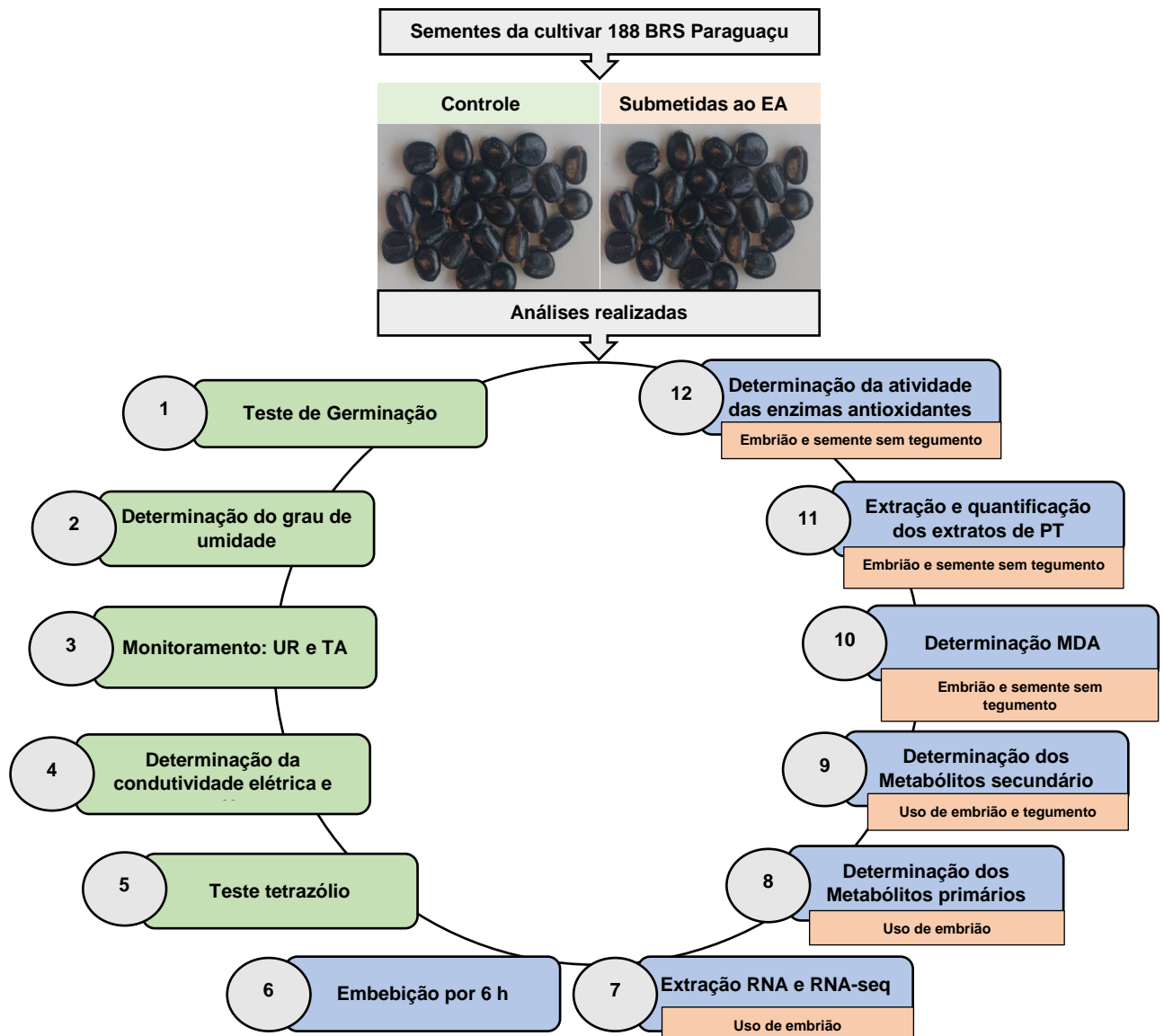
Figura 2 – Ajuste de protocolo para o tratamento de envelhecimento acelerado realizado com cinco, dez e quinze dias. Uso de incubador (IK-7) com sal de sulfato de zinco, a 40°C e 85% UR.



Após realizada a extração de RNA (do embrião das sementes) e análise por RNA-Seq; Avaliação do perfil dos metabólitos primários (dos embriões das sementes) e secundários (dos embriões e tegumento das sementes); peroxidação lipídica das sementes inteiras (com remoção apenas do tegumento) e do embrião das sementes, através da determinação de malonaldeído (MDA); quantificação de proteínas totais e atividade enzimática das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD),

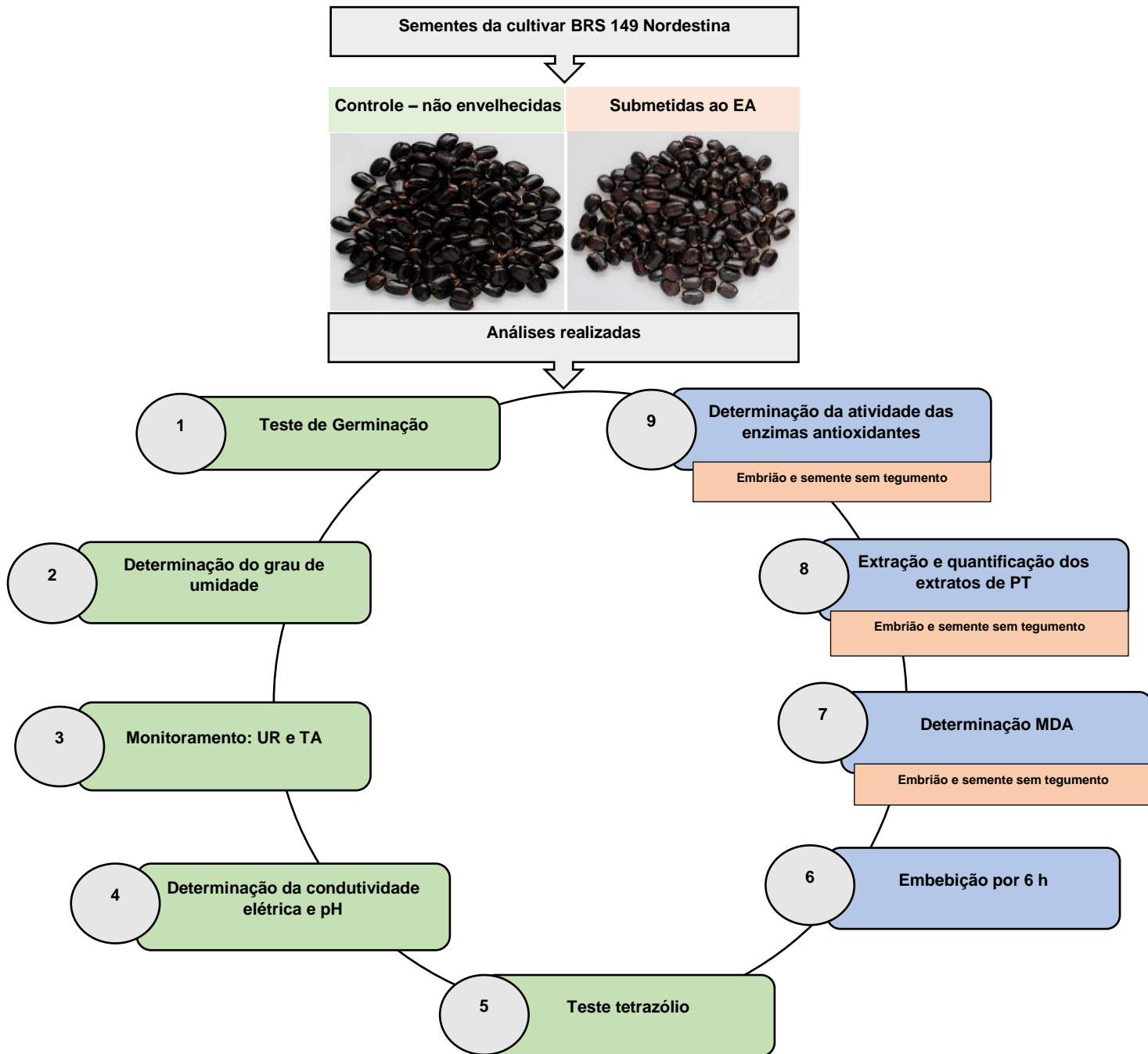
catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutationa redutase (GR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutationa peroxidase (GPX), glutationa S-transferase (GST) das sementes inteiras (remoção apenas do tegumento) e do embrião das sementes (Figura 3 e 4).

Figura 3 – Análises das sementes submetidas ao EA e não envelhecidas da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* L..



*Determinação da germinação (1), e grau de umidade (2), monitoramento da umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA) (3), determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato da semente (4), teste de tetrazólio (5). Embebição das sementes em água por seis horas (6), seguida da extração de RNA dos embriões das sementes, realização da análise de RNA-seq (7); determinação dos metabólitos primários dos embriões das sementes (8) e secundários dos embriões e do tegumento das sementes (9); peroxidação lipídica das sementes inteiras (sem tegumento e carúncula) e do embrião através da determinação de malonaldeído (MDA) (10); extração e quantificação das proteínas totais (PT) das sementes inteiras (sem tegumento) e dos embriões (11). Determinação da atividade das enzimas antioxidantes (12): superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutationa redutase (GR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutationa peroxidase (GPX), glutationa S-transferase (GST).

Figura 4 – Análises das sementes submetidas ao EA e não envelhecidas da cultivar BRS 149 Nordestina de *Ricinus communis* L..



* Determinação da germinação (1), e grau de umidade (2), monitoramento da umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA) (3), determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato da semente (4), teste de tetrazólio (5). Embebição das sementes em água por seis horas (6); peroxidação lipídica das sementes inteiras (sem tegumento e carúcula) e do embrião através da determinação de malonaldeído (MDA) (7); extração e quantificação das proteínas totais (PT) totais das sementes inteiras (sem tegumento) e dos embriões (8). Determinação da atividade das enzimas antioxidantes (9): superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutationa redutase (GR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutationa peroxidase (GPX), glutationa S-transferase (GST).

2. Biometria das sementes

A Biometria das sementes foi realizada de acordo com as recomendações da Regra para análise de sementes (Brasil, 2009). As sementes foram coletadas aleatoriamente para compor uma amostra de trabalho de 100 sementes (quatro replicatas de 25 sementes) e medidas em milímetros, altura (medida do ápice à base), a largura e a espessura (região mediana) de cada unidade de propagação, com o auxílio de paquímetro digital (Miteetoyo absolute digimatic).

3. Peso de mil sementes

O peso de mil sementes foi realizado de acordo com as Regra para Análise de Sementes (Brasil, 2009), empregando béquer previamente tarado, para as pesagens na balança analítica (Sartorius Basic). A amostra utilizada foi de 10 repetições de 100, e o resultado foi expresso em gramas (g). A partir do peso médio, foi calculado o peso de mil sementes, utilizando a seguinte fórmula: **Peso de mil sementes (g) = Y x 10**

Onde:

Y é a média das 10 repetições das 100 sementes.

4. Determinação do grau de umidade

A avaliação da umidade por gravimetria foi realizada seguindo as recomendações da Regra para Análise de Sementes (Brasil, 2009). Foram utilizados recipientes de alumínio (com diâmetro de 5 cm) e tampas previamente pesados (**t**) em balança analítica (Mettler AE163). As sementes foram separadas em três replicatas de 25 sementes, as quais foram cortadas, com aproximadamente 5 g de sementes cada, e colocadas em recipientes de alumínio a 105°C por 24 horas. O cálculo foi realizado com base em peso úmido (P) e peso seco (p) de acordo com a expressão:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{100 (P-p)}{P-t}$$

Onde:

P = Peso Inicial (Peso do recipiente e sua tampa adicionado ao peso da semente fresca (g));

p = Peso Final (Peso do recipiente e sua tampa adicionado ao peso da semente seca (g));

t = Tara (peso inicial do recipiente com sua tampa (g)).

5. Monitoramento da umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA)

A determinação da UR (%) e TA (°C) foi realizada utilizando o datalogger (EL-USB-2-LCD RH/TEMP DATALOGGER) com medições a cada 30 minutos, fazendo análises semanais dos dados. Os dados obtidos foram anotados e avaliados pelo programa EasyLog USB.

6. Teste de germinação

O experimento de germinação foi realizado com adaptações, segundo as Regras de Análise de Sementes (Brasil, 2009), utilizando três replicatas de 25 sementes, que foram separadas aleatoriamente. Em seguida realizou-se desinfestação com submersão em solução de hipoclorito 0,5% e tween 20 (1%) sob agitação constante por 20 minutos. Em seguida, foram lavadas com água destilada. Em seguida foram secas sobre papel toalha.

Houve a germinação de sementes sem carúnculas visando maior uniformidade na embebição, sendo que, as carúnculas foram removidas após a desinfestação das sementes. Avaliou-se germinação com sementes inteiras não escarificadas (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE). As escarificações das sementes foram realizadas segundo as Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009), foi realizada uma escarificação mecânica, realizando a remoção de uma lasca do tegumento na parte oposta ao eixo do embrião, para evitar danos ao embrião.

Os ensaios foram realizados inicialmente em caixa gerbox e após a germinação as sementes foram transferidas para rolos de papéis germitest (GE Healthcare Life Science), umedecidos com água destilada, na proporção 2,5 vezes do peso do substrato seco e mantidas em incubadora BOD (Snijders Scientific Jumo DTRON 304), sem fotoperíodo, a uma temperatura de 30°C. Após sete dias determinou-se plântulas normais (%), plântulas anormais deformadas (%), plântulas anormais deterioradas (%), sementes mortas (confirmadas pelo teste de tetrazólio), sementes não germinadas, biometria e massa seca das plântulas normais na estufa (MMM Medcenter Ecocell 55 Oven) a 80°C até peso constante.

Na avaliação da viabilidade foi utilizado o software Germinator (JOOSSEN *et al.*, 2010), por meio da determinação da germinação máxima (Gmax), do tempo máximo para alcançar 50% de germinação (T50), índice de uniformidade da germinação (U8416) e área abaixo da curva de germinação (AAC).

7. Condutividade elétrica e avaliação do pH do exsudato das sementes

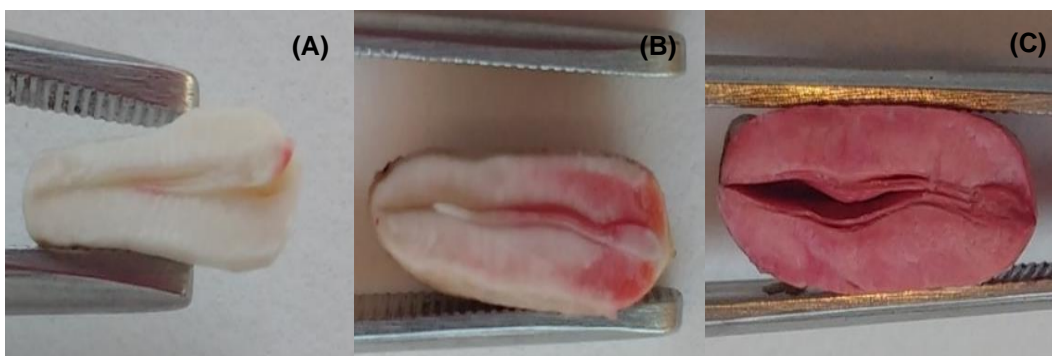
O teste de condutividade elétrica foi realizado segundo Fogaça *et al.* (2017). O teste foi realizado com três repetições de 25 sementes, pesadas e embebidas em recipiente plástico contendo 75 mL de água ultrapura, recoberto com papel alumínio, e mantidas em incubadora BOD (Snijders Scientific Jumo DTRON 304) a 25°C, por 3, 6, 12 e 24 horas. A leitura foi processada em condutímetro (Cond 385L WTW), expressos em $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$.

Para a determinação do pH do exsudado empregou-se o pHmetro de bancada (Fisher Scientific CG 825), usando as mesmas amostras submetidas à condutividade elétrica (SANTOS *et al.*, 2011; ARALDI e COELHO, 2015).

8. Teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio foi realizado para avaliar a viabilidade das sementes como lote, assim como, também as sementes que não germinaram no teste de germinação. Seguiu-se o protocolo descrito por Gaspar-Oliveira *et al.*, (2009), com adaptações. As sementes cortadas ao meio foram colocadas em recipiente e submersas em solução de tetrazólio 0,2% e colocadas a 35°C em incubadora BOD (Snijders Scientific Jumo DTRON 304) por duas horas (Figura 5).

Figura 5 - Teste de tetrazólio em sementes da cultivar 188 BRS Paraguaçu de *Ricinus communis*. (A e B) sementes inviáveis, (C) semente viável.



9. Curva de embebição

As curvas de embebição foram realizadas com os tratamentos SI, SST e SE, segundo metodologia descrita nos trabalhos de Zuchi *et al.*, (2012) e Teles (2013), com adaptações. Foi utilizado quatro repetições de 10 sementes para o período diurno e para o período noturno, as sementes foram colocadas para embeber em substrato de papel germitest (GE Healthcare life science) em caixas gerbox (DBP plastics 109) umedecida com água destilada, na proporção de 2,5 vezes a massa do papel seco (BRASIL, 2009) e colocados em germinador tipo B.O.D. (Snijders Scientific Jumo DTRON 304) a 30°C e com ausência de luz. Foram realizadas pesagens individuais a cada duas horas até a protusão radículas com 1 mm de comprimento em pelo menos 50% das sementes de cada repetição. As análises dos resultados foram realizadas em programa Excel, com a geração de um gráfico para identificação de uma curva de padrão trifásico (BEWLEY e BLACK, 1994).

10. Envelhecimento acelerado (EA)

O envelhecimento acelerado foi realizado de forma adaptada, considerando a metodologia descrita por Delouche (1965), Braga Junior *et al.* (2011), David *et al.* (2013). Neste trabalho utilizou-se como condições de envelhecimento das sementes a temperatura de 40 °C, umidade relativa de 85% e o período de 10 dias. Para definir estas condições de envelhecimento acelerado, as sementes foram mantidas no incubador (IK-7) com sal de sulfato de zinco com 40°C e 85% UR em diferentes tempos de envelhecimento (5, 10 e 15 dias). As sementes foram colocadas em recipientes abertos para facilitar a entrada da umidade e a ação da temperatura. Durante todo o experimento foram monitoradas as condições do ambiente quanto a UR (%) e TA (°C) com datalogger (EL-USB-2-LCD RH/TEMP DATALOGGER), realizando-se aferições a cada 30 minutos. Assim, neste trabalho, será utilizado o termo envelhecimento acelerado (EA), quando se tratar das condições de envelhecimento acelerado utilizadas como tratamento (10 dias, 40°C e UR de 85%).

11. Embebição das sementes

Após a submissão a condições de envelhecimento acelerado as sementes, envelhecidas e não envelhecidas (controle), foram submetidas a embebição monitorada para a elaboração da curva de embebição, como descrito por Mendes *et*

al. (2009), com modificações. Todas as sementes tiveram as carúnculas retiradas, as sementes de BRS 188 Paraguaçu permaneceram com seus tegumentos e as sementes de BRS 149 Nordestina tiveram seu tegumento escarificado. Para início dos processos as sementes foram mantidas em caixas gerbox (DBP plastics 109), em incubadora BOD (Snijders Scientific Jumo DTRON 304), por seis horas a 30°C, e com ausência de luz. Em seguida as sementes tiveram seus tecidos separados em embrião, tegumen e semente inteira sem tegumento, os quais foram congelados em nitrogênio líquido e colocados para liofilizar (Labconco 4.5 Liter Freeze Dry System) até peso constante.

12. Extração de RNA total

Para a realização da extração de RNA total foi utilizado o protocolo Hot Borate (WAN e WILKINS, 1994), e as amostras obtidas em triplicata. Foram utilizados 100 mg de embriões liofilizados e macerados (com o auxílio de nitrogênio líquido). As amostras foram transferidas para microtubos de 2,0 mL, de fundo redondo, aos quais foram acrescentados 800 µL do tampão de extração [(2,0 M de tetraborato de sódio decahidratado (Borax), 30 mM de ácido tetra-acético etileno-glicol (EGTA), 1 % dodecil sulfato de sódio (SDS), 1% de desoxicolato de sódio (Na-DOC) contendo 10,56 mg de 1,4-ditiotreitol (DTT) e 316 mg de polivinilpirrolidona (PVP40)] previamente aquecido a 80°C.

Após a extração com borato cada amostra foi acrescida 4 µL de proteinase K (solução com o uso de 8 mg proteinase K e 26,4µL de H₂O ultrapura) (Sigma, cod. P8044). Em seguida as amostras foram homogeneizadas e incubadas em banho-maria (Grant, mod. TC120) a 42 °C por 12 min. Em seguida foram adicionados 64 µL de cloreto de potássio 2M e as amostras foram incubadas em gelo durante 30 min e centrifugadas durante 20 min a 12.000 x g a 4 °C em centrifuga refrigerada (Thermo Scientific, mod. Fresco 17). O sobrenadante foi transferido para novos tubos, acrescentados de 259 µL de cloreto de lítio 8 M (LiCl) e incubados em gelo durante a noite a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 min a 12.000 x g a 4 °C e o sobrenadante descartado. O pellet foi lavado em 750 µL de LiCl 2M e centrifugado novamente durante 10 min a 12.000 x g a 4 °C.

Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 80 μ L de água contendo dicarbonato de dietila (DEPC). Para o tratamento com DNase foram utilizados 40 μ L de amostra, sendo adicionado 40 μ L de água DEPC e 20 μ L do mix contendo tampão e DNase, e foram incubados em banho-maria a 37 °C durante 30 min. A cada microtubo foram adicionados 100 μ L de uma mistura contendo fenol e clorofórmio na proporção 1:1 (v/v), homogeneizado em agitador tipo Vortex (VELP Scientifica, mod. ZX4) e centrifugado durante 5 min a 12.000 x g (Thermo Scientific, mod. Fresco 17). O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e acrescido de 9,0 μ L de acetato de sódio 3M (NaAc) e 235 μ L de etanol 100 %, sendo incubado durante 2 h a -20 °C. As amostras foram centrifugadas durante 20 min a 12.000 g a 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com 250 μ L de etanol 70% (v/v) e centrifugado novamente durante 5 min a 12.000 x g a 4 °C. Mais uma vez o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi seco e ressuspendido em 20 μ L de água DEPC.

A qualidade do RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria utilizando as razões de absorbância A260/A280 e A260/A230 nm no Nanodrop (ND-1000 V 3.7.1). A integridade do RNA foi avaliada em gel de agarose a 1%.

13. RNA-seq

Para a realização da análise do RNA-seq foi utilizado 1 μ g de RNA total (WAN e WILKINS, 1994; WANG *et al.*, 2009; CARDOSO-SILVA *et al.*, 2014; CONESA *et al.*, 2016). Antes do preparo da biblioteca de transcrito, o cDNA sintetizado foi preparado e sequenciado usando o Illumina Truseq® (Hiseq 2500), foi utilizado o índice: IDT Kit de índice duplo exclusivo, gerando aproximadamente 2x150 bases sequenciadas. Após o sequenciamento, os dados foram processados. Inicialmente os dados foram processados com o trimmomatic (versão 0.32) para remover as leituras menores que 36, posteriormente as leituras foram filtradas quanto as contaminações usando Phi-x e Bowtie 2 (2.2.1). Por fim, os dados foram verificados de acordo com a qualidade com FastQC (0.11.4). Os transcritos diferentemente expressos foram identificados funcionalmente, análise consistiu em tratamento verso controle. Em seguida realizou-se a análise de expressão gênica diferencial utilizando os algoritmos do pacote DESeq² no programa estatístico R e a contagem de “reads” foi feita com o Salmon (LOVE *et al.*, 2014; SRIVASTAVA *et al.* 2019).

Após encontrar as 31.171 sequências que foram expressas, foram selecionadas as sequências baseadas no padj no valor menor que 0.1. Considerando este critério de corte avaliou-se 494 sequências para estas foi realizada a caracterização funcional por homologia utilizando a plataforma *Gene Ontology Functional Enrichment Annotation Tool* (Go FEAT) (<http://computationalbiology.ufpa.br/gofeat/>). O Go FEAT agrega bases como *Universal Protein Knowledgebase* (UniProt) (<https://www.uniprot.org/>), *InterPro* (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>), *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (<https://www.genome.jp/kegg/>), *Protein Domain Families* (Pfam) (<http://pfam.xfam.org/>), *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e SEED (https://www.theseed.org/wiki/Home_of_the_SEED) para realizar a anotação e curadoria dos alvos selecionados (OVERBEEK *et al.*, 2014; FINN *et al.*, 2015; KANEHISA *et al.*, 2016; FINN *et al.*, 2017; The UniProt Consortium, 2017; ARAUJO *et al.*, 2018). Foi necessário o uso de um arquivo multifasta de aminoácidos como dados de entrada. As 494 sequências foram isoladas a partir da plataforma *Phytozome* (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) através do código “*Transcript Name*” (Phytozome).

14. Análises metabolômicas

14.1 Metabólitos primários

As análises foram realizadas segundo Prosba-Bialczyk *et al.* (2013) e Carvalho *et al.* (2015), com modificações. Foi utilizado protocolo de extração (para a fase polar e apolar) antes de submetido para análise de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS). Os padrões internos utilizados foram o ribitol (adonitol) na concentração de 1 mg mL⁻¹ em água (fase polar) e 1 mgmL⁻¹ do ácido nonadecanóico metil ester - CHCl₃ (fase orgânica).

Para a realização da extração preparou-se três tipos de mix de extração: mix A, Metanol – MeOH 400 µL:CHCl₃ 300 µL padrão interno); mix B, água 130 µL e 20 µL ribitol (1 mg/ml); e mix C, MeOH:CHCl₃, 1:1 (v/v). É importante ressaltar que todos os passos da metodologia foram realizados com as amostras em gelo. Inicialmente foram pesados 10 mg de embrião liofilizado e macerado em microtubo de 2 mL de fundo redondo e colocado imediatamente em gelo. Foi adicionado ao tubo 350 µL mix A e em seguida agitado em agitador tipo vortex (VELP Scientifica ZX4) por 15

segundos, em seguida foi adicionado 75 μL mix B e o tubo agitado novamente até a dissolução completa da solução. Posteriormente os tubos foram colocados em banho com ultrassom durante 10 minutos.

A cada microtubo de amostras adicionou-se 100 μL H_2O ultrapura e mais uma vez foram misturados até homogeneização completa para posteriormente realizar a centrifugação (Thermo Scientific, mod. Fresco 17) por 5 minutos e 210 g. Após a centrifugação foi transferido cerca de 90% da fase superior para um novo tubo previamente identificado de 2 mL e acrescido ao mesmo o mix C, e agitado até mistura completa da solução, posteriormente o tubo foi colocado em recipiente com gelo e deixado em descanso por 10 minutos. Após o repouso foi adicionado 100 μL de água ultrapura e o recipiente foi agitado até mistura completa das soluções e centrifugado por 5 minutos a 210 g.

Após a centrifugação foi realizada a coleta 90% da fase superior e colocada em um novo recipiente (fase polar). Em seguida, pipetou-se 25 μL da fase polar e colocados em tubos de vidro deixados no *SpeedVac* (ThermoSavant AES1010) durante a noite para secar, antes da aplicação no cromatógrafo. As amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás com espectrômetro de massa Thermo Scientific Trace 300 triplo quadruplo integrado (GC-MS) (Thermo Scientific 3000) usando o protocolo de derivatização on-line.

As amostras foram separadas por coluna DB5-ms ou equivalente funcional. Os espectros de impacto de elétrons foram recolhidos de m/z 50 a 600). As amostras foram derivatizadas imediatamente antes da injeção em 20mgmL^{-1} de cloridrato de metoxiamina em piridina (90 minutos, 30°C) e MSTFA (MSTFA - N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida) (30 minutos, 37°C). O padrão interno utilizado no equipamento foi o ribitol e o gás hélio foi usado como transportador e a ionização de efluentes da coluna (GC-MS) por ionização de elétrons, 70 volts.

Para a avaliação dos resultados foram utilizados os programas RStudio (versão 1.1), MZmine (versão 2.3.5) e R (versão 3.5.0). E a plataforma utilizada para a identificação dos compostos foi a *Golm Metabolome Database* (GMD) e utilização da Plataforma Metaboanalyst versão 5.0 para a construção de *heat map*.

14.2 Metabólitos secundários

Para a avaliação dos metabólitos secundários foram utilizados 30 mg de amostras de embriões e de tegumentos das sementes, liofilizados e macerados até

pó fino (com o auxílio de nitrogênio líquido). Após, houve transferência destas amostras para microtubos de 2 mL e de fundo redondo. É importante ressaltar que foi utilizado os mesmos tegumentos das sementes que tiveram seus embriões removidos para uso. Após as amostras terem sido pesadas foram adicionados 1.200 µL (metanol a 75% e ácido fórmico 0,1%). Os tubos foram levados a agitação em vortex (VELP Scientifica ZX4) até mistura total da solução. Posteriormente os tubos foram levados ao sonicador por 15 minutos, depois agitados por 15 segundos e levadas ao sonicador novamente por 15 minutos. Em seguida os microtubos, foram novamente agitados por mais 15 segundos, para posterior centrifugação (Thermo Scientific, mod. Fresco 17) por 5 minutos e 210 x g, 180 µL do sobrenadante foram transferidos para frasco de vidro para cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS). E todo o experimento foi realizado em triplicata.

Para análise cromatográfica injetou-se 5 µL do extrato no sistema LC-MS (MS: *Accurate Mass Orbitrap FTMS*) em equipamento com uma coluna C18 de fase reversa e um modo de ionização negativa $[M-H]^-$, com resolução de 60.000 e m/z de 95 - 1300 D.

Os metabólitos foram identificados pela plataforma METELIN (https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage) e os gráficos e a estatística foram criados na Plataforma Metaboanalyst versão 5.0 para a construção de heat map.

15. Determinação de malonaldeído (MDA)

A análise da peroxidação lipídica foi realizada através da determinação do MDA segundo Heath e Packer (1968), com modificações, e padronizada para realização da análise em microplacas. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas biológica e quadruplicatas técnicas. Cada amostra foi composta por semente inteira sem tegumento e embrião. Empregou-se 0,125g de material liofilizado, essas amostras foram colocadas em microtubo de fundo redondo de 2mL acrescido de 1,0 mL de ácido tricloroacético (TCA) 0,1% as quais foram homogeneizadas e centrifugadas durante 15 minutos a 210 x g, e a 25°C em centrífuga refrigerada (HETTICH, mod.320 R). Posteriormente, foram coletados 500 µL de sobrenadante e colocados em um novo microtubo de fundo redondo de 2mL e adicionado 1.500µL de uma mistura de ácido tricloroacético (TCA) 5% e ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,5%. Os tubos microtubos foram aquecidos em banho-maria (Polyscience, mod. POL00010) a 95 °C por 35 min,

posteriormente transferidos para gelo durante 10 minutos. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 10 minutos a 4 °C a 210 x g em centrífuga refrigerada (HETTICH, mod.320 R). Os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos, quatro replicatas técnicas foram colocadas em microplacas de 96 poços (marca Greiner, leitura em luz visível). As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Varian Care 50) nos comprimentos 532 nm e 600 nm. A quantidade de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção molar $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em $\mu\text{MMDA g}^{-1}$ de massa seca.

16. Extração e quantificação de proteínas totais

Foram separadas três replicatas biológicas de sementes inteiras (sem tegumento) e embriões (dez unidades) do tratamento controle e após condição de envelhecimento acelerado. As amostras foram maceradas até pó fino com o uso de nitrogênio líquido e empregados 200 mg de semente inteira e 20 mg de embriões. A cada amostra adicionou-se tampão gelado de fosfato de potássio 100 mM em pH 7,4; sendo 2 mL para semente inteira e 1 mL para embriões (SAMBROOK *et al.*, 1989). Em cada microtubo acrescentou-se três esferas de emtal e em seguida as amostras foram maceradas em desmebrador (Sartorius, Mod. Mikro-Dismembrator S) por 3 minutos (com intervalos de 1 minuto para resfriar os recipientes). Posteriormente, os microtubos, sem as esferas de metal, foram centrifugadas a 4°C, 210 x g e 30 minutos. Após a centrifugação os sobrenadantes (sem lipídeos) foram transferidos para novos tubos e colocados em gelo para a quantificação das proteínas totais.

A quantificação das proteínas totais foi realizada segundo o método proposto por Bradford (1976), usando o padrão de Albumina do soro bovino (BSA) (Molecular Probes) para a construção da curva analítica (microplaca Greiner luz visível). O teor de proteínas totais foi determinado segundo o protocolo do reagente de cor Bradford (B6916, Sigma-Aldrich) com leituras das absorbâncias em comprimento de onda de 595 nm, utilizando espectrofotômetro (Varian Care 50, com leitor de microplaca). Para a construção da curva analítica padrão e determinação da concentração de proteínas totais utilizou-se a solução estoque BSA ($1440 \mu\text{g mL}^{-1}$), com diluições que variaram entre 2,5 a $18 \mu\text{g mL}^{-1}$. A leitura das amostras foi feita empregando-se alíquotas de 5 μL do extrato bruto diluído em 250 μL de reagente de Bradford, sendo misturados e totalizando um volume de 255 μL , deixados reagir 5 minutos antes da leitura. A

concentração das proteínas nas amostras foi calculada usando-se a equação obtida no cálculo de regressão linear da curva analítica com BSA.

17. Determinação da atividade das enzimas antioxidantes

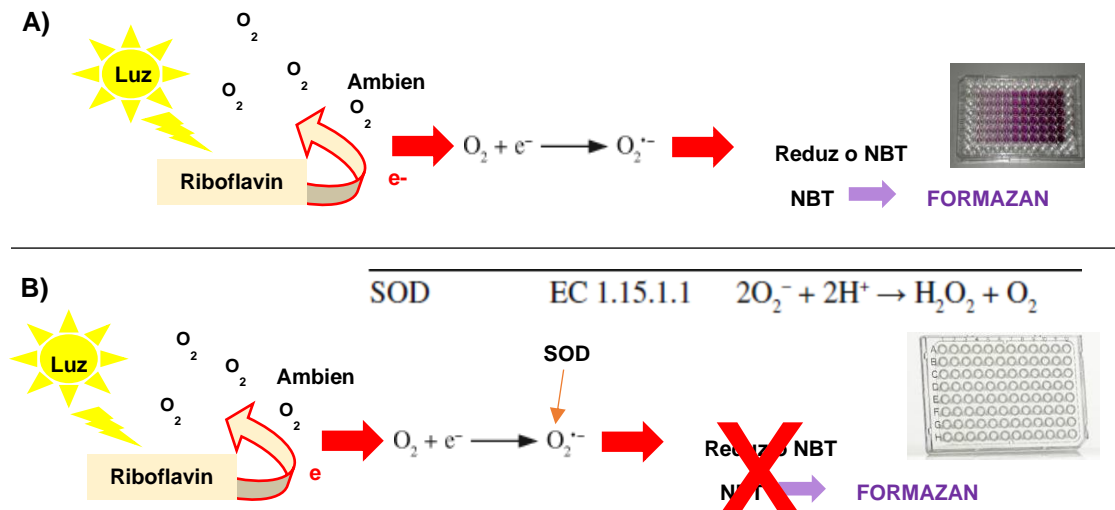
Para realização de todos os ensaios de atividade das enzimas antioxidantes foram utilizadas amostras de extrato de proteína total de semente inteira (sem tegumento) e extrato de proteína total de embrião. Todos os experimentos foram realizados em triplicata biológica e quatro replicatas técnicas de cada repetição biológica.

17.1 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da SOD foi realizada ajustando a metodologia para microanálise, considerando o descrito em Omar *et al.*, (2012), Beauchamp e Fridovich (1971), Onahue *et al.*, (1997), Silva *et al.*, (2012), Carneiro (2011) e Gianopolitis e Ries (1977). A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada espectrofotometricamente (Varian Carry 50, leitor de microplaca) utilizando microplaca de 96 poços (Greiner, luz visível). Esta análise é baseada na detecção espectrofotométrica do formazan a 560 nm (produto de redução do azul de nitro-tetrazólio – NBT), mediado pelos radicais superóxidos, que são formados quando a riboflavina é submetida à luz (Figura 6). A luz causa uma fotólise na riboflavina, que providencia um elétron para o oxigênio do ambiente (O_2), resultando no íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O superóxido atua reduzindo o NBT a formazan, de coloração roxa (Figura 6 - A). Na presença de SOD, a reação é inibida e não ocorre produção de formazan. Esta inibição é utilizada para determinar atividade enzimática da SOD (Figura 6 - B) como descrito por Alfenas, 2006.

Inicialmente determinou-se o tempo de reação para fotorredução do NBT e posteriormente realizada a inibição de formazan a partir do NBT utilizando o extrato proteico em estudo (semente inteira e embrião), para determinar o volume de extrato a ser utilizado, segundo a metodologia de GIANOPOLITIS e RIES (1977). Foram utilizados diferentes volumes de amostra para determinação do volume necessário para 50% da inibição na reação de redução do NBT, quando mantidos a exposição à luz.

Figura 6 – Representação da atividade da Superóxido dismutase (SOD). A luz causa fotólise na riboflavina, que supre um elétron para o oxigênio do ambiente (O_2), resultando no íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$). O superóxido atua reduzindo NBT a formazan (produto de coloração roxa) (A). Na presença de SOD, a reação é inibida e não ocorre produção de formazan. Esta inibição é utilizada para determinar atividade enzimática da SOD (B).



A análise foi realizada a 25 °C e o meio de reação foi composto por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), metionina 14 mM, ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,1 µM, NBT 75 µM e riboflavina 2 µM. Para a determinação da atividade da SOD em semente inteira (sem tegumento), utilizou-se 11 µL em meio de reação de 250 µL com exposição sob iluminação (20 w) em caixa fechada recoberta com papel alumínio, por 10 minutos. E para os extratos de proteínas totais de embrião utilizou-se 10 µL, com exposição a luz por 10 minutos. O preparo e leitura do branco foi feito da mesma forma, no entanto, sob o abrigo da luz. As leituras das absorbâncias foram realizadas a 560 nm em espectrofotômetro (Varian Cary 50). A atividade da SOD foi considerada como a quantidade de enzima (SOD) necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT e foi calculada pela reação de atividade específica descrita abaixo:

Cálculo para atividade da SOD

SOD (Unidade /µL) = [(V/v) - 1] x F / [PT] onde:

V corresponde à taxa de reação na ausência da SOD;

v corresponde à taxa de reação na presença da enzima;

F é o fator de diluição semente inteira (22,73), embrião (25);

PT corresponde à concentração de proteínas totais do extrato bruto.

O resultado é expresso em Unidade SOD. μg^{-1} de Proteína.

17.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da CAT foi determinada em microplacas, pelo método descrito por Bergmeyer (1970) para leitura UV (greiner). A Atividade da CAT foi determinada pela decomposição enzimática do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo que este decaimento foi medido em espectrofotômetro (Varian Cary 50) a 240 nm durante 3 minutos. O ensaio consistiu no uso de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,4 e EDTA a 0,1 mM, água ultrapura, amostra e peróxido de hidrogênio a 0,03% em um volume de reação de 250 μL . Para a leitura em branco a solução não teve a adição de peróxido. O experimento foi realizado em triplicata biológica e quatro replicatas técnicas para as amostras com extrato de proteínas total. A atividade da enzima foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio 0,0436 M cm^{-1} . Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade necessária de enzima para converter 1 mmol de substrato em produto por minuto, por μL , nas condições do ensaio. O resultado foi expresso em U CAT ($\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ proteína).

17.3 Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.11.1.1)

A atividade da APX foi realizada pelo monitoramento da oxidação do ascorbato (ASA) com a leitura da absorbância a 290 nm, durante 7 minutos, de acordo com o descrito por Nakato e Asada (1981). A atividade da APX foi realizada para um volume de 250 μL , sendo utilizado tampão fosfato de potássio pH 7,0 a 100mM, ácido ascórbico 0,5 mM, EDTA 0,1 mM, água ultrapura, peróxido de hidrogênio 1 mM. Para leitura em branco não foi adicionado peróxido de hidrogênio e amostra. A taxa de oxidação do ascorbato foi determinada pelo decréscimo na absorbância a 290 nm ($2,8 \text{ mM.cm}^{-1}$). A atividade da APX foi expressa como mmol ASA consumido $\text{min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteínas, ou seja, APX ($\text{mmol ASA min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteína).

17.4 Monodehidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4)

A MDHAR é uma enzima que faz parte do ciclo da ascorbato glutationa, a MDHAR está envolvida na regeneração do ascorbato, através do poder redutor do $\text{NADPH} + \text{H}^+$. A atividade foi realizada segundo Murshed *et al.*, (2008) e Miyake e Asada (1992), com adaptações para microplaca de 96 poços. A atividade de MDHAR

foi iniciada com a adição de 0,4 unidade de enzima ascorbato oxidase (SIGMA, A0157-100UN) para a geração de monodehidroascorbato. A reação para atividade da MDHAR consistiu em utilizar um volume de 250 μL , de tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,6; ascorbato 2,5 mM; NADH + H^+ 0,25 mM, ascorbato oxidase 0.4 U por poço, água ultrapura e amostra. A atividade foi determinada espectrofotometricamente (Varian Carry 50, leitor de microplaca), através da redução a 340 nm por 5 min com intervalos de 1 minuto. Para leitura em branco não se empregou ascorbato oxidase e amostra. A atividade específica foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de $6.22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em MDHAR ($\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteína).

17.5 Glutationa redutase (GR, EC 1.6.4.2)

O método para a atividade da glutatona redutase foi realizado segundo a metodologia proposta por Smith *et al.* (1998), com modificações. Baseado no aumento na absorbância a 412 nm quando o DTNB (ácido L' 2,2'-dinitro-5,5'-ditiobenzóico (ou ácido 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico)) recebe um grupo tiol liberado pela glutatona e se oxida formando o ânion colorido ácido tionitrobenzóico (TNB). A análise foi realizada usando o volume de reação de 250 μL , composta por tampão fosfato de potássio pH 7,5 100 mM e ácido etilenodiamino tetra-ácético (EDTA) 0,5 mM, DTNB 0,75 mM, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NADPH + H^+) 0,1 mM, glutatona oxidada (GSSG) 1 mM, água ultrapura e amostra. Para o preparo do branco não se adicionou DTNB e amostra na solução. A atividade foi determinada considerando a formação de TNB que foi medida em espectrofotômetro (Varian Carry 50, leitor de microplaca) em 412 nm, porque este é o comprimento de onda onde há absorção máxima do TNB, produto colorimétrico gerado a partir da oxidação do DTNB durante 10 minutos, com intervalos de 1 usando $\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. O resultado foi expresso em GR ($\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteína).

17.6 Dehidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1)

A atividade da dehidroascorbato redutase foi mensurada segundo Murshed *et al.* (2008), com modificações. A atividade foi determinada pelo monitoramento a 265 nm por 5 minutos de reação. A atividade específica foi calculada usando o coeficiente de extinção molar de $14\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. A correção para a redução não enzimática do DHA por GSH foi realizada na ausência da amostra da enzima (branco). A análise foi

realizada em um volume de 250 μL , com tampão fosfato de potássio 50 mM e pH 7,0, glutathiona reduzida (GSH) 2,5 mM, DHA 0,2 mM, EDTA 01 mM, água ultrapura e amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Varian Cary 50), realizada a 265 nm, de 15 em 15 segundos, durante 3 minutos, utilizando como branco todos os reagentes exceto a amostra. Para realização do cálculo foi utilizado o coeficiente de extinção molar da glutathiona oxidada 0,18 $\text{mM}\cdot\text{cm}^{-1}$. Os resultados foram expressos em DHAR ($\mu\text{molmin}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteína).

17.7 Glutathiona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9)

A atividade antioxidante foi determinada, segundo Lee *et al.* (2003) e Paglia e Valentine (1967). A atividade da GPX foi mensurada através da oxidação do NADPH +H⁺ a 340 nm. Foi realizada para um volume de 250 μL , composta por tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7, EDTA 1 mM, GSH 10 mM, glutathiona redutase (SIGMA, G3664-100 UN). O resultado foi expresso em GPX ($\mu\text{molmin}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteína).

17.8 Glutathiona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)

O ensaio da glutathiona transferase foi realizado segundo Drotar *et al.* (1985), este é realizado usando o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato e mensurando o aumento da absorvância a 340 nm até a formação de glutathiona conjugada. Foi realizada uma reação de 250 μL com tampão fosfato de potássio 250 mM e pH 6,5, glutathiona reduzida 2 mM água ultrapura, CDNB diluído em etanol 2 mM. O resultado foi expresso em GST ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ proteína).

18. Análise dos dados

A condução dos ensaios para obtenção dos dados foi feita em delineamento inteiramente casualizado (DIC). E foi utilizado o teste Tukey, e teste t de student a 5% de probabilidade, através do processamento de dados do programa SISVAR versão 5.0 (FERREIRA, 2000) para os dados fisiológicos e bioquímicos. Utilizou-se o teste de Dunnet, usando o Graph Pad Prism versão 9.0 para avaliação do teste de tetrazólio com dados da germinação. Para a correlação entre as enzimas antioxidantes foi utilizado a correlação de Pearson, usando o programa online MetaboAnalyst versão 5.0.

19. REFERÊNCIAS

- ALFENAS, A. C. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos. 2ª Ed. Viçosa: Ed.UFV, 2006.
- ARALDI, C. G.; COELHO, C. M. M. pH do Exsudato na Avaliação da Viabilidade de Sementes de *Araucaria angustifolia*. **Floresta e Ambiente**, n. 22, v.3, p. 426-433, 2015.
- ARAUJO, F. A.; BARH, D.; SILVA, A.; GUIMARÃES, L.; THIAGO, R.; RAMOS, J. GO FEAT: a rapid web-based functional annotation tool for genomic and transcriptomic data. **Scientific REPOrTS**, v. 8, p.1-4, 2018.
- BEAUCHAMP, C. O; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Biochemical Journal**, v. 44, p. 276–287, 1971.
- BERGMEYER, N. Methoden der enzymatischen analyse. **Akademie Verlag**, v. 1, p. 636-647, 1970.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA JUNIOR, J. M.; ROCHA, M. S.; BRUNO, R. L. A.; VIANA, JEANDSON, S. V.; BELTRÃO, N. E. M. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de mamona cultivar BRS – Energia. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 4, n. 1, p. 88-101, 2011.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Glossário ilustrado de morfologia / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: Mapa/ACS, 2009.
- CARDOSO-SILVA, C. B.; COSTA, E. A.; MANCINI, M. C.; BALSALOBRE, T. W. A.; CANESIN, L. E. C.; PINTO, L. R.; CARNEIRO, M. S.; GARCIA, A. A. F.; De SOUZA, A. P.; VICENTINI, R. De Novo Assembly and Transcriptome Analysis of Contrasting Sugarcane Varieties. **Transcriptome Analysis of Sugarcane**, v. 9, n. 2, p. 01-10, 2014.
- CARNEIRO, M. M. L. C.; DEUNER, S.; OLIVEIRA, P. V.; TEIXEIRA, S. B.; SOUSA, C. P.; BACARIN, M. A.; MORAES, D. M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.754-763, 2011.
- CARVALHO, M. T. V.; PONGRAC, P.; MUMM, R.; ARKEL, J. V.; AELST, A. V.; JEROMEL, L.; VAVPETI, PELICON, P.; Aarts, M. G. M. *Gomphrena claussenii*, a novel metal-hypertolerant bioindicator species, sequesters cadmium, but not zinc, in vacuolar oxalate crystals. **New Phytologist**, v. 208, p. 763–775, 2015.
- CONESA, A.; MADRIGAL, P.; TARAZONA, S.; GOMEZ-CABRERO, D.; CERVERA, A.; MCPHERSON, A.; Szcześniak, M. W.; GAFFNEY, D. J.; ELO, L. L.; ZHANG, X.; MORTAZAVI, A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. **Genome Biology**, p.01-19, v. 17, n. 13, 2016.

DAVID, A. M. S. de S.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F.; DIAS, D. C. F. dos S.; NOBRE, D. A. C.; SILVA NETA, E. C. Envelhecimento acelerado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Ricinus communis* L.. **Agrária - Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.8, n.4, p.517-521, 2013.

DELOUCHE, J. C. An accelerated aging technique for predicting relative storability of crimson clover and tal fescue seed lots. **Agronomy Abstracts**, v. 40, n.1, p. 40, 1965.

DROTAR, A., PHELPS, P., and Fall, R. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. **Plant Science**, v. 42, p. 35—40, 1985.

FINN, R. D.; ATTWOOD, T. K.; BABBITT, P. C.; BATEMAN, A.; BORK, P.; BRIDGE, A. J.; CHANG, H-Y.; DOSZTANYI, Z.; EL-GEBALI, S.; FRASER, M.; GOUGH, J.; HAFT, A.; HOLLIDAY, G. L.; HUANG, H.; HUANG, X.; LETUNIC, I.; LOPEZ, R.; LU, S.; MAECHLER-BAUER, A.; MI, H.; MISTRY, J.; NATALE, D. A.; NECCI, MARCO; NUKA, G.; ORENGO, C. A.; PARK, Y.; PESSEAT, S.; PIOVESAN, D.; POTTER, S. C.; RAWLINGS, N. D.; REDASCHI, N.; RICHARDSON, L.; RIVOIRE, C.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SIGRIST, C.; SILLITOE, I.; SMITHERS, B.; SQUIZZATO, S.; SUTTON, G.; THAHKI, N.; THOMAS, P. D.; TOSATTO, S. C. E; WU, C. H.; XENARIOS, I; YEH, L-S.; YOUNG, S-Y.; MITCHELL, A. L. InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 190-199, 2017.

FINN, R. D.; MISTRY, J.; SCHUSTER-BOCKLER, B.; GRIFFITHS-JONES, S.; HOLLICH, V.; LASSMANN, T.; MOXON, S.; MARSHALL, M.; KHANNA, A.; DURBIN, R.; EDDY, S. R.; SONNHAMMER, E. L. L.; BATEMAN, A. Pfam: clans, web tools and services. **Nucleic Acids Research**, v. 34, p 01-13, 2015.

FOGAÇA, J. J. N. L.; SILVA, R. A.; SANTOS, J. S.; NUNES, R. T. C.; FERREIRA, L. L.; MORAIS, O. M. Physiological quality of Creole castor seeds var. Carrapatinho depending on the raceme position. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n.1, p. 87-93, 2017.

GASPAR-OLIVEIRA, C.; MARTINS, C.; NAKAGAWA, J. **Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio**. Revista Brasileira de Sementes, Botucatu, v. 31, n. 1, p.160-167, 2009.

GIANOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.

KANEHISA, M.; FURUMICHI, M.; TANABE, M.; SATO, Y.; MORISHIMA, K. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 01 -09, 2016.

LEE, S. E.; SHIN, H-T.; HWANG, H. J.; KIM, J. H. Antioxidant Activity of Extracts from *Alpinia katsumadai* Seed. **Phytother Research**, v. 17, p. 1041-1047, 2003.

LIMA, M. G. S.; MENDES, C. R.; MORAES, D. M.; LOPES, N. F.; RODRIGUES, M. A. V. Caracterização da Qualidade Fisiológica de Sementes de Mamona Cultivar Guarani. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 675-677, 2007.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v.15, n. 550, P.01-21, 2014.

MURSHED, R.; LOPEZ-LAURI, F.; SALLANON, H. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. **Analytical Biochemistry**, v. 383, p. 320–322, 2008.

NAKATO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant e Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.
OMAR, S. A.; ELSHEERY, N. I.; KALAJI, H. M.; XU, ZENG-FU; SONG-QUAN, S. CARPERNTIER, R. LEE, C. H.; ALLAKHVERDIEVS, S. I. Dehydroascorbate Reductase and Glutathione Reductase Play an Important Role in Scavenging Hydrogen Peroxide during Natural and Artificial Dehydration of Jatropha curcas Seeds. **Journal plant biology**, v.55, p. 469-480, 2012.

ONAHUE, J. L.; OKPODU, C.M.; CRAMER, C. L.; GRABAU, E. A.; ALSCHER, R. G. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (Relationships to resistance). **Plant Physiology**, v.113, p. 249–257, 1997.

OVERBEEK, R.; OLSON, R.; PUSCH, G. D.; OLSEN, G. J.; DAVIS, J. J.; DISZ, T.; EDWARDS, R. A.; GERDES, S.; PARRELLO, B.; SHUKLA, M.; VONSTEIN, V.; WATTAM, A. R.; XIA, F.; STEVENS, R. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 206-214.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PROSBA-BIACZYK, U.; SZAJSNER, H.; GRZYS, E.; DEMCZUK, A.; SACALA, E.; BAK, K. Effect of seed stimulation on germination and sugar beet yield, **International Agrophysics**, v. 27, p. 195-201, 2013.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. - **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**.

SANO, N.; RAJJAOU, L.; NORTH, H.; DEBEAUJON, MARION-POLL, A.; SEO, M. Staying Alive: Molecular aspects of seed longevity. **Plant Cell Physiol**, v. 1, n.15, p. 1-15, 2015.

SANTOS, J. F.; ALVARENGA, R. O.; TIMÓTEO, T. S.; CONFORTO, E. C.; MARCOS FILHO, J.; VIEIRA, R. D. Avaliação do potencial fisiológico de lotes de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 743-751, 2011.

SILVA, S. A.; CERQUEIRA, L. S.; VILARINHOS, A. D.; AMORIM, E. P.; MOREIRA, R. F. C.; COSTA, M. A. P. C. Variabilidade genética em cultivares de mamona por meio de marcadores RAPD. **Magistra**, v. 24, n. 4, p. 341-347, 2012.

SMITH, I. K.; VIERHELLER, T. L.; THORNE, C. A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid). **Analytical biochemistry**, v. 175, n. 2, p. 408-413, 1988.

SOUZA, L. A.; CARVALHO, M. L. M.; KATAO, V. Y.; OLIVEIRA, J. A. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 60-67, 2009.

SRIVASTAVA, A.; MALIK, L.; SARKAR, H.; ZAKERI, M.; SONESON, C. Alignment and mapping methodology influence transcript abundance estimation. **BioRxiv**, v. 3, p. 01-21, 2019.

TELES, C. A. S. **Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica**. 2013, 97f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

TESNIER, k.; STROOKMAN-DONKERS, H. M.; VAN PIJLEN, J. G.; VAN DER GEEST, A. H. M.; BINO, R. J.; GROOT, S. P. C. A controlled deterioration test for *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. **Seed Science e technology**, v. 30, p. 149-165, 2002.

The UniProt Consortium, **Nucleic Acids Research**, v. 45, 2017.

WAN, C. Y.; WILKINS, T. A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Analytical Biochemistry**, v. 233, n. 1, p. 7-12, 1994.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews/ Genetics*, v. 10, p. 57-63, 2009.

ZUCHI, J.; PANOZZO, L. E.; HEBERLE, E.; ARAUJO, E. F. Curva de embebição e condutividade elétrica de sementes de mamona classificadas por tamanho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3, p. 504 - 509, 2012.

CAPÍTULO 03: Efeito do envelhecimento acelerado no perfil fisiológico, bioquímico e molecular em sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* L.

RESUMO

O processo de envelhecimento da semente é iniciado a partir da maturidade fisiológica e envolve uma redução progressiva na viabilidade e vigor da semente. São vários os processos de deterioração que levam ao desequilíbrio na produção de ERO e os danos causados podem ser irreversíveis e até ocorrer morte celular. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar marcadores fisiológicos, metabólitos e moleculares para avaliar a deterioração de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu, submetidas ao envelhecimento acelerado (EA). Caracterização inicial do lote foi realizada, além das análises de germinação, grau de umidade, condutividade elétrica, pH do exsudato, teste de tetrazólio, curva de embebição, dos transcritos (RNA-seq), do perfil metabólômico, da peroxidação lipídica, do malonaldeído (MDA), da atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHA), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutatona redutase (GR), glutatona peroxidase (GPX), glutatona S-transferase (GST) e quando submetidas ao EA (10 dias a 40°C e 85% UR). Após o EA não houve alteração significativa para o Gmax, T50 e AAC. No entanto, ocorreu redução significativa na uniformidade, aumento significativo na quantidade de plântulas deterioradas e as normais apresentaram uma redução significativa na biometria e massa seca. A condutividade elétrica aumentou significativamente com o tempo, enquanto o pH não apresentou alteração. A viabilidade e o vigor reduziram em 50% (teste de tetrazólio). Quanto ao perfil metabolômico e transcriptômico foram identificados metabólitos em resposta ao estresse submetido, a exemplo de açúcares redutores, responsáveis pela proteção através da formação do estado vítreo nas sementes e maior expressão de genes do metabolismo energético nas sementes necessários à respiração celular. Dentre os metabólitos secundários produzidos há diferença entre os tecidos analisados no embrião e no tegumento. Após o EA as sementes inteiras apresentaram uma redução significativa no resultado de MDA, CAT e APX, enquanto a atividade da SOD e DHAR aumentou significativamente em semente inteira e embrião. Nos embriões houve redução significativa de MDHAR, GST e GPX, após o EA. No entanto, a atividade de GR não apresentou diferença significativa entre as sementes em nenhuma das condições analisadas. A condição de EA realizada foi suficiente para reduzir a qualidade e o vigor inicial das sementes e verificar a presença e biomarcadores.

Palavras-chaves: Mamona. Qualidade. Marcador de envelhecimento.

1. INTRODUÇÃO

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma das principais oleaginosas produzidas pelo pequeno agricultor, no semiárido nordestino, seu óleo apresenta uma grande aplicabilidade industrial (BELTRÃO *et al.*, 2003; CHAVES *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2019). A cultivar 188 BRS Paraguaçu apresenta um potencial genético para uma produtividade satisfatória em condições climáticas do semiárido, se tornando uma boa opção para o pequeno agricultor do semiárido Nordeste, devido as suas características.

Preservar e garantir a qualidade das sementes é de grande importância, principalmente quando se busca o sucesso da lavoura, além dos benefícios de aumento do rendimento do produto econômico. Entre os principais atributos da qualidade fisiológica, está o vigor das sementes. O uso de sementes de alto vigor é justificado em todas as culturas com o objetivo de assegurar o desenvolvimento das sementes, em uma ampla variação de condições ambientais de campo encontradas, durante a emergência de plântulas (TEKRONY e EGLI, 1991; SCHUCH *et al.*, 2009; SCHEEREN *et al.*, 2010).

A capacidade de desempenhar funções vitais, caracterizada pela germinação, vigor e longevidade, que afeta diretamente a implantação da cultura em condições de campo, pode definir a qualidade fisiológica das sementes. Assim, a redução na qualidade da semente, é em geral, caracterizada pelo decréscimo na porcentagem de germinação, aumento de plântulas anormais e redução no vigor das plântulas (SCHUCH *et al.*, 2009; TOLEDO *et al.*, 2009; SMANIOTTO *et al.*, 2014).

Em virtude de uma redução financeira em relação aos gastos com plantios utilizando sementes que não germinam ou que possuem baixa qualidade (possuem baixa germinação ou uma germinação não uniforme), é preciso pesquisas direcionadas a análise do vigor e a viabilidade das sementes de diferentes culturas de *R. communis*. Portanto, há a necessidade de utilização de métodos rápidos e confiáveis para a avaliação segura do potencial fisiológico destas sementes, já que o objetivo básico dos testes de vigor é a identificação de diferenças importantes no potencial fisiológico de diferentes lotes de sementes (MARCOS FILHO, 1999; MARCOS FILHO, 2005; DAVID *et al.*, 2013).

Dentre os testes existentes e utilizados para a avaliação do potencial fisiológico das sementes, deve-se considerar testes que permitam os resultados de acordo com potencial fisiológico e que possam ser comparados com o desempenho das sementes em condições de campo. Em meio aos vários procedimentos usados para avaliar o vigor das sementes, o envelhecimento acelerado (EA) é um dos mais empregados, pois é considerado um dos mais sensíveis e eficientes para avaliação do vigor de sementes de diversas espécies. O EA simula as condições de estresse ambientais nas sementes, gerando uma taxa de respiração e consumo de reservas. Desta forma, acelera os processos metabólicos que levam a deterioração das sementes. Este é utilizado para comparar os lotes e permite a identificação daqueles lotes que apresentam sementes de melhor comportamento germinativo após serem submetidas ao EA, além de permitir um aprofundamento nos estudos sob a resposta das sementes ao EA (MARCOS FILHO, 1999; PIÑA-RODRIGUES *et al.*, 2004; MARCOS FILHO, 2005; DAVID *et al.*, 2013; CHAN e LASSIM, 2019).

Processos metabólicos complexos ocorrem durante a deterioração, interferindo diretamente no potencial fisiológico da semente. A velocidade da deterioração nas sementes é caracterizada principalmente pela genética da cultivar, teor de água e temperatura do ambiente. São várias as alterações resultantes da deterioração das sementes, tais como: modificações fisiológicas, bioquímicas e genéticas (MARCOS FILHO, 1999; SILVA *et al.*, 2008; CHAN e LASSIM, 2019; NAZAR *et al.*, 2020). A deterioração ocasiona maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), danos nos cromossomos, degradação e modificações enzimáticas, degradação de biomoléculas importante do sistema respiratório, redução na síntese de adenosina trifosfato (ATP), desorganização e danos nas membranas celulares, peroxidação lipídica, descontrole do metabolismo e das trocas de água e solutos entre célula e meio externo, redução na viabilidade das sementes, dentre outros danos. Desta forma, o teste de envelhecimento acelerado é considerado como um dos mais sensíveis para avaliação de vigor (MARCOS FILHO, 1999; SILVA *et al.*, 2008; CHAN e LASSIM, 2019; NAZAR *et al.*, 2020).

O EA tem como princípio a submissão de sementes a alta temperatura e umidade, e com isso, a deterioração é aumentada, resultando na perda de sua qualidade. Portanto, o estudo dos mecanismos de envelhecimento de sementes e a determinação de indicadores de qualidade das sementes são importantes e resultam

como um avanço e um benefício na pesquisa. O processo de germinação das sementes envolve uma sequência de reações bioquímicas onde as substâncias de reserva das sementes, são utilizadas, transportadas ou ressintetizadas no eixo embrionário, sendo iniciado, com a absorção de água pelas sementes. Após a hidratação das sementes ocorre aumento do metabolismo, acompanhado pelo aumento da taxa respiratória, ativação de enzimas, síntese de RNA e proteína, ativação e desativação de genes. Outro fator importante, são os metabólitos primários, que estão relacionados com a síntese de compostos essenciais para a sobrevivência da semente, além dos compostos do metabolismo secundários, que podem ser produzidos ou ter sua produção natural intensificada devido ao estresse do EA (HÖFS *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2008; ATAÍDE *et al.*, 2012; PEREIRA e CARDOSO, 2012).

Avaliar e comparar as sementes que não foram expostas com as que foram expostas ao EA é importante para estudar todas as modificações que ocorrem nas sementes antes e após o envelhecimento. E a partir dessas informações potencializar os estudos e definir biomarcadores que sejam capazes de identificar o estado das sementes, através da avaliação da qualidade e a possibilidade do uso no plantio. Esses dados podem ser obtidos através de estudos na fisiologia, bioquímica e dos mecanismos moleculares das sementes. A identificação de marcadores poderá ser utilizada na produção de kits e/ou métodos rápidos para avaliar lotes de sementes, e assim facilitar o processo de escolha das sementes. Portanto, poderá ajudar em novos estudos científicos, e principalmente ao pequeno agricultor, através de conhecimento e protocolos que forneçam subsídios para o esclarecimento e utilização de sementes viáveis para uma melhor produção.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar marcadores fisiológicos, bioquímicos (enzimas antioxidantes, metabólitos primários e secundários) e moleculares para avaliar a deterioração de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu, submetidas ao envelhecimento acelerado (EA).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos foram realizados como descrito no Capítulo II. Realizou-se: determinação da qualidade inicial das sementes de mamona da cultivar BRS 188 Paraguaçu, o teste de germinação, a curva de embebição, a determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato, o teste de tetrazólio, o envelhecimento

acelerado e caracterização das sementes após o EA, RNA-seq, Análise Metabolômicas (determinação dos metabólitos primários por GC-MS e dos metabólitos secundários por LC-MS, peroxidação lipídica e análise de enzimas antioxidantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da qualidade inicial das sementes de mamona da cultivar BRS 188 Paraguaçu

3.1.1 Biometria, peso de mil sementes, determinação do grau de umidade das sementes, determinação da umidade relativa e temperatura do ambiente

A caracterização das sementes permite um conhecimento prévio sobre como está o lote adquirido, as informações obtidas da morfologia das sementes são pode auxiliar na avaliação da qualidade das sementes em algumas espécies, pois algumas espécies podem ter o seu tamanho associado ao vigor, mas não é regra. Estes dados associados a germinação são parâmetros importantes para a identificação e diferenciação lotes, genótipos e identificação da variabilidade genética dentro de uma população de uma mesma espécie. Além de fornecer elementos que podem auxiliar no entendimento sobre vigor, armazenamento, viabilidade e métodos de propagação da espécie (BORGES e RENA, 1993; MATHEUS e LOPES, 2007; AQUINO *et al.*, 2009; SCHULZ *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2018).

Inicialmente foi realizada uma caracterização do lote das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu. Para avaliação biométrica (mm) foram determinados o tamanho comprimento 17,08, largura 12,90 e espessura 7,39. O volume foi de 1628,25 (mm³), peso de mil sementes 715 ± 1,28 (g), grau de umidade 5 ± 0,14 (%), umidade relativa 55 ± 3,2 (%) e temperatura do ambiente 21 ± 0,9 (°C).

Jesus Filho (2014) obteve resultados semelhantes na avaliação biométrica (mm) das sementes BRS 188 Paraguaçu, comprimento 17,35, largura 12,92 e espessura 7,15. No entanto, Gomes Neto (2016) teve um resultado (mm) diferente em relação ao comprimento 16, 44. Mas com valores de largura 12,63 e espessura 7,09 muito próximos aos obtidos nesta pesquisa.

As diferenças nos resultados podem ser justificadas porque há variações individuais devidas às influências de fatores bióticos e abióticos, durante o

desenvolvimento das sementes e à variabilidade genética característica da mamona, além, da variabilidade das condições do plantio. Assim, o tamanho e a massa de sementes podem variar entre plantas da mesma espécie, de ano para ano e, também, dentro de uma mesma planta (PIÑA-RODRIGUES e AGUIAR, 1993).

O valor encontrado para o peso de mil sementes foi muito próximo ao encontrado nos trabalhos descrito por Zuchi (2008) e Jesus Filho (2014), que registraram os valores de 711g e 738,1g, respectivamente. A variação no peso das sementes pode ser justificada pela localização do plantio, condições do cultivo, forma de armazenamento, diferenças genéticas, efeitos do ambiente durante a sua formação. Contudo, um menor valor no peso de mil sementes, não indica que as sementes da cultivar será menos produtiva do que um cultivar com peso de mil sementes maior (BEZERRA *et al.*, 2012; JESUS FILHO, 2014; JESUS, 2016; ARAÚJO NETO *et al.*, 2018).

As sementes apresentaram grau de umidade de $5 \pm 0,14$ (%), este é um fator de grande importância para a qualidade da semente. As sementes tendem a entrar em equilíbrio higroscópico com o ambiente, e quanto maior a umidade do ambiente, maior a umidade das sementes. O aumento da umidade e da temperatura gera um aumento da taxa de respiração e da atividade metabólica da semente. Além de desencadear outros processos, como o aumento das atividades enzimáticas, metabólicas, ácidos graxos livres, ainda é capaz de originar a aceleração da velocidade de deterioração das sementes (SMANIOTTO, 2013; MOROZESK *et al.*, 2014; JUVINO *et al.*, 2014; SANTOSO *et al.*, 2015). Estes distúrbios no equilíbrio levam ao aumento súbito de níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio, que podem causar danos significativos ao DNA, peroxidação lipídica, oxidação de proteínas e morte celular (GILL e TUJETA, 2010; ROCHA, 2014; BAILLY, 2019).

O grau de umidade encontrado para as sementes em análise é considerado um bom valor para sementes oleaginosas. Segundo as RAS (BRASIL, 2009) a umidade máxima para sementes oleaginosas é de no máximo 10%. Além disso, o valor da temperatura do ambiente também foi adequado, já que a ação simultânea de alta umidade relativa e alta temperatura do ambiente aceleram o processo de deterioração das sementes ortodoxas como a mamona (MACOS FILHO, 2005).

3.1.2 Procedimentos pré-germinativos em sementes empregadas no teste de germinação: sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE)

A germinação das sementes é um processo crítico de desenvolvimento do ciclo de vida de espermatófitos. Uma germinação bem-sucedida e o desenvolvimento de plântulas normais, são fatores decisivos para o desenvolvimento da planta e boa produção. As atividades metabólicas do eixo embrionário são retomadas durante a germinação, após a embebição de água. No entanto, quando estimulado por condições ambientais, desenvolve-se, ocorrendo então, o rompimento do tegumento pela radícula. Essa é uma etapa crítica para o biociclo vegetal pelo fato de o processo estar associado a vários fatores de natureza extrínseca (fatores do ambiente físico e fatores bióticos) e intrínseca, ou seja, a processos fisiometabólicos (SANTOS, 1999; NERY *et al.*, 2007; FAGUNDES *et al.*, 2011; BARBOSA, 2020).

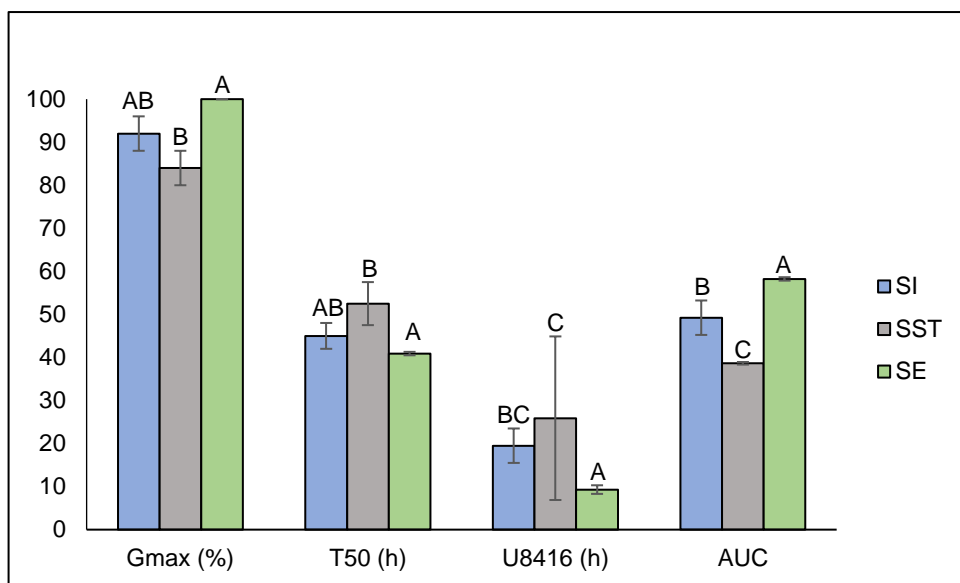
Parâmetros da germinação de sementes são de grande importância para avaliar a qualidade das sementes e assim determinar o vigor do lote. A germinação máxima (Gmax) serve para avaliar a qualidade das sementes quanto à germinação; através do T50 (tempo para alcançar 50% da germinação) se analisa a viabilidade e vigor das sementes; o índice de uniformidade (U8416) corresponde ao tempo que as sementes de um determinado lote germinam dentro do espaço de tempo específico, permitindo avaliar o quanto uniforme é a germinação; a área abaixo da curva de germinação (AAC) é um parâmetro que permite avaliar o vigor das sementes a partir do Gmax e T50 (JOOSSEN *et al.*, 2010).

Inicialmente foi determinado qual a melhor forma de germinar as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu, submetendo as suas sementes a tratamentos pré-germinativos e avaliando a germinação das SI, SST e SE (Figura 7).

O valor de Gmax apresentou diferença significativa apenas entre as condições SST e SE, o mesmo aconteceu para T50 e U8416. No entanto, a AAC teve uma diferença significativa para as três condições. Diante dos resultados, a condição SI foi a mais interessante para dar continuidade aos experimentos, já que apresentou bons resultados e menor discrepância ao se avaliar os parâmetros da germinação e vigor, tais como: plântulas normais (%), plântulas anormais deformadas (%), plântulas anormais deterioradas (%), sementes mortas (%) (confirmada pelo teste de tetrazólio),

sementes não germinadas (determinadas pelo teste de tetrazólio), biometria das plântulas normais (mm) e massa seca das plântulas normais (g). A germinação das sementes inteiras promoveu melhores resultados, e não diferiu significativamente quanto as sementes que foram escarificadas em relação a quatro parâmetros dos sete analisados (Tabela 1).

Figura 7 - Procedimentos pré-germinativos para sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*. Sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE), germinação máxima – Gmax (%), tempo para alcançar 50% da germinação - T50 (horas), índice de uniformidade da germinação - U8416 (horas), área abaixo da curva de germinação – AAC (adimensional).



Letras iguais maiúsculas não representam diferença de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

A embebição das sementes constitui um importante procedimento técnico para auxiliar na identificação da especificidade de dormência, sobretudo quando associado à dureza e à impermeabilidade de tegumento. Além disso, a velocidade de absorção da água pelas sementes é influenciada pelas condições ambientais e pelo tegumento (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; SANTOS *et al.*, 2007; MORAIS, 2007; CAVARIANI *et al.*, 2009). Ao se avaliar os resultados da Figura 7, os maiores desvios estatísticos ocorreram em sementes sem tegumento. Isto quer dizer que a semente embebeu intensamente, uma vez que o tegumento também é um regulador na entrada de água nas sementes. Sementes que embebem muito rapidamente não tem uma organização equilibrada, inicialmente, dos arranjos lipoproteicos da bicamada das membranas celulares (MARCOS FILHO, 2005; GALINDO, 2006; SILVA *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas (%), número de sementes não germinadas (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g) de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*, em sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST), sementes escarificadas (SE).

	SI	SST	SE
Plântulas normais (%)	76 A	28 C	48 B
Plântulas anormais deformadas (%)	5 C	21 B	36 A
Plântulas anormais deteriorada (%)	11 C	36 A	15 B
Sementes mortas (%)	0 B	15 A	0 B
Sementes não germinadas (%)	8 A	0 B	1 B
Biometria plântulas normais (mm)	66 A	50 B	65 A
Massa seca plântulas normais (g)	0,570 A	0,195 C	0,298 B

Letras iguais maiúsculas nas linhas não representam diferença de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

A água é um fator imprescindível, pois o processo germinativo se inicia com a absorção de água pelo processo de embebição, ocorrendo a reativação do metabolismo e promovendo o amolecimento do tegumento, favorecendo a entrada do oxigênio, e aumento do volume do embrião e uso dos tecidos de reserva, estimula as atividades metabólicas básicas, favorecendo o crescimento do eixo embrionário (MARCOS FILHO, 1986; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; FONSECA e PEREZ, 2003; DRUMOND *et al.*, 2020). A velocidade na qual a água é absorvida pela semente é influenciada quando há modificação das condições do ambiente, mas a quantidade máxima de água absorvida não se altera, pois é uma propriedade dos coloides hidrofílicos da semente, condicionada pela maturação e/ou pelas condições de armazenamento (LABOURIAU, 1983; CAVARIANI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2020).

O tegumento funciona como um protetor das sementes, a sua remoção facilita o processo de penetração da água e nutrientes para dentro da semente. Além do fato de acelerar a embebição, pode existir alguma substância química, presente no tegumento, que iniba a germinação. No entanto, a sua parcial ou total ausência faz com que os processos metabólicos das sementes aumente de forma muito rápida. Fatores ambientais tais como temperatura e umidade relativa podem afetar diretamente o estado das sementes, gerando alterações metabólicas e danos nas sementes. A remoção do tegumento pode facilitar a contaminação por fungos e bactérias, e a ocorrência de danos ao embrião (SOETISNA *et al.*, 1985; FOGAÇA,

2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006; MORAES, 2007). Em virtude destes acontecimentos, e de acordo com os resultados obtidos, a germinação de sementes com tegumento demonstrou ser a melhor opção para ter uma boa germinação e obter plântulas com maior vigor e qualidade. A partir destes parâmetros, os demais experimentos foram realizados com as sementes com tegumento.

3.1.3 - Curva de embebição para sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE)

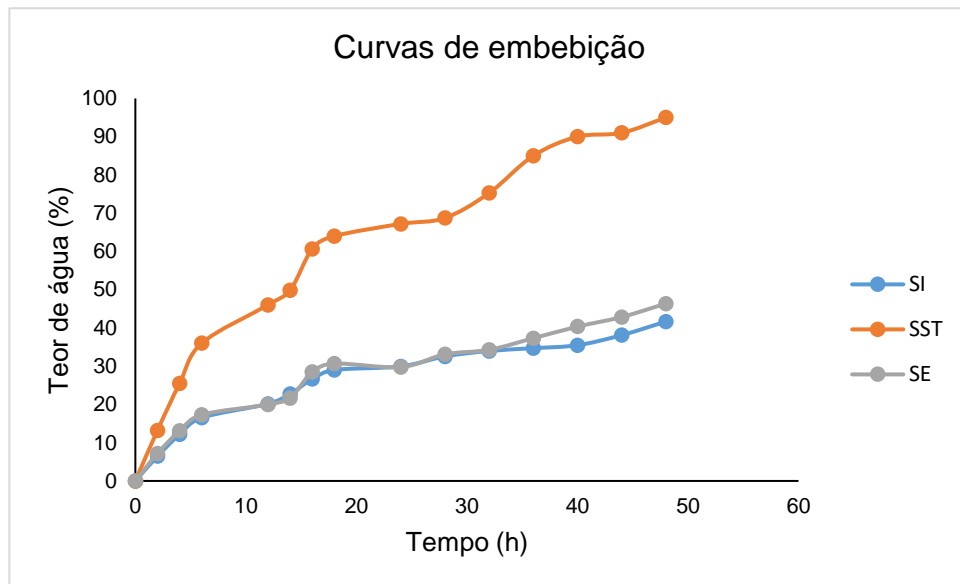
A embebição é uma etapa importante para a germinação das sementes, já que a absorção de água, é necessária para a ativação dos processos metabólicos. A embebição é composta por três fase, na fase I há a rápida absorção da água, que ocorre tanto nas sementes viáveis como nas inviáveis, em consequência do potencial hídrico existente entre a semente e o substrato. Além disso, ocorre também o aumento da atividade respiratória, ativação de enzimas e a síntese de proteínas a partir do RNA mensageiro (RNAm) armazenado nas sementes durante o final do processo de maturação. A fase II é considerada como a mais longa do processo e praticamente não há absorção de água, nesta fase acontece a preparação para a germinação por meio de degradação das substâncias de reservas para gerar compostos ricos em energia para o crescimento do embrião. E a fase III é caracterizada pela protusão radicular e crescimento da plântula (BEWLEY e BLACK, 1994; MARCOS FILHO, 2005; TELES, 2013).

De acordo com os dados obtidos na curva de embebição (Figura 8), entre os períodos de 0 a 16 horas para SI, SST e SE ocorreu aumento do peso fresco das sementes, caracterizando rápida embebição de água, indicando que as sementes se encontravam na Fase I de embebição de água, como descrito por Bewley e Black (1994).

Entre os períodos de 18 até 32 horas para SI e SE (Figura 8) e de 18 até 28 horas para SST (FIGURA 8), houve menor aumento no peso fresco das sementes, caracterizando uma fase estacionária e de menor intensidade de embebição, indicando que as sementes neste período estavam na fase II do processo de embebição. Após o período da fase II verificou-se um novo aumento no peso fresco, sendo a partir das 36 h de embebição para SI e SE; e de 32 h para SST, representativo

de uma embebição mais intensa, quando também se deu início à protrusão da radícula de algumas sementes, caracterizando a Fase III do processo de embebição de água das sementes (BEWLEY e BLACK, 1994; TELES, 2013).

Figura 8 - Curvas de embebição de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*. Sementes inteiras (SI), sementes sem tegumentos (SST) e sementes escarificadas (SE).



As condições de embebição das sementes na sua primeira fase foram semelhantes em valores, provavelmente por se tratar do mesmo lote de semente e por estas possuírem boa qualidade (DE CASTRO e HILHORST, 2004; PINHO *et al*, 2004; LUZ, 2012; TELES, 2013). As diferenças passaram a ser encontradas na segunda e terceira fase, e estas podem ser justificadas pelo potencial hídrico e pela ausência do tegumento. O tegumento funciona como uma barreira física que dificulta a absorção de água, retardando a ocorrência das reações químicas que desencadeiam o processo germinativo (OLIVEIRA e SCIVITTARO, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2010).

O estudo da embebição de água nas sementes, mesmo sendo da mesma espécie e cultivar, é importante em pesquisas científicas, pois o conhecimento deste processo permite o entendimento das etapas iniciais do processo germinativo e possibilita o desenvolvimento de técnicas que visem avaliar e melhorar a qualidade das sementes, utilizando diferentes tratamentos. Além disso, saber como as sementes

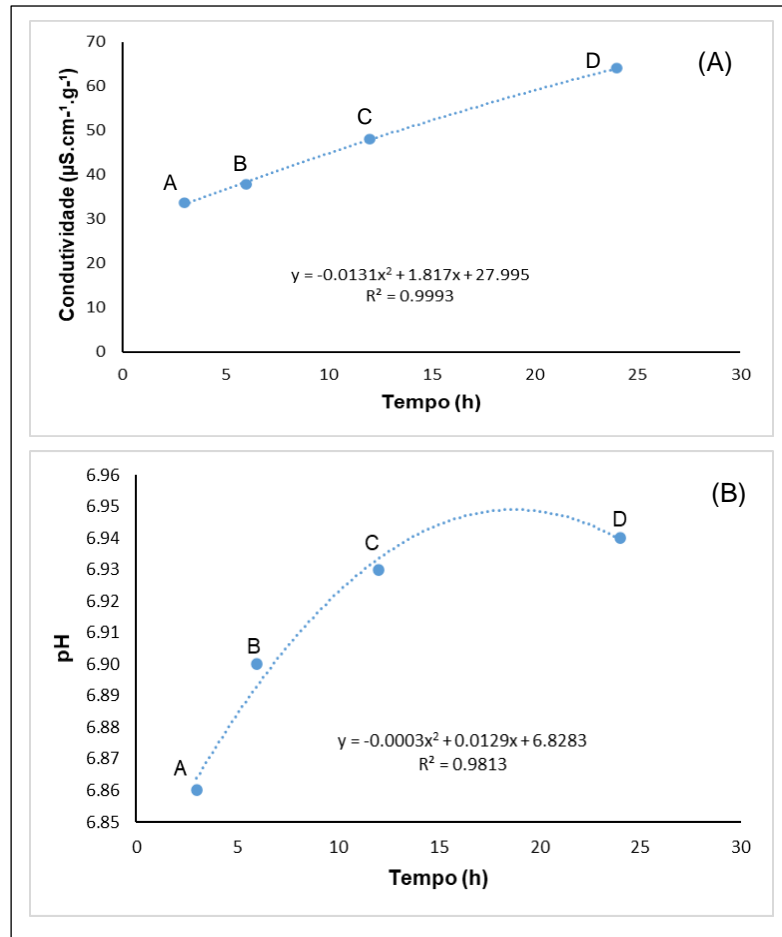
se comportam durante a embebição, a depender de cada condição estudada é importante para continuidade de futuros experimentos.

Neste trabalho, as primeiras horas de embebição são muito próximos, verificou-se o tempo de seis horas como um tempo suficiente para embeber as sementes e reativar o metabolismo celular, permitindo assim, avaliar metabólitos, genes e enzimas, produzidos e armazenados durante o desenvolvimento das sementes e que não estão relacionados com a germinação. Além disso, ao observar as sementes durante a embebição, percebeu-se que as sementes sem tegumento foram as mais afetadas, por estarem mais susceptíveis a microrganismos e ao estresse do ambiente, assim como, algumas sementes escarificadas. Diante dos resultados obtidos durante a germinação (Figura 7 e Tabela 1), foi decidido que todos os experimentos com as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* seriam realizados usando sementes na condição de semente inteira. Além disso, em experimentos que foram necessários embeber as sementes, estas foram embebidas por 6 horas a 30°C, temperatura adequada para a espécie *R. communis*.

3.1.4 Determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato

É possível verificar um resultado significativo no aumento da condutividade elétrica em relação ao aumento do tempo de embebição, este resultado demonstra que há alteração na membrana e liberação de exsudatos (Figura 9). No entanto, os danos não são suficientes para liberar exsudatos que alterem o pH do meio de forma significativa. Isso pode ser justificado por se tratar do uso de sementes com qualidade, como verificado através dos parâmetros de germinação. Pois, para a maioria das espécies o padrão de germinação é igual ou superior a 80% (Instrução Normativa MAPA 45/2013 para mamona; BARROS NETO et al., 2014; MENDES de PAULA, 2020). Além disso, nos estudos de David *et al.* (2013) considera sementes de *R. communis* IAC-226 com germinação de 80, 76 e 76 (%) e com plântulas normais 76, 66 e 72 (%) como sementes com vigor. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Braga Junior *et al.* (2011) com sementes de *R. communis* BRS Energia, considera uma semente de alta qualidade a germinação de 89 % e plântulas normais 79%.

Figura 9 – (A) Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e (B) pH de exsudato das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*, durante o período de três, seis, doze e vinte e quatro horas.



Letras iguais maiúsculas representa que não há diferença significativa, de acordo com o teste Tukey 5% de probabilidade.

Segundo Souza et al., (2009) as sementes sem qualidade ou com qualidade inferior, liberam maior quantidade de eletrólitos em consequências de uma menor permeabilidade seletiva da membrana, pois a perda do potencial fisiológico da semente está ligada diretamente às maiores quantidades de solutos lixiviados, resultante de uma perda da integridade da membrana (HEPBURN et al., 1984; LIMA et al., 2007; MENDES de PAULA, 2020). Portanto, é possível afirmar que as sementes utilizadas estão com boa qualidade, sem perda da integridade de membrana, demonstrado pelos valores máximos de condutividade elétrica obtidos, e a não ocorrência de alteração do pH, independentemente do tempo de análise, confirmando

que não houve perda eletrólitos de forma a causar diminuição do processo germinativo.

3.1.5 Teste de tetrazólio

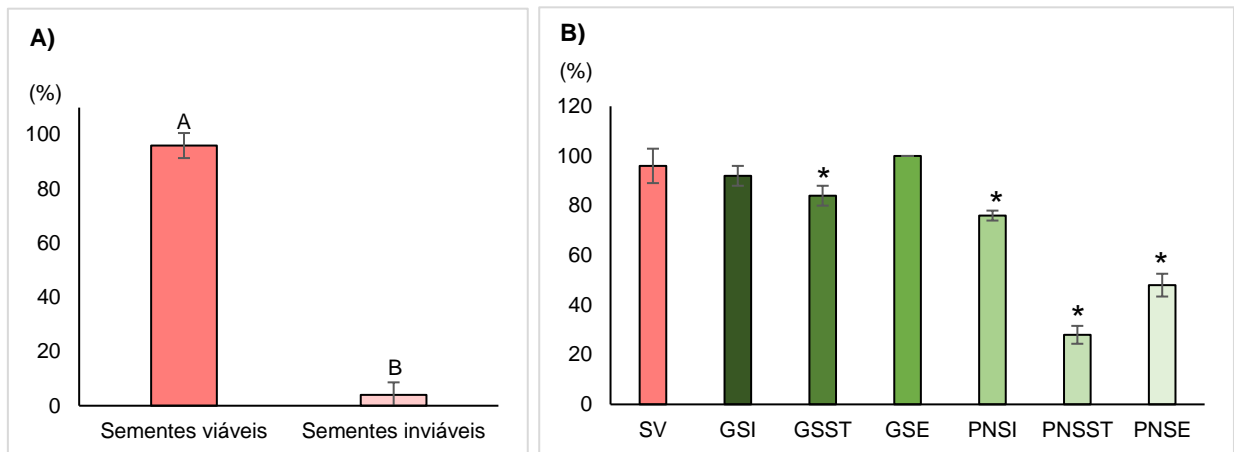
O teste de tetrazólio é utilizado para avaliar o vigor e a viabilidade das sementes. Este, baseia-se na atividade das desidrogenases nos tecidos vivos, estas enzimas catalisam reações nas mitocôndrias durante a glicólise e o ciclo de Krebs. A liberação de íons de hidrogênio ocorre durante o processo de respiração celular. Em especial os íons de H^+ liberados durante a respiração dos tecidos vivos são transferidos por um grupo de enzimas desidrogenases, particularmente, a desidrogenase do ácido málico, e reage com o sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, substância de coloração incolor e solúvel, que se difunde pelo tecido da semente. Ao reagir com os íons de hidrogênio, o tetrazólio forma uma substância estável, de coloração vermelha e insolúvel denominada de formazam, sendo, portanto, utilizado para avaliar a viabilidade da semente (MORAES, 2007; GASPAR-OLIVEIRA *et al.*, 2009). Esta reação se processa no interior das células vivas e o composto se difunde, e, portanto, há nítida separação dos tecidos vivos e coloridos que respiram, daqueles mortos e que não colorem (DELOUCHE *et al.*, 1976; GASPAR-OLIVEIRA *et al.*, 2009; RODRIGUES, 2019). Os resultados do teste de tetrazólio nas sementes de BRS 188 Paraguaçu visando verificar o vigor e a viabilidade das sementes estão na Figura 10 (A).

Verificou-se que o lote da cultivar BRS 188 Paraguaçu possui uma quantidade maior de sementes viáveis, resultando em um lote viável para o uso de sementes (Figura 10 - A). A viabilidade das sementes foi avaliada individualmente, verificando-se a estrutura da semente pelo teste de tetrazólio e os danos ocorridos, no embrião e no endosperma. Dando-se ênfase a coloração vermelha, localização das manchas, presença de lesões e turgescência dos tecidos, especialmente na região do embrião. Principalmente porque os tecidos vigorosos tendem a se colorir de forma uniforme.

Ao avaliar a porcentagem de viabilidade das sementes com os resultados de germinação (%) e plântulas normais (%), houve diferença significativa para todas as

condições analisadas, com exceção da germinação das sementes inteiras e sementes escarificadas (Figura 10 - B).

Figura 10 – Resultados do teste de tetrazólio em lote de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*. (A). Comparação entre a porcentagem de Sementes Viáveis (SV) com Germinação Sementes Inteiras (GSI), Germinação Sementes Sem Tegumentos (GSST), Germinação Sementes Escarificadas (GSE), Plântulas Normais Sementes Inteiras (PNSI), Plântulas Normais Sementes Sem Tegumentos (PNSST) e Plântulas Normais Sementes Escarificadas (PNSE).



Letras iguais maiúsculas nas barras representam que não há diferença significativa de acordo com o teste t de Student a 5% de probabilidade.

Valores seguidos de asterisco (*) diferem significativamente do grupo controle (SV) pelo teste de Dunnett a 5% de significância.

O teste de tetrazólio pode ser relacionado com a viabilidade, no caso, pode ser comparado com as altas germinações das condições SI e SE (Figura 10 – B). Provavelmente, não há uma correlação direta com as sementes que tiveram total remoção do tegumento, pois, pode ter ocorrido algum dano mecânico nas sementes durante a execução do teste, ou danos causados por embebição rápida e aumento da ocorrência de microorganismos. Segundo Mendes *et al.* (2009) quando se remove totalmente o tegumento, a velocidade de germinação é aumentada pelo fato de não haver barreira para a hidratação dos tecidos da semente, nem para o crescimento do embrião.

O teste de tetrazólio permite identificar o vigor e viabilidade da semente, no entanto, não há garantias sobre o desenvolvimento das plântulas. Pois pode ocorrer interferências durante o desenvolvimento daquela semente, como ação de microorganismo, sendo uma limitação do teste (KRZYZANOWSKI *et al.*, 1999; LUZ, 2012). Além disso, os resultados obtidos no teste de tetrazólio, tendem a ser maiores que os obtidos no teste de germinação, em função de não se verificar pelo teste a

presença de fungos e a ocorrência de sementes dormentes (PIÑA-RODRIGUES e SANTOS, 1988; MORAES, 2007; GASPAR-OLIVEIRA 2009; GASPAR-OLIVEIRA, 2011). Outro fator importante é sobre os valores adquiridos pelo teste de tetrazólio poderem variar em 10 pontos percentuais em relação à média de germinação (FOGAÇA, 2000; MORAES, 2007). Então, é justificável os resultados da Figura 10-B, principalmente em relação ao fato das germinações de todas as condições serem superiores a 80% e existir uma discrepância em relação a porcentagem de plântulas normais serem inferiores a porcentagem de germinação.

3.2 Sementes submetidas a tratamento de envelhecimento acelerado

O EA consiste em submeter as sementes a altas condições de umidade e temperatura. Este baseia-se no fato de que a taxa de deterioração das sementes é aumentada consideravelmente através de sua exposição a níveis elevados de temperatura e umidade relativa. Devido a isso, sementes de menor qualidade deterioram-se mais rapidamente do que as mais vigorosas, com reflexos na germinação após o EA. Assim, o EA além de ser reconhecido na avaliação de vigor, é capaz de proporcionar informações com alto grau de consistência (TESNIER, 2002; MORAES, 2007).

Para realizar o melhor ajuste de protocolo para o EA em sementes de *R. communis* foi realizado um teste piloto para avaliar qual o melhor tempo de submissão das sementes com tegumento ao EA. Foram estabelecidas a temperatura de 40°C e 85% UR, baseando-se nos estudos, Delouche (1965), Braga Junior *et al.* (2011) e David *et al.* (2013), com adaptações.

Durante todo o experimento de EA foi monitorado a umidade nas sementes, a temperatura e umidade relativa do ambiente, como exposto na Tabela 2.

A umidade das sementes variou significativamente ao longo dos 15 dias ao se comparar com o grupo de sementes controle (sementes que não foram submetidas ao EA). Isso foi verificado com o aumento significativo da temperatura e a umidade relativa do ambiente. Estes fatores são de grande importância para a qualidade da semente, pois estes alteram facilmente a qualidade fisiológica das sementes, acelerando a deterioração das sementes e reduzindo o vigor e a viabilidade, que pode ser confirmado facilmente pelos resultados de germinação (Figura 11).

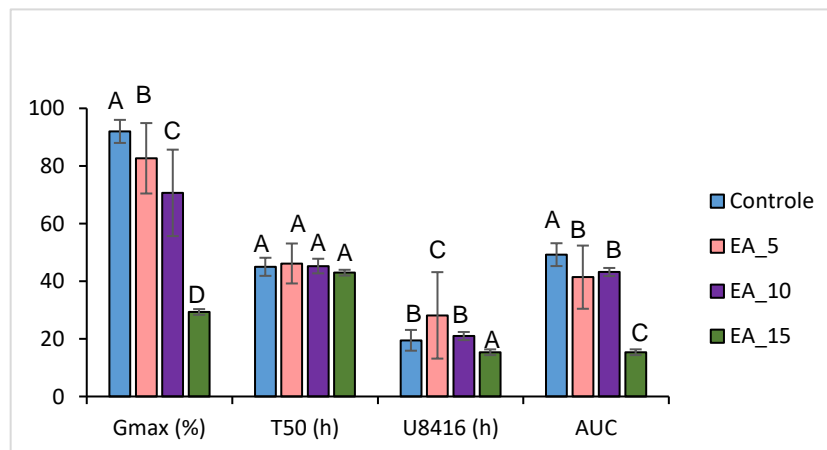
Tabela 2 – Grau de umidade da semente (%), temperatura (°C) e umidade relativa (UR) do ambiente (%), antes (controle) e após as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* serem submetidas ao teste envelhecimento acelerado (TEA) a 40 °C e 85% de umidade, durante o período de 5, 10 e 15 dias.

	Sementes	Ambiente	
	Umidade (%)	Temperatura (°C)	UR (%)
Controle	5 ± 0,14 A	21 ± 0,9 A	55 ± 3,2 A
EA 5	7 ± 0,14 C	40 ± 0,8 B	78 ± 5,3 B
EA 10	6 ± 0,08 B	40 ± 0,8 B	78 ± 5,3 B
EA 15	7 ± 0,12 C	40 ± 0,8 B	78 ± 5,3 B

Letras iguais maiúsculas na coluna não representam diferença significativa de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

A germinação apresentou redução significativa ao longo dos diferentes tempos de EA, quinze dias apresentou os piores valores em relação a germinação. Além disso, aos quinze dias de EA houve um aumento na quantidade de sementes mortas e com maiores danos (Tabela 3), o que não seria interessante e viável para as análises de RNA-seq e análises metabolômicas (GC-MS e LC-MS) a serem realizadas, visando estudar o metabolismo e mecanismos moleculares durante o envelhecimento das sementes. A partir dos valores da germinação (Figura 11) e os valores dos parâmetros da germinabilidade (Tabela 3), optou-se então por continuar o experimento do EA com sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu com 10 dias de submissão das sementes a 40°C e 85% UR.

Figura 11 - Germinação das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* antes (controle) e após a submissão ao teste de envelhecimento acelerado (EA) durante o período de 5, 10 e 15 dias a 40°C e 85% UR.



Letras iguais maiúsculas representam que não há diferença significativa, de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 3 - Germinação das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* antes (controle) e após a submissão ao envelhecimento acelerado durante o período de 5, 10 e 15 dias a 40°C e 85% UR. Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), número de sementes não germinadas (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g).

	Germinação cultivar Paraguaçu			
	Teste de envelhecimento acelerado			
	Controle	5 dias	10 dias	15 dias
Plântulas normal (%)	76 A	61 C	68 B	23 D
Plântulas anormais deformadas (%)	5 B	13 C	4 B	1 A
Plântulas anormais deteriorada (%)	11 C	8 B	12 C	5 A
Sementes mortas (%)	0 A	0 A	0 A	10 B
Sementes não germinadas (%)	8 A	17 B	16 B	61 C
Biometria plântulas normais (mm)	66 B	60 C	68 A	33 D
Massa seca plântulas normais (g)	0,4336 A	0,3713 C	0,4197 B	0,0685 D

Letras maiúsculas iguais entre linhas representam que não há diferença significativa de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Houve uma redução nos valores de germinação em função da umidade, temperatura e tempo aos quais as sementes foram submetidas. Resultados semelhantes foram descritos no estudo de Braz *et al.* (2008), em que foi verificada uma redução da germinação após o teste de EA em função do aumento da umidade e temperatura com o tempo nas sementes de girassol. Bittencourt e Vieira (2006) em estudo com semente de milho, observou que a alta temperatura e umidade durante o envelhecimento, promovem efeitos drásticos sobre a germinação, prolongando o período de estresse. ZUCARELI *et al.* (2011) avaliaram sementes de milho, sob deterioração controlada, com submissão das sementes a temperatura e umidades relativas alta, e verificaram que o prolongamento do tempo afeta drasticamente as sementes de milho. Através dos resultados obtidos e dos dados disponíveis na literatura, fica evidente que altas temperaturas e altas umidades relativas causam danos nas sementes ao longo do tempo, tornando do EA eficiente para avaliação do vigor em sementes de *Ricinus communis* (DAVID *et al.*, 2013).

Outro fator relevante visualizado durante a execução dos experimentos foi a mudança da coloração do tegumento das sementes após dez e quinze dias de EA. Os tegumentos antes do teste estavam pretos e após o EA ocorreu uma mudança na coloração que variava de preto para marrom e essa coloração se intensificou quando as sementes foram colocadas para germinar, chegando em maior intensidade de mudança de coloração após os sete dias de germinação (Figura 12). O tegumento possui a função de proteção da semente e principalmente das estruturas internas, portanto, esta mudança de coloração pode estar relacionada com a degradação de biomoléculas produzidas durante a maturação da semente e que são responsáveis pela proteção e manutenção da viabilidade e vigor.

A qualidade e a composição das sementes estão relacionadas a fatores genéticos. Mas sofre influência direta do ambiente. Além disso, o ponto de colheita é de grande importância, pois a maturidade da semente corresponde ao momento em que não ocorrem alterações significativas da massa seca. As modificações na composição das sementes, podem ser refletidas diretamente no produto final ou comportamento das plantas, pois se a colheita for tardia pode haver perdas significativas de sementes, se for precoce, pode prejudicar a qualidade da semente (MARCOS FILHO, 2005; SANTOS *et al.*, 2007). Todos estes problemas que comprometem a qualidade fisiológica das sementes podem ser relacionados às características do tegumento das sementes (SOUZA e MARCOS-FILHO, 2001; MERTZ *et al.*, 2009).

Figura 12 - Sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* apresentaram mudança na coloração no tegumento das sementes submetidas ao EA durante dez e quinze dias de EA. (A) Semente da cultivar Paraguaçu antes do EA; (B) Tegumento das sementes submetidas ao EA por dez dias; (C) Sementes de dez dias de TEA, submetidas a germinação, coloração do papel germitest após 7 dias de germinação.



A mudança na coloração do tegumento das sementes pode estar relacionada a semi-permeabilidade do tegumento que proporciona o extravasamento de substância para o substrato (papel). Esta semi-permeabilidade reduz as flutuações de umidade que ocorrem nas sementes devido às variações das condições no campo, como umidade, tornando as sementes menos susceptíveis a deterioração. Sementes com tegumento semipermeável possui maior potencial de armazenamento e é menos susceptível a contaminação por microrganismos (MERTZ *et al.*, 2009). Asiedu e Powell (1998), verificaram em seus estudos que sementes que não apresentam acúmulo de pigmentos, apresentaram maior taxa de embebição em relação às sementes pigmentadas, corroborando que a cor do tegumento das sementes é uma característica associada com a permeabilidade de água.

Sementes de amendoim possuem diferentes colorações que estão relacionadas com a sua qualidade. Attree *et al.* (2015) em seus estudos avaliaram se a coloração e a qualidade das sementes estão diretamente relacionadas a quantidade de compostos fenólicos, flavonoides, antocianina, taninos. Concluíram que há um aumento das antocianinas nas sementes pretas de amendoim em relação as vermelhas. No entanto, nenhum estudo descreveu quais compostos estão sendo produzidos durante o envelhecimento das sementes e o que se acumula no tegumento, ocasionando a mudança na coloração dele. Devido a isso, no presente estudo, foi avaliado o tegumento quanto a presença de metabólitos secundários, utilizando uma abordagem metabolômica.

3.3 Análises das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*

L. submetidas ao EA

3.3.1 Determinação do grau de umidade da semente, UR (%) e TA (°C)

Levando em consideração o teste piloto, foi definido o período de dez dias para a duração do envelhecimento acelerado com as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu. Então as sementes foram colocadas no incubador para envelhecer por dez dias a 40°C e 85% UR, enquanto as sementes controle foram mantidas na temperatura ambiente. As condições de EA e do ambiente foram monitoradas e os valores médios estão descritos na Tabela 4. Após este tempo, as sementes foram separadas para as análises posteriores. Durante todo o experimento foi monitorado

a umidade relativa do ambiente e a temperatura, assim como a umidade interna das sementes.

Os processos naturais de degeneração dos sistemas biológicos são acelerados por altas umidades e altas temperaturas, essas variáveis aumentam a respiração da semente e os processos de deterioração dos tecidos internos as sementes, fazendo com que esta perca sua qualidade (AZEVEDO *et al.*, 2003). Todos os resultados foram significativos no aumento no grau de umidade da semente, temperatura e umidade relativa do ambiente após os dez dias do EA (Tabela 13).

Tabela 4 – Comparação entre as condições controle e após EA das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*, durante o período de dez dias, nas condições: umidade interna das sementes e do ambiente (temperatura e umidade relativa).

	Semente	Ambiente	
	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Umidade relativa (%)
Controle	5 ± 0,14 A	21 ± 0,9 A	55 ± 3,2 A
EA_10	8 ± 0,15 B	40 ± 0,2 B	78 ± 7,4 B

Letras iguais maiúsculas na coluna representam que não há diferença significativa, de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

A temperatura e a umidade, são fatores que afetam diretamente a qualidade da semente. Temperaturas e umidades altas aumentam a velocidade de deterioração da semente juntamente com o aumento da taxa de respiração. Já que, o teor de umidade das sementes depende da umidade relativa do ar no ambiente que por sua vez, é influenciado pela temperatura. O tempo necessário para que a umidade das sementes entre em equilíbrio com a umidade relativa do ambiente (ponto de equilíbrio higroscópico) depende da espécie e principalmente da temperatura ao qual a semente está submetida (SANTOS, 2010; ABREU *et al.*, 2013).

Variações extremas na temperatura e umidade podem influenciar os processos fisiológicos e bioquímicos nas sementes, afetando diretamente o crescimento inicial. Em condições de altas temperaturas, esta condição causa um estresse abiótico nas sementes, gerando um desequilíbrio na produção de ERO. As ERO são extremamente reativas e podem causar danos oxidativos a diversos componentes celulares, incluindo cloroplastos, mitocôndrias, membrana plasmática, peroxissomos, parede celular e apoplasto. Além disso, as ERO podem atacar o sistema de

membranas celulares, desestruturando-o mais ainda, indicado pelo aumento dos lixiviados, levando à redução gradativa da viabilidade das sementes (MITTLER, 2002; MARINI *et al.*, 2012; MATOS *et al.*, 2015).

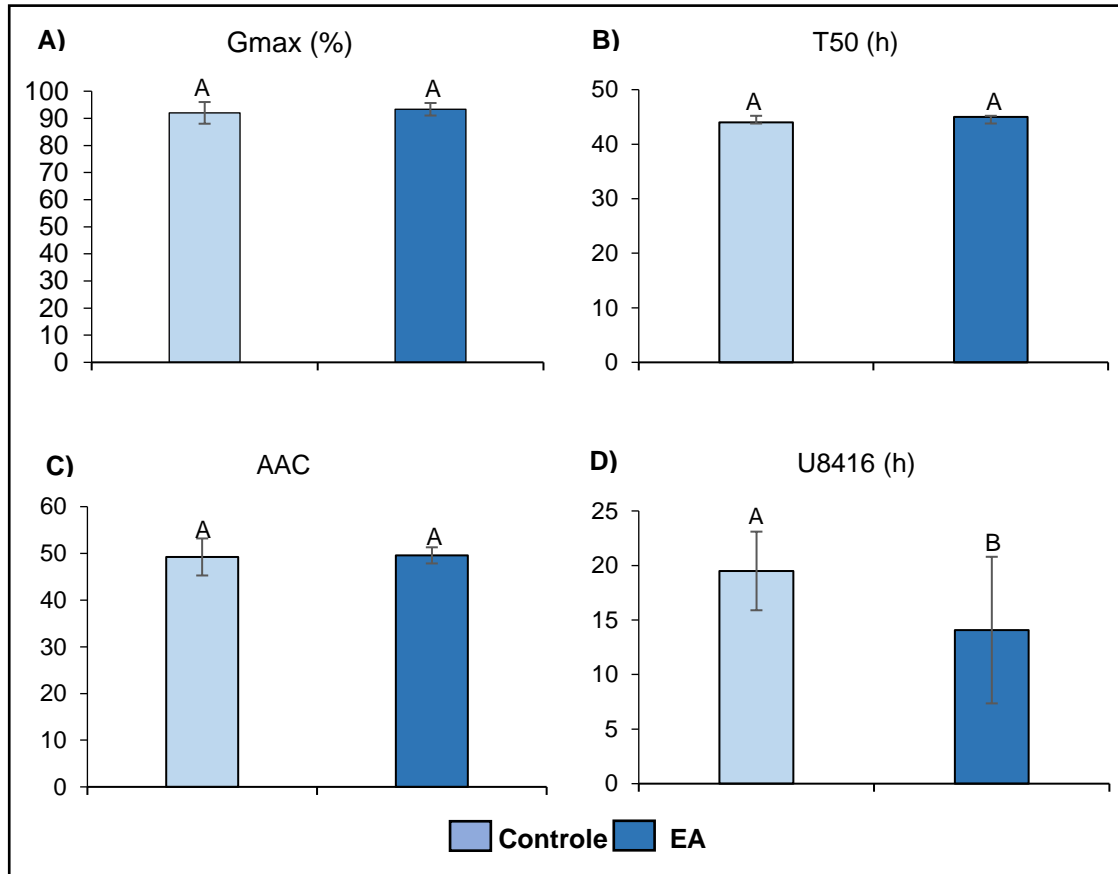
3.3.2 Teste de germinação

O teste de germinação é um teste fisiológico que avalia o vigor e viabilidade das sementes e determina a taxa de semeadura. É utilizado como parâmetro de avaliação de sementes para comercialização. Este teste quando realizado em laboratório, sob condições de ambiente controlado e favorável, visa a obtenção da mais completa e rápida germinação dos lotes de sementes. A temperatura e a umidade relativa do ambiente são de extrema importância, pois o excesso de umidade e temperatura pode ser prejudicial à germinação, provocando atraso ou paralização do desenvolvimento das plântulas (MOREIRA-SOUZA e CARDOSO, 2003; COIMBRA *et al.*, 2007).

A germinação das sementes controle e das sementes após o EA não apresentaram diferença significativa em relação aos parâmetros de germinação (germinação máxima – Gmax, tempo para alcançar 50% de germinação – T50% e área abaixo da curva - AAC). No entanto, ao se avaliar a uniformidade das sementes - U8416 foi possível verificar que as sementes do controle foram mais uniformes durante a germinação, quando se comparou com as sementes submetidas ao EA (Figura 13).

O tempo que as sementes levaram para que houvesse a germinação refletiu a variação da qualidade da germinação das sementes controle e submetidas ao EA. A variação de germinação pode ocorrer devido à vários fatores, dentre eles há: a condição ambiental (temperatura e umidade) que a semente foi exposta, a maturação das sementes e tempo de colheita (FANAN *et al.*, 2009). Além, das características das sementes e a sua umidade a germinação é influenciada diretamente pelo ambiente, porque as sementes tendem ao equilíbrio higroscópico. Deste modo o teor de umidade da semente é diretamente proporcional a umidade relativa do ambiente (OLIVEIRA, 2011; GREGGIO e BONINI, 2014).

Figura 13 - Germinação de sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *R. communis* não submetidas e submetidas ao teste envelhecimento acelerado, durante dez dias a 40°C e 85% UR. (A) Germinação máxima – Gmax, (B) Tempo para alcançar 50% de germinação – T50, (C) Área abaixo da curva de germinação – AAC, (D) Uniformidade de germinação (medindo-se o intervalo de tempo em horas entre 84% e 16% de germinação de sementes - U8416).



Letras iguais maiúsculas entre barras representam que não há diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

No EA a alta úmida e alta temperatura do teste, gera um estresse na semente que ocasiona a liberação de espécies reativas de oxigênio proveniente do metabolismo, pois todos os organismos aeróbicos estão susceptíveis aos danos oxidativos. As células têm que lidar com o estresse oxidativo, cuja intensidade depende diretamente das condições ao qual as sementes foram submetidas. Na condição do EA o atraso na germinação de sementes envelhecidas, pode estar relacionado ao tempo necessário para que as células reiniciem a maquinaria antioxidante para reduzir o estresse oxidativo (BAILLY, 2004; BAILLY *et al.*, 2008).

Vários estudos demonstraram que durante o envelhecimento há o acúmulo de espécies reativas de oxigênio e radicais livres na semente, que estão associados com a perda da atividade das enzimas antioxidantes e degradação de outras biomoléculas. Condições inadequadas de temperatura, umidade relativa e o envelhecimento,

ampliam os danos oxidativos, gerando disfunções celulares devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (BAILLY, 2004). Outro fator importante é que as sementes de *R. communis* são sementes oleaginosas e estas apresentam, um menor potencial de armazenamento, porque são mais sensíveis ao ambiente do que as sementes amiláceas, devido à menor estabilidade química dos lipídios em relação ao amido. Temperaturas elevadas aumentam o processo respiratório, tendo como consequência a decomposição dos lipídios, redução da atividade enzimática, peroxidação lipídica, baixa integridade das membranas, e a elevação da taxa de deterioração (MARCOS FILHO, 2005; FANAN *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2016). Devido a todos esses fatores realizamos o EA para avaliar como alterações na umidade e na temperatura podem gerar danos diretos na semente e na sua qualidade visando avaliar os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos, como também identificar marcadores bioquímicos e moleculares de envelhecimento em sementes de *R. communis*.

Ao se avaliar todos os parâmetros da germinação (Tabela 5), verifica-se que as sementes que foram submetidas ao EA tiveram uma redução significativa no vigor quando comparadas as sementes controle. Além disso, apesar das sementes que foram submetidas ao EA germinarem elas deram origem a muitas plântulas anormais, isso significa que as sementes que foram deterioradas podem germinar, mas não garante o desenvolvimento de plântulas normais e vigorosa. Segundo Toledo (2011), os efeitos na qualidade fisiológica das sementes são geralmente traduzidos pelo decréscimo da germinação em decorrência da redução de plântulas normais, pois as porcentagens das plântulas normais variam em função do vigor das sementes. Além disso, ao avaliar as plântulas identificando se são plântulas normais ou anormais, verificar massa seca das plântulas normais e sua biometria foram parâmetros importantes, considerando que este tipo de análise é um método que possui como principais vantagens: o baixo custo, a eficiência e a rapidez para obtenção de dados (VANZOLINI *et al.*, 2007).

A redução do vigor está relacionada a mudanças degenerativas de origem bioquímica, fisiológica e molecular, essas mudanças afetam diretamente a qualidade das sementes (vigor e viabilidade) (CORTE *et al.*, 2010). A redução significativa nos parâmetros da germinação significa redução do vigor, estando de acordo com alguns estudos que avaliam qualidade das sementes, como Oliveira (2011) e Santos (2016),

verificaram em seus estudos a influência da temperatura e umidade sob sementes oleaginosas, assim como Jesus (2016). Ambos verificaram que tanto a temperatura quanto a umidade afetam diretamente a qualidade das sementes oleaginosas.

Tabela 5 - Germinação das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *R. communis* não submetidas e submetidas ao envelhecimento acelerado, durante dez dias a 40°C e 85% UR. Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), número de sementes não germinadas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g).

	Germinação cultivar Paraguaçu	
	Controle	TEA 10 dias
Plântulas normais (%)	76 A	43 B
Plântulas anormais deformadas (%)	5 A	5 A
Plântulas anormais deterioradas (%)	11A	44 B
Sementes mortas (%)	0 A	4 B
Sementes não germinadas (%)	8 B	4A
Biometria das plântulas normais (mm)	49 A	34 B
Massa seca das plântulas normais (g)	0,4336 A	0,2276 B

Letras iguais maiúsculas entre coluna não representam diferença significativa de acordo com o teste T a 5% de probabilidade.

Sendo importante ressaltar que ao realizar o EA há dois estresses submetidos sob a semente que é o térmico e o outro por umidade, levando em consideração a umidade da semente e a alta UR ao qual foi submetida durante o EA. A umidade desencadeia uma deterioração causando alterações físicas, por exemplo, sucessivas expansões e contrações do volume das sementes ocasionam a formação de enrugamento. Além, de acontecer o cansaço físico dos tecidos que pode resultar em ruptura do tegumento e dos tecidos embrionários, comprometendo o desempenho das membranas aos níveis celular e subcelular. A deterioração causada por umidade também é capaz de deixar a semente vulnerável a impacto mecânico e contaminação por microorganismo (FRANÇA NETO e HENNING, *et al.*, 1984; FRANÇA NETO *et al.*, 2005; HUTH, 2015).

O estresse térmico causa grandes lesões na semente devido a submissão a altas temperaturas, gerando agregação e desnaturação de proteínas, aumento na fluidez dos lipídeos de membrana, indiretas ou baixas lesões que incluem a inativação de enzimas no cloroplasto e mitocôndrias, inibição da síntese proteica, degradação e perda da integridade da membrana, afeta na organização de microtúbulos e na divisão e/ou alongamento do eixo, formação de microtúbulos. Essas lesões acabam levando

a inibição no crescimento, redução do fluxo iônico, produção de compostos tóxicos, síntese de ERO (SMERTENKO *et al.*, 1997; WAHID *et al.*, 2007).

A deficiência de água impede a ativação de processos bioquímicos, físicos e fisiológicos, que define a retomada do crescimento do embrião. Contudo, a umidade da semente não pode ser demasiada, porque pode limitar a aeração e prejudicar a germinação. Ao longo da realização do teste de germinação, restrições de oxigênio podem provocar atraso ou paralisação no desenvolvimento das plântulas, ou a ocorrência de anormalidades, como a presença de plântulas anormais deformadas e deterioradas, o que justificaria os valores na Tabela 5, associados, a acontecimentos citados anteriormente. Além do estresse térmico afetar diretamente o tamanho e desenvolvimento da plântula reduzindo significativamente a massa seca das plântulas (PHANEENDRANATH, 1980; ISTA, 2004, COIMBRA *et al.*, 2007).

3.3.3 Determinação da condutividade elétrica e pH exsudado das sementes

O teste de condutividade elétrica é um teste rápido para avaliar o vigor das sementes, e tem sido utilizado com sucesso (SOUZA, 2009). O método consiste na avaliação da condutividade elétrica do meio, que aumenta quando os eletrólitos são lixiviados pela semente na água de embebição. As sementes liberam maior quantidade de eletrólitos em consequência da diminuição da permeabilidade seletiva de membrana, em função de danos na semente com consequente perda de qualidade. A perda do potencial fisiológico da semente está ligada diretamente às maiores quantidades de solutos lixiviados, resultantes de uma perda da integridade da membrana (SOUZA, 2007; SOUZA *et al.*, 2009).

Um fator importante na padronização do teste de condutividade elétrica é o tempo de embebição das sementes, pois este fator influencia de forma direta na quantidade de eletrólitos liberados. Entretanto, o tempo varia de acordo com a espécie e lote, por isso a necessidade de padronização do método, para se ter maior sensibilidade na avaliação do vigor (SOUZA *et al.*, 2009). Ao se avaliar os resultados (Figura 14 - A), é possível notar que há uma diferença estatística significativa entre as duas condições (controle e EA) nas sementes após serem submetidas ao teste de condutividade elétrica. A quantidade de eletrólitos lixiviados aumenta com o tempo de experimento, chegando ao valor máximo de 60 ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) para as sementes do controle e 90 ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) para as sementes após serem submetidas a EA. Além

disso, ao se verificar as análises estatísticas para as mesmas condições ao longo do tempo é possível notar que existe uma diferença estatística significativa para o aumento da condutividade elétrica ao longo do tempo de análise.

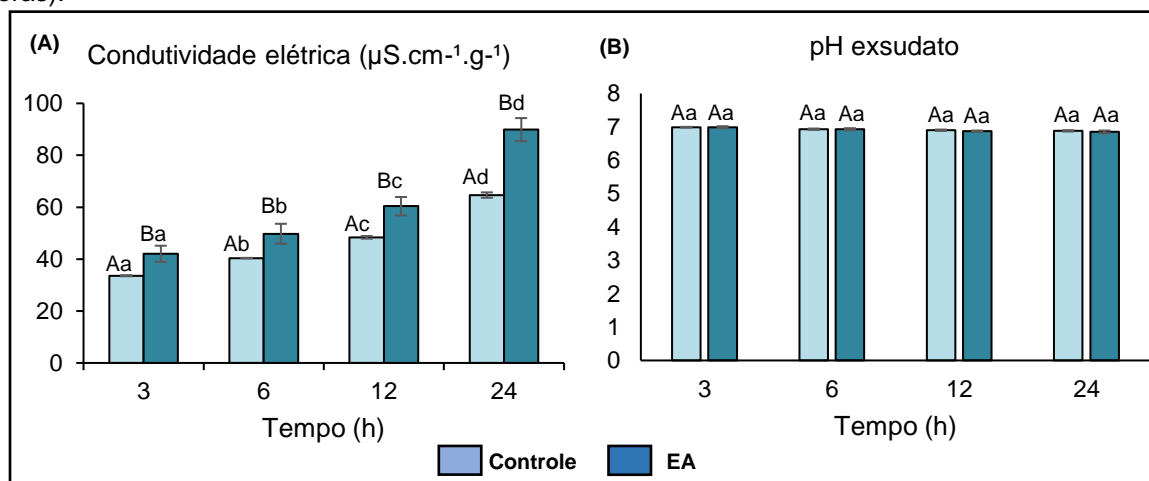
Outro teste rápido, associado a determinação da condutividade elétrica, para avaliar a qualidade fisiológica das sementes que vem sendo aplicado com eficiência e a determinação do pH do exsudato. Este teste possui baixo custo e rapidez na obtenção de resultados, facilitando sua execução para a avaliação da viabilidade de sementes. A avaliação do pH do exsudato também é baseado na permeabilidade das membranas, envolvendo a lixiviação de solutos e a integridade do tegumento das sementes. Durante a embebição das sementes em água, pode ocorrer a liberação de metabólitos como açúcares, ácidos orgânicos e íons H^+ , os quais acidificam o meio e provocam a redução do pH do exsudato das sementes. Enquanto as sementes com elevada qualidade fisiológica apresentam baixa lixiviação de solutos e não promovem grandes alterações no pH do meio, as sementes deterioradas liberam maior quantidade de íons, resultando em diminuição do pH (PESKE e AMARAL, 1994; RECH *et al.*, 1999; AMARAL e PESKE, 2000; CABRERA e PESKE, 2002; SANTOS *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2012; ARALDI e COELHO, 2015).

Os resultados da condutividade elétrica dos exsudados obtidos com as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu (Figura 14 - A), são diferentes dos resultados obtidos no trabalho de Silva e Marthis (2009), que avaliou cinco lotes da cultivar AL Guarany 2002 de *Ricinus communis* a (45 °C por 24h a 100%UR). Os valores de condutividade elétrica dos exsudados dessas sementes foram inferiores aos encontrados neste estudo, para os tempos de seis e vinte e quatro horas de embebição.

Mendes *et al.* (2010) em seu estudo, onde realizou envelhecimento acelerado (41°C e 45°C e 100% UR, por 48, 72 e 96 horas) em sete lotes de sementes da cultivar AL-Guarany de *R. communis*, também obtiveram resultados inferiores aos encontrados (Figura 14 - A) para os tempos de 6 e 24 horas de embebição. Os resultados encontrados no presente estudo (Figura 14 – A), são maiores e pode ser justificado pelo maior tempo de exposição às sementes a altas umidade e altas temperaturas, dez dias a 40°C e 85% UR. A temperatura e a umidade têm um papel fundamental na deterioração e na longevidade das sementes, pois ambas combinadas e quando elevadas aceleram o processo de deterioração. Normalmente, nessas

condições ocorre a produção de ERO, em especial Hidroperoxila (HO_2^{\cdot}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Ambas as espécies são capazes de destruir a membrana e o peróxido é capaz de gerar peroxidação na membrana. Danos na membrana causam uma desorganização e as sementes tendem a reduzir o vigor em consequência disso, podendo ser verificado pelo aumento da quantidade de lixiviados durante o processo de embebição (ABBA e LOVATO, 1999; FERREIRA e MATSUBARA, 1997; ARAGÃO, 2007).

Figura 14 - (A) Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e (B) pH do exsudado das sementes do cultivar BRS Paraguaçu de *R. communis* controle e sementes após serem submetidas ao EA. As sementes foram imersas em 75 mL de água ultrapura durante diferentes períodos de embebição (3, 6, 12 e 24 horas).



Letras iguais maiúsculas nas colunas controle e EA representa que não há diferença estatística entre os tratamentos; letras iguais minúsculas nas barras controle e EA, representam que não há diferença significativa na mesma condição de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Levando em consideração o aumento significativo da condutividade elétrica para ambos os tratamentos (controle e EA), concluiu-se que para a análise em questão vinte e quatro horas é o melhor tempo para a avaliação da condutividade elétrica destas sementes. Um outro fator importante, está no resultado do aumento da condutividade, principalmente para as sementes após EA, que apresentaram valores significativamente superior a condutividade do exsudado das sementes controle. Estes dados, corroboram com os resultados anteriores da perda de vigor e viabilidade das sementes após serem submetidas à 40°C e 85% UR, visto que sementes mais deterioradas absorvem maior quantidade de água e têm como consequência uma perda maior de eletrólitos em virtude do maior dano de membrana e ao maior tempo requerido para reparação da capacidade seletiva do sistema de membranas (SOUZA, 2009). No entanto, os danos não foram suficientes para liberar componentes que

reduzam o pH das amostras nos diferentes tempos (Figura 14 - B), isto pode ser justificado por se tratar de uma semente que têm um bom mecanismo de proteção contra as ações deletérias externas. Esta deve ter sofrido danos por causa no aumento na quantidade de lixiviado na Figura 14 – A. Mas, não houve perda da integridade ou descontinuidade das membranas suficiente com a liberação de açúcares, ácidos orgânicos e íons que contribuem na acidificação do meio e consequente redução do pH do meio (PIÑA-RODRIGUES *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2011; GOMES, 2013; ARALDI e COELHO, 2015).

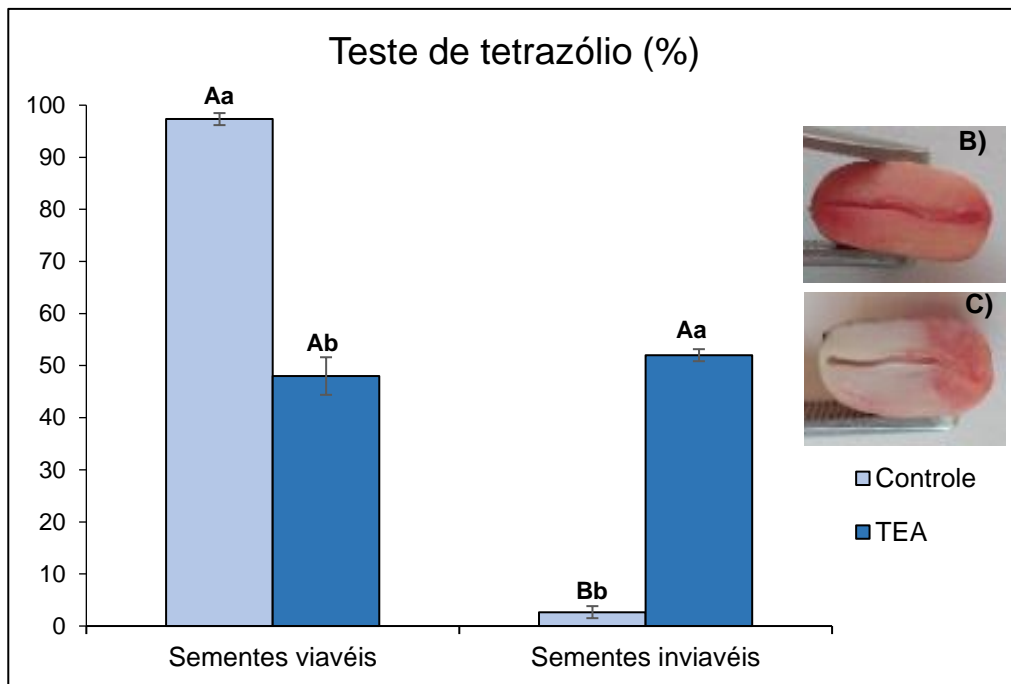
3.3.4 Teste de tetrazólio

A viabilidade e vigor das sementes pode ser determinada também pelo teste de tetrazólio, este é um teste rápido que fornece resultados confiáveis. O teste leva em consideração a atividade das enzimas desidrogenases e estão presentes nas mitocôndrias. Durante as reações da respiração celular há liberação de íons de H⁺ que reagem com o sal de 2,3,5-trifenil tetrazólio (incolor e difusível), formando uma substância de cor vermelha e insolúvel, denominada formazam, delimitando os tecidos vivos da semente (GASPAR-OLIVEIRA *et al.*, 2010; GASPAR-OLIVEIRA *et al.*, 2011; GARLET *et al.*, 2015).

Segundo Gaspar-Oliveira (2010) e as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009), um fator de extrema importância é a identificação de alterações nos tecidos das sementes e a identificação das sementes viáveis ou inviáveis pelo manipulador do teste, considerando o padrão de coloração para a seleção das sementes. Sementes com 50% do endosperma e 100% do embrião corado de vermelho são consideradas viáveis e sementes com menor proporção de coloração são consideradas como inviáveis. De acordo com os resultados da demonstrado na Figura 15 e os padrões de viabilidade (Figura 15 - A) e inviabilidade (Figura 15 - B) das sementes analisadas é possível notar que as sementes que não foram submetidas ao EA apresentam um maior número de sementes viáveis em relação as sementes após EA. Cerca de 96% das sementes, da condição controle, estavam viáveis e apenas 4% dessas sementes estavam inviáveis. Considerando então o lote é possível afirmar que possivelmente 4% das sementes não irão germinar e/ou dar origem a plântulas vigorosas. No entanto, ao se avaliar as sementes após EA cerca de 48% das sementes apresentaram viabilidade e 52% foram consideradas como

inviáveis, isto significa, que os danos após o EA foram suficientes para reduzir a qualidade.

Figura 15 - Teste de Tetrazólio do lote das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *R. communis* controle e sementes após serem submetidas ao EA, valor de semente viável e inviável.



Letras iguais maiúsculas nas colunas controle e EA representa que não há diferença estatística entre os tratamentos; letras iguais minúsculas nas barras controle e EA, representam que não há diferença significativa na mesma condição de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Levando em consideração os dados posteriores de germinação e condutividade é possível correlacionar os dados e confirmar a perda de viabilidade e vigor das sementes após a submissão das sementes ao EA. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que as alterações iniciais nos processos bioquímicos associados a deterioração, geralmente ocorrem antes que seja verificado declínio na capacidade germinativa (DELOUCHE e BASKIN, 1973; PANOBIANCO e MARCOS FILHO, 2001). Devido a isso, o uso de testes de vigor é de extrema importância e utilidade para o monitoramento da qualidade das sementes.

O EA tem como princípio o aumento considerável da taxa de deterioração das sementes, através da exposição desta a altas umidade e temperaturas, considerados fatores de extrema influência no processo de deterioração. Além disso, há a influência da qualidade das sementes, sementes de baixa qualidade se deterioram mais

rapidamente que as mais vigorosas, apresentando redução acentuada na viabilidade da semente após o EA (SANTOS *et al.*, 2004).

Segundo Santos *et al.* (2004), qualquer mudança degenerativa na semente, após esta ter atingido sua máxima qualidade é considerada como deterioração. A sensibilidade das sementes ao processo de deterioração, está relacionada a sua genética e a influência direta do ambiente (alta temperaturas e alta umidades relativa). A deterioração nas sementes pode ser evidenciada por vários fatores tais como: danos no material genéticos, danos na integridade das membranas, redução da capacidade seletiva, peroxidação lipídica, lixiviação de solutos, mudanças na atividade respiratória das sementes modificações na atividade de enzimas, alterações na síntese de proteínas, incapacidade de manutenção do gradiente eletroquímico, perda de compartimentalização celular e o acúmulo de substâncias tóxicas.

Quando há deterioração nas sementes, há também uma resposta fisiológica indicando as alterações ocorridas, tais como: atraso na germinação, redução na germinação, a germinação passa a ser desuniforme, redução ou ausência no vigor das plântulas, aumento no número de plântulas anormais, maior suscetibilidade a ataques de microorganismos, redução da produtividade dessas sementes, modificação na coloração das sementes, redução do potencial de armazenamento, completa perda da capacidade germinativa e morte das sementes (SANTOS *et al.*, 2004; SANTOS, *et al.*, 2005).

O armazenamento de sementes da cultivar Paraguaçu de *Ricinus communis*, durante doze meses, na condição de umidade relativa e temperatura do ambiente de laboratório – URTAL, mostrou a variação na viabilidade das sementes pelo teste tetrazólio ao longo dos doze meses (Jesus, 2016). Nos seus resultado, Jesus demonstrou que as sementes armazenadas nesta condição, a qual sofreu ação da temperatura e umidade do ambiente teve as maiores variações, já que está era uma condição sem controle. Deixando claro e corroborando com os dados dos teste de tetrazólio após o EA, que demonstrou que as sementes que sofreram ação pela umidade e temperatura tiveram uma redução na sua viabilidade, devido as diferentes ação danosas que o altas temperaturas e umidades podem causar nas sementes. Durante esse processo, corre aumento das ERO e todos os danos gerados, que variam desde a redução do vigor até a morte celular programada das sementes (GASPAR-OLIVEIRA *et al.*, 2009; GASPAR-OLIVEIRA, 2011; JESUS, 2016).

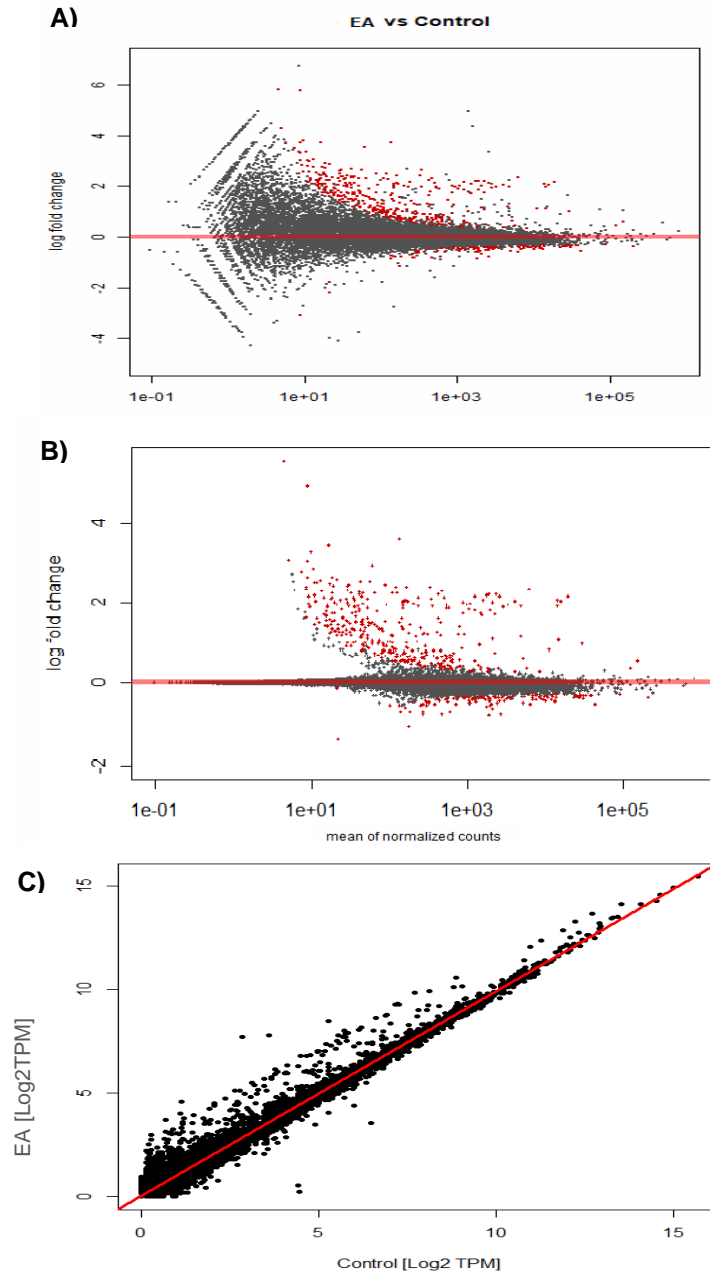
Ao correlacionar estes resultados com os descritos anteriormente no presente estudo, é possível concluir que as sementes após o teste de envelhecimento acelerado tiveram redução na viabilidade e no vigor. A partir disso, análises mais específicas como RNA-seq e metabolômica foram realizadas a fim de identificar genes ou moléculas que sejam produzidos ou expressas nas sementes e que possam ser usados como marcadores de qualidade das sementes. Para tanto, e estes dados foram correlacionados com os resultados fisiológicos e posteriormente com os dados de atividade de enzimas antioxidantes. Essas análises e correlações poderão permitir maior esclarecimento do processo de deterioração nas sementes, além da identificação de marcadores bioquímicos e moleculares, que poderão servir como parâmetros para futuras produções de protocolos rápidos para a análise da qualidade de sementes oleaginosas, ampliando assim, os conhecimentos científicos nesta área.

3.3.5 RNA-seq

A análise do RNA-seq de *R. communis* consistiu na comparação entre o tratamento de EA versus o controle. Portanto, os valores de *fold-change* foram interpretados em relação a indução ou repressão da expressão dos transcritos em resposta ao envelhecimento acelerado. Os valores são positivos quando a expressão dos genes foi induzida e negativo quando foi reprimida pelo EA (Figura 16).

Resultados das análises do RNA-seq estão representados na Figura 16, que representa o resultado global, considerando o MxA plot. Integra a variação de expressão e a média de expressão para todas as 31.171 sequências expressas identificados nos experimentos. A Figura 16 (A) está demonstrado que foi encontrado um total de 31.171 sequências expressas durante todo o experimento incluindo as amostras controle e as amostras após EA. A Figura 16 (B) representa as mesmas sequências da Figura A, após a realização do tratamento estatístico para remover todas as sequências sem significância estatística, enquanto a Figura 16 C representa o contraste das bibliotecas, correspondendo a um plot de Log2 de transcritos por milhão (TPM) médio de sementes submetidas ao EA versus controle. Foi possível verificar que a maioria das sequências expressas são induzidas pelo EA (Figura 16 C).

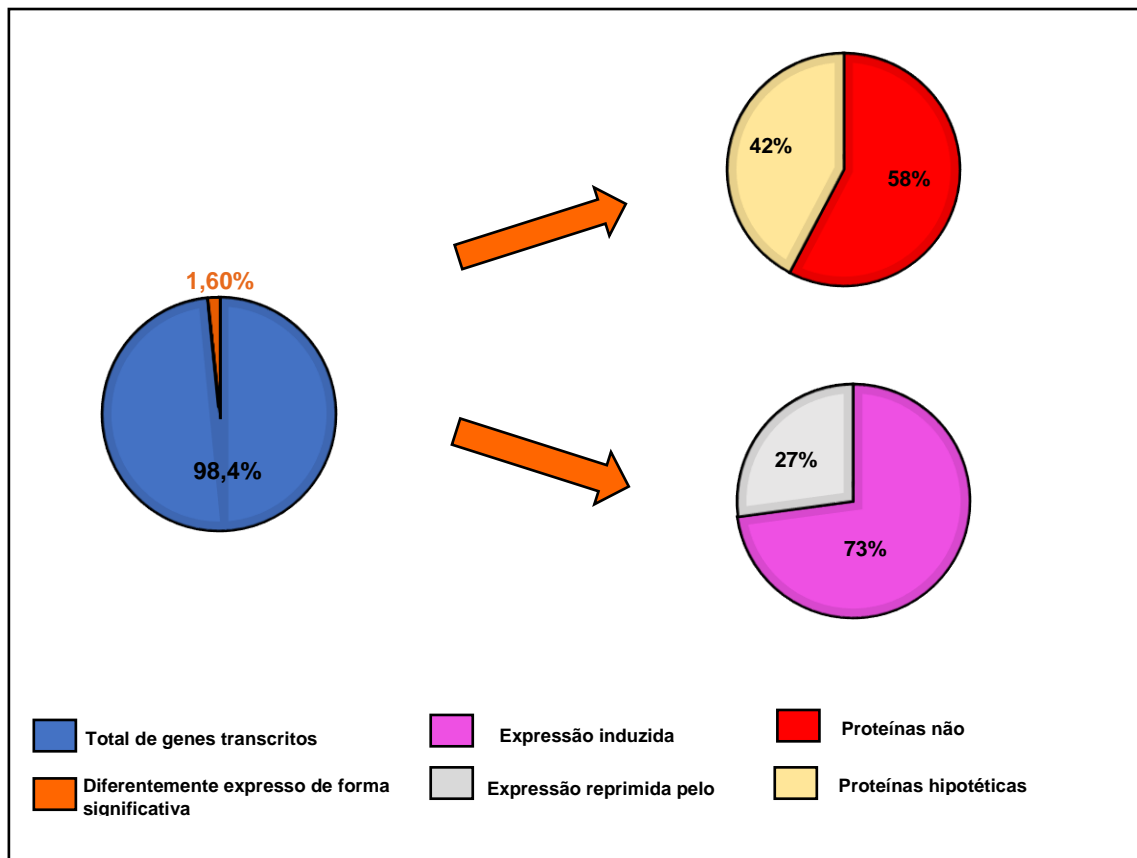
Figura 16 - Representação dos resultados das análises do RNA-seq das sementes submetidas ao EA versus o controle utilizando figuras de *Mxa plot*. (A) representa o resultado global, integrando a variação de expressão e a média de expressão para todas as 31.171 sequências. (B) representa as mesmas sequências da figura A, após a remover o ruído da análise; (C) representa o contraste das bibliotecas, correspondendo a um *plot de Log2 de* transcritos por milhão (TPM). Os pontos em vermelho correspondem as sequências significativas que têm um padj menor que 0.1.



Após a análise estatística do total de 31.171 de sequencias que foram expressas, considerando o critério de corte utilizado, foram identificados 494 sequências diferencialmente expressas. A partir dessas sequências foram identificadas as principais relacionadas a função molecular, processos biológicos e componentes celulares. Dentre estas, 360 sequências (73%) apresentaram a

expressão induzida pelo EA e 134 sequências (27%) tiveram as suas expressões reprimidas (Figura 17). Além disso, das 494 sequências, 285 codificam proteínas não hipotéticas e 209 das sequências expressas estão anotados como codificadoras de proteínas hipotéticas. As proteínas hipotéticas são aquelas previstas por ferramentas de bioinformática (Figura 17), mas que não têm ainda suas funções caracterizadas (MAIA, 2019; SOUZA, 2019).

Figura 17 – Total de sequências expressas (31.171), total de sequências significativas (494) que codificam para proteínas hipotéticas ou não.

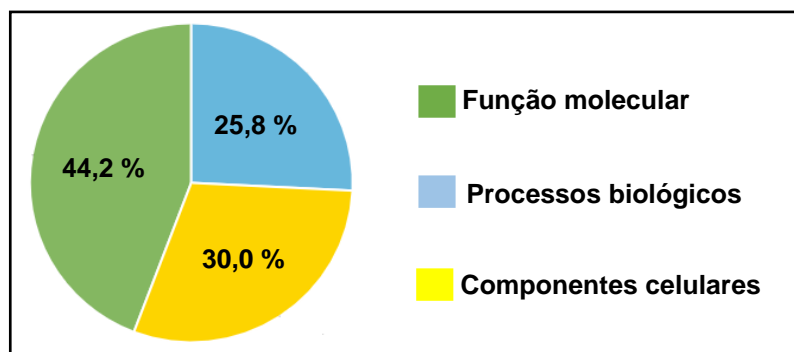


A identificação global dos 494 sequências dos transcritos diferentemente expressos de forma significativa entre o controle e o EA realizado, através do GO FEAT possibilitou a definição da função molecular, de processos biológicos e componentes celulares, como representado na Figura 18 (ARAÚJO *et al.*, 2018).

O termo função molecular descreve atividades que ocorrem no nível molecular, que geralmente correspondem a atividades que podem ser realizadas por produtos gênicos individuais. No entanto, algumas atividades são realizadas por complexos moleculares compostos de vários produtos gênicos. Foram verificados, de acordo com os gráficos de nuvens, que os transcritos relacionados a função molecular são: de

Ligação de ATP, de ligação de RNA, constituinte estrutural do ribossomo, de ligação de íon metálico.

Figura 18 – Identificação das sequencias (494) de acordo com a sua função molecular, processos biológicos e componentes celulares.



Os processos biológicos, correspondem a processos maiores, realizados por múltiplas atividades moleculares, sendo importante ressaltar que um processo biológico não é equivalente a uma via. Processos tais como a tradução, regulação da transcrição, DNA molde, transporte de prótons acoplado à síntese de ATP, conjunto de subunidade ribossômica grande, respiração aeróbica, dentre outros processos.

Já, os componentes celulares, correspondem as localizações relativas às estruturas celulares nas quais um produto gênico desempenha uma função, sejam compartimentos celulares ou complexos macromoleculares estáveis dos quais fazem parte. As classes de componentes celulares não se referem a processos, mas sim a uma anatomia celular (ARAUJO *et al.*, 2018), a exemplo de componente integral da membrana, núcleo, citoplasma, subunidade grande ribossômica citosólica, citosol.

Para afunilar a análise de maneira significativa, focou-se nas 285 sequências que codificam para proteínas não hipotéticas, selecionando os primeiros 42 genes mais significativos, segundo o Padj (Tabela 6).

A sequências significativamente expressas para codificação de proteínas não hipotéticas, são provenientes das sementes que foram submetidas ao envelhecimento acelerado a 40 °C e 85% UR durante dez dias, em seguida essas sementes foram embebidas durante seis horas. O processo de embebição da semente durante a Fase I, é uma ação puramente física, esse processo depende somente da ligação da água à matriz da semente. Durante a etapa da Fase I, diferentes eventos são iniciados: respiração e acúmulo de ATP, síntese de mRNA e reparo de DNA, ativação de

polissomos, síntese de proteínas a partir de diferentes mRNA recentemente sintetizados (BUCKERIDGE *et al.*, 2004; TELES, 2013). Ocorre nessas sementes a respiração e acúmulo de ATP, a síntese de mRNA e reparo de DNA, o que justifica os resultados descritos na Tabela 6.

Na fase I, durante a etapa da embebição, ocorre um acentuado aumento na intensidade respiratória, o que caracteriza a Fase I. Este processo resulta na produção de grandes quantidades de energia, justificando assim, a quantidade de genes na Tabela 6, que estão relacionados à respiração aeróbica e a indução desses genes de acordo com o tratamento realizado. No entanto, há três genes diferencialmente inibidos pelo EA (29912.m005554, 28842.m000960, 44238.m000013), sendo o primeiro relacionado a transcrição de fatores e os dois últimos codificam Proteína de ligação de centrômero / microtúbulo *cbf5*, *putativa*. Dessa forma, a divisão celular passa a ser afetada, assim como a síntese de proteínas que irão auxiliar na transcrição, justificando assim, alteração das características fisiológicas, em específico o observado em relação ao aumento da quantidade de sementes que após o envelhecimento deram origem a plântulas anormais deformadas e deterioradas.

Kingsbury e Koshland (1993), em seus estudos sobre função de centrômero, verificou que a eficiência da ligação do centrômero a microtúbulos depende da concentração do polímero de microtúbulos e é inibida pelo ATP. O que corrobora com os dados obtidos, pois a produção de ATP após o EA foi acentuada. Além disso, a proteína de ligação de centrômero/ microtúbulo *cbf5* é uma das principais proteínas de ligação ao centrômero (JIANG *et al.*, 1993).

Os danos causados pelo EA ocorreram principalmente nas vias que envolvem a respiração aeróbica das sementes, na síntese de moléculas de alta energia e carreadores de elétrons (ATP e $\text{NADH}^+ \text{H}^+$). Além de promover alterações em processos no ribossomo, mitocôndria e citocromo. A temperatura tem um grande efeito nos genes envolvidos em vias de geração de energia, como o ciclo de Calvin-Benson-Bassham, gliconeogênese, degradação de amido e de triacilglicerol em sementes de *R. communis* durante a embebição e durante a germinação de sementes (Ribeiro *et al.*, 2018).

Tabela 6 – Identificação dos 42 genes mais significativos.

ID (Phytozome)	log2FoldChange	Padj	Definição do Phytozome	Processos Biológicos	Função Molecular	Componente celular	Vias Metabólicas
58083.m000079	2.085426458	2.74E-53	Citocromo c oxidase subunidade 1	Respiração Aeróbica	Citocromo-c oxidase atividade, ligação de heme	Componente integral de membrana	Respiração Aeróbica I (citocromo c)
39835.m000093	2.338504987	6.83E-52	ATP subunidade sintase, putativa	ATP transporte de prótons acoplado à síntese	Atividade do transportador transmembranar de prótons	Complexo ATP sintase transportador de prótons, fator de acoplamento F (o)	Nenhum
45457.m000037	2.147338255	1.26E-51	NADH desidrogenase, putativa	Nenhum	Atividade oxidorreductase	Componente integral da membrana	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
52479.m000014	2.153581969	2.53E-51	ATP sintase, putativa	Síntese de ATP acoplado transporte de prótons, processo metabólico de ATP, transporte transmembrana de prótons	Atividade de ATP sintase de transporte de prótons, mecanismo rotacional, ligação de ATP, ligação de adenil ribonucleotídeo	Complexo ATP sintase transportador de prótons, núcleo catalítico F (1)	Biossíntese de novo de ribonucleotídeos de adenosina. supervia de nucleotídeos de adenosina biossíntese de novo I, supervia de nucleotídeos de purina biossíntese de novo I
42076.m000069	2.187540332	4.97E-51	NADH-ubiquinona oxidorreductase, putativa	Transporte de elétrons acoplado à síntese de ATP	Atividade da NADH desidrogenase (ubiquinona)	Nenhum	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
37640.m000021	2.203457162	2.85E-47	Proteína ribossomal S4	Nenhum	Ligação de RNA	Nenhum	Nenhum
50378.m000013	1.855468535	3.08E-47	ATP sintase alfa subunidade mitocondrial, putativa	Transporte de prótons acoplado à síntese de ATP	Ligação de ATP, atividade de ATP sintase de transporte de prótons, mecanismo rotacional	Complexo ATP sintase transportador de prótons, núcleo catalítico F (1)	Biossíntese de novo de ribonucleotídeos de adenosina, supervia de biossíntese de novo de nucleotídeos de adenosina I, supervia de biossíntese de novo de nucleotídeos de purina

55768.m000058	2.066703351	1.96E-44	Subunidade citocromo oxidase, putativa	Respiração aeróbica	Atividade de citocromo-c oxidase, ligação de Heme	Componente integral da membrana	Respiração aeróbica I (citocromo c)
51189.m000022	2.05529764	3.40E-43	subunidade alfa da ATP sintase	Síntese de ATP acoplado transporte de prótons, processo metabólico de ATP, transporte transmembrana de prótons	Ligação de ATP, atividade de ATP sintase de transporte de prótons, mecanismo rotacional, ligação de adenil ribonucleotídeo	Complexo ATP sintase transportador de prótons, núcleo catalítico F (1)	Biossíntese de novo de ribonucleotídeos de adenosina, supervia de biossíntese de novo de nucleotídeos de adenosina I, supervia de biossíntese de novo de nucleotídeos de purina
45011.m000026	2.031001784	8.61E-38	Proteína ribossômica 60S mitocondrial L5, putativa	Tradução	Constituinte estrutural do ribossomo	Ribossomo	Nenhum
56774.m000019	1.96547791	2.86E-37	NADH desidrogenase, putativo	Transporte de elétrons acoplado à síntese de ATP	Atividade da NADH desidrogenase (ubiquinona)	Nenhum	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
46608.m000023	1.972514796	9.84E-35	Subunidade 3 do citocromo c oxidase	Cadeia de transporte de elétrons aeróbica, cadeia de transporte de elétrons respiratória	Atividade de citocromo-c oxidase, atividade de transferência de elétrons	Membrana, mitocôndria, componente integral da membrana	Biossíntese de novo de ribonucleotídeos de adenosina, supervia de nucleotídeos de adenosina, biossíntese de novo I, supervia de nucleotídeos de purina, biossíntese de novo I, respiração aeróbica I (citocromo c)
37812.m000075	1.991738551	2.73E-30	NADH desidrogenase, putativo	Nenhum	Nenhum	Membrana	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
46574.m000081	1.746126208	3.40E-30	Citocromo C oxidase, subunidade II, putativo	Cadeia de transporte de elétrons	Atividade de oxidoreductase, atividade de citocromo-c oxidase, ligação de íons de cobre	Componente integral da membrana, membrana	Respiração aeróbica I (citocromo c)

55768.m000059	2.301978822	3.79E-30	Cadeia NADH-ubiquinona oxidorredutase 4L, putativa	Transporte de elétrons acoplado à síntese de ATP	Atividade oxidorredutase, agindo sobre NAD(P)H	Nenhum	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
44144.m000044	2.006321412	6.70E-30	Citocromo B	Nenhum	Atividade de transferência de elétrons, atividade de oxidorredutase	Membrana	Nenhum
29694.m000361	1.917908985	4.60E-27	Cadeia NADH-ubiquinona oxidorredutase, putativa	Nenhum	Nenhum	Componente integral da membrana	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
48739.m000082	1.769812573	9.29E-26	Proteína fe-s NADH-ubiquinona oxidorredutase, putativa	Nenhum	Atividade oxidorredutase, agindo sobre NAD(P)H, ligação de quinona, ligação de NAD	Nenhum	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
53582.m000022	1.989610431	8.71E-20	Precursor mitocondrial NADH-ubiquinona oxidorredutase, putativo	Nenhum	Atividade oxidorredutase, atuando na atividade NAD(P)H, NADH desidrogenase (ubiquinona)	Nenhum	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
55946.m000018	1.646453682	9.45E-20	Proteína ribossômica 30S S7, putativa	Tradução	Constituinte estrutural do ribossomo, ligação de rRNA	Subunidade ribossomal pequena mitocondrial, subunidade ribossomal pequena	Nenhum
58936.m000022	1.724933946	9.11E-19	Proteína ribossômica 60S L16, putativa	Tradução	Constituinte estrutural do ribossomo, ligação de rRNA	Ribossomo	Nenhum
28153.m000281	2.104419424	3.26E-13	Reservatório de nutrientes, putativo	Nenhum	Atividade do reservatório de nutrientes	Nenhum	Nenhum

29822.m003369	2.314730837	1.30E-11	Proteína quinase serina-treonina, tipo vegetal, putativo	Fosforilação de proteínas	Atividade de proteína quinase, ligação de ATP	Nenhum	Nenhum
57154.m000018	1.31593778	8.03E-11	NADH desidrogenase, putativa	Nenhum	Nenhum	Membrana	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
58083.m000075	1.016161328	8.28E-11	ATP sintase 9 mitocondrial, putativo	Transporte transmembranar de prótons, transporte de prótons acoplado à síntese de ATP	Atividade do transportador transmembranar de prótons	Complexo ATPase de dois setores transportador de prótons, domínio transportador de prótons, complexo ATP sintase transportador de prótons, fator de acoplamento F(o)	Nenhum
48739.m000078	1.170311728	6.03E-10	Proteína fe-s NADH-ubiquinona oxidoreductase, putativa	Nenhum	Atividade oxidoreductase, agindo sobre NAD(P)H, ligação de quinona, ligação de NAD	Nenhum	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH
30174.m008925	1.2740541	2.02E-09	F-box e proteína de domínio wd 40, putativa	Nenhum	Ligação de proteínas, ligação de íons metálicos	Nenhum	Nenhum
29070.m000129	2.48470566	3.21E-09	Serina/treonina proteína quinase, putativo	Fosforilação de proteínas	Atividade de proteína quinase, ligação de ATP	Nenhum	Nenhum
29736.m002058	2.05282195	2.03E-08	Proteína de ligação ao DNA curva, putativa	Dobramento de proteínas	Ligação proteica não dobrada	Nenhum	Nenhum
29725.m000232	1.309834562	6.30E-08	NADH desidrogenase, putativo	Respiração aeróbica	Nenhum	Complexo I da cadeia respiratória mitocondrial, componente integral da membrana	Respiração aeróbica I (citocromo c), respiração aeróbica III (via alternativa da oxidase), fosforilação e desfosforilação de NAD/NADH

51845.m000009	1.902445098	7.50E-08	ATP sintase 9 mitocondrial, putativo	Transporte de prótons acoplado à síntese de ATP, transporte transmembranar de prótons	Atividade do transportador transmembranar de prótons	Complexo ATP-sintase transportador de prótons, fator de acoplamento F _o , complexo ATPase de dois setores transportador de prótons, domínio transportador de prótons	Nenhum
38858.m000012	1.277099163	8.75E-08	Proteína contendo domínio ribossomal_L16	Tradução	Constituinte estrutural do ribossomo, ligação de rRNA	Ribossomo	Nenhum
30147.m014080	2.651869373	1.12E-07	Proteína de dedo de zinco, putativa	Ubiquitinação de proteínas	Atividade da proteína ligase da ubiquitina	Citoplasma	Nenhum
59928.m000011	1.011880623	1.73E-07	proteína ribossômica 60S L16, putativa	Tradução	Constituinte estrutural do ribossomo, ligação de rRNA	Ribossomo	Nenhum
50568.m000008	3.744493675	4.06E-07	ATP sintase alfa subunidade mitocondrial, putativo	Síntese de ATP acoplado transporte de prótons, processo metabólico de ATP, transporte transmembrana de prótons	Ligação de ATP, atividade de ATP sintase de transporte de prótons, mecanismo rotacional, ligação de adenil ribonucleotídeo	Complexo ATP sintase transportador de prótons, núcleo catalítico F (1)	Biossíntese de novo de ribonucleotídeos de adenosina, supervia de biossíntese de novo de nucleotídeos de adenosina I, supervia de biossíntese de novo de nucleotídeos de purina
29681.m001348	2.704546123	6.01E-06	Precursor da glicoproteína EP1 secretada específica da epiderme, putativo	Nenhum	Nenhum	Nenhum	Nenhum
29701.m000596	0.943180308	6.91E-06	Bombas de prótons vacuolares 1a, putativa	Transporte de íons cálcio, transporte de cátions, transporte transmembrana	transportadora transmembrana de cátions	Componente integral da membrana	Nenhum
29912.m005554	-0.654363558	1.07E-05	Fator de transcrição, putativo	Nenhum	Ligação de DNA específica da sequência da região reguladora de transcrição	Núcleo	Nenhum

28842.m000960	-0.78318396	1.29E-05	Proteína de ligação de centrômero/microtúbulo cbf5, putativa	Processamento de RNA, modificação de RNA	Nenhum	Nenhum	Nenhum
44238.m000013	-1.167423562	2.92E-05	Proteína de ligação de centrômero/microtúbulo cbf5, putativa	Modificação de RNA, processamento de RNA	Nenhum	Nenhum	Nenhum
30169.m006379	1.640837881	3.79E-05	Proteínas Serina-Treonina Quinase	Fosforilação de proteínas	Atividade de proteína quinase, ligação de ATP, atividade de proteína serina/treonina quinase	Nenhum	Nenhum
29589.m001272	0.770539328	9.16E-05	Feoforbídeo A oxigenase, putativa	Nenhum	Atividade de oxigenase	Nenhum	Nenhum

Os danos oxidativos ocasionados nas sementes podem ser correlacionados com o aumento dos danos oxidativos nas plântulas e com o aumento de plântulas deformadas. Ribeiro *et al.* (2018) usando análise de microarranjos para determinar o perfil do transcriptoma de *R. communis* subjacente aos mecanismos de termotolerância durante a embebição da semente, demonstraram mudanças no transcriptoma durante a germinação das sementes quando mantidas a 20, 25 e 35 °C. Embora a temperatura tenha um forte efeito no transcriptoma de *R. communis*, a maioria dessas diferenças ocorreu entre 6 h de embebição e o início da germinação, coincidindo com a janela termossensível identificada. Houve expressão de genes que codificam transcrições de proteínas de ligação de ATP, proteínas de ligação de DNA, proteínas de ligação de RNA, RNA polimerases dirigidas por DNA, proteínas de fator de choque térmico, proteínas de fator de ponte multiproteína, e proteína dedo de zinco também foram afetadas pela temperatura, sugerindo que os mecanismos de reprogramação transcricional foram perturbados.

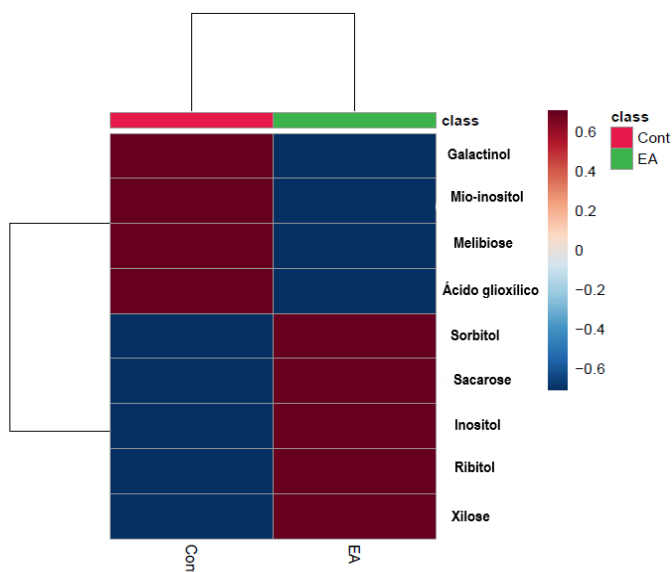
Entre as transcrições reguladas, três foram compartilhados por todos os três estágios: um relacionado à oxidação de zinco 2, uma proteína de domínio F-box e wd40 e uma proteína de ligação de DNA / transcrição semelhante a MYB fator. Entre os transcritos regulados positivamente, nove foram compartilhados por todos os três estágios: uma proteína semelhante a BET1P / SFT1P 14BB, uma proteína rica em cisteína de baixo peso molecular LCR78, uma proteína de repetição WD, uma proteína GAST1, uma adenilato cinase 1 / P-loop contendo proteína da superfamília de nucleosídeo trifosfato hidrolases e quatro proteínas hipotéticas conservadas (Ribeiro *et al.*, 2018).

3.3.6 Análises Metabolômicas

3.3.6.1 Determinação dos metabólitos primários dos embriões das sementes por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS)

O metabolismo primário é constituído pelos processos essenciais à vida, que se caracteriza por grande produção e distribuição universal e com funções essenciais, sendo comum a todos os organismos (TAIZ & ZEIGER, 2004; DUNN & ELLIS, 2005; ABDELNUR, 2011; LEHNINGER & COX, 2011). Cinquenta metabólitos foram anotados por GC-MS com base em propriedades físico-químicas características (MS de alta resolução), no entanto, apenas dez foram identificados: galactinol, mio-inositol, melibiose, ácido glioxílico, sorbitol, sacarose, Inositol, ribitol e xilose (Figura 19).

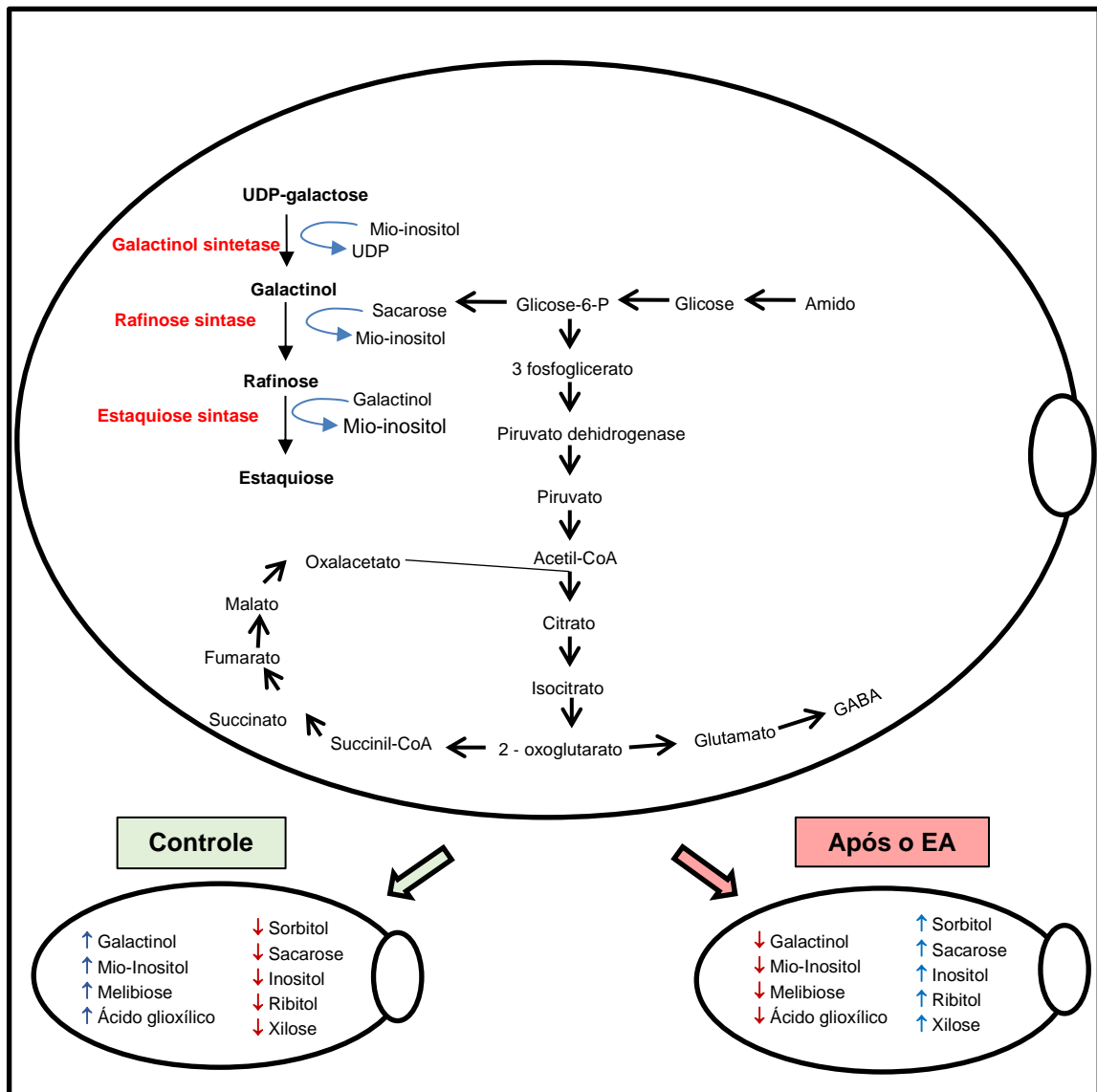
Figura 19 – Mapa de calor com os metabólitos primários identificados no embrião das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis* L. na condição controle e após envelhecimento acelerado.



Foi construído um mapa de calor para avaliar a correlação entre o EA e a variação destes metabólitos no embrião de sementes controles e submetidas ao EA. Um mapa de calor é uma representação gráfica de um determinado conjunto de dados onde às cores do gradiente representam os valores individuais de uma matriz (Figura 19) (SANTOS *et al.*, 2018).

Os embriões das sementes controles apresentaram maior concentração de galactinol, mio-inositol, melibiose, ácido glioixílico, as sementes após o EA apresentam menor concentração desses compostos e maior concentração de sorbitol, inositol, xilose, sacarose e ribitol (Figura 20).

Figura 20 – Biomarcadores de qualidade de sementes de *Ricinus communis* cultivar BRS 188 Paraguaçu e a via de biossíntese de galactinol, rafinose e estaquiiose (Adaptado de NISHIZAWA, YABUTA & SHIGEOKA, 2008; DOMERGUE *et al.*, 2019).



O galactinol é considerado um marcador da qualidade de semente, pois a sua redução está diretamente ligada a uma redução na qualidade da semente, que pode ser evidenciado em sementes submetidas ao EA. Vidigal *et al.* (2018) em estudo sobre a investigação do conteúdo de galactinol descrevem que a alteração deste metabólito pode ser um comportamento preditivo de armazenabilidade de sementes de *Arabidopsis*, repolho e tomate.

As análises revelaram uma correlação positiva entre o conteúdo de galactinol e a longevidade das sementes das três espécies, confirmando que a redução do conteúdo de galactinol está diretamente ligado a redução da qualidade da espécie. Vidigal *et al.* (2016) relataram que o conteúdo de galactinol de sementes maduras secas pode ser usado como um biomarcador adequado para a longevidade das sementes. Considerando que houve diminuição do galactinol e do mio-inositol durante o envelhecimento acelerado aplicado às sementes analisadas, é possível afirmar que estes dois metabólitos são biomarcadores de envelhecimento em *R. communis*, além da resposta a estresse abióticos, durante a germinação.

O galactinol é produzido durante a primeira etapa da via de biossíntese de oligossacarídeos da família da rafinose – RFO (rafinose, estaquiase e verbascose), onde a UDP-galactose é convertida em galactinol pela galactinol sintase que desempenha um papel regulador nesta via (CASTILLO *et al.*, 1990; NISHIZAWA *et al.*, 2008; VIDIGAL *et al.*, 2018). Os carboidratos da RFO são sintetizados por um conjunto de galactosiltransferase (GolS; EC 2.4.1.123), uma família GT8 glicosiltransferase e os dois metabólitos essenciais da via são galactinol e mio-inositol, esta enzima galactosila mio-inositol para produzir galactinol. A galactinol sintase é a primeira enzima envolvida na conversão de galactinol UDP-galactinol e pode desempenhar um papel na regulação de vias.

Estas biomoléculas protegem o embrião da dessecação associada à maturação, são carboidratos de transporte predominantes em algumas famílias de plantas, agem como molécula sinalizadora após estresses bióticos e se acumulam nos tecidos vegetativos em resposta a uma série de estresses abióticos (SENGUPTA *et al.*, 2015; VIDIGAL *et al.*, 2018) Altos níveis intracelulares de galactinol em plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando galactinol sintase genes (GolS1,

GolS2 e GolS4) foram correlacionados com aumento da tolerância a vários estresses abióticos (NISHIZAWA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.* 2015a).

Em estudo com sementes de *R. communis* e avaliação do efeito da temperatura na alocação de biomassa nas mudas de dois genótipos contrastantes, demonstraram que para o genótipo MPA11, os níveis de galactinol foram maiores nas raízes cultivadas a 35 °C do que a 20 °C e 25 °C. Para o genótipo IAC80, no entanto, os níveis de galactinol não variaram em resposta à temperatura. Níveis maiores de galactinol a 35 °C indicam que o genótipo MPA11 evita danos oxidativos causados por estresse térmico e assim, mantém a homeostase para suportar um maior crescimento da raiz em temperaturas elevadas (RIBEIRO *et al.* 2015a).

Ribeiro *et al.* (2015b) ao avaliar o perfil metabólico de sementes de *R. communis* durante o início da embebição da semente demonstraram uma assinatura metabólica específica em resposta a temperatura. Neste estudo foi mostrado que a mobilização de galactinol não ocorreu nas primeiras duas horas de embebição, mas após oito horas de embebição a 35 °C, sendo que foi reduzido 1,4 vezes em comparação das sementes embebidas duas horas com as sementes secas e. Além disso, a degradação do galactinol promoveu um aumento nos níveis de mio-inositol em sementes embebidas por 8 h, especialmente aquelas embebidas a 35 °C. Isso mostra que as sementes também podem ter reservas alternativas, como RFO para atender a demanda de energia para germinação e crescimento inicial das plântulas.

A rafinose e os subsequentes RFO de maior peso molecular (estaquiose, verboscose e ajugose) são sintetizados a partir da sacarose pela adição subsequente de frações de galactose ativadas doadas por Galactinol. A conversão de galactinol e sacarose em rafinose e mio-inositol é catalisada pela rafinose sintase. A adição de um galactinol adicional à rafinose é catalisada pela estaquiose sintetase e resulta na formação de estaquiose e mio-inositol e, adicionando a outro galactinol, estaquiose é convertido em verboscose e mio-inositol, que é catalisado pela verboscose sintase (VIDIGAL, 2015). Além disso, a rafinose e estaquiose podem ser degradadas em melibiose e frutose (MEYER *et al.*, 2018).

O acúmulo dos oligossacarídeos da família da rafinose (RFO) ocorre do estágio intermediário de desenvolvimento a maturação das sementes, no entanto, isso varia de espécie para espécie. Estes se acumulam em muitos grupos de plantas em

resposta a diversos estresses abióticos (NISHIZAWA-YOKOI; YABUTA; SHIGEOKA, 2008 a, b), como temperaturas extremas ou secas.

Jing *et al.* (2018) realizaram a caracterização funcional da galactinol sintase e rafinose sintase em aquisição a tolerância à dessecação no desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis*, seus resultados indicam que a galactinol sintase e a rafinose sintase, não tiveram efeito significativo no desenvolvimento da semente, mas afetou o tempo tolerância a dessecação durante o desenvolvimento das sementes. E o acúmulo de galactinol e RFO melhorou a resistência à oxidação, sendo estes componentes importantes para a aquisição de tolerância a dessecação durante o desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis*. Resultados semelhantes foram encontrados por Pukacka, Ratajczak & Kalemba (2009) com sementes de faia (*Fagus sylvatica*) na avaliação de tolerância a dessecação e armazenamento. Os autores verificaram uma correlação positiva entre a capacidade de germinação e o conteúdo de estaquiose. Além disso, os resultados indicaram claramente que a composição dos RFO em sementes de faia está intimamente relacionada à aquisição de tolerância a dissecação e à viabilidade das sementes durante o armazenamento.

A rafinose é conhecida por apoiar a sacarose na proteção da integridade da membrana, limitando a cristalização de lipídios e as reações de deterioração, vários estudos têm mostrado que os carboidratos ajudam a manter a integridade estrutural das membranas e proteínas sob condições secas devido à formação de um estado vítreo para limitar as reações de deterioração (BERNAL-LUGO & LEOPOLD, 1995; NISHIZAWA, YABUTA & SHIGEOKA, 2008; VIDIGAL *et al.*, 2018). A sacarose em sementes oleaginosas pode ser originada pela degradação dos triacilgliceróis e produção de carboidratos por gliconeogênese, este é um processo que envolve diferentes vias metabólicas. Sementes oleaginosas, possuem lipídeos armazenados na forma de triacilglicerol. A degradação do triacilglicerol é catalisada por lipases, produzindo ácido graxo e glicerol, os ácidos graxos entram no glioxissomo, onde ocorre β -oxidação e parte do ciclo do glioxilato. A β -oxidação converte o ácido graxo a acetil-CoA, que é posteriormente condensado a um composto de quatro carbonos, por meio do ciclo do glioxilato. Este composto é transferido para as mitocôndrias e transportado para o citosol para gliconeogênese (onde há a produção de sacarose) ou usado como substrato para a respiração (HUANG, 1975; HIPPMAN, 1976; LIN, 1976; LIN, 1977; EASTMOND, 2004; GRAHAM, 2008).

A sacarose serve como substrato para a síntese de rafinose e RFO, contribuindo para o vigor e a proteção das sementes (VIDIGAL, 2015). LEDUC (2007) avaliando sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil) durante a maturação, verificou que os teores de rafinose e estaquiose aumentaram expressivamente quando as sementes foram submetidas à secagem lenta. Em sementes imaturas com 35 DAA (dias após a antes) que não toleraram a dessecação ou que tiveram a germinação prejudicada por outros fatores, também foram observados elevados teores de rafinose, estaquiose e mais expressivamente de sacarose. Muito semelhante ao encontrado nesse estudo, as sementes após serem submetidas ao EA, tiveram um aumento na quantidade de sacarose, quando comparado ao controle.

O inositol é um polialcool cíclico, nomeado de ciclohexanohexol, com seis grupos hidroxil, um em cada carbono do anel. A sua formação pode ocorrer pela hidrólise do ácido fítico que é realizada pela enzima fitase, uma fosfomonoesterase específica, que hidroliza um fósforo de cada vez. A fitase catalisa a hidrólise do ácido fítico formando inositol e seis grupamentos fosfatos (Pi), liberando um fosfato de cada vez. Durante a germinação da semente, o teor de ácido fítico diminui grandemente e o teor de fosfato inorgânico e mio-inositol não se acumulam, tendo em vista que estes são rapidamente metabolizados (BUCKERIDGE *et al.*, 2004). Os inosítóis podem ser arranjados em nove estereoisômeros: scilo, myo, neo, epi; D e L. Entre esses isômeros está o mio-inositol, estes são os mais abundantes na natureza, sendo produzidos a partir da glicose (ALMEIDA *et al.*, 2003; DE SOUZA, 2010). O inositol é encontrado em várias partes das plantas, como raízes, sementes e folhas, principalmente de plantas submetidas a estresses. No entanto, pouco se sabe sobre as funções desempenhadas por esse composto em plantas (MURAKEÖZY *et al.*, 2002; DE SOUZA, 2010).

O mio-inositol, um hexahidroxíciclohexano, está diretamente ligado a formação do galactinol. O crescimento das plantas é marcado pela função do mio-inositol e seus derivados. Estes possuem diversas funções nas células, tais como reserva de fosfato, os mio-inositol fosfatos estão envolvidos em processos de rotas celulares, transdução, regulação de sinal, regulação da síntese de ATP, transporte e estocagem de auxina, biossíntese de parede celular, endocitose e tráfego de vesículas, produção de moléculas relacionado ao estresse, remodelamento de cromatina e reparo de DNA, expressão de genes e exportação de RNA (Abreu, 2006).

Poucas plantas toleram ao estresse em resposta a fatores ambientais adversos, incluindo sementes de grão de bico, esta é capaz de aumentar os níveis de mio-inositol para a sua adaptação ao estresse (BOOMINATHAN et al., 2004). Saxena et al. (2013) em seu estudo com grão de bico (*Cicer arietinum* L.) demonstrou que a atividade da monofosfatase de mio-inositol é distribuída na planta, e aumentada durante o estresse ambiental, sendo sua função importante na biossíntese de mio-inositol. Em estudo com superexpressão da monofosfatase de mio-inositol em *Arabidopsis* os autores, demonstraram tolerância ao estresse durante a germinação de sementes e crescimento de plântulas. Karner et al. (2004) em estudo com ervilha (*Pisum sativum* L.) verificou uma correlação altamente significativa entre os níveis de mio-inositol e RFO, mio-inositol e galactinol, sacarose e RFO. Demonstraram assim, evidências para o papel fundamental do mio-inositol para a síntese de galactinol, concluindo a partir dos resultados obtidos que o acúmulo de RFO é controlado pelos níveis dos substratos iniciais, como o mio-inositol e a sacarose.

A melibiose é um dissacarídeo presente nas sementes e pode ser utilizado como substrato da alfa-galactosidase para produzir glicose e galactose. Esta é originada do grupo frutossil da rafinose, quando a invertase cliva o grupo frutossil originando a melibiose. A rafinose acumula-se em concentrações elevadas nos órgãos de reserva durante o desenvolvimento da planta, durante a maturação ocorre perda de água nas sementes e há simultaneamente aumento na concentração de rafinose (DEY, 1985; CALLEGARI, 2003). Aguiar (2015) em estudo para identificação do perfil metabólico de cana-de-açúcar verificou que os açúcares da via da pentose fosfato e seus intermediários estiveram presentes em concentrações muito elevadas, como por exemplo, a glicero-guloheptulose, melibiose e xilose. Justificando o aumento da concentração compostos aromáticos, provenientes da via da pentose que fornece açúcares para via do ácido chiquímico. Além disso, Alterações importantes no metabolismo dos açúcares incluem o aumento significativo de produtos osmorreguladores e de açúcares associados à rigidez da parede celular (melibiose, galactose, salicina e trealose). A concentração de melibiose aumentou em resposta ao estresse, corroborando com este estudo.

O ácido glioxílico é importante para o processo foto-respiração nos vegetais e se forma no ciclo do glioxilato a partir da degradação e uso de lipídeos. No ciclo do ácido glioxílico, há utilização das moléculas de acetil-CoA produzidas na oxidação dos

ácidos graxos que não são utilizadas pelas mitocôndrias para a produção de ATP. Os metabólitos desta via são utilizados para a produção de intermediários do ciclo de Krebs e da glicose. Dessa forma, há a transformação de ácidos graxos em glicose por gliconeogênese (EASTMOND & GRAHAM, 2001). SEW *et al.* (2016) em estudo com mutantes duplos que foram afetados na malato desidrogenase mitocondrial 1 e 2. Verificaram que a maioria das sementes não eram viáveis e as poucas sementes viáveis que germinaram, possuíam uma alta taxa de respiração, acumularam aminoácidos à custa de 2-oxoglutarato, e foram menos resistentes ao envelhecimento artificial. Isso demonstra o papel crítico desempenhado pelo catabolismo do malato sendo possível afirmar que a capacidade de reciclar o ciclo de Krebs ou os intermediários do ciclo glicoxílico via malato é um mecanismo importante para a qualidade da semente (DOMERGUE *et al.*, 2019).

O sorbitol é um poliálcool proveniente de glicose, podendo atuar de três maneiras; primeiro como um álcool que é transportado de modo não vascular do endosperma para o embrião; segundo, como um metabólito intermediário; e terceiro, servindo como um escape para o excesso de NADPH + H⁺ formado no interior hipóxico da semente. Além disso, o sorbitol pode ser translocado do endosperma para o embrião pelo transportador de sorbitol e ser convertido em glicose pela aldose redutase (AR) no interior do embrião (SOUZA, 2006).

Kuo *et al.* (1990) ao avaliar o metabolismo das sementes de soja (*Glycine max* L. Merrell) durante a germinação, verificaram que o sorbitol acumulou-se nos eixos durante a germinação, O acúmulo de sorbitol nos eixos começou no primeiro dia de germinação, à medida que a sacarose diminuía e a glicose e a frutose aumentavam. A sacarose também diminuiu nos cotilédones, mas não houve acúmulo de sorbitol, glicose ou frutose. O acúmulo de sorbitol e hexoses foram altamente correlacionados com o aumento da atividade da invertase nos eixos, mas não com a sacarose sintase e atividades de sacarose fosfato sintase. Já Lahuta *et al.* (2007) em estudo com sementes de ervilha para avaliar o efeito do envelhecimento acelerado em relação a composição e o teor de carboidratos, verificaram uma redução gradual na concentração de rafinose e o acúmulo de sorbitol nos embriões, junto ao envelhecimento das sementes, ocorrendo perda de vigor e viabilidade. O acúmulo de sorbitol pode indicar deterioração semente e perda da qualidade durante o armazenamento. Este resultado corrobora com o resultado das sementes após o EA

no presente estudo, já que houve um aumento na quantidade de sorbitol. Assim sendo, é possível afirmar que o sorbitol pode ser considerado um biomarcado para indicar deterioração e perda de qualidade da semente em *R. communis*.

O ribitol é um poliol derivado de pentano com 5 hidroxilas, o d-ribitol é um dos constituintes da Riboflavina, componente presente em sementes e plantas, importante para a síntese de moléculas de flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e atua também em atividades antioxidantes (CORREA *et al.*, 2008). Almaghamsi *et al.* (2020) investigaram os efeitos do estresse hídrico na biossíntese e metabolismo do sorbitol e acúmulo de sorbitol e ribitol em tomate (*Solanum lycopersicum* L.), verificando que ambos se acumularam com o aumento do estresse. Resultado semelhante foi verificado em outra espécie por Zhang *et al.* (2019) ao avaliar o envelhecimento e o estresse causado por infecção endofítica em sementes de *Festuca arundinacea* Schreb. Os autores verificaram, ao fazer uma análise de metabólitos secundários, um aumento na concentração de manitol, ribitol e trealose no embrião em comparação com o endosperma. Associado a estes resultados demonstraram que as sementes que tiveram uma infecção endofítica apresentaram maior concentração desses metabólitos primários quando comparado com as sementes envelhecidas. Neste trabalho também foi verificado o aumento na quantidade de ribitol após o envelhecimento das sementes, assim, o ribitol pode ser considerado um bom marcador para a qualidade de sementes de diferentes espécies que foram submetidas a estresse biótico ou abiótico e envelhecimento.

Xilose é um açúcar presente em sementes, os xiloglucanos de sementes são constituídos de uma cadeia principal linear de glucano, como a celulose, mas possui resíduos de xilose ou de galactose unida a xilose, ambos ligados à cadeia principal através de ligações α -(1→6) (SUDA, 2001; MORAIS, 2013). Corte *et al.* (2010), analisaram sementes (*Melanoxylon brauna* - Leguminosae-Caesalpinoideae) armazenadas por 0, 3, 6, 9 e 12 meses a 20 °C (envelhecimento natural) e durante 0, 24, 48 e 72 horas à 40 °C (envelhecimento acelerado). No envelhecimento natural verificaram o aumento no conteúdo de xilose nos cotilédones. Apenas os valores de xilose mostraram uma correlação positiva entre os dois tipos de armazenamento e compartimentos (eixo embrionário e cotilédones), mas a relação nos níveis de xilose foi inverso, sugerindo a transferência de xilose entre os compartimentos durante o armazenamento. Em geral, houve uma degradação significativa de xilose, manose e

galactose no eixo embrionário durante o armazenamento natural. Durante o envelhecimento acelerado, o nível de xilose no eixo embrionário aumentou até 48 horas e permaneceu aproximadamente estável pelas próximas 24 horas até o fim do experimento com 72 horas.

Resultado semelhante foi obtido por Reis *et al.* (2020) ao avaliar relações entre o substrato e a mobilização de reserva com variação de temperatura durante a germinação de sementes de *Ormosia coarctata* Jack. Os níveis de xilose não mudaram significativamente durante a embebição a 15°C, enquanto a 25, 30 e 35°C a concentração de xilose diminuiu após 48 h. E a 40°C a xilose foi rapidamente consumida. Resultado semelhante foi encontrado para a galactose e concluíram que os monossacarídeos são preferencialmente decompostos, independentemente da presença de oligossacarídeos. A xilose e a galactose foram consumidas ou liberadas em maior taxa nas sementes embebidas a 40 °C, provavelmente devido à degradação das membranas celulares no final da embebição.

Neste trabalho, foram obtidos resultados semelhantes a Ribeiro (2015), que verificou que a quantidade de xilose e sacarose, presente nas sementes com seis horas de embebição a 35°C foram três vezes maior que no controle, semente seca. Concluiu que sementes embebidas sob altas temperaturas apresentam uma germinação mais rápida e alta germinação, no entanto, as mudas apresentam-se comprometidas devido ao estresse térmico, já que a planta reconhece a temperatura de 35°C ou superior como uma temperatura de estresse térmico. A alta temperatura apresenta um efeito negativo em processos importantes, tais como: degradação dos lipídeos de armazenamento, com β -oxidação de ácidos graxos, realização de ciclo do glioxilato e gliconeogênese. Assim como, o EA realizado neste trabalho, a temperatura utilizada, gerou danos gerando grande quantidade de plântulas deterioradas e deformadas. Portanto, neste estudo o aumento do sorbitol, inositol, xilose, sacarose e ribitol podem ser considerados como marcadores de deterioração e perda de qualidade da semente.

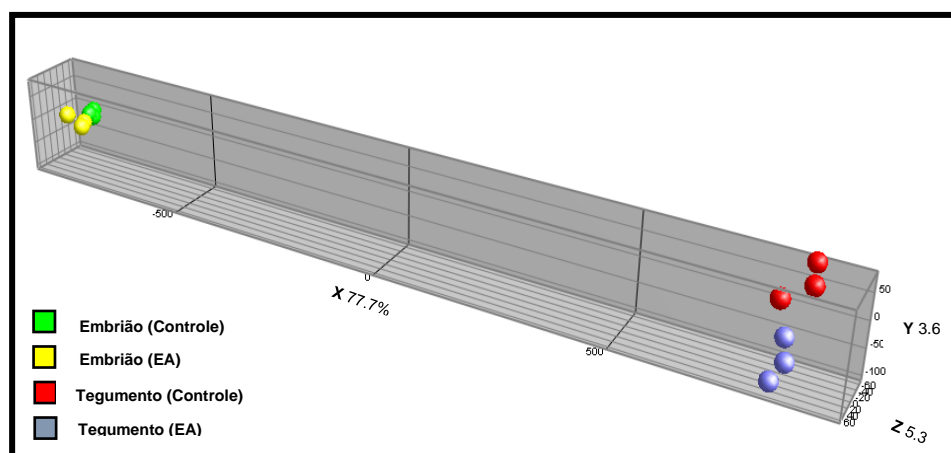
Embora o galactinol, mio-inositol, melibiose, sorbitol, sacarose e xilose, tenham sido apresentados em outros estudos como bons marcadores para a deterioração e perda da qualidade de sementes, e sendo considerado por este estudo, potenciais biomarcadores para a espécie de *R. communis* durante o envelhecimento acelerado,

ainda é necessários mais estudos e verificação em outras espécies, pois não se sabe se estes potenciais marcadores bioquímicos são aplicáveis a todos os casos.

3.3.6.2 Determinação dos metabólitos secundários dos embriões das sementes e do tegumento das sementes (LC-MS)

As amostras dos embriões e tegumentos apresentaram diferença significativa quanto a identificação dos metabólitos secundários presentes nas condições controle e EA, como pode ser evidenciado na Figura 21.

Figura 21 - Análise de componentes principais dos metabólitos secundários das amostras de Embrião e Tegumento do Controle e EA.



O envelhecimento acelerado é fator principal para a alteração da semente, pois a preservação da qualidade da semente depende da condição externa a qual a semente é submetida. A temperatura e umidade relativa são frequentemente citados como os principais fatores que afetam adversamente a qualidade das sementes, causando danos físicos e mudanças bioquímicas e moleculares nas sementes. Os principais danos como perda da integridade da membrana celular, diminuição na atividade enzimática, peroxidação lipídica e conseqüentemente perda de vigor na semente pode ser verificado (OGE *et al.*, 2008; DOS SANTOS *et al.*, 2016). Justificando assim, ao se analisar os dados fisiológicos, bioquímicos e moleculares deste estudo, o efeito do EA. O envelhecimento acelerado causou danos que reduziu significativamente a qualidade das sementes causando o aumento da peroxidação lipídica e o aumento significativo de plântulas deformadas e deterioradas.

O tegumento por ser um componente externo de proteção para a semente está sujeito aos maiores danos devidos as alterações do ambiente, o que explica o resultado demonstrado. A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada a todo conjunto de dados, usando metabólitos identificados e não identificados com o objetivo de encontrar as direções que melhor explicam a variação no conjunto de dados (Figura A). Componente principal 1 (PC1) explicou 77,7% da total variância, enquanto o componente principal 2 (PC2) explicou 5,3% e o componente principal 3 (PC3) explicou 3,6% da variância total. A maior parte da variação na composição do metabólito pode ser atribuída a diferença de tecidos, evidenciando o efeito do EA mais evidente no tegumento.

Técnicas de identificação do perfil metabólito, como a cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC-MS) fornecem informações vitais para a compreensão dos processos biológicos e são aplicadas para identificar o potencial dos compostos bioativos em diferentes amostras biológicas (SANTOS *et al.*, 2018; BATISTA *et al.*, 2019). Através do uso da LC-MS para análise das amostras foram identificados um total de 16.097 sinais de massa, sendo filtrado 5.940 sinais, por estarem pelo menos em duas amostras com intensidade >2.000, sendo analisado 933 dos metabólitos e identificados os presentes na Tabela 7.

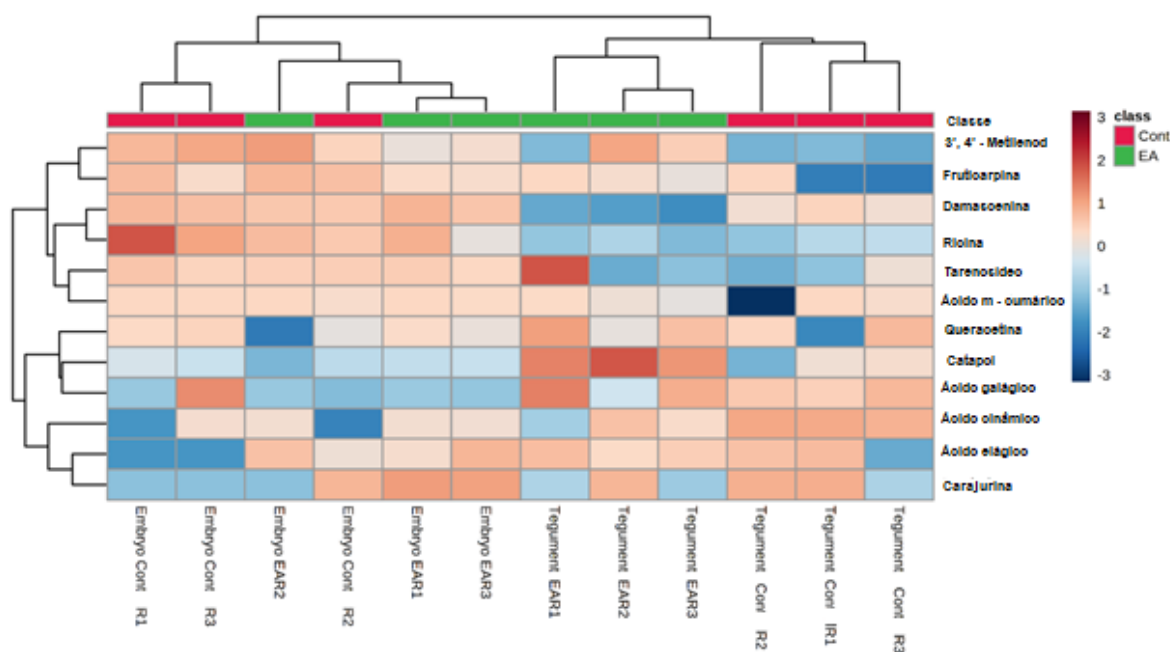
Tabela 7 – Metabólitos identificados com base em análise de identificação LC-MS, com o uso do programa METLIN (https://metlin.scripps.edu/landing_page.php?pgcontent=mainPage).

ID	tr	Nome	Fórmula	Massa	ppm	Aduct
68409	49.29	Damascenina	C10H13NO3	195.0895	1	[M-H] ⁻
50728	1.56	Quercetina 3-acetato 7,3',4'-tri-O-sulfato	C17H12O17S3	583.9237	2	[M-H] ⁻
48149	14.17	Fruticarpina	C17H16O5	300.0998	1	[M-H] ⁻
69146	12.17	Tarenosídeo	C16H22O9	358.1264	1	[M-H] ⁻
305	36.08	ácido m-cumárico	C9H8O3	164.0473	1	[M-H] ⁻
41152	51.86	Catalpol	C15H22O10	362.1213	1	[M-H] ⁻
47208	29.97	Carajurin	C17H16O5	300.0998	2	[M-H] ⁻
65606	2.05	Ricinina	C8H8N2O2	164.0586	1	[M-H] ⁻
86147	21.95	Ácido galágico	C28H12O16	604.0125	1	[M-H] ⁻
310	28.11	Ácido cinâmico	C9H8O2	148.0524	2	[M-H] ⁻
3430	22.86	Ácido elágico	C14H6O8	302.0063	1	[M-H] ⁻
47361	22.58	3',4'-Methylenedioxy epicatechin 5,7-dimethyl ether	C18H18O6	330.1103	2	[M-H] ⁻

*ID METLIN; Tempo de retenção (tr); Δ ppm; Aductos.

Para facilitar a visualização dos metabólitos secundários de *R. communis* em amostras de embrião e tegumento, na condição controle e após EA, foi construído um mapa de calor para expor a composição metabólica das amostras (Figura 22). Um mapa de calor é uma representação gráfica de um dado conjunto de dados em que as cores de gradiente representam os valores individuais de uma matriz (SANTOS *et al*, 2018).

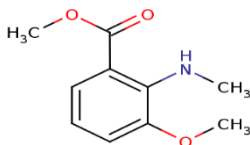
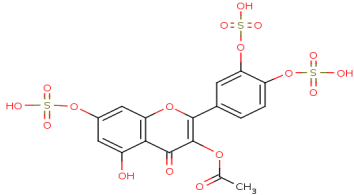
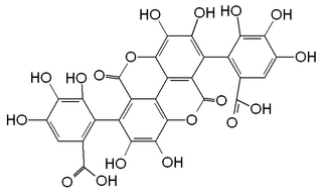
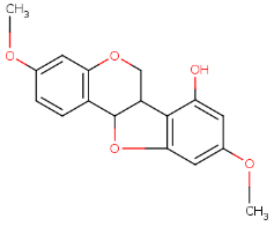
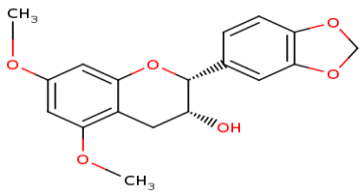
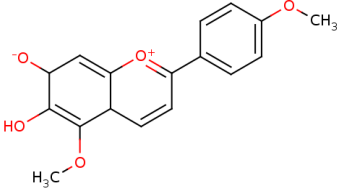
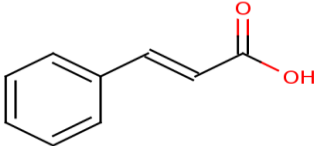
Figura 22 - Representação do mapa de calor dos metabólitos identificados de embrião e tegumento na condição controle e após EA de *R. communis* com base em análise de identificação LC-MS.

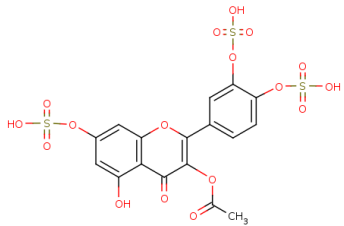
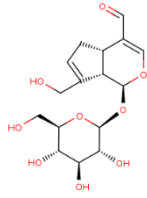
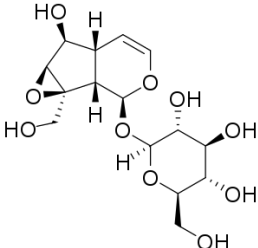
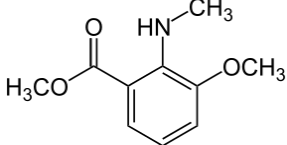
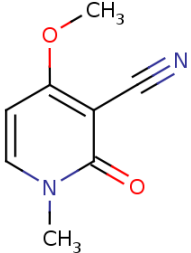


Como exposto na Figura 22 existe uma diferença entre os metabólitos e suas concentrações de acordo com os tecidos, como mostrado na Figura 21. O tegumento possui a presença de ácido m-cumárico, ácido elágico, ácido galágico, fruticarpina, 3',4'-metilenodioxo epicatequina 5,7-dimetil éter, carajurin. Contudo, o embrião possui em maior quantidade: ricinina, ácido cinâmico, queracetin, tarenosídeo, catalpol e damascenina.

Sendo classificado como composto fenólico: ácido m-cumárico, ácido elágico, ácido galágico, fruticarpina, 3',4'-metilenodioxo epicatequina 5,7-dimetil éter, carajurin, ácido cinâmico, queracetin. Sendo classificados como terpenos: tarenosídeo e catalpol. E a damascenina e ricinina são compostos nitrogenados (Tabela 8).

Tabela 8 – Classificação e estrutura dos metabólitos encontrados.

Classificação	Nome do composto	Estrutura química
Compostos fenólicos	• Ácido M-cumárico	
	• Ácido elágico	
	• Ácido galáico	
	• Fruticarpina	
	• 3',4'-metilenodioxiepicatequina 5,7-dimetil éter	
	• Carajurina	
	• Ácido cinâmico	

	<ul style="list-style-type: none"> • Queracetina 	
Terpenos	<ul style="list-style-type: none"> • Tarenosídeo 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Catalpol (glicosídeo iridoide) 	
Alcalóides	<ul style="list-style-type: none"> • Damascenina 	
	<ul style="list-style-type: none"> • Ricinina 	

Os compostos fenólicos são uma classe dos metabólitos secundários importantes para os vegetais, estes contêm um grupo fenol (um grupo hidroxila funcional em um anel aromático), estes compostos são derivados de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico. E constituem um grupo quimicamente heterogêneo, devido à sua diversidade química apresentam uma variedade de funções nos vegetais e presente em um extenso número de espécies de plantas (TAIZ e ZEIGER, 2009; VIZZOTO, 2010; SILVA et al., 2022).

O ácido m-cumárico, ácido elágico, ácido galágico, fruticarpina, 3',4'-metilenodioxil epicatequina 5,7-dimetil éter, carajurina são os compostos fenólicos presentes no tegumento das sementes, as variações presentes podem ser devido à realização da análise de forma que não são evidentes as variações nesses compostos identificados. O mesmo é verificado nas amostras de embrião, sendo identificados os compostos fenólicos: ácido cinâmico e quercetina.

Além destes, os terpenos foram identificados. São formados através da justaposição sucessiva de isopentenilpirofosfato (IPP-C5) que dá origem a todos os terpenos, a exemplo do o tarenosídeo, e o catalpol. Foram identificados também, alcalóides: damascenina e ricinina. Os alcalóides são compostos nitrogenados cíclicos que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel (TAIZ e ZEIGER, 2009; VIZZOTO, 2010; SILVA et al., 2022).

Apesar dos compostos identificados e da diferença evidente entre metabólitos nos tecidos, os compostos identificados não são suficientes para explicar a mudança de coloração nos tegumentos identificados (Capítulo 3). Sugerindo que outros compostos fenólicos não identificados podem estar presentes nas amostras analisadas.

3.3.7 Peroxidação lipídica das sementes inteiras (sem tegumento) e embrião através da determinação de malonaldeído (MDA)

Quando os níveis de ERO aumentam e ficam acima do limite considerado adequado, ocorre um aumento da peroxidação lipídica, ocorrendo tanto nas membranas das células quanto nas membranas das organelas, que afeta o funcionamento normal da célula. A peroxidação lipídica agrava a oxidação e o estresse através do aumento de radicais derivados dos lipídeos que podem agir danificando proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. A análise da peroxidação lipídica tem sido utilizada como marcador para lesões em membranas ocasionadas por ERO sob condições estressantes. O aumento da peroxidação lipídica por ERO aumenta a produção de malonaldeído (MDA), este é um dos produtos da peroxidação de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados de fosfolipídios e é responsável pelos danos de membrana, sendo utilizado como indicativo de estresse oxidativo (LIMA e ABDALLA, 2001; BAILLY, 2004; ATAÍDE *et al.*, 2012).

Dois locais comuns para o ataque das ERO são as duplas ligações entre átomos de carbono das moléculas de ácidos graxos, e ligação éster entre glicerol e ácido graxo dos fosfolipídios. Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), presentes nos fosfolipídios nas membranas são particularmente sensíveis ao ataque de ERO, pois uma única hidroxila pode resultar na peroxidação de vários ácidos graxos poli-insaturados, porque as reações envolvidas nesse processo fazem parte de uma reação em cadeia cíclica (SHARMA e DUBEY, 2005; TANOU *et al.*, 2009; SHARMA *et al.*, 2012).

Há vários ERO responsáveis pela peroxidação lipídica, estes são resultantes da redução do oxigênio molecular com consequente formação de produtos tóxicos, em especial o superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil, cada um com capacidade distinta de causar danos à célula. Sementes que possuem baixo vigor possuem menor eficiência de capturar ERO gerando assim, um estresse oxidativo.

Quando a semente é envelhecida, ocorre maior peroxidação dos lipídeos e a depender o nível de dano há uma diminuição na atividade enzimática removedoras de peróxidos, contribuindo para a perda da viabilidade (JOSÉ *et al.*, 2010; ATAÍDE *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2012). Segundo o estudo de Sung e Jeng (1994), ocorre maior peroxidação dos lipídeos nas sementes envelhecidas com diminuição da atividade das enzimas removedoras de peróxidos, contribuindo para a perda de viabilidade. Altas temperaturas e umidades nas sementes contribuem para a deterioração, pois promovem alterações degenerativas como a desestabilidade nas atividades de enzimas e a desestruturação e perda de integridade do sistema de membranas (SHARMA e DUBEY, 2005; CORTE *et al.*, 2010; SHARMA *et al.*, 2012).

Através dos dados de peroxidação lipídica é possível afirmar que as sementes apresentaram comportamento diferente na condição controle e após o EA, principalmente, ao se analisar as amostras de sementes inteiras e o embrião de sementes. Ao se analisar os níveis de MDA nas sementes inteiras, há diferença significativa entre a amostra controle e após o EA (Figura 23 – A). E nas amostras de embrião não houve diferença significativa quanto à produção de MDA, apesar do leve aumento (Figura 23 – B). As sementes são dotadas de um mecanismo protetor eficiente de defesa contra as ERO, promovendo a remoção eficiente das espécies reativas produzidas. O que justificaria os resultados da germinação, o EA afeta a semente, mas por se tratar de uma viável, como demonstrado nos resultados iniciais

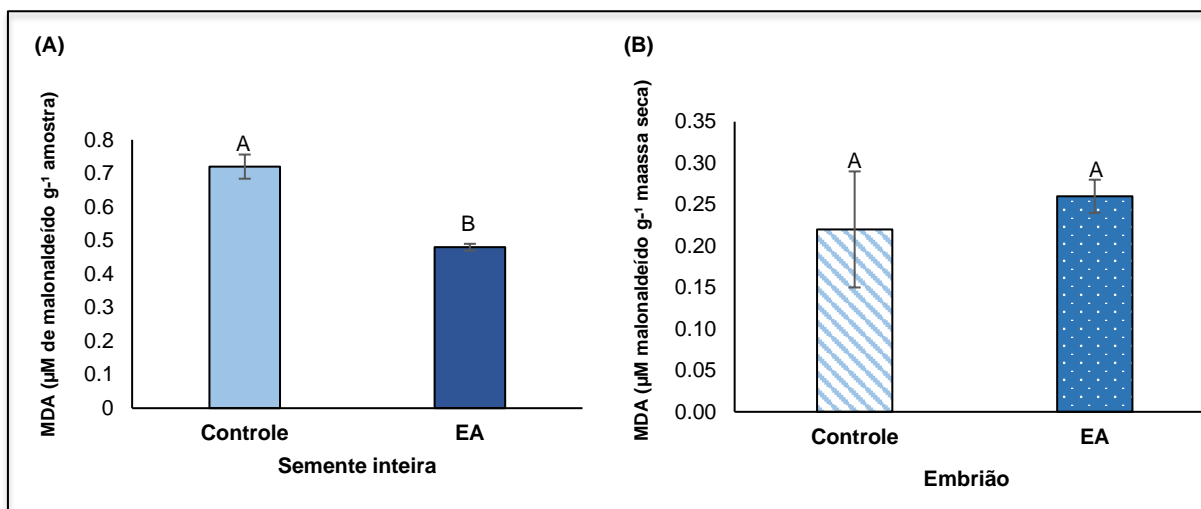
de caracterização do lote. O EA durante 10 dias a 40°C e 85% UR foi capaz de causar danos na semente, afetando vias metabólicas energéticas pela presença dos genes transcritos pelo RNA-seq. Entretanto, por ser um lote de sementes conservada ainda possuem um mecanismo protetor eficiente, com ação de enzimas antioxidantes, a exemplo das enzimas do ciclo do ascorbato/glutationa, as quais atuariam em paralelo com a enzima catalase.

Uma outra justificativa para a diferença entres os resultados encontrados na Figura 23 (A e B), se deve a existência de compartimentos mais sensíveis à deterioração que outros nas sementes, e o embrião é uma estrutura que é protegida pelo tegumento e endosperma das sementes. Além disso, como encontrado nos resultados de metabolômica há o acúmulo dos oligossacarídeos da família da rafinose (RFO), que tem sua importância na proteção, durante a formação do estado vítreo (JOSÉ *et al.*, 2006; CORTE *et al.*, 2010; SANO *et al.*, 2015).

Na composição cotilédone e embrião, há carboidratos solúveis. Dentre eles existe a presença de sacarose, oligossacarídeos, rafinose, estaquiose e verbascose. Durante a desidratação, há açúcares específicos que podem prevenir os efeitos danosos da dessecação nas membranas celulares, ocorre um impedimento da transição da fase líquida cristalina para a fase gel. Isto porque ocorre formação de ligações de hidrogênio que repõe a água normalmente, associada com as superfícies das membranas. Mantendo assim, o espaçamento dos grupos de lipídeos, evitando a transição. A sacarose é capaz de manter em níveis baixos a estrutura da bicamada líquida e cristalina da membrana (JOSÉ *et al.*, 2006; VIDIGAL, 2015).

Há outro mecanismo por meio do qual açúcares pode agir na proteção as células durante a dessecação e a formação um vidro intracelular. A vitrificação ou a formação de “vidros” no citoplasma, é devido a característica de uma solução líquida, que possui a propriedade de viscosidade de um sólido, que não forma cristais mesmo em temperaturas muito baixas e com estabilidade em uma ampla faixa de temperatura, mas que durante o processo de dessecação pode se formar. A formação de vidro previne a desnaturação de moléculas e a formação de agregados moleculares e serve para evitar o aumento excessivo do colapso nos tecidos, pois o estado vítreo paralisa todas as reações químicas que requerem difusão de moléculas assegurando a estabilidade (SUN, 1997; WALTERS *et al.*, 2001; JOSÉ *et al.*, 2006).

Figura 23 – Determinação de malonaldeído (μM de MDA g^{-1}MS) em sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu, nas condições controle e após EA. (A) Sementes inteiras sem tegumento e (B) Embrião. (MS) massa seca.



Letras iguais maiúsculas entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Bailly (1996) em seu estudo de envelhecimento com sementes de girassol a 45°C e 75 e 100% UR, verificou o acúmulo de MDA nas sementes com 100% UR e um aumento acentuado no quinto dia de envelhecimento, quando começou a perder a viabilidade. No entanto, nas sementes a 76% UR não acumularam MDA em quantidades significativas e permaneceram viáveis. Resultados semelhantes foram obtidos em sementes de girassol durante incubação a 45°C em água por Gidrol *et al.* (1989). Ataíde *et al.* (2012) em seu estudo com *Pterogyne nitens* sem e com superação de dormência, por meio da aplicação de ácido sulfúrico concentrado (95-99%), durante 10 minutos, foram submetidas ao EA por 24, 48 e 72 horas a 40°C e 100% UR. Em seus resultados na determinação de MDA, obteve um resultado estável até 24 horas de envelhecimento após a superação da dormência, com valor máximo em 48 horas e uma redução significativa em 72 horas.

Segundo o estudo de Jeng e Sung (1994), quando a semente é envelhecida, há maior peroxidação e uma redução na atividade das enzimas removedoras de peróxidos. O que contribui para a perda da viabilidade da semente. Desta forma segundo Ataíde *et al.* (2012), em 48 horas de EA, indica que o envelhecimento ocasionou a deterioração nas sementes. No entanto, em 72 h, pode existir duas causas: a redução poderia ser justificada pela morte das sementes ou devido a ação de enzimas antioxidantes do ciclo do ascorbato/ glutathiona em paralelo com a ação da

catalase, ambas removedoras de peróxido de hidrogênio. No entanto, neste caso as enzimas não sofreriam a ação do ambiente estressante de envelhecimento.

3.3.8 Determinação da atividade das enzimas antioxidantes:

3.3.8.1 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

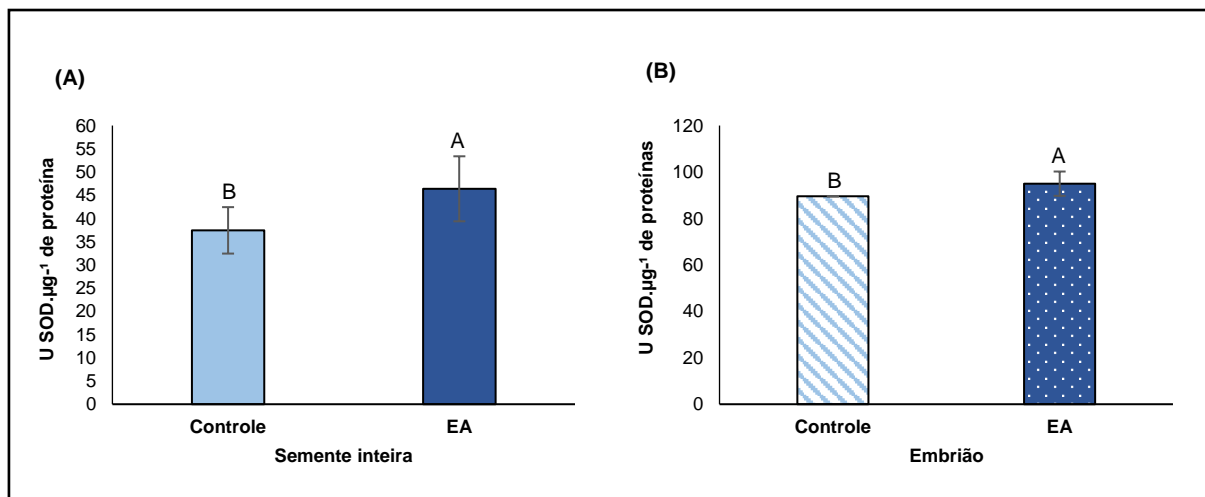
As sementes e/ou plantas estão expostas a ações bióticas, abióticas e ao envelhecimento natural, quando há distúrbios ocasionados por estes fatores. Estes, em desequilíbrio induz ao acúmulo de ERO nas células, que pode causar severo dano oxidativo às plantas. O equilíbrio entre a produção e a eliminação de ERO é conhecido como homeostase redox, no entanto, quando a produção de ERO sobrecarrega a capacidade de eliminação, desequilibrando a homeostase redox celular e o resultado é um estresse oxidativo. As sementes e plantas apresentam um sistema antioxidante importante nessa defesa, dentre eles a enzima superóxido dismutase se destaca por atuar como primeira enzima no processo de desintoxicação celular, a SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 (COSTA *et al.*, 2002; CAVERZAN *et al.*, 2016; JESUS, 2016).

A temperatura e a umidade relativa são frequentemente citadas como alguns dos principais fatores que afetam frequentemente a qualidade das sementes, causando danos físicos e químicos, alterações como perda da integridade da membrana celular, diminuição da atividade enzimática, peroxidação lipídica e conseqüentemente perda de vigor. No entanto, no começo do estresse oxidativo há um aumento súbito da proteção antioxidante na tentativa de desintoxicar e tentar manter o equilíbrio de ERO gerado por fatores externos (OGE *et al.*, 2008; CARDOSO *et al.*, 2012; VENKATESWARLU *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2016). Pois, o aumento na atividade desta enzima é reconhecido por conferir tolerância ao estresse oxidativo (JALEEL *et al.*, 2007; MITTLER, 2002; BARROS, 2017). O que justificaria os resultados no aumento significativos na condição de EA (Figura 24 A e B). Em virtude do estresse recebido nas sementes submetidas ao EA, o sistema antioxidantes ativo da SOD atuou na proteção da semente, esse resultado justifica o resultado encontrado na Figura 24.

Com o estresse abiótico gerado sobre a semente a formação de ERO, a expressão de SOD foi intensificada, principalmente nos embriões (Figura 24 – B). A SOD é capaz de detectar diferença sutis no metabolismo tanto no citoplasma celular

e na matriz mitocondrial e atua efetivamente na remoção de superóxido (CORTE *et al.*, 2010; NAKADA *et al.*, 2010; JESUS, 2016).

Figura 24 – Atividade da Superóxido dismutase (U SOD.mg⁻¹ de proteína) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.



Letras iguais maiúsculas entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

O armazenamento de sementes da cultivar Paraguaçu de *Ricinus comunis* foi avaliado por Jesus (2016), utilizando diferentes condições de armazenamento durante doze meses. A autora verificou aumento significativo na atividade da SOD em relação ao controle e o terceiro mês de armazenamento, com uma redução significativa para as condições em que havia o controle apenas da umidade ou temperatura e umidade juntamente com a temperatura. O aumento significativo em função da maior expressão da enzima e atuação dela na remoção de superóxido, em virtude da adaptação das sementes ao ambiente de armazenamento pode justificar estes resultados.

Já Bailly *et al.* (1996) estudando o envelhecimento acelerado com semente de girassol a 45°C e 75 e 100% UR durante sete dias, verificou um aumento da atividade da SOD no primeiro dia para as sementes submetidas ao EA, realizado a 75 e 100% de umidade. No entanto, Sung e Jeng (1994), conseguiram um resultado diferente em seu estudo de EA a 45°C e 79% UR por 3, 6 e 9 dias. Foi verificada redução na atividade da SOD tanto no cotilédone quanto no embrião, esta redução na atividade foi justificada pelo aumento da duração do envelhecimento e uma perda da atividade, provavelmente resultante da deterioração induzida pelo envelhecimento. Resultado semelhante foi obtido por Silva *et al.* (2020), em seu estudo de envelhecimento

acelerado a 42°C e 60% UR por 96 horas, onde houve redução na atividade da SOD. Esta alteração pode ter ocorrido devido a degradação e/ou inativação desta enzima, devido a alteração da homeostase celular, evidenciada pela ocorrência do aumento de eletrólitos, justificado em seus resultados.

Suresh *et al.* (2019) em estudo com sementes de *Jatropha curcas* L. sob o envelhecimento natural e o envelhecimento acelerado, verificaram que ao longo do envelhecimento natural de até 12 meses, as sementes exibem uma atividade antioxidante para SOD eficiente, posteriormente essa atividade é reduzida. Durante o envelhecimento acelerado sua melhor atividade só é encontrada no início, obtendo uma redução com o passar do tempo. A maior atividade da SOD é em resposta ao aumento de radicais livres, superóxido. Os autores concluíram que as sementes que passaram por um envelhecimento natural possuem vigor, viabilidade e alta atividade antioxidante. No entanto, o envelhecimento acelerado causa muito mais danos a semente.

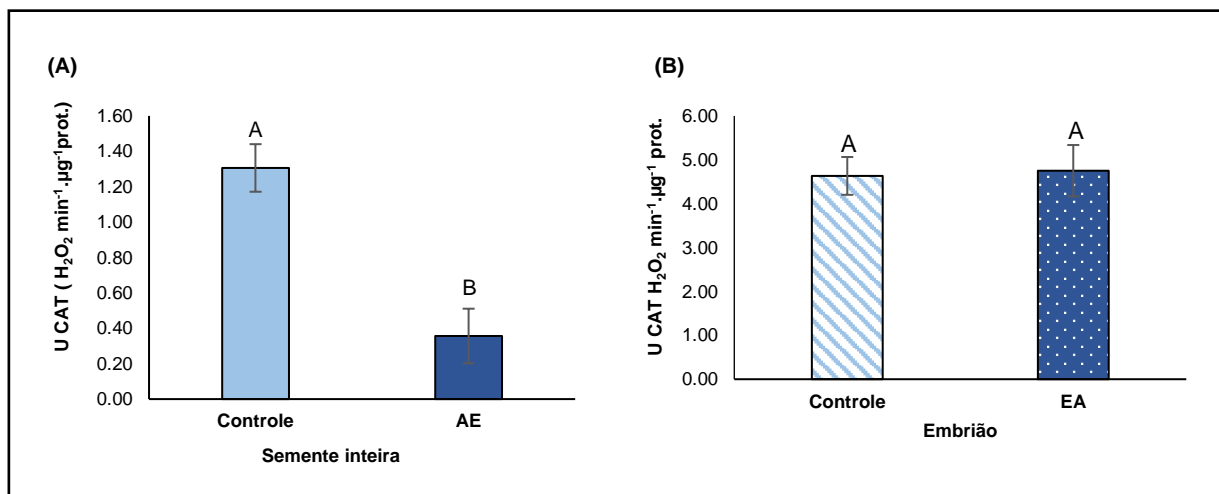
A semente possui seu próprio tempo de deterioração, pois esta começa a envelhecer desde a colheita, antes de ser submetida a um tratamento adicional, para diferentes finalidades. Há uma relação direta entre altas temperaturas e altas umidades, pois as ERO possuem um efeito deletério nas sementes, tanto durante o envelhecimento natural quanto artificial, aumentando a peroxidação lipídica, danos a membrana, comprometimento das enzimas antioxidantes, perda de viabilidade e redução na germinação (GOEL *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2017; SURESH *et al.*, 2019).

3.3.9.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

Após a atuação da SOD no sistema antioxidante e a produção de H₂O₂ outras enzimas começam a atuar na decomposição do peróxido de hidrogênio, dentre as enzimas que possuem esta capacidade está a CAT, que catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular. A CAT é uma enzima abundante em células, onde atua continuamente nas moléculas de peróxido de hidrogênio, presente nos peroxissomos, cloroplasto e mitocôndria. Esta é altamente eficiente, capaz de degradar milhões de moléculas de peróxido de hidrogênio em um segundo (GÓTH *et al.*, 2004; VENKATESWARLU *et al.*, 2012; IGHODARO e AKINLOYE, 2018).

A catalase apresentou uma redução significativa na sua atividade na semente inteira quando submetida ao EA (Figura 25 – A). No entanto, a atividade do embrião foi mais alta do que na semente inteira, apesar de não haver uma diferença significativa entre o controle e as sementes submetidas ao EA (Figura 25 - B).

Figura 25 – Atividade da Catalase ($\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.



Letras iguais maiúsculas entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

O resultado da atividade da CAT pode ser devido a atuação de outras enzimas antioxidantes, que são capazes de decompor o peróxido de hidrogênio, a exemplo da ascorbato peroxidase (APX), que depende diretamente das enzimas do ciclo do ascorbato/glutationa. Há também outras enzimas que possuem a capacidade de decompor o H_2O_2 , a exemplo da glutathione peroxidase (GPX). E a glutathione S-transferase (GST) além de atuar na redução da toxicidade de xenobiótico, pode atuar também como peroxidase nas células (VENKATESWARLU *et al.*, 2012; JESUS, 2016; IGHODARO e AKINLOYE, 2018).

KAPILAN e THIAGARAJAH (2015) em estudo de envelhecimento acelerado com sementes de girassol durante oito dias a 40°C e 100% UR, verificou a redução significativa da germinação ao longo do tempo de envelhecimento. Além de obter um resultado com tendência decrescente para a atividade das enzimas CAT e APX com o período de envelhecimento, houve a redução da germinação. As maiores atividades enzimáticas foram obtidas nos estágios iniciais de envelhecimento na tentativa de reduzir os efeitos danosos nas sementes. Gordin *et al.* (2015) avaliaram o envelhecimento acelerado (realizado a 41 e 45°C , 100% UR durante 24, 48, 72 e 92 h de envelhecimento) com sementes niger, semente oleaginosa utilizada na produção

de biocombustível. Avaliaram diferentes lotes de sementes, produzidas em anos diferentes, lote 1 (2009/2010), lote 2, 3, 4 e 5 (2011/2012) e lote 6 (2012/2013). As sementes que tiveram vigor mesmo depois do envelhecimento foram as do lote 6. Isso indica que sementes que possuem o envelhecimento natural e mais antigas, quando expostas ao EA, tornam-se mais sensíveis a exposição e perdem o vigor. E acabam sendo incapazes de promover a reparação dos danos, perdendo a capacidade de germinar.

Já Kibinza *et al.* (2011) em seu estudo de envelhecimento a 35°C com sementes de girassol e submissão dessas sementes a um efeito primer, verificaram que o vigor das sementes e a expressão de catalase reduziram em virtude do acúmulo de ERO e a indução do estresse oxidativo nas sementes. Concluíram que há o desequilíbrio entre as ERO e a defesa antioxidante, de forma que a catalase não é detectada em sementes envelhecidas. A idade das sementes usadas no estudo (2004) pode influenciar na resposta ao envelhecimento, já que foram submetidas a um estudo de envelhecimento acelerado e primer em 2011. Estas sementes ao ser expostas ao EA não tinham mais mecanismos para suportar o EA, que causou danos drásticos, a exemplo da não expressão da CAT, que pode ser justificado pela degradação devido a indução do envelhecimento e a oxidação nas sementes.

Já o estudo de Goel e Sheoran (2003) sobre envelhecimento natural de sementes de algodão durante dezoito meses com avaliações trimestrais, verificou que as sementes perderam a qualidade com o tempo, devido ao envelhecimento natural das sementes. Sendo verificado uma redução na atividade da CAT em virtude dos danos causado pelas ERO, o envelhecimento foi capaz de causar a deterioração das proteínas.

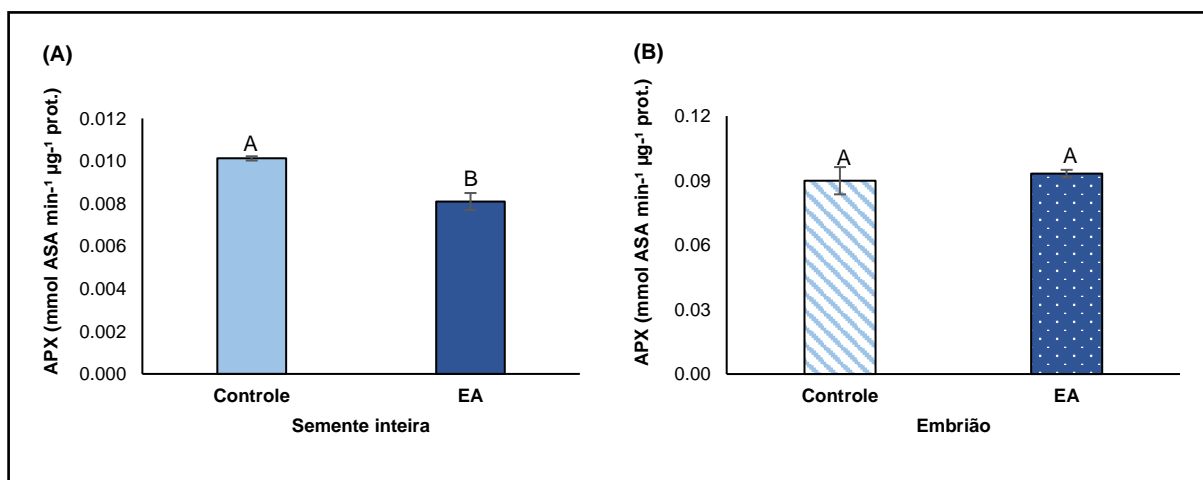
Segundo estudos de Marcos filho (2005) e Demirkaya *et al.* (2010), durante o processo de deterioração das sementes, ocorre o decréscimo da atividade da CAT, justificado pela inativação progressiva ou redução e paralização na sua síntese. E a redução geral na atividade da CAT na semente diminui a capacidade respiratória, reduzindo o fornecimento de energia (ATP) e assimilados para a germinação da semente (SCANDALIOS, 2005; ATAÍDE *et al.*, 2012). No entanto, acredita-se que a atividade significativamente reduzida da CAT neste estudo na condição EA pode ser em virtude de uma menor atuação da CAT na semente, já que existem outras enzimas que são capazes de decompor o peróxido de hidrogênio. A redução da atividade da CAT pode ser em virtude aos efeitos deletérios das ERO acontecendo uma baixa

expressão ou inativação da mesma (MARQUES, 2012; OLIVEIRA, 2013; JESUS, 2016).

3.3.9.3 Enzimas do ciclo do ascorbato-glutationa

A ascorbato peroxidase faz parte das enzimas do ciclo da ascorbato peroxidase, está possui a capacidade de reduzir o peróxido de hidrogênio em paralelo ao funcionamento de outras enzimas do ciclo. Neste estudo, houve uma redução significativa na atividade da APX nas sementes inteiras submetidas ao EA (Figura 26-A). No entanto, não há alteração significativa na atividade desta enzima no embrião, (Figura 26 - B) após o EA. Provavelmente esse resultado pode ser justificado também pela presença de outras enzimas capazes de decompor o peróxido de hidrogênio ou pode ser pelo conjunto de ações das demais enzimas do ciclo do ascorbato-glutationa no sob o efeito do EA.

Figura 26 – Atividade da ascorbato peroxidase ($\text{mmol ASA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.



Letras iguais maiúsculas entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

De Castro (2013) em seu estudo com sementes oleaginosas de girassol e cártamo, submetidas ao envelhecimento acelerado durante nove dias, com análises de três em três dias, submetidas a 45°C e 100% UR. Verificou em seus resultados que o processo de envelhecimento demonstrou estar intimamente relacionado à atuação do sistema antioxidante enzimático, pois alterou significativamente o sistema antioxidante entre ele a atividade da APX, nas sementes de girassol o envelhecimento inibiu parcialmente a atividade da APX. Isso também foi observado no estudo de CAO

et al. (2019) no envelhecimento acelerado a 40°C e 100% UR, com análises durante 3, 6 e 9 dias em sementes de arroz. Verificaram em seus resultados que o envelhecimento aumentou a peroxidação lipídica e a atividade das enzimas antioxidantes analisadas reduziu drasticamente (SOD, CAT, APX, POX). Este estudo demonstrou que o envelhecimento artificial agravou a deterioração das sementes. Já nas sementes de cártamo a atividade da APX foi maior nas sementes envelhecidas, provavelmente, um mecanismo complementar para regular o conteúdo intracelular de H₂O₂ na depleção do sistema da CAT pelo envelhecimento, e quando o envelhecimento inibiu a atividade da CAT houve um aumento da atividade da APX.

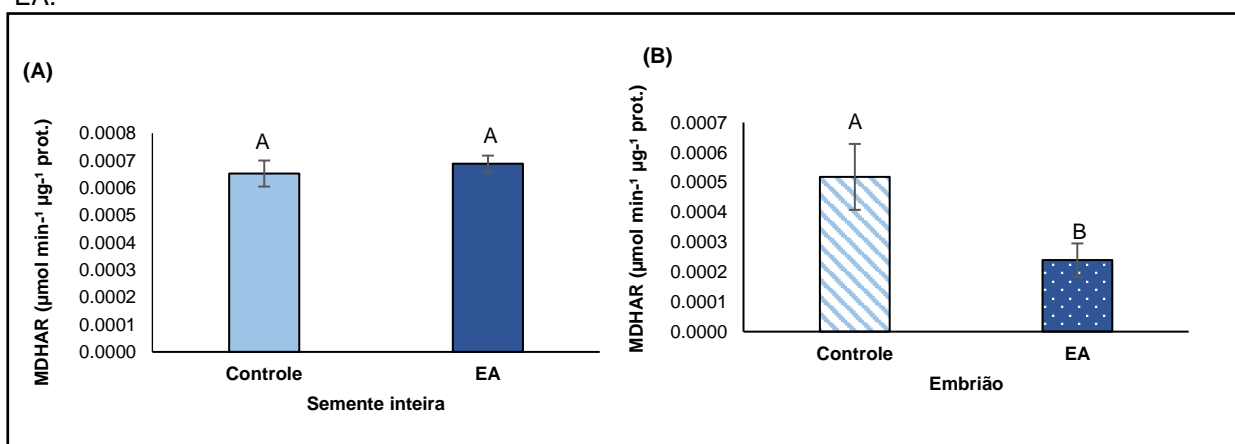
Goel *et al.* (2003) avaliaram sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.) sob envelhecimento acelerado a 40°C e 100% UR com avaliações com 24, 48, 72 e 96 horas de envelhecimento, verificou a redução nas atividades das enzimas antioxidantes incluído a APX, acompanhado da redução da germinação e aumento da peroxidação lipídica e condutividade elétrica, indicando uma perda de vigor e viabilidade. Tian *et al.* (2008) ao analisar sementes de *Glycine max* L. sob envelhecimento acelerado a 40°C e 100% UR, durante vinte dias e avaliação de cinco em cinco dias, verificaram uma redução no vigor e viabilidade da semente e paralelo com a redução da atividade das enzimas antioxidantes, entre elas a APX, em virtude do aumento das ERO e aumento da taxa de respiração das sementes, ocorrendo posterior morte celular.

Segundo o estudo de Aragão (2007) utilizou dois cultivares de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), denominadas Pitiúba e Pérola para analisar envelhecimento acelerado a 45 °C e 99% de umidade relativa, durante o período de 72 h, coletando as sementes diariamente. Houve um decréscimo significativo na atividade total da CAT em sementes e Pérola envelhecidas artificialmente, enquanto, em sementes de Pitiúba, a atividade da catalase durante o tratamento manteve-se próximo ao nível do controle. Interessantemente, a atividade total da APX decresceu significativamente em sementes de Pitiúba acompanhando a curva do decréscimo de sua atividade em sementes de Pérola. Até as 72 h de tratamento, não houve efeito perceptível sobre a percentagem de germinação na cultivar Pitiúba, como também não houve resultados significativos no vazamento de eletrólitos, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas. Por outro lado, o tratamento de envelhecimento artificial induziu uma queda

drástica no percentual de germinação, um aumento significativo na condutividade elétrica, na peroxidação de lipídios e na oxidação de proteínas em sementes de Pérola submetidas ao envelhecimento. Quanto a cultivar Pitiúba, os resultados demonstram a habilidade das sementes em reparar melhor o dano causado em membranas celulares, além das sementes desta, provavelmente possuir outros mecanismos de reparo ou suporte ao processo de envelhecimento, impedindo assim a sua deterioração. Estes dados corroboram com os resultados aqui apresentado.

A Monodehidroascorbato redutase faz parte do ciclo do ascorbato/glutationa. O monodehidroascorbato formado a partir da catálise da APX pode ser regenerado a ascorbato pela ação da MDHAR e o consumo $\text{NADPH} + \text{H}^+$ ou espontaneamente convertido à dehidroascorbato (GILL e TUTEJA, 2010; VENKATESWARLU *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2017; ROQUE, 2018). A MDHAR não apresentou alteração significativa nas sementes inteiras, mesmo depois de ser submetida ao EA (Figura 26 – A). No entanto, a atividade da MDHAR no embrião apresentou uma redução significativa, provavelmente na semente inteira a redução significativa na atividade da APX influenciou diretamente na atividade da MDHAR, pela quantidade de produto disponível para a atividade da MDHAR (Figura 27 – B). No entanto, a redução na atividade desta enzima no embrião provavelmente deve ser em relação as enzimas do ciclo do AsA-GSSG, provavelmente a atuação da DHAR outra enzima do ciclo.

Figura 27– Atividade da Monodehidroascorbato redutase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot.}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.

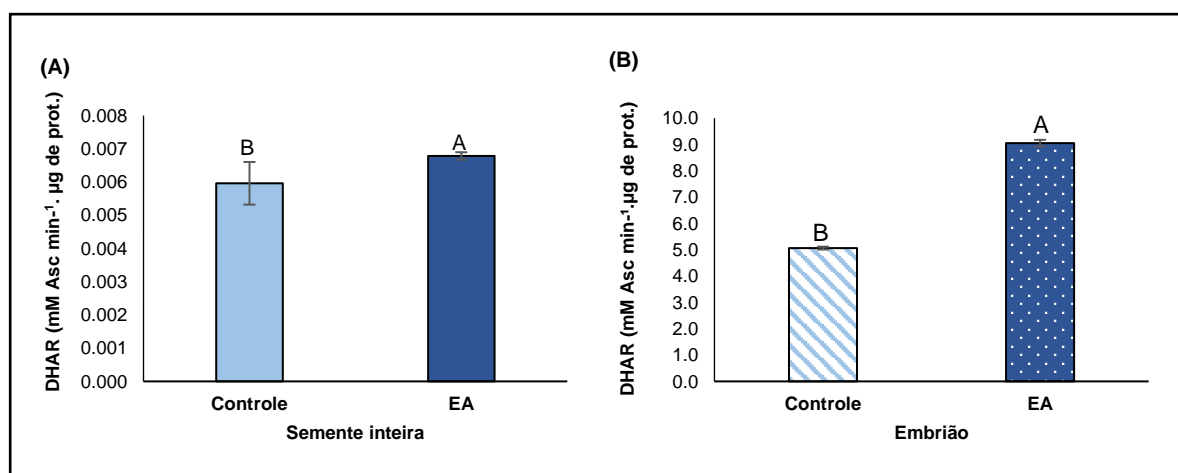


Letras iguais maiúsculas entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Outra maneira de regenerar o ascorbato é a redução de dehidroascorbato (DHA), catalisada pela Dehidroascorbato redutase (DHAR), com o consumo de

moléculas de glutationa (GSSG). A atividade da DHAR tem um aumento significativo tanto nas amostras de semente inteira quanto nas de embrião (Figura 28, A - B). O resultado no aumento da atividade da DHAR na amostra de embrião após o EA justificaria o resultado da atividade da MDHAR (Figura 28 B), pois a DHAR iria atuar na produção de AsA.

Figura 28 – Atividade da Dehidroascorbato redutase ($\text{mM GSSG min}^{-1} \cdot \mu\text{g de prot.}^{-1}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.



Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Bailly *et al.* (1998) em seu estudo de envelhecimento acelerado com sementes de girassol (*Helianthus annuus* L.) 45°C e 100% UR durante cinco dias e posterior efeito de osmoprímio, o efeito do envelhecimento resultou na redução da germinação e aumento de MDA, associado a redução da atividade da CAT e GR, sendo que a atividade da SOD e DHAR foram as menos alteradas, sendo que a APX não foi detectada. E após o efeito de osmoprímio por sete dias para total restauração do mecanismo de desintoxicação da célula, mudou fortemente o efeito de envelhecimento da célula, ocorrendo alteração na atividade enzimática e mostrando a relação entre energia, germinação e a eficiência do sistema antioxidante, de forma que deixa claro a importância da defesa antioxidante no vigor das sementes.

Yin *et al.* (2014) analisou envelhecimento acelerado de sementes de arroz durante 1, 9 e 17 meses a 50±1°C, verificando que o envelhecimento altera drasticamente as sementes e reduz a germinação significativamente. Ao determinar a atividade das enzimas antioxidantes, os níveis de atividade de SOD, GR e DHAR em embriões de arroz envelhecidos não mudaram significativamente. No entanto, os

níveis da atividade de CAT, APX e MDHAR no embrião das sementes de arroz envelhecidas reduziram significativamente. O aumento da quantidade ERO e seu acúmulo nas sementes de arroz envelhecidas implica que o EA diminuiu a eficiência do mecanismo de eliminação das ERO. A APX usa o AsA reduzido como doador de elétrons para a redução do peróxido de hidrogênio. O AsA é oxidado a um DHA, este possui vida curta e é instável, por isso pode ser reduzido pelo MDHAR, nas sementes de arroz o envelhecimento afetou a regeneração de AsA.

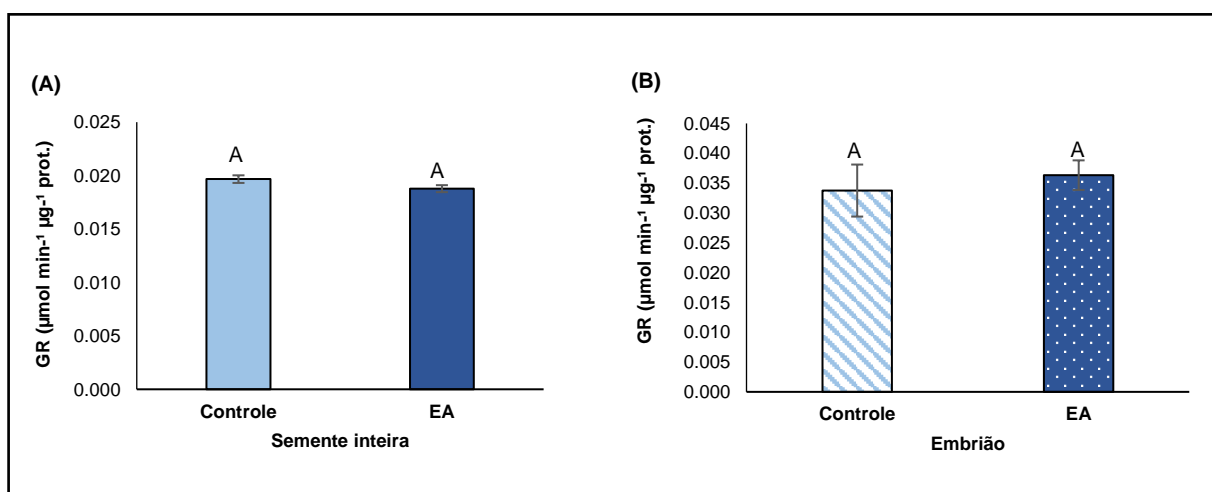
No presente estudo, provavelmente o envelhecimento afetou a atividade da MDHAR no embrião (Figura 27 – B), mas a redução do AsA foi suprida pela DHAR e a oxidação GSH (Figura 28 - B). De acordo com a “teoria dos radicais livres e envelhecimento”, as ERO desempenham um papel muito importante na progressão do envelhecimento e vários fatores relacionado aos efeitos do envelhecimento. A “homeostase redox” é regularizada pelos antioxidantes não enzimáticos e enzimáticos, normalmente as sementes são capazes de equilibrar a geração e a eliminação de ERO durante a germinação, por isso, há uma alta correlação entre a viabilidade das sementes e o nível de atividade do sistema antioxidante. Além disso, sugere-se que o envelhecimento artificial aumenta a toxicidade, os efeitos do estresse oxidativo, levando a mais alterações fisiológicas (CORTE *et al.*, 2010; SILVA e FERRARI, 2011).

Nigam *et al.* (2019) em estudo de envelhecimento acelerado a 40°C e 100% UR durante nove dias com sementes de tomate verificou que o vigor das sementes reduziu com o tempo, em paralelo os danos oxidativos aumentaram, dentre eles a peroxidação lipídica, degradação do DNA. Ocorreu a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes e o teor de proteínas solúveis, devido ao aumento da oxidação de proteínas e perda de propriedades funcionais. A redução significativa se deu para a SOD, CAT, APX, DHAR, MDHAR. O envelhecimento inicia inúmeras alterações morfológicas, bioquímicas e fisiológicas em tomateiro, envolvendo uma diminuição da germinação, comprimento da parte aérea e raiz, peso seco e atividade das enzimas antioxidantes, ocorrendo um aumento da peroxidação lipídica e acúmulo de produtos tóxicos semente. Como resultado deste processo há inativação de enzimas ou degradação de proteínas, desestruturação do sistema de membranas celulares, perda de integridade da molécula de DNA e em danos no mecanismo de reparo celular.

A manutenção do sistema enzimático é importante para remover ou reduzir a ação das ERO que causam danos e afetam negativamente o potencial da semente. Há enzimas que agem diretamente na remoção das ERO, no entanto, há outras que agem conjuntamente com outras enzimas, a exemplo da glutatona redutase, esta não age diretamente na remoção de espécies reativas de oxigênio, porém possuem um papel importante na regeneração da glutatona à sua forma reduzida (GSH), na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida ($\text{NADPH} + \text{H}^+$), possuindo como objetivo de impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona, dando suporte as enzimas GST e GPX (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001; VENKATESWARLU *et al.*, 2012;

A atividade da GR nas sementes inteiras e embrião, mesmo após o EA não apresentaram alteração significativa na sua atividade (Figura 29, A – B). A atividade da GR possui como principal função impedir a paralisação do ciclo metabólico da glutatona. A atividade da GR influencia diretamente a atividade da GST e GPX. A resistências de muitas células em relação a ERO está correlacionada com elevados níveis intracelulares de GSH, a GPX utiliza a glutatona peroxidase utiliza a GSH como agente redutor para decompor o peróxido de hidrogênio em água (PEREIRA, 2010).

Figura 29 – Atividade da Glutationa redutase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.



Letras iguais maiúsculas entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Bailly *et al.*, (1997) em estudo de envelhecimento acelerado com sementes de girassol a 45°C e 100% UR por cinco dias, verificou redução do vigor das sementes em paralelo a um aumento na peroxidação lipídica. A atividade da SOD foi afetada

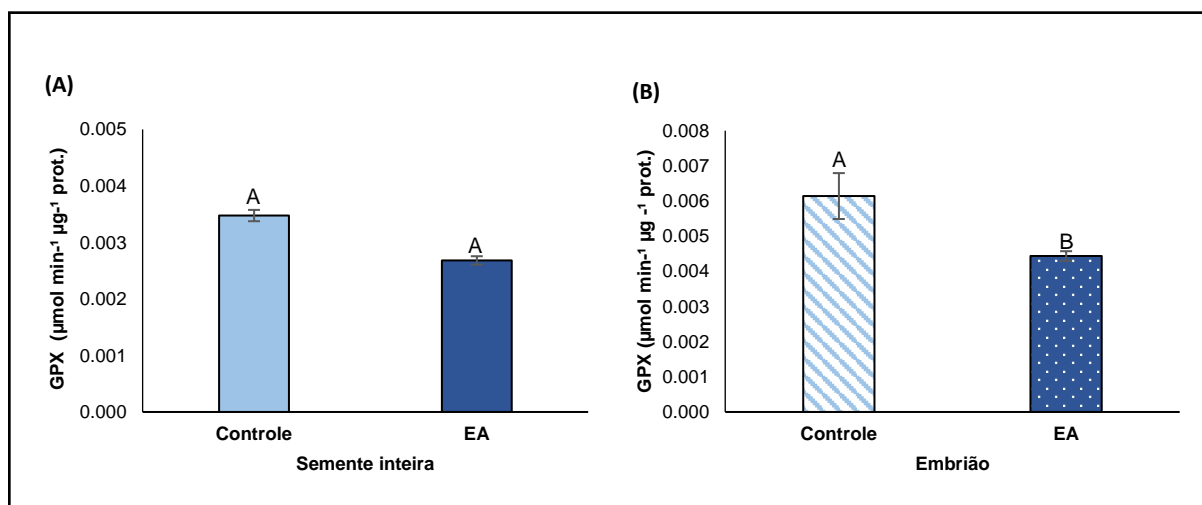
acentuadamente pelo tratamento de envelhecimento, a CAT teve uma redução na sua atividade em virtude do envelhecimento juntamente com a GR. E a redução na atividade da GR foi associada a uma diminuição significativa no conteúdo de glutathiona.

Já Nigam *et al.* (2019) quando promoveu envelhecimento acelerado a 40°C e 100% UR durante nove dias em sementes de tomate, não verificou diferença significativa na atividade da GR. Isso também foi verificado por Yin *et al.* (2014) ao induzir envelhecimento artificial de sementes de arroz (*Oryza sativa* L.) a 50°C com avaliações com um, nove e dezessete meses. Ocorreu a redução da germinação e perda de vigor, com a redução significativa na atividade da CAT, APX e MDHAR, no entanto, não houve alteração significativa na atividade da SOD, GR, DHAR. Sugeriram que a capacidade do arroz em decompor o H₂O₂ reduz com o tempo, em virtude da redução da atividade da CAT e APX. E a redução de MDHAR afetou a regeneração de AsA e conseqüentemente afetou a atividade da APX. Além dos resultados obtidos revelarem uma redução na atividade do ciclo da ascorbato-glutathiona e causar o acúmulo de ERO, a DHAR e GR desempenharam papéis importantes na regeneração de GSH. A DHAR reduz o DHA a AsA, usando o GSH como redutor e GR transforma GSSG em GSH.

3.3.9.4 Glutathiona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9)

A glutathiona peroxidase é capaz de reduzir o peróxido de hidrogênio a água, através da oxidação da GSH, esta enzima é encontrada apenas citoplasma e mitocôndria (RAJJOU e DEBEAUJON, 2008; BHABAK e MUGESH, 2010; VENKATESWARLU *et al.*, 2012). A atividade da GPX na semente inteira não apresentou diferença significativa na condição controle e após EA (Figura 30 – A). No entanto, a atividade no embrião apresentou uma redução significativa após o EA (Figura 30 – B). Essa redução significativa pode ser em relação a quantidade de peróxido de hidrogênio e/ ou a disponibilidade de GSH após a submissão ao EA. Além disso, apesar da GR não apresentar diferença significativa em nenhuma das duas condições de análise, do que auxiliaria na disponibilidade de GSH. Ao se analisar a atividade da DHAR, esta apresentou um aumento significativo na atividade do embrião e esta enzima, também utiliza o GSH para produzir AsA (Figura 25 - B).

Figura 30 – Atividade da Glutaciona peroxidase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot.}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.



Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Carta *et al.* (2018) promoveu o envelhecimento em sementes *Ranunculus baudotii* e analisaram a resposta antioxidante das sementes sob efeito da umidade, temperatura e oxigênio na longevidade das sementes, a fim de avaliar a persistência da semente no solo. Foi realizada a avaliação da atividade da GPX, e verificaram que o peróxido de hidrogênio e oxigênio não foram significativamente associados a atividade da GPX, enquanto a umidade explicava significativamente a variação na atividade da GPX. Essa enzima atuou nas condições de maior umidade e foi encontrado um aumento desta enzima com o tempo de envelhecimento. No entanto, a atuação por se só da GPX na viabilidade das sementes não foi clara, pois seu aumento pode ter sido em virtude simplesmente de uma indicação de estresse.

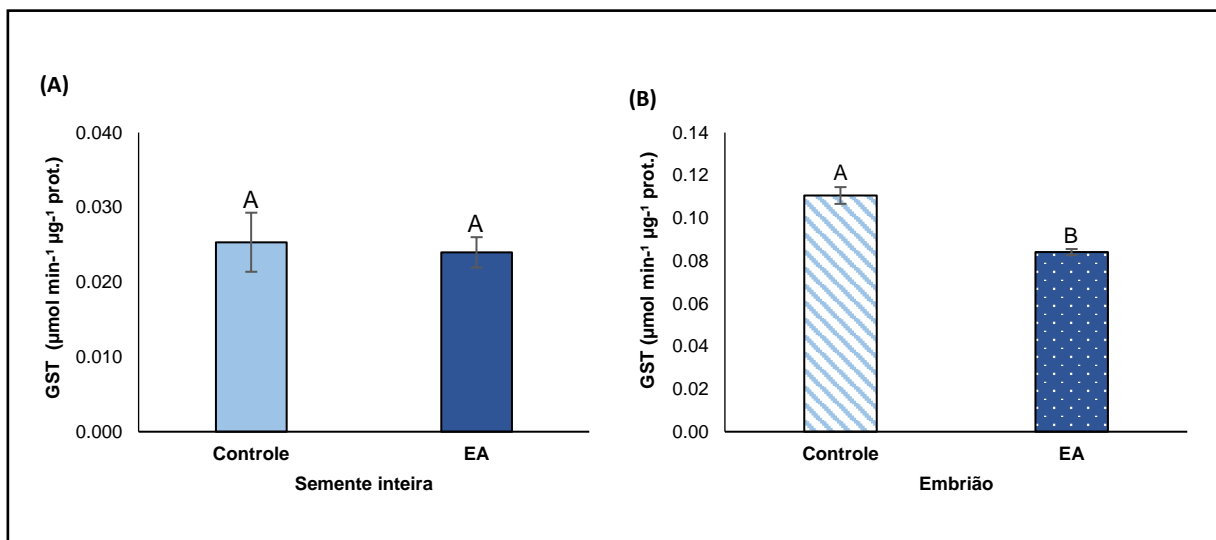
Já Burguieres *et al.* (2017) realizam estudo com sementes de ervilha (*Pisum sativum*) visando avaliação do efeito da vitamina C na resposta do vigor das sementes e atividade antioxidante. Verificaram o aumento da GPX, SOD e CAT em resposta ao tratamento com vitamina C e ácido fólico, em paralelo foi encontrado um aumento no conteúdo fenólico da atividade antioxidante à base de DPPH. Esse estudo sustenta a hipótese que a via da pentose fosfato correlacionada com a prolina estimula a síntese fenólica e a atividade antioxidante para a eliminação de ERO. Além disso, essa estimulação da via da pentose fosfato ligada à prolina em resposta ao ácido fólico e à vitamina C também foram correlacionados à resposta da enzima antioxidante indicada pela estimulação da atividade GPX, SOD e CAT. Este estudo indicou o aprimoramento

da resposta do vigor das sementes por ácido fólico e vitamina C, refletido nas respostas agrônômicas e bioquímicas, e isso ocorreu através da estimulação da resposta antioxidante ligada ao teor de fenólicos, que provavelmente é modulada positivamente pela pentose fosfato ligado à prolina.

3.3.9.5 Glutathione S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)

A atividade da glutathione S-transferase, não apresentou diferença significativa entre amostras de sementes inteiras após o EA (Figura 31 – A) e o controle. No entanto, nas amostras de embrião houve uma redução significativa na atividade após o EA (Figura 31 – B). Muito semelhante ao que aconteceu com a GPX. A GPX, juntamente com a GST merecem uma atenção especial, uma vez que ambas dependem da manutenção do ciclo redox da glutathione, por meio do controle da relação entre glutathione reduzida (GSH) e oxidada (GSSG).

Figura 31 – Atividade da Glutathione S-transferase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) na cultivar BRS 188 Paraguaçu em semente inteira sem tegumento (A) e em embrião (B) nas condições controle e após EA.



Letras iguais maiúsculas entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

A atividade da GST é baseada na capacidade desta enzima em promover a associação de glutathione (GSH) com metabólitos potencialmente tóxicos a célula, tais como xenobióticos e produtos endógenos causadores de danos oxidativos, como radicais hidroxila citotóxicos, peróxidos de lipídios de membrana e produtos de degradação oxidativa do DNA, visando sua desintoxicação, tornando estes mais

solúveis e facilitando a sua excreção. Além disso, a GST pode atuar como peroxidase (CATANEO *et al.*, 2003; VENKATESWARLU *et al.*, 2012).

YIN *et al.* (2017) avaliou o envelhecimento de sementes de arroz (*Oryza sativa*), verificando a redução significativa na atividade da GST em paralelo com a redução do vigor e um declínio na viabilidade das sementes, sendo verificado uma redução nos antioxidantes em virtude do estresse oxidativo. Considerando os resultados anteriores obtidas no presente estudo, principalmente DHAR, GR, GPX, provavelmente a redução significativa desta atividade está relacionada a oxidação de GSH e redução de GSSG, já que são importantes principalmente para atividade da GPX e GST. Torres *et al.* (1997) em estudo sobre alterações induzidas pelo envelhecimento no sistema glutathiona de sementes de girassol, verificou que o envelhecimento induz uma lenta conversão de GSH em GSSG, causando uma variação nas proporções relativas destes compostos e tornando os tecidos mais sensíveis aos danos oxidativos.

Os tióis estão entre os compostos celulares que são inicialmente afetados pelo estresse oxidativo em geral, devido a susceptibilidade do seu grupo sulfidrílico à oxidação. O principal tiol não proteico na maioria das espécies de plantas é o GSH, o principal produto da oxidação do GSH é o dissulfeto GSSG que é produzido, principalmente através da troca de tiol-dissulfeto com proteínas, mas também por uma variedade de oxidantes, o GSSG pode voltar a GSH pela ação da GR e oxidação do NADPH. Nas células sem ação do estresse, a glutathiona está presente principalmente como GSH, no entanto, com o estresse oxidativo o estado redox da glutathiona pode mudar para o um estado mais oxidativo, devido ao aumento da oxidação da GSH (SMITH *et al.* 1990; RIC DE VOS *et al.*, 1994; TORRES *et al.*, 1997).

3.3.10 Correlação entre as enzimas antioxidantes

Os dados das atividades das enzimas antioxidantes foram correlacionados, usando o coeficiente de correlação de Pearson (r), correlação forte, positiva e direta ($r = 1$). E correlação forte, negativa e inversamente proporcional ($r = -1$) (GALARÇA *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2006). Ao correlacionar os dados das enzimas antioxidantes em todas as condições testadas (controle, após envelhecimento acelerado, semente inteira e embrião) verificou-se diferenças de resposta e correlação em função de cada enzima.

No geral a SOD, GR, CAT e GST apresentaram correlação forte e positiva, já as enzimas GPX, APX e DHAR tiveram correlação forte e negativa quando comparadas as outras enzimas. A GST teve uma correlação forte, positiva e direta com SOD e GR, e uma correlação forte, negativa e inversamente proporcional com a GPX. A MDHAR teve uma correlação forte, positiva e direta com a SOD e GR, e uma correlação forte, negativa e inversamente proporcional com GPX, APX e DHAR. A SOD apresentou correlação forte, positiva e direta com a GR e correlação forte, negativa e inversamente proporcional com GPX, APX e DHAR. A GR apresentou apenas correlação forte, negativa e inversamente proporcional GPX, APX e DHAR. A CAT apresentou apenas correlação forte, positiva e direta com SOD e GR. A GPX teve correlação forte, positiva e direta com CAT e correlação forte, negativa e inversamente proporcional com APX e DHAR. A APX apresentou apenas correlação forte, positiva e direta com DHAR. E a DHAR apresentou apenas correlação forte, positiva e direta com GST (Tabela 9).

Tabela 9 – Correlação de Pearson entre os dados das enzimas antioxidantes da cultivar BRS 188 Paraguaçu. Glutationa S-transferase (GST), Monodehidro ascorbato redutase (MDHAR), Superóxido dismutase (SOD), Glutationa redutase (GR), Catalase (CAT), Glutationa peroxidase (GPX), Ascorbato peroxidase (APX), Dehidroascorbato redutase (DHAR).

	GST	MDHAR	SOD	GR	CAT	GPX	APX	DHAR
GST	1	0.23110	0.64138	0.63060	0.34815	-0.67030	-0.34501	-0.08532
MDHAR	0.46988	1	0.88861	0.86967	-0.37488	-0.83943	-0.98540	-0.98910
SOD	0.02458	0.00011	1	0.99223	-0.05354	-0.98836	-0.91791	-0.81289
GR	0.02792	0.00024	2.19E-06	1	0.050518	-0.99827	-0.88367	-0.79509
CAT	0.26744	0.22987	0.86874	0.87610	1	-0.09576	0.41322	0.43691
GPX	0.01706	0.00064	1.65E-05	1.20E-09	0.76719	1	0.85781	0.75811
APX	0.27206	0.00005	2.55E-01	0.000138	0.18183	0.00036	1	0.95695
DHAR	0.79205	0.00001	0.00131	0.001994	0.15556	0.00427	0,001083	1

A SOD é considerada como linha de frente na defesa antioxidante, pois esta enzima é capaz de realiza a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio, seguida da CAT que é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, assim como a GST, que também pode atuar como peroxidase, decompondo o peróxido de hidrogênio. Já a GR age na oxidação do NADPH + H⁺, disponibilizando um elétron para reduzir a glutathione oxidada, para que a GST possa usar a glutathione reduzida como substrato para realizar sua atividade (HASANUZZAMAN *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2012; GALLÉ *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019). A APX é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio em água, com a ajuda das enzimas do ciclo do ascorbato-

glutathione, a DHAR é uma enzima importante neste ciclo, pois atua na produção de ascorbato que será usado como substrato pela APX e na oxidação de glutathione, substrato que será usado pela GPX, que atua também na decomposição do peróxido de hidrogênio em água (GUPTA *et al.*, 2010; HASANUZZAMAN *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2012; ROHMAN *et al.*, 2019).

4. CONCLUSÃO

A realização da caracterização inicial das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu, através da morfometria, massa de mil sementes, teste de germinação, umidade das sementes, viabilidade do lote pelo teste tetrazólio, condutividade elétrica e pH do exsudado de sementes. É importante para avaliar a qualidade das sementes e identificar que trabalhar com as sementes com tegumento e com a remoção da carúncula é a condição ideal e que apresenta melhores resultados. Além de poder utilizar essas informações para avaliar o vigor das sementes antes e após o envelhecimento.

Para a cultivar BRS 188 Paraguaçu, o melhor tempo para o teste de deterioração controlada das sementes é o período de dez dias a 45°C e 85 UR%, por se tratar de um tempo capaz de reduzir o vigor da semente, mas não gerar danos suficientes para causar morte celular.

As sementes de Paraguaçu apresentam alta germinação após o EA, não ocorrendo redução significativa nos parâmetros de germinação (Gmax, AAC, T50). Apenas na uniformidade das sementes (U8416) há uma redução significativa quando submetidas ao EA. Além disso, o EA promove redução significativa na quantidade de plântulas normais formadas, aumento de produção de plântulas anormais, deterioradas, redução da biometria e massa seca das plântulas normais, acarretando na redução do vigor das sementes.

A condutividade elétrica nas sementes aumenta significativamente com o aumento do tempo de embebição, independentemente da idade das sementes, sendo que o EA promove aumento de eletrólitos no exsudado e conseqüentemente da condutividade elétrica. O envelhecimento acelerado das sementes testado neste estudo (dez dias a 45°C e 85 UR%) não promove dano suficiente para ocorrer perda

de constituintes capazes de alterar o pH do exsudado. Entretanto, há redução em 50% da viabilidade das sementes

O EA é um excelente método para análise do metabolismo de sementes em processo de envelhecimento ou envelhecidas, considerando que pelo RNA-seq é possível avaliar a transcrição de cerca de 494 sequências que foram expressas, e dentre eles há sequências relacionadas a processos do metabolismo energético celulares.

Através da análise metabolômica é possível realizar a avaliação de diferentes metabólitos primários e secundários e auxiliar na identificação de metabólitos essenciais em resposta ao estresse sofrido pelas sementes durante o EA. Nas sementes de Paraguaçu submetidas ao EA há aumento relativo de compostos do metabolismo de lipídeos e carboidratos, como ácido glioxílico, xilose e sorbitol. Dentre os metabólitos primários, pela técnica utilizada é possível avaliar a presença de inositol, ribitol, melibiose, galactinol e sacarose. Há diferença significativa quanto aos metabólitos secundários identificados pela metabolômica quando se compara o embrião do tegumento em condições normais de embebição e após o EA.

As amostras dos embriões e tegumentos apresentaram diferença significativa quanto aos metabólitos secundários presentes nos tecidos, o tegumento por ser um componente externo de proteção para a semente está sujeito aos maiores danos devidos as alterações do ambiente, o que explica a diferença nos metabólitos entre os tecidos analisados.

A grande parte dos genes identificados após o EA estão relacionados a respiração aeróbica, justificado pela Fase I da etapa da embebição, onde ocorre um acentuado aumento na intensidade respiratória, potencializado pela temperatura e os danos oxidativos ocasionados. Há também três genes diferencialmente inibidos pelo EA, relacionados a fatores de transcrição e a síntese de proteínas de ligação de centrômero/ microtúbulo. Conseqüentemente a divisão celular passa a ser afetada, assim como, a síntese de proteínas que irão auxiliar na transcrição, justificando assim, alteração das características fisiológicas, em específico o observado em relação ao aumento da quantidade de sementes que após o envelhecimento deram origem a plântulas anormais deformadas e deterioradas.

As amostras analisadas com sementes inteiras apresentaram uma redução significativa no resultado de MDA após a submissão das sementes ao EA. As enzimas que apresentaram diferença significativa após o EA foi a SOD que apresentou um aumento significativo juntamente com a DHAR. E a CAT e APX tiveram uma redução significativa.

Nas amostras com apenas embrião existe diferença significativa apenas no resultado de algumas enzimas, a SOD e a DHAR apresentam um aumento significativo. E a MDHAR, GPX e GST apresentam redução significativo após o EA.

Dentre as enzimas analisadas é possível identificar como melhores biomarcadores bioquímicos de envelhecimento acelerado a SOD e DHAR para avaliação em semente inteira e embrião.

As sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu, mesmo após o EA apresenta viabilidade, no entanto, o envelhecimento pode promover uma perda de vigor nas sementes, alterando o metabolismo e principalmente o energético, causando alterações bioquímicas como desestruturação do sistema de membrana, alteração enzimática, alteração na quantidade e qualidade das plântulas normais, aumento de plântulas deterioradas. A perda da viabilidade é decorrente de mudanças químicas e estruturais irreversíveis dos constituintes celulares em resposta a esse estresse.

5. REFERÊNCIAS

- ABBA, E.J.; LOVATO, A. Effect of seed storage temperature and relative humidity on maize (*Zea mays* L.) seed viability and vigour. **Seed Science Technology**, v.27, p.101–114, 1999.
- ABDELNUR, P. V. Metabolômica e Espectrometria de Massas. **Circular Técnica Embrapa**, v. 10, 2011.
- ABREU, E. F. M. **Clonagem e estudo da expressão do Gene da mio-inositol 3-fosfato, sintase (MIPS) em maracujazeiro (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*)**. 2006, 43 f. Dissertação apresentada ao Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, 2006.
- ABREU, L. A. S.; CARVALHO, M. L. M.; GOMES PINTO, C. A.; KATAOKA, V. Y.; SILVA, T. T. A. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 240-247, 2013.
- AGUIAR, Nathália Oliveira. Perfil metabólico de cana-de-açúcar tratada com bioinoculante à base de substâncias húmicas e bactérias diazotrófica endofíticas. 2015, 134f. Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Federal do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2015.
- ALFENAS, A. C. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos. 2ª Ed. Viçosa: Ed.UFV, 2006.
- ALMEIDA, M.V.; SILVA, A.D.; SOUZA, M.V.N.; BENÍCIO, A.A.A. A cascata de sinalização dos fosfoinositídeos. **Química Nova**, v. 26, p. 105-111, 2003.
- AMARAL, A. S; PESKE, S. T. Testes para avaliação rápida da qualidade fisiológica de sementes de trigo. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 6, n. 1, p. 12-15, 2000.
- AOSA - ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. Seed vigor testing handbook. Eastasing, p. 88, 1983.
- AQUINO, N. F.; AJALA, M. C.; DRANSKI, J. A.; IGNÁCIO, V. L.; MALAVASI, M. M.; MALAVASI, U. C. Morfometria de sementes de *Jatopha curcas* L. em função da procedência. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 8, n. 2, p. 142-145, 2009.
- ARAGÃO, Theresa Christine Filgueiras Russo. **Danos oxidativos e o envelhecimento de sementes de feijão caupi**. 2007, 144f. Tese apresentada ao programa de Pós- Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.
- ARALDI, C. G.; COELHO, C. M. M. pH do Exsudato na Avaliação da Viabilidade de Sementes de *Araucaria angustifólia*. **Floresta e Ambiente**, n. 22, v.3, p. 426-433, 2015.
- ARAÚJO NETO, J. C. A.; TEXEIRA, J. D.; NEVES, M. I. R. S.; MELO, L. D. F.A.; FERREIRA, V. M. Morphometric characterization, germination and conservation of triplaris Brasiliana cham. Seeds (*polygonaceae*). **Ciência Florestal**, v. 28, n. 3, p. 949-959, 2018.

ARAUJO, F. A.; BARH, D.; SILVA, A.; GUIMARÃES, L.; THIAGO, R.; RAMOS, J. GO FEAT: a rapid web-based functional annotation tool for genomic and transcriptomic data. **Scientific REPOrTS**, v. 8, p.1-4, 2018.

ARAUJO, Maicon Marinho Vieira. **Indicadores de qualidade em grãos de soja submetidos a diferentes condições de armazenamento**. 2014, 84 f. Dissertação apresentada à faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2014.

ASIEDU, E.A.; POWELL, A.A. Comparisons of storage potential of cultivar of cowpea (*Vigna unguiculata*) differing in seed coat pigmentation. **Seed Science and Technology**, v. 26, n.1, p. 211-221, 1998.

ATAÍDE, G. da M.; FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogyne nitens* Tull. durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa agropecuária tropical**, v. 42, n. 1, p. 71-76, 2012.

ATTREE, R.; DU, B.; XU, B. Distribution of phenolic compounds in seed coat and cotyledon, and their contribution to antioxidant capacities of red and black seed coat peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 448–456, 2015.

AZEVEDO, M. R. Q. A.; GOUVEIA, J. P.G.; TROVÃO, D. M. D. M; QUEIROGA, V. P. Influência das embalagens e condições de armazenamento no vigor de sementes de gergelim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.7, n.3, p.519-524, 2003.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, n. 02, p. 93-107, 2004.

BAILLY, C. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. **Biochemical Journal**, v. 476, p. 3019–3032, 2019.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; COME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia plantarum**, v. 97, p.104-110, 1996.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; COME, D. Changes in Superoxide Dismutase, Catalase and Glutathione Reductase Activities in Sunflower Seeds during Accelerated Ageing and Subsequent Priming. **Basic and Applied Aspects of Seed Biology**, p. 665-672, 1997.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 104, 646-652, 1998.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **C RBiol**, v. 331, p. 806–814, 2008.

BARBOSA, R. D. **Socoró (*Mouriri guianensis* Aubl.): germinação, desenvolvimento da plântula e classificação das sementes para fins de armazenamento.** 2020, 56f. Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Agricultura no Trópico Úmido, Manaus, 2020.

BARROS NETO, J.J.S.; ALMEIDA, F. A. C.; QUEIROGA, V. de P.; GONÇALVES, C. C. Sementes estudos tecnológicos. [recurso eletrônico]: estudos tecnológicos / Aracaju: IFS, 2014. 285 p. Formato: e-book, ISBN 978-85-68801-58-1.

BARROS, Tiago Texeira Viana. **Osmocondicionamento e tolerância ao estresse térmico na germinação de sementes de girassol.** 2017, 55f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2017.

BATISTA, D.; CAMPOS, P.; SILVA, V. R.; SANTOS, L. de S.; BEZERRA, D. P.; SOARES, M. B. P.; COLEPICOLA, P.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; PINTO, E.; ARAÚJO, F. M.; MARTINS, D.; FERNANDEZ, L. G.; LIGTERINK, W.; CANUTO, G. A. B.; DE CERQUEIRA, M. D.; RIBEIRO, P. R. Piper anisum as a promising new source of bioactive metabolites. **Chemical Papers**, v. 74, p. 1505-1515, 2020.

BEAUCHAMP, C. O; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Biochemical Journal**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BELTRÃO, N. E. DE M.; SOUZA, J. G.; SANTOS, J. W.; COSTA, F. X.; LUCENA, A. M. A.; QUEIROZ, U. C. Modificações na bioquímica da planta da mamoneira, cultivar BRS 188 Paraguaçu, submetida ao estresse hídrico (deficiência e excesso). **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, v.7, n.1, p.653-658, 2003.

BELTRÃO, N. E. M.; MELO, F.B.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S. Mamona: Árvore do Conhecimento e Sistemas de Produção para o Semi-árido Brasileiro. Campina Grande, PB: MAPA, 2003. 19 p.

BERGMEYER, N. Methoden der enzymatischen analyse. **Akademie Verlag**, v. 1, p. 636-647, 1970.

BERNAL-LUGO, I.; LEOPOLD, A. C. Seed stability during storage: raffinose content and seed glassy state, **Seed Science Research**, v. 5, 75-80, 1995.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. 2nd ed. New York: Plenum Press, 1994. 445p.

BEZERRA, F. T. C.; ANDRADE, L. A.; BEZERRA, M. A. F.; PEREIRA, W. E.; FABRICANTE, J. R.; OLIVEIRA, L. S. B.; FEITOSA, R. C. Biometry of fruits and seeds and pre-germination treatments in *Cassia grandis* L. f. (Fabaceae), **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, p. 2863-2876, 2012.

BHABAK, K. P.; MUGESH, G. Functional Mimics of Glutathione Peroxidase: Bioinspired Synthetic Antioxidants. **Accounts of chemical research**, v. 43, n. 11, p. 1408-1419, 2010.

BITTENCOURT, S.R.M.; VIEIRA, R.D. Temperatura e período de exposição de sementes de milho no teste de envelhecimento acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.3, p.61-168, 2006.

BOOMINATHAN, P.; SHUKLA, R.; KUMAR, A.; MANNA, D.; NEGI, D.; VERMA, P. K.; CHATTOPADHYAY. Long Term Transcript Accumulation during the Development of Dehydration Adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiology*, v. 135, p. 1608–1620, 2004.

BORGES, E.E.L.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B.; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Ed.). *Sementes florestais tropicais*. Brasília: ABRATES, p.83-136, 1993.

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

BRAGA JÚNIOR, J. M. **Maturação, qualidade fisiológica e testes de vigor em sementes de mamona**. 2009, 138 f. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.

BRAGA JUNIOR, J. M.; ROCHA, M. S.; BRUNO, R. L. A.; VIANA, JEANDSON, S. V.; BELTRÃO, N. E. M. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de mamona cultivar BRS – Energia. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 4, n. 1, p. 88-101, 2011.

BRASIL. Regras para análise de sementes. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.

BRAZ, M. R., BARROS, C. S.; CASTRO, F. P.; ROSSETTO, C. A. V. Testes de envelhecimento acelerado e deterioração controlada na avaliação do vigor de aquênios de girassol. **Ciência Rural**, v.38, n.7, p.1857-1863, 2008.

BRUNETTI, C.; GEORGE, R. M.; TATTINI, M.; FIELD, K.; DAVEY, M. P. Metabolomics in plant environmental physiology. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 13, p. 4011-4020, 2013.

BUCKERIDGE, M. D.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. 2004. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (eds.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre, Artmed, p. 151.

BUCKERIDGE, M. S.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A.; AIDAR, M. P. M.. (2004) Mobilização de Reservas. In: **Germinação**. Do básico ao aplicado. Alfredo Gui Ferreira & Fabian Borgheti (Eds.). Artmed, Porto Alegre pp.163-185.

BURGUIERES, E.; MCCUE, P.; KWON, Y.; SHETTY, K. Effect of vitamin C and folic acid on seed vigour response and phenolic-linked antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1393–1404, 2007.

CABRERA, A. C.; PESKE, S. T. Testes do pH do exsudato para sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p.134-140, 2002.

CALLEGARI, Carina Marin. **Hidrólise de oligossacarídeo de raffinose, presente em produtos de soja, por α -galactosidases**. 2003, 104f. Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2003.

CANUTO, G. A. B.; COSTA, J. L.; CRUZA, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIIO, A. T.; KLASSENC, A.; RODRIGUESA, K. T.; TAVARESA, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CARDOSO, R. B.; BINOTTI, F. F. S.; CARDOSO, E. D. Potencial fisiológico de sementes de crambe em função de embalagens e armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.3, p.272-278, 2012.

CARNEIRO, M. M. L. C.; DEUNER, S.; OLIVEIRA, P. V.; TEIXEIRA, S. B.; SOUSA, C. P.; BACARIN, M. A.; MORAES, D. M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.754-763, 2011.

CARTA, A.; BOTTEGA, S.; SPANÒ. Aerobic environment ensures viability and antioxidant capacity when seeds are wet with negative effect when moist: implications for persistence in the soil. **Seed Science Research**, v. 28, n. 1, p. 16-23, 2018.

CARVALHO, J. E. U.; NAZARÉ, R. F. R.; OLIVEIRA, W. M. Características físicas e físico-químicas de um tipo de bacuri (*Platonia insignis* M.) com rendimento industrial superior. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 25, p. 326-328, 2003.

CARVALHO, M. T. V.; PONGRAC, P.; MUMM, R.; ARKEL, J. V.; AELST, A. V.; JEROMEL, L.; VAVPETI, PELICON, P.; Aarts, M. G. M. *Gomphrena claussenii*, a novel metal-hypertolerant bioindicator species, sequesters cadmium, but not zinc, in vacuolar oxalate crystals. **New Phytologist**, v. 208, p. 763–775, 2015.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4 ed. Jaboticabal: Funep, p. 588, 2000.

CASTILLO, E. M.; De Lumen, B. O.; REYES, P. S.; De LUMEN, H. Z. Raffinose Synthase and Galactinol Synthase in Developing Seeds and Leaves of Legumes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 2, 1990.

CATANEO, A. C.; DÉSTRO, G. F. G; FERREIRA, L. C.; CHAMMA, K. L.; SOUSA, D. C. F. Atividade de glutathione S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 307-312, 2003.

CAVARIANI, C.; TOLEDO, M. Z.; RODELLA, R. A.; FRANÇA NETO, J. B.; NAKAGAWA, J. Velocidade de hidratação em função de características do tegumento de sementes de soja de diferentes cultivares e localidades. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p.030-039, 2009.

CAVERZAN, C.; ASASSOLA, A.; BRAMMER, S. P. Antioxidant responses of wheat plants under stress. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n.1, p.1-6, 2016.

CHAN, S. Y.; LASSIM, M. B. M. Effect of accelerated aging on mungbean (*Vigna Radiata* L. Wilczek) seed vigour. **International Journal of Agricultural Policy and Research**, v.7, n. 5, p. 114-123, 2019.

CHAVES, L. G.; CABRAL, P. C. P.; JUNIOR, G. B.; LACERDA, R. D. Efeito de zinco e cobre no estado nutricional da mamoneira, BRS 188 Paraguaçu. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 4; p. 129-135, 2009.

COIMBRA, R. A.; TOMAZ, C. A.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Teste de germinação com acondicionamento dos rolos de papel em Sacos plásticos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n.1, p. 92-97, 2007.

COOPER, T. G.; BEEVERS, H. Mitochondria and glyoxysomes from castor bean endosperm. Enzyme constituents and catalytic capacity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 3507–3513, 1969.

COOPER, T.G.; BEEVERS, H. β -oxidation in glyoxysomes from castor bean endosperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 244, p. 3514–20, 1969.

CORREA, G. C.; NAVES, R. V.; ROCHA, M. R. CHAVES, L. J. BORGES, J. D. Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* Vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* Rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), visando melhoramento genético. **Bioscience Journal**, v.24, n.4, p.42-47, 2008.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. DE L.; GONÇALVES, J.F. de C.; SILVA, M. S. Alterations in the lipid and soluble sugar content of melanoxylon brauna seeds during natural and accelerated ageing. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 3 p. 152-162, 2010.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; LEITE, H. G.; PEREIRA, B. L. C.; GONÇALVES, J. F. C. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n.1 p.83-91, 2010.

COSTA, H.; GALLEGOS, S. M.; TOMARO, M. L. Effect of UV-B radiation on antioxidant defense system in sunflower cotyledons. **Plant Science**, v. 162, p. 939-945, 2002.

DAVID, A. M. S. de S.; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F.; DIAS, D. C. F. dos S.; NOBRE, D. A. C.; NETA, I. C. S. Envelhecimento acelerado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Ricinus communis* L. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.8, n.4, p.517-521, 2013.

De CASTRO, Érika Cristina Pinheiro. **Coordenação dos sistemas antioxidantes da catalase e da ascorbato peroxidase durante o envelhecimento acelerado de sementes de cártamo e girassol**. 2013, 82f. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2013.

DE CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (Org.). Germinação, do básico ao aplicado. Ed: Porto Alegre: Artmed, 2004, capítulo 9, v.1, p.149-162.

DE JESUS, Paulo Roberto Ribeiro. **Biochemical, physiological and molecular responses of *Ricinus communis* seeds and seedlings to different temperatures: a multi-omics approach.** 2015, 186f. Tese apresentada a Universidade de Wageningen, Wageningen, 2015.

DE OLIVEIRA, Carolina Maria Gaspar. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de Mamoneira (*Ricinus communis* L.) Pelo teste de tetrazólio.** 2007, 113 f. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp, Campus de Botucatu, 2007.

DE SOUZA, Simone Cayres. **Análise das alterações metabólicas de *Canavalia ensiformis* durante germinação e desenvolvimento pós-germinativo em resposta a insulina e compostos relacionados.** 2010, 87 f. Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2010.

DELOUCHE, J. C. An accelerated aging technique for predicting relative storability of crimson clover and tall fescue seed lots. **Agronomy Abstracts**, v. 40, n.1, p. 40, 1965.

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

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. O teste de tetrazólio para viabilidade da semente. **AGIPLAN**, p. 103, 1976.

DEMIRKAYA, M.; DIETZ, K. J.; SIVRITEPE, H. O. Changes in antioxidant enzymes during aging of onion seeds. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 38, n. 1, p. 49-52, 2010.

DEY, P. M.; DIXON, R. A. Biochemistry of storage carbohydrates in green plants. **New York: Academic Press**, p. 53-129, 1985.

DOIJODE, S. D. Solute leakage in relation to loss of seed viability in chilli cultivars. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 31, p. 285 - 287, 1988.

DOMERGUE, J-B; ABADIE, C.; LIMAMI, A.; WAY, D.; TCHERKEZ, G. Seed quality and carbon primary metabolism. **Plant Cell Environ**, v. 42, p 2776–2788, 2019.

DOS SANTOS, H. O.; DE CARVALHO, M. L. M.; CALDEIRA, C. M.; COELHO, S. V. B.; VON PINHO, E. V. de R.; OLIVEIRA, J. A. Physiological and biochemical aspects of castor beans seeds deterioration stored in different packaging conditions and temperatures. **Journal of Seed Science**, v.38 n.3, p.241-247, 2016.

Drotar, A., Phelps, P., and Fall, R. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. **Plant Science**, v. 42, p. 35—40, 1985.

DRUMOND, A. A. L.; SALES, J. de F.; ZUCHI, J.; RESENDE, O.; CAMELO, G. N.; SOUZA, M. M. V. Physiological quality of castor bean seed genotypes stored at two temperatures. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 42, p. 1-10, 2020.

DUNN, W. B.; ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 285-294, 2005.

EASTMOND, P. J. Glycerol-insensitive Arabidopsis mutants: gli1 seedlings lack glycerol kinase, accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress. **The Plant Journal**, v. 37, p. 617–25, 2004.

ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. **Plant Biology**, v. 16, p. 1–8, 2014.

FAGUNDES, M.; CAMARGOS, M. G.; COSTA, F. V. A qualidade do solo afeta a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas de *Dimorphandra mollis* Benth. (*Leguminosae: Mimosoideae*). **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 4, p. 908-915, 2011.

FANAN, S.; MEDINA, P. F.; CAMARGO, M. B. P.; RAMOS, N. P. Influência da colheita e do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 31, n. 1, p. 150-159, 2009.

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

FERREIRA, D.F. Sistema de análises de variância para dados balanceados. Lavras: UFLA, 2000. (SISVAR 4. 1. – pacote computacional).

FOGAÇA, C. A. **Padronização e adequação de metodologias para avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. - caesalpinaceae**. 2000. 95 f. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2000.

FOGAÇA, J. J. N. L.; SILVA, R. A.; SANTOS, J. S.; NUNES, R. T. C.; FERREIRA, L. L.; MORAIS, O. M. Physiological quality of Creole castor seeds var. Carrapatinho depending on the raceme position. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n.1, p. 87-93, 2017.

FONSECA, S. C. L.; PEREZ, S. C. J. G. A. Ação do polietileno glicol na germinação de sementes de *Adenanthera pavonina* L. e o uso de poliaminas na atenuação do estresse hídrico sob diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 25, n.1, p. 1-6, 2003.

FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de soja, EMBRAPA-CNPSo, 1984. 39 p. (Circular Técnico, 9).

FRANÇA NETO, J. B.; KRYZANOWSKI, F. C.; SILVA, W. R. Tecnologia da produção de sementes de soja de alta qualidade. EMBRAPA, CNPSo, 12 p. (Circular técnica 40). Brasília, DF: Abrates, 2005. p. 1-24.

FU, Y-B.; AHMED, Z.; DIEDERICHSEN, A. Towards a better monitoring of seed ageing under ex situ seed conservation. **Conservation Physiology**, v. 3, p. 1-16, 2015.

GALARÇA, S. P.; LIMA, C. S. M.; SILVEIRA, G.; RUFATO, A. de R. Correlação de pearson e análise de trilha identificando variáveis para caracterizar porta-enxerto de *Pyrus communis* L.. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 860-869, 2010.

GALINDO, **Carlos Afonso Magalhães**. **Absorção de água, germinação e dormência de sementes de *Mucuna preta***. 2006, 97f. Dissertação apresentada a Pós-graduação em Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

GARLET, J.; SOUZA, G. F.; DELAZERI, P. Teste de tetrazólio em sementes de *Cassia leptophylla*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 11, n. 21, p.1800-1808, 2015.

GARZA-CALIGARIS, L. E.; AVENDAÑO-VÁZQUEZ, A. O.; ALVARADO-LÓPEZ, S.; ZÚÑIGA-SÁNCHEZ, A.; OROZCO-SEGOVIA, A.; PÉREZ-RUIZ, R. V.; GAMBOA-DEBUEN, A. At3g08030 transcript: a molecular marker of seed ageing. **Annals of Botany**, v. 110, p. 1253–1260, 2012.

GASPAR DE OLIVEIRA, C. M. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) pelo teste de tetrazólio**. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrônômicas da Unesp - Campus de Botucatu, São Paulo, 2007.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de Mamoneira (*Ricinus communis* L.) Pelo teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1, p. 186-196, 2010.

GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Précondicionamento das sementes de mamoneira para o teste de tetrazólio. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 303-311, 2011.

GASPAR-OLIVEIRA, C.; MARTINS, C.; NAKAGAWA, J. Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p.160-167, 2009.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GIDROL, X.; SERGHINI, H.; NOUBHANI, A.; MOCQUOT, B.; MAZLIAK, P. Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds, I, Lipid peroxidation and membrane damage. **Plant Physiology**, v. 76, p.591-597, 1989.

GILL, S. S. & TUTEJA, N. Reactive species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.48, p. 909-930, 2010.

GOEL, A.; GOEL, A. K.; SHEORAN, I. S. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **Journal of plant physiology**, v. 160, p. 1093-1100, 2003.

GOEL, A.; SHEORAN, I. S. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. **Biologia Plantarum**, v. 46, n. 3, p. 429-439, 2003.

GOMES NETO, Valdir. **Atividade de superóxido dismutase em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) sob restrição hídrica**. 2016, 114f. Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular PMBqBM, Universidade Federal da Bahia, 2016.

GOMES, Keiver Bruno Paradelo. **Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Terminalia argentea* Mart. et Zucc. pelos testes de raios x, condutividade elétrica, ph do exsudato e germinação**. 2013, 88f. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Florestais, 2013.

GORDIN, C. R.; SCALON, S. P. Q.; MASETTO, T. E. Accelerated aging test in niger seeds. **Journal of Seed Science**, v.37, n.3, p.234-240, 2015.

GÓTH, L.; RASS, P.; PÁY. A. Catalase enzyme mutations and their association with diseases. **Molecular Diagnostics**, v.8, p. 141–149, 2004.

GRAHAM, I. A.; Seed Storage Oil Mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 115-142, 2008.

GREGGIO, E. A.; BONINI, E. A. Qualidade do grão de soja relacionada com o teor de acidez do óleo. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v.7, n.3, p. 645-658, 2014.

GU, J.; HOU, D.; LI, Y.; CHAO, H.; ZHANG, K.; WANG, H.; XIANG, J.; RABOANATAHIRY, N.; WANG, B.; LI, M. Integration of proteomic and genomic signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 806–814, 2008.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. **New Phytologist**, v. 169, p. 453-468, 2006.

HASANUZZAMAN, M. HOSSAIN, M. A. SILVA, J. A. T. S. FUJITA, M. Plant Response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In: VENKATESWARLU, B; SHANKER, A. K.; SHAKER, C.; MAHESWARI, M. Crop stress and its management: perspectives and strategies. New York: Springer; 2012. p. 261-301.

HE, H.; WILLEMS, L.; BATUSHANSKY, A.; FAIT, A.; HANSON, J.; NIJVEEN, H.; HILHORST, H. W. M.; BENTSINK, L. Effects of Parental Temperature and Nitrate on Seed Performance are Reflected by Partly Overlapping Genetic and Metabolic Pathways. **Plant Cell Physiol**, v. 57, n. 3, p. 473-487, 2016.

HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.

HEPBURN, H. A.; POWELL, A. A.; MATTHEWS, S. Problems associated with the routine application of electrical conductivity measurements of individual seeds in the

germination testing of peas and soybeans. **Seed Science and Technology**, v. 12, n. 2, p. 403-413, 1984.

HIPPMAN, H.; HEINZ, E. Glycerol kinase in leaves. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, v. 79, n. 5, p. 408-418, 1976.

HÖFS, A.; SCHUCH, L. O. B.; PESKE, S. T.; BARROS, A. C. S. A. Emergência e crescimento de plântulas de arroz em resposta à qualidade fisiológica de sementes. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n.1, p.92-97, 2004.

HUANG, A. H. C. Enzymes of glycerol metabolism in the storage tissues of fatty HUI, Y. H. (1996). Bailey's industrial oil and fat products. (5 th ed.). New York: Wiley, 1996, 603-654p

HUTH, Caroline. **Lignina no tegumento de semente de soja: Deterioração por umidade de dano mecânico e tamanho de amostra para o teste de tetrazólio**. 2015, 96f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, p. 287–293, 2018.

Instrução Normativa MAPA 45/2013 para mamona. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/publicacoes-sementes-e-mudas/copy_of_INN45de17desetembrode2013.pdf. Acesso em 09 de março 2021.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf: ISTA, 2004. p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50.

JALEEL, C.A.; MANIVANNAN, P.; SANKAR, B.; KISHOREKUMAR, A.; GOPI, R. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B. Biointerfaces**, v. 60, n. 1, p. 110-116, 2007.

JENG, T. L.; SUNG, J. M. Hydration effect on lipid peroxidation and peroxide scavenging enzymes activity of artificially aged peanut seed. **Seed Science and Technology**, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1994.

JESUS FILHO, H. P. **Caracterização de genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) para potencial utilização do farelo na alimentação animal**. 2014, 95 f. Dissertação, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

JESUS, **Thamires Soares Ricardo**. **Marcadores fisiológicos e bioquímicos da qualidade de sementes de *Ricinus communis* L. submetidas a diferentes condições de armazenamento**. 2016, 143 f. Dissertação apresentada ao programa Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular PMBqBM/UFBA, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

JIANG, W.; MIDDLETON, K.; YOON, H. J.; FOUQUET, C.; CARBON, J. An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 8, p. 4884-4893, 1993.

JING, Y.; LANG, S.; WANG, D.; XUE, H.; WANG, X-F. Functional characterization of galactinol synthase and raffinose synthase in desiccation tolerance acquisition in developing *Arabidopsis* seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 230, p.109-121, 2018.

JOOSEN, R. V. L.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A. J.; LIGTERINK, W.; PLAS, L. H. W. V. P.; HILHORST, H. W. M. Germinator: a software package for highthroughput scoring and curve fitting of arabidopsis seed germination. **The Plant Journal**, Malden, v.62, p. 148-159, 2010.

JOSÉ, S. C. B. R.; PINHO, É. V. R. V.; DIAS, M. A. G. S. Açúcares e tolerância à alta temperatura de secagem em sementes de Milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 2, p.60-68, 2006.

JOSÉ, S. C. B. R.; SALOMÃO, A. N.; COSTA, T. S. A.; SILVA, J. T. T. T.; CURI, C. C. S.; Armazenamento de sementes de girassol em temperaturas subzero: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 4 p. 29 - 38, 2010.

JUNIOR BRAGA, J. M.; ROCHA, M. do S.; ALCÂNTARA BRUNO, R. de L.; VIANA, J. S.; BELTRÃO, N. E. de M. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de mamona cultivar BRS – Energia. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 4, n. 1, p. 88-101, 2011.

JUVINO, A. N. K.; RESENDE, O.; COSTA, L. M.; SALES, J. F. Vigor da cultivar BMX Potência RR de soja durante o beneficiamento e períodos de armazenamento, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, v. 18, n. 8, p. 844–850, 2014.

KAPILAN, R.; THIAGARAJAH, M. Effect of Aging on the Germination Characteristics and Enzyme Activity of Sunflower Seeds. **International Journal of Research and Innovations in Earth Science**, v. 2, n. 6, p. 147-150, 2015.

KARNER, U.; PETERBAUER, T.; RABOY, V.; JONES, D. A; HEDLEY, C. L.; RICHTER, A. myo-Inositol and sucrose concentrations affect the accumulation of raffinose Family oligosaccharides in seeds. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 405, p. 1981–1987, 2004.

KIBINZA, S.; BAZINA, J.; BAILLY, C; FARRANT, J. M.; CORBINEAU, F. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. *Plant Science*, v. 181, 309–315, 2011.

Kingsbury, J.; Koshland, D. Centromere Function on Minichromosomes Isolated from Budding Yeast. **Molecular Biology of the Cell**, v. 4, p. 859-870, 1993.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. Cap. 2, p. 124.

KRZYŻANOWSKI, F.C.; WEST, S.H.; FRANÇA NETO, J.B. O teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Informativo Abrates**, v.11, n. 2, p.185, 2001.

KUO, T. M.; DOEHLERT, C. D.; CRAWFORD, C. G. Sugar Metabolism in Germinating Soybean Seeds. **Plant Physiology**, v. 93,1514-1520, 1990.

LABOURIAU, L.G. Germinação das sementes. Washington: OEA, p.174, 1983.

Lahuta, L. B.; Gońrecki, R. J.; Zalewski, K.; Hedley, C. L. Sorbitol accumulation during natural and accelerated ageing of pea (*Pisum sativum* L.) seeds. **Acta Physiol Plant**, v. 29, p. 527–534, 2007.

LEDUC, Simone Nadur Motta. Indução de Tolerância à Dessecação e Variações de Carboidratos Solúveis em Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (Pau-Brasil) durante a Maturação. 2007, 117 f. Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, Biodiversidade vegetal e meio ambiente, na área de Plantas Vasculares em Análises Ambientais, São Paulo, 2007.

LEE, S. E.; SHIN, H-T.; HWANG, H. J.; KIM, J. H. Antioxidant Activity of Extracts from *Alpinia katsumadai* Seed. *Phytother Research*, v. 17, p. 1041-1047, 2003.

LEHNINGER, N. D & COX, M. M. **Princípio de Bioquímica**, 5. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2011.

LI, Y.; XUE, H.; PRITCHARD, H. W.; WANG, X. Changes in the mitochondrial protein profile due to ROS eruption during ageing of elm (*Ulmus pumila* L.) seeds. **Plant Physiology Biochemistry**. v. 114, p. 72-87, 2017.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 1-11, 2001.

LIMA, M. G. S.; MENDES, C. R.; MORAES, D. M.; LOPES, N. F.; RODRIGUES, M. A. V. Caracterização da Qualidade Fisiológica de Sementes de Mamona Cultivar Guarani. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 675-677, 2007.

LIN, E. C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 30, p. 535–78, 1976.

LIN, E. C. Glycerol utilization and its regulation in mammals. **Annual Review of Biochemistry**, v. 46, p. 765–95, 1977.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v.15, n. 550, P.01-21, 2014.

LUZ, Renata Pereira. **Caracterização morfológica, molecular e agrônômica de cultivares de nordestina**. 2012, 94 f. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal De Lavras, 2012.

MA, Z.; BYKOVA, N. V.; IGAMBERDIEV, A. U. Cell signaling mechanisms and metabolic regulation of germination and dormancy in barley seeds. **ScienceDirect**, p.1-19, 2017.

MAIA, Guilherme Augusto. **Ferramenta integrada para anotação de proteínas hipotéticas: estudo de caso utilizando análises proteogenômicas em *Trypanosoma rangeli***. 2019, 79 f. Dissertação submetida ao Programa de Biotecnologia e Biociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

MANGRAUTHIA, S. K.; AGARWAL, S.; SAILAJA, B.; SARLA, N.; VOLETI, S. R. Transcriptome Analysis of *Oryza sativa* (Rice) Seed Germination at High Temperature Shows Dynamics of Genome Expression Associated with Hormones Signalling and Abiotic Stress Pathways. **Springer Science**, p. 01-16, 2016.

MARCOS FILHO, J. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. **FEALQ. Biblioteca de Ciências Agrárias Luiz de Queiroz**, ed.1., p. 495, 2005.

MARCOS FILHO, J. Germinação de sementes. In: CICERO, S.M.; MARCOS FILHO, J.; SILVA, W.R. (Coord.) Atualização em produção de sementes. Campinas: Fundação Cargill, p.11-39, 1986.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. (Ed.). Vigor de sementes: conceitos e testes. Londrina: ABRATES, 1999. cap.3, p.1-24.

MARINI, P. M.; MORAES, C. L.; MARINI, N.; MORAES, D. M.; AMARANTE, L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de arroz submetidas ao estresse térmico. **Revista Ciência Agronômica**, v.43, n.4, p.722-730, 2012.

MARQUES, E. R. **Qualidade fisiológica e sanitária, dormência e atividade enzimática de sementes de cultivares de arroz armazenadas em diferentes ambientes**. 2012, 62 f. Tese - Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.

MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C. Morfologia de frutos, sementes e plântulas e germinação de sementes de *Erythrina variegata* L. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 08-17, 2007.

MATOS, A. C. B.; BORGES, E. E. L.; SILVA, L. J. Fisiologia da germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.). Allemão ex Benth. sob diferentes temperaturas e tempos de exposição. **Revista Árvore**, v.39, n.1, p.115-125, 2015.

MENDES de PAULA, Alyne Dantas. **Vigor relativo: uma nova abordagem para classificação de lotes de sementes**. 2020, 58f. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

MENDES, R. C.; DIAS, D. C. F.; PEREIRA, M. D.; DIAS, L. A. S. Vigor test for the evaluation of the physiology potencial of castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 114-120, 2010.

MENDES, R. de C.; DIAS, D. C. F. dos S.; PEREIRA, M. D.; BERGER, P. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p.187-194, 2009.

MERTZ, L. M.; HENNING, F. A.; CRUZ, H. L.; MENEGHELLO, G. E.; FERRARI, C. S.; ZIMMER, P. D. Diferenças estruturais entre tegumentos de sementes de soja com permeabilidade contrastante. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 23-29, 2009.

MEYER, T.; VIGOUROUX, A.; AUMONT-NICAISE, M.; COMTE, G.; VIAL, L.; LAVIRE, C.; MORÉRA, S. The plant defense signal galactinol is specifically used as a nutrient by the bacterial pathogen *Agrobacterium fabrum*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 21, p. 7930-7941, 2018.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends Plant Science**, v. 7, n. 1, p. 405-410, 2002.

MOÏSE, J. A.; HAN, S.; GUDYNAITE-SAVITCH, L.; JOHNSON, D. A.; MIKICA, B. L. A. Seed coats: Structure, development, composition, and biotechnology. In vitro cellular and developmental biology. **Planty**, v.41, p. 620-644, 2005.

Moraes, Guilherme Moreira. **Influência da linhagem de levedura e das condições de cultivo no processo de isomerização e fermentação e fermentação simultâneas da xilose**. 2013, 102 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2013.

MORAES, J. V. **Morfologia e germinação de sementes de Poecilanthe parviflora Benth.** 2007, 88f. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo, 2007.

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

MOROZESK, M.; BONOMO, M. M.; DUARTE, I. D.; ZANI, L. B.; CORTE, V. B. Longevidade de sementes nativas da Floresta Atlântica. **Floresta Atlântica, Natureza on line**, v. 12, n. 4, p. 185-194, 2014.

MURAKEÖZY, E.O.; SMIRMOFF, N.; NAGY, Z. e TUBA, Z. Seasonal accumulation pattern of Pinitol and other carbohydrates in *Limonium gmelini* subsp. Hungarica. **Journal of Plant Physiology**, v. 159, p. 485-490, 2002.

MURSHED, R.; LOPEZ-LAURI, F.; SALLANON, H. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. *Analytical Biochemistry*, v. 383, p. 320–322, 2008.

NAKADA, P. G.; OLIVEIRA, J. A.; MELO, L. C.; SILVA, A. A.; SILVA, P. A.; PERINA, F. J. Desempenho durante o armazenamento de sementes de pepino submetidas a diferentes métodos de secagem. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 3, p 42-51, 2010.

NAKATO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant & Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NAZARI, R.; PARSA, S.; AFSHARI, R. T.; MAHMOODI, S.; SEYYEDI, S. M.; Salicylic acid priming before and after accelerated aging process increases seedling vigor in aged soybean seed. **Journal of crop improvement**, p. 01-20, 2020.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A. A.; JUSTO, C. F.; DOUSSEAU, S.; VIEIRA, C. V. Comunicação efeito da temperatura e do tegumento na germinação de sementes de *Calophyllum brasiliense*. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1872-1877, 2007.

NIGAMA, M.; MISHRAB, A. P.; SALEHIC, B.; KUMARD, M.; SAHRIFI-RADE, M.; COVIELLOF, E.; IRITIG, M. SHARIFI-RAD, J. Accelerated ageing induces physiological and biochemical changes in tomato seeds involving MAPK pathways. **Scientia Horticulturae**, v. 248, p. 20–28, 2019.

NISHIZAWA, A., YABUTA, Y., SHIGEOKA, S. Galactinol and raffinose constitute a novel function to protect plants from oxidative damage. **Plant Physiology**, 147, 1251–1263, 2008.

NISHIZAWA-YOKOI, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. Galactinol and Raffinose Constitute a Novel Function to Protect Plants from Oxidative Damage. **Plant Physiology**, v.147, p. 1251-1263, 2008.

NISHIZAWA-YOKOI, A.; YABUTA, Y.; SHIGEOKA, S. The contribution of carbohydrates including raffinose Family oligosaccharides and sugar alcohols to protection of plant cells from oxidative damage. *Plant Signaling e Behavior*, v. 3, n. 11, p. 1016-1018, 2008.

OGE, L.; BOURDAIS, G.; BOVE, J.; COLLET, B.; GODIN, B.; GRANIER, F.; BOUTIN, J. P.; JOB, D.; JULLIEN, M.; GRAPPIN, P. Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.20, n. 11, p. 3022 - 3037, 2008.

OGE, L.; BOURDAIS, G.; BOVE, J.; COLLET, B.; GODIN, B.; GRANIER, F.; BOUTIN, J. P.; JOB, D.; JULLIEN, M.; GRAPPIN, P. Protein repair L-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, v.20, n. 11, p. 3022 - 3037, 2008.

OLIVEIRA, G. L. **Alteração fisiológica de enzimáticas em sementes de *Jatropha curcas* durante o armazenamento**. 2013, 59 f. Tese – Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

OLIVEIRA, M. **Efeitos da umidade, do tempo e de sistemas de armazenamento sobre parâmetros de qualidade e propriedades tecnológicas dos grãos e do óleo de soja**. 2011. 131 f. Tese - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B. Formação do porta-enxerto Trifoliata: época de semeadura e tegumento na emergência de plântulas. **Revista Ciência Rural**, v.37, n.1, p.281-283, 2007.

OLIVEIRA, R. P.; SCIVITTARO, W. B.; RADMANN, E. B. Escarificação química da semente para favorecer a emergência e o crescimento do porta-enxerto Trifoliata. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.9, p.1429-1433, 2006.

OMAR, S. A.; ELSHEERY, N. I.; KALAJI, H. M.; XU, ZENG-FU; SONG-QUAN, S. CARPERNTIER, R. LEE, C. H.; ALLAKHVERDIEVS, S. I. Dehydroascorbate Reductase and Glutathione Reductase Play an Important Role in Scavenging Hydrogen Peroxide during Natural and Artificial Dehydration of *Jatropha curcas* Seeds. **Journal plant biology**, v.55, p. 469-480, 2012.

ONAHUE, J. L.; OKPODU, C.M.; CRAMER, C. L.; GRABAU, E. A.; ALSCHER, R. G. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (Relationships to resistance). **Plant Physiology**, v.113, p. 249–257, 1997.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PANOBIANCO, M.; MARCOS FILHO, J.; Envelhecimento acelerado e deterioração controlada em sementes de tomate. **Scientia Agricola**, v. 58, n.3, p.525-531, 2001.

PEREIRA, Érika Patrícia Lima. **Marcadores bioquímicos da atividade Antioxidante em sementes de amburana cearenses (Fr. Allemão) A. C. Smith submetidas a estresse hídrico**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

PEREIRA, M. D.; MARTINS FILHO, S.; LAVIOLA, B. G. Envelhecimento acelerado de sementes de pinhão-mansão. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 119-123, 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n.4: p. 146-152, 2012.

PESKE, S.T. & AMARAL, A.S. pH of seed exudate as a rapid physiological quality test. **Seed Science and Technology**, v.22, n 3, p.641-644, 1994.

PETER J. EASTMOND, P. J.; GRAHAM, I. A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. **Trends in Plant Science**, v. 6, n. 2, p. 72-77, 2001.

PHANEENDRANATH, B.R. Influence of amount of water in the paper towel on standard germination tests. **Journal of Seed Technology**, v. 5, n. 2, p. 82-87, 1980.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; PEIXOTO, M. C. Tecnologia de sementes: Testes de qualidade. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. Germinação – do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 265-282.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; SANTOS, N. R. F. Teste de tetrazólio. In: PIÑARODRIGUES, F. C. M. (Coord.). Manual de análise de sementes florestais. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p. 91 - 100.

PINHO, S. Z.; CARVALHO, L. R.; DELACHIAVE, M. E. A. Limit between stages I and II of a seed imbibition curve. **Scientia Agricola**, v.61, n.1, p.17-20, 2004.

PROSBA-BIACZYK, U.; SZAJSNER, H.; GRZYS, E.; DEMCZUK, A.; SACALA, E.; BAK, K. Effect of seed stimulation on germination and sugar beet yield, **International Agrophysics**, v. 27, p. 195-201, 2013.

PUBCHEM, 1,2-Ethanedithiol (Compound). Disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2-Ethanedithiol#section=Melting-Point. Acesso em 16 de dezembro de 2022.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E.; KALEMBA, E. Non-reducing sugar levels in beech (*Fagus sylvatica*) seeds as related to withstanding desiccation and storage. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 13, p. 1381-1390, 2009.

RAJJOU, L.; DEBEAUJON, I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 796–805, 2008.

RAMOS, K. M. O; MATOS, J. M. M.; MARTINS, R. C. C.; MARTINS, I. S. Electrical conductivity testing as applied to the assessment of freshly. **International Scholarly Research Network**, p. 01-05, 2012.

RECH, E. G., VILLELA, F. A., TILLMANN, M. A. Avaliação rápida da qualidade fisiológica de sementes de ervilha. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n. 2, p. 1-9, 1999.

REIS, L. P.; BORGES, E. E. de L.; DE SOUZA, G. A.; BRITO, D. S. Relationships between substrate and the mobilization of reserve with temperature during seed germination of *Ormosia coarctata* Jack. **Journal of Seed Science**, v. 42, p. 1-11, 2020.

RIBEIRO, P. R.; WILLEMS, L. A. J.; MUDDE, E.; FERNANDEZ, L. G.; DE CASTRO, R. D.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. M. Metabolite profiling of the oilseed crop *Ricinus communis* during early seed imbibition reveals a specific metabolic signature in response to temperature. **Industrial Crops and Products**, v. 67, 305–309, 2015.

RIBEIRO, P. R.; WILLEMS, L. A. J.; SILVA, A. T.; FERNANDEZ, L. G.; DE CASTRO, R. D.; BUCHER, J.; SNOEK, B. L.; HILHORST, H. W. M.; LIGTERINK, W. Transcriptome profiling of *Ricinus communis* L. provides new insights underlying the mechanisms towards thermotolerance during seed imbibition and germination. **Industrial Crops & Products**, v. 126, p. 380–393, 2018.

RIBEIRO, P. R.; ZANOTTI, R. F.; DEFLERS, C.; FERNANDEZ, L. G.; DE CASTRO, R. D.; LIGTERINK, W.; HILHORST, H. W. M. Effect of temperature on biomass allocation in seedlings of two contrasting genotypes of the oilseed crop *Ricinus communis*, **Journal of Plant Physiology**, v. 185, p. 31–39, 2015.

RIC DE VOS, C. H.; KRAAK, H. L.; BINO, R. J. Ageing of tomato seeds involves glutathione oxidation. **Physiologia plantarum**, v. 92, p. 131-139, 1994.

ROCHA, L. D. **Ácido Húmico extraído do lodo de esgoto sanitário e seus efeitos em plantas**. 2014, 70f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

RODRIGUES, H. C. H.; CARVALHO, S. P.; CARVALHO, A. V.; SANTOS, C. E. M.; FILHO, J. L. S. C. Correlações genotípicas, fenotípicas e ambientais entre caracteres de mamoneira. **Ciência Agrotecnologia**, v.34, n. 6, p.1390-1395, 2010.

ROQUE, André Luiz Maia. **Caracterização, análise filogenética e perfil de expressão dos genes do ciclo ascorbato-glutathiona de soja (*Glycine max*)**. 2018, 120 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

ROSA, R. De la; KIRAN, A. I.; BARRACO, D.; LEON, L. Seedling vigour as a preselection criterion for short juvenile period in olive breeding. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, p. 477–481, 2006.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖCHR, N. F; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. - **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Second Edition- Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1, 2, 3, 2001. Section 6: 6.39-6.44.

SANO, N.; RAJJAOU, L.; NORTH, H.; DEBEAUJON, MARION-POLL, A.; SEO, M. Staying Alive: Molecular aspects of seed longevity. **Plant Cell Physiol**, v. 1, n.15, p. 1-15, 2015.

SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

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

SANTOS, E. L.; PÓLA, J. N.; BARROS, A. S. R.; PRETE, C. E. C. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com variação na cor do tegumento. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 1, p.20-26, 2007.

SANTOS, H. O.; CARVALHO, M. L. M.; CALDEIRA, C. M.; COELHO, S. V. B.; PINHO, E. V. R. V.; OLIVEIRA, J. A. Physiological and biochemical aspects of castor beans seeds deterioration stored in different packaging conditions and temperatures. **Journal of Seed Science**, v.38 n.3, p.241-247, 2016.

SANTOS, H., O. **Conservação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2010, 85f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, J. F.; ALVARENGA, R. O.; TIMÓTEO, T. S.; CONFORTO, E. C.; MARCOS FILHO, J.; VIEIRA, R. D. Avaliação do potencial fisiológico de lotes de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 743-751, 2011.

SANTOS, L. A.; SILVA, S. A.; SOUZA, D. R.; ARAUJO, G. M.; ALMEIDA, V. O.; NEVES, C. G. Genetic parameters in agronomic characters for selection of superior lineages of *Ricinus communis* L. **Ciência Rural**, v.49, n.1, p.01-06, 2019.

SANTOS, P. M.; BATISTA, D. L. J.; RIBEIRO, L. A. F.; BOFFO, E. F.; De CERQUEIRA, M. D.; MARTINS, D.; De CASTRO, R.; SOUZA-NETA, L. C.; PINTO, E.; ZAMBOTTI-VILLELA, L.; COLEPICOLO, P.; FERNANDEZ, L. G.; CANUTOA, G. A. B.; RIBEIRO, P. R. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds from the oilseed crop *Ricinus communis* using a multiplatform metabolite profiling approach. **Industrial Crops e Products**, v. 124, p. 834–844, 2018.

SANTOS, P. M.; BATISTA, D. L. J.; RIBEIRO, L. A. F.; BOFFO, E. F.; DE CERQUEIRA, M. D.; MARTINS, D.; DE CASTRO, R.; DE SOUZA-NETAC; PINTOD, E.; ZAMBOTTI-VILLELAE, L.; COLEPICOLO, P.; FERNANDEZ, L. G.; CANUTO, G. A. B.; RIBEIRO, P. R. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds from the oilseed crop *Ricinus communis* using a multiplatform metabolite profiling approach. **Industrial Crops & Products**, v. 124, p. 834–844, 2018.

SANTOS, S. R. G. dos. **Efeito da temperatura na germinação de sementes de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith e Downs (Branquilha)**. 1999. 76 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia - Produção e Tecnologia de Sementes) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.

SANTOSO, B. B.; PARWATA, I. A.; JAYA, I. K. D. Seed Viability and Oil Content of Castor Bean (*Ricinus communis* L.) as Affected by Packaging Materials during Storage. **International Journal of Applied Science and Tecnology**, v.5, n. 2, p. 56-61, 2015.

SAXENA, S. C.; SALVI, P.; KAUR, H.; VERMA, P.; PETLA, B. P.; RAO, V. Differentially expressed myo-inositol monophosphatase gene (CaIMP) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) encodes a lithium-sensitive phosphatase enzyme with broad substrate specificity and improves seed germination and seedling growth under abiotic stresses. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 18, p. 5623–5639, 2013.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SCHAUER, N.; FERNIE, A. R. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 10, p. 1-9, 2006.

SCHEEREN, B. R.; PESKE, S. T.; SCHUCH, L. O. B.; BARROS, A. C. A. Qualidade fisiológica e produtividade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3 p. 035-041, 2010.

SCHUCH, L. O. B.; KOLCHINSK, E. M.; FINATTO, J. A. Qualidade fisiológica da semente e desempenho de plantas isoladas em soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 144-149, 2009.

SCHULZ, D. G.; ORO, P.; VOLKWEIS, C.; MALAVASI, M. M.; MALAVA, U. C. Maturidade Fisiológica e Morfometria de sementes de *Inga laurina* (Sw.) Willd. **Floresta e Ambiente**, v. 21, n. 1, p. 45-51, 2014.

seedlings. **Plant Physiology**, v. 55, p. 555–58, 1975.

SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, S.; BASAK, P.; MAJUMDER, A. L. Significance of galactinol and raffinose family oligosaccharide synthesis in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 656, p. 01-10, 2015.

SEW, Y. S., STRÖHER, E., FENSKE, R., e MILLAR, A. H. Loss of mitochondrial malate dehydrogenase activity alters seed metabolism impairing seed maturation and post-germination growth in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 171, 849–863, 2016.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. “Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings,” **Plant Growth Regulation**, v. 46, n. 3, p. 209–221, 2005.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, p.01-27, 2012.

SILVA, A. S. L.; SILVA, A. de J.; LATIF, A. L. O.; SANTOS JÚNIOR, A. de F.; BENEVIDES, C. M. de J. Use of analytical methodologies for the determination of phenolic compounds in food in Brazil: advances and weaknesses. *Research, Society and Development*, v. 11, n. 2, p. 01-22, 2022.

SILVA, B. R. dos S.; BEZERRA, A. C.; PESSOA, A. M. dos S. P.; CARDOSO, J. F.; ALVES, E. U.; BRUNO, R. de L. A. B. Germinação e alterações anatômicas em sementes de *Erythrina velutina* Willd. escarificadas com ácido sulfúrico (H₂SO₄). **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p. 11092-11106, 2021.

SILVA, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIEIRA, S. A.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. S. Coordinate changes in photosynthesis, sugar accumulation and antioxidative enzymes improve the performance of *Jatropha curcas* plants under drought stress. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 270-279, 2012.

SILVA, G. P.; SALES, J. F.; NASCIMENTO, K. J. T.; RODRIGUES, A. A.; CAMELOC, G. N.; BORGES, E. E. D. L. Biochemical and physiological changes in *Dipteryx alata* Vog. seeds during germination and accelerated aging. **South African Journal of Botany**, v. 131, p. 84-92, 2020.

SILVA, L. B. & MARTINS, C. C. Teste de condutividade elétrica para sementes de mamoneira Electrical conductivity test on castor bean seeds. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 1, p. 1043-1050, 2009.

SILVA, M. A. D.; VIEIRA, R. D.; SANTOS, J. M.; influência do envelhecimento acelerado na anatomia da testa de sementes de soja, cv. Monsoy 8400. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p. 091-099, 2008.

SILVA, M. F.; SILVA, J. N. da; ALVES, R. M.; SILVA, E. F. da; SILVA, M. A. D. da. Alternative methods to sulfuric acid to overcome dormancy of *Enterolobium contortisiliquum* (tamboril) seeds. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. 1-11, 2020

SILVA, W. J. M.; FERRARI, C. K. B. Metabolismo Mitocondrial, Radicais Livres e Envelhecimento. **Revista brasileira**, v14, n. 3, p. 441-451, 2011.

SMANIOTTO, T. A.; RESENDE, O.; MARÇAL, K. A. F.; OLIVEIRA, D. E. C.; SIMON, G. A. Qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes condições. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 4, p. 446–453, 2014.

SMANIOTTO, Thaís Adriana Souza. **Qualidade da soja armazenada em diferentes condições**. 2013, 75f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Rio Verde, 2013.

SMERTENKO, A., DRABER, P., VIKLICKY, V., OPATRNY, Z. Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. **Plant Cell Environ**, v. 20, p. 1534–1542, 1997.

SMITH, I. K.; VIERHELLER, T. L.; THORNE, C. A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoic acid). **Analytical biochemistry**, v. 175, n. 2, p. 408-413, 1988.

SOETISNA, U.; KING, M.W.; ROBERTS, E.H. Germination test recommendations for estimating the viability of moist or dry seeds of lemon (*Citrus limon*) and lime (*C. aurantifolia*). **Seed Science and Technology**, v.13, p.87-110, 1985.

SOUZA, Andreza Geisiane Maia. **Caracterização das proteínas LmxM.36.6760 e LinJ.30.3360 de função desconhecida em diferentes espécies de *Leishmania***. 2019, 52 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SOUZA, F. H. D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 24, n.4. p. 365-375, 2001.

SOUZA, L. A. **Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona**. 2007. 53 f. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SOUZA, L. A.; CARVALHO, M. L. M.; KATAO, V. Y.; OLIVEIRA, J. A. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 60-67, 2009.

SOUZA, M. T.; SOUZA, M. T.; PANOBIANCO, M. Morphological characterization of fruit, seed and seedling, and seed germination test of *Campomanesia guazumifolia*. **Journal of Seed Science**, v.40, n.1, p. 075-081, 2018.

SRIVASTAVA, A.; MALIK, L.; SARKAR, H.; ZAKERI, M.; SONESON, C. Alignment and mapping methodology influence transcript abundance estimation. **BioRxiv**, v. 3, p. 01-21, 2019.

SUDA, Cecilia Nahomi Kawagoe Suda. **Hidrolase da parede celular em sementes de *Euphorbia heterophylla***. 2001, 144 f. Durante a germinação e desenvolvimento inicial da plântula. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, área Bioquímica, Faculdade de Medicina de Ribeirão, Ribeirão Preto, 2001.

SUN, W.Q. Glassy state and seed storage stability: the WLF kinetics of seed viability loss at T-T_g and the plasticization effect of water on storage stability. **Annals Botany**, v.79, p.291- 297, 1997.

SUNG, J. M.; JENG, T. L. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes associated with accelerated aging of peanut seed. **Physiologia plantarum**, v. 91, p. 51-55, 1994.

SURESH, A.; SHAH, N.; KOTECHEA, M.; ROBIN, P. Evaluation of biochemical and physiological changes in seeds of *Jatropha curcas* L. Under natural aging, accelerated aging and saturated salt accelerated aging. **Scientia Horticulturae**, v. 255, p. 21–29, 2019.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2006.

TANOU, G.; MOLASSIOTIS, A.; DIAMANTIDIS, G. "Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity," **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, n. 2-3, p. 270–281, 2009.

TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. Relationship of seed vigor to crop yield: A review. **Crop Science**, v.31, p. 816-822, 1991.

TELES, C. A. S. **Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica**. 2013, 97f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

TELES, C.A.S. **Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica**. 2013, 97 f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

TESNIER, k.; STROOKMAN-DONKERS, H. M.; VAN PIJLEN, J. G.; VAN DER GEEST, A. H. M.; BINO, R. J.; GROOT, S. P. C. **Seed Science & technology**, v. 30, p. 149-165, 2002.

TIAN, X.; SONG, S.; LEI, Y. Cell Death and Reactive Oxygen Species Metabolism during Accelerated Ageing of Soybean Axes. **Russian Journal of Plant Physiology**, v 55, n. 1, p. 33–40, 2008.

TOLEDO, M. Z. **Desenvolvimento de plântulas de soja em função da dessecação das plantas e do tratamento das sementes**. 2011, 133f. Tese –Programa de Pós-Graduação em Agrônoma, Faculdade de Ciências Agronômicas da UNESP, Botucatu, 2011

TOLEDO, M. Z.; FONSECA, N. R.; CÉSAR, M. L.; SORATTO, R. P.; CAVARIANI, C.; CRUSCIOL, C. A. C. Qualidade fisiológica e armazenamento de sementes de feijão em função da aplicação tardia de nitrogênio em cobertura. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, n. 2, v. 39, p. 124-133, 2009.

TORELLI, N. Q.; FERREIRA JÚNIOR, J. R.; KOWALTOWSKI, A. J.; MARQUES DA CUNHA, F. RTG1 and RTG2-Dependent Retrograde Signaling Control Mitochondrial Activity and Stress Resistance in *S. cerevisiae*. **Free Radical Biology and Medicine**, p. 1-15, 2014.

TORRES, M.; DE PAULA, M.; PEREZ-OTAOLA, M.; DARDER, M.; FRUTOS, G.; MARTINEZ-HONDUVILLA, C. J. Ageing-induced changes in glutathione system of sunflower seeds. **Physiologia plantarum**, v. 101, p. 807-814, 1997.

VANZOLINI, S.; ARAKI, C. A. S.; SILVA, A. C. T. M.; NAKAGAWA, J. Teste de comprimento de plântula na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 2, p. 90-96, 2007.

VIDIGAL, D. de S.; WILLEM, L.; ARKEL, J. V.; DEKKERS, B. J. W.; HILHORST, H. W. M.; BENTSINK, L. Galactinol as marker for seed longevity. **Plant Science**, v. 246, p. 112–118, 2016.

VIDIGAL, D. S. **Adaptation and acclimation of seed performance**. 2015, 158 f. Tese apresentada a Universidade de Wageningen, Wageningen, 2015.

VIEIRA, R. F. Ciclo do Nitrogênio em sistemas agrícolas. Embrapa, p. 163, 2017.

VILLAS -BÔAS, S. G.; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma. **Biotechnology Ciência & Desenvolvimento**, v. 9, n. 36, p. 58 -69, 2006.

VILLAS-BÔAS, S. G.; RASMUSSEN, S. & LANE, G. Metabolomics or metabolite profiles? **Trends in Biotechnology**, v. 23, p.385-386, 2005 a.

VIZZOTO, MARCIA. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância / Marcia Vizzoto, Ana Cristina Krolow e Gisele Eva Bruch Weber – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316).

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Heat tolerance in plants: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 61, p. 199–223, 2007.

WALTERS, C.; PAMMENTER, N.W.; BERJAK, P.; CRANE, J. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerant and sensitive seeds. **Seed Science Research**, v.11, n.2, p.135-148, 2001.

WAN, C. Y.; WILKINS, T. A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Analytical Biochemistry**, v. 233, n. 1, p. 7-12, 1994.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v.10, n. 1, p. 57-63, 2009.

YIN, G.; XIN, X.; SONG, C.; CHEN, X.; ZHANG, J.; WU, S.; LI, R.; LIU, X.; LU, X. Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 1-9, 2014.

ZHANG, W.; MACE, W. J.; MATTHEW, C.; CARD, S. D. The Impact of Endophyte Infection, Seed Aging, and Imbibition on Selected Sugar Metabolite Concentrations in Seed. *Jornal Agricultural and Food Chemistry*, v. 67, 6921–6929, 2019.

ZUCARELI, C.; CVARIANI, C.; SBRUSSI, C. A. G.; NAKAGAWA, J. Teste de deterioração controlada na avalia o do vigor de sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4 p. 732 - 742, 2011.

ZUCHI, J.; BEVILAQUA, G. A. P.; PESKE, S. T.; SILVA, S. D. A.; SEDIYAMA, C. S. S. Características agronômicas de cultivares de mamona em fun o do local de cultivo e da época de semeadura no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 501-506, 2010.

ZUCHI, J.; PANOZZO, L. E.; HEBERLE, E.; ARAUJO, E. F. Curva de embebi o e condutividade elétrica de sementes de mamona classificadas por tamanho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3, p. 504 - 509, 2012.

ZUCHI, Jacson. **Características agronômicas de cultivares de Mamona em fun o do ambiente de cultivo**. 2008, 56f. Disserta o apresentada ao Programa de Pós-Gradua o em Ciência e Tecnologia de Sementes, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

CAPÍTULO 04: Efeito do envelhecimento acelerado (EA) em sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *Ricinus communis* L.

RESUMO

As sementes passam por um processo natural de envelhecimento que se inicia desde o processo de maturação. O envelhecimento acelerado (EA) pode potencializar o efeito do envelhecimento natural, já que, as sementes são expostas a altas temperaturas e altas umidades relativas. Este estudo teve como objetivo, avaliar o perfil fisiológico e bioquímico das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *Ricinus communis* após EA, com o intuito de identificar marcadores de qualidade e verificar o vigor das sementes. Para tanto, realizou-se a caracterização inicial do lote (análise morfométrica, teste de germinação, grau de umidade da semente, condutividade elétrica e pH do exsudato, teste de tetrazólio e curva de embebição). Após o EA, determinou-se o grau de umidade da semente, germinação, condutividade elétrica e pH do exsudato, tetrazólio, determinação de malonaldeído (MDA), atividade antioxidante da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHA), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona S-transferase (GST). As sementes da cultivar BRS 149 Nordestina após o EA apresentaram redução do vigor e viabilidade das sementes, redução significativa na germinação e nos parâmetros da germinação, aumento da condutividade elétrica e redução o pH do exsudato das sementes, e redução na quantidade de sementes viáveis. Além do aumento na peroxidação lipídica nas sementes inteiras e no embrião, também houve alterações significativas na atividade da SOD ocorrendo aumento nas sementes inteiras e redução no embrião após EA, e da APX e DHAR redução da atividade nas sementes inteiras e embrião. No entanto, apenas nas sementes inteiras ocorreu redução significativa na atividade da CAT e da MDHAR, GR e GPX nas amostras de embrião, após EA. A GST não apresentou alteração significativa em nenhuma das condições analisadas. As sementes naturalmente envelhecidas, após passarem por EA não são capazes de manter seu vigor e viabilidade, provavelmente devido aos diversos danos ocasionados, dentre eles os danos oxidativos com perda de qualidade. Estas sementes são capazes de manter sua viabilidade e qualidade, no entanto, ao serem submetidas a condições de estresse, por exemplo o EA, essas não mantêm seus mecanismos de defesa eficientes, provavelmente devido ao acúmulo ERO e os diversos danos causados pelo envelhecimento. Este estudo traz informações pertinentes para posteriores estudo mais profundos sobre o efeito do envelhecimento na qualidade de sementes oleaginosas de *R. communis*.

Palavras-chaves: Viabilidade. Vigor. Biomarcador.

1. INTRODUÇÃO

Ricinus communis é uma oleaginosa com grande variabilidade genética, dentre os genótipos existentes temos a cultivar BRS 149 Nordeste. Esta foi desenvolvida pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), criada para o plantio no semiárido. Representa uma ótima opção para a agricultura familiar, por se tratar de uma cultivar de porte médio que possui maior adaptação às condições do semiárido, por possuir um sistema radicular mais profundo e desenvolvido, cujas características lhes conferem maior tolerância aos efeitos da estiagem (QUEIROGA *et al.*, 2011; MAGALHÃES *et al.*, 2013; JESUS, 2016).

O óleo extraído das sementes de *R. communis* apresentam uma grande variabilidade na sua aplicação, este é utilizado como insumo para a produção de tintas e verniz, cosméticos, medicamentos farmacêuticos, plástico dentre outros. Devido à grande aplicação do óleo de rícino há também a necessidade de uma boa produção adequada de sementes. Uma forma de garantir a qualidade e a viabilidade das sementes antes do plantio é através de um armazenamento adequado (CHIERICE e CLARO NETO, 2007; JESUS, 2016; MELO e VOLTOLINI, 2019).

A velocidade de deterioração das sementes oleaginosas depende das condições ambientais de armazenamento e das particularidades da composição da espécie. Para a realização de um armazenamento adequado é importante levar em consideração os fatores ambientais: temperatura, umidade, disponibilidade de oxigênio e embalagem. Além de considerar a qualidade inicial do lote e as características inerentes da semente. Um armazenamento adequado pode manter as sementes viáveis por mais tempos, pois condições ótimas diminui a velocidade de deterioração. Já que o envelhecimento natural faz parte da semente (BALEŠEVIĆ-TUBIĆ *et al.*, 2010; ABREU *et al.*, 2013; MISHRA *et al.*, 2016).

Um conjunto de processos bioquímicos, fisiológicos e moleculares causa o envelhecimento natural, este é um processo inevitável e irreversível que ocorre nas sementes e vegetais. Os sintomas do envelhecimento nas sementes são manifestados pela perda de vigor e viabilidade, redução na germinação, tamanho e massa seca das plântulas normais. Além disso, o envelhecimento é caracterizado pela perda de proteínas, aumento da atividade proteolítica, dano celular e peroxidação

lipídica (DESIMONE *et al.*, 1996; DEL RIO *et al.*, 1998; CORTE, 2010; PES e ARENHARDT, 2015; KUREK *et al.*, 2019).

Uma forma de acelerar o envelhecimento das sementes é através do teste de envelhecimento acelerado, as sementes são submetidas a alta temperatura e alta umidade relativa, durante certo período. Este é um teste indicado para avaliação do vigor das sementes, a eficiência deste teste é avaliada pela diferença de sensibilidade ao envelhecimento apresentada pelas sementes. Além disso, o processo de deterioração é acelerado, de modo que sementes mais vigorosas deterioram mais lentamente (MENDES *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2020).

Condições ambientais e o envelhecimento (natural ou induzido) leva as sementes a perda de qualidade, viabilidade e vigor, porque ocorrem mudanças que levam a deterioração, reduzindo a capacidade de sobrevivência das sementes. A deterioração é o processo irreversível e acumulativo. Este pode ser definida como um processo natural que envolve citologia, alterações fisiológicas, bioquímicas e físicas nas sementes, essas mudanças reduzem a viabilidade e pode causar a morte da semente (KAPOOR *et al.*, 2010; MOSAVI NIK *et al.*, 2011; FARHADI *et al.*, 2012; JYOTI e MALIK, 2013; ZINSMEISTER *et al.*, 2020).

Após a ocorrência da deterioração das sementes, os processos catabólicos não podem ser revertidos. Começa a acontecer vários processos bioquímicos, predominantemente dano de membrana, comprometimento das reações biossintéticas, desencadeando a redução na taxa de germinação, emergência de plântulas e morte celular. A perda de viabilidade resulta em substâncias químicas e estruturais irreversíveis alterações nos constituintes celulares, na membrana, no DNA, oxidação de moléculas, alteração enzimáticas produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) em excesso, peroxidação lipídica, ácidos graxos livres (VERMA *et al.*, 2003; WALTERS *et al.*, 2010; JYOTI e MALIK, 2013; ZINSMEISTER *et al.*, 2020).

As sementes contam com uma proteção antioxidante não enzimática e enzimática, tem como função inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das ERO nas sementes. Este sistema não enzimático é composto por glutathione (GSH), ascorbato (AsA), tocoferol, compostos fenólicos, alcaloides, carotenoides. E o sistema enzimático é composto pelas enzimas: catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), superóxido dismutase (SOD), monodehidroascorbato redutase (MDHAR),

dehidroascorbato redutase (DHAR), glutathiona redutase (GR), glutathiona S-transferase (GST), glutathiona peroxidase (GPX) (BARBOSA *et al.*, 2010; GILL e TUTEJA, 2010; VENKATESWARLU *et al.*, 2012; JESUS, 2016).

Através das respostas bioquímicas e fisiológicas das sementes, após o envelhecimento é possível verificar alterações enzimáticas, que podem fornecer de forma direta evidências sobre o estresse oxidativo fornecendo dados importantes para o esclarecimento de rotas de sinalização relacionadas ao envelhecimento das sementes. Estas informações serão importantes para a busca de marcadores de qualidade para as sementes de *R. communis*. Neste contexto, este estudo pretende identificar a qualidade e a viabilidade de sementes, através de respostas bioquímicas e fisiológicas, de sementes envelhecidas naturalmente e artificialmente.

2. MATERIAL E METÓDO

Todos os experimentos foram realizados como descrito no Capítulo II. Realizou-se: determinação da qualidade inicial das sementes de mamona da cultivar BRS 149 Nordestina, o teste de germinação, a curva de embebição, a determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato, o teste de tetrazólio, o envelhecimento acelerado e caracterização das sementes após o EA, peroxidação lipídica e análise de enzimas antioxidantes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação da qualidade inicial de sementes de mamona da cultivar BRS 149 Nordestina Paraguaçu

3.1.1 Biometria, peso de mil sementes (MMS) determinação do grau de umidade das sementes (U), determinação da umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA)

As sementes é o principal meio de propagação de uma espécie, sua identificação é importante para identificar genótipo, espécie, a anatomia, morfologia e fisiologia das sementes. Análise com estas contribuem melhorando o conhecimento acerca da semente e são capazes de definir se as sementes em estudo possuem qualidade e viabilidade. O uso de sementes de alta qualidade é um fator fundamental e de grande importância para produção (OLIVEIRA *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2007; LORENTZ e NUNES, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A qualidade das sementes é de extrema importância, para que se tenha uma boa produtividade. A temperatura e a umidade são fatores de grande relevância quando se leva em consideração a qualidade das sementes. Pois o processo de deterioração das sementes é algo natural, que ocorre juntamente com o envelhecimento das sementes. Mas é potencializado pela temperatura e umidade do ambiente, pois estes são fatores que influenciam diretamente na qualidade de sementes, principalmente pelo fato das sementes entrarem em equilíbrio higroscópico com o ambiente. A umidade e a temperatura geram mudanças no metabolismo das sementes, causando mudanças bioquímicas, fisiológicas e moleculares (CAMARGO e CARVALHO, 2008; BORGES *et al.*, 2009; SMANIOTTO *et al.*, 2013; JESUS, 2016).

Através da caracterização inicial do lote de sementes da cultivar BRS 149 Nordestina, determinou-se altura, largura, espessura, volume das sementes, peso de mil sementes e grau de umidade. Considerando os resultados da cultivar BRS 188 Paraguaçu (Capítulo 3), a biometria dessas sementes apresentou um resultado maior, além de um maior peso de mil sementes. Sendo que o grau de umidade, temperatura e umidade relativa do ambiente apresentaram valores iguais, por estarem armazenadas no mesmo ambiente. As sementes da BRS 149 Nordestina apresentaram biometria (mm): tamanho do comprimento 16,04, largura 11,42 e espessura 6,77. O volume foi de 1240 (mm³), peso de mil sementes 536 ± 1,86 (g), grau de umidade da semente 55 ± 3,2 (%), umidade relativa 55 ± 3,2 e temperatura ambiente 21 ± 0,9 (°C).

Ao avaliar o armazenamento de sementes com a cultivar BR 149 Nordestina, Jesus (2016) verificou que as sementes apresentaram uma altura de 16,92 mm, largura de 13,62, mm e espessura de 6,77 mm, o volume foi de 1726,73 g e a massa de mil sementes de 657,3 g. Sendo valores maiores, do que o encontrado no estudo atual. Isso pode ser justificado, porque o peso das sementes e sua morfometria além de depender do tipo de cultivar, depende do local de plantio, das condições climáticas, solo, luz, dentre outras variáveis e fatores bióticos e abióticos. No entanto, não há comprovações científicas que sementes maiores são mais vigorosas, existem vários trabalhos sobre esse assunto e a correlação entre tamanho e qualidade, mas estes ainda divergem muito (PÁDUA *et al.*, 2010; REGO *et al.*, 2011; CANGUSSÚ *et al.*,

2013; JESUS, 2016), e por isso, muitos trabalhos usam de avaliação de imagens de raio X para avaliar qualidade de sementes.

3.1.2 Procedimentos pré-germinativos em sementes empregadas no teste de germinação: sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE)

Sementes de alta qualidade são imprescindíveis para a produção comercial, geralmente baixa produtividade está associada a utilização de lotes de sementes com baixa germinação, vigor reduzido e alta contaminação por microrganismos. Além disso, a antecipação na colheita de racemos e conseqüentemente coleta de sementes antes da maturidade fisiológica, pode resultar em baixa qualidade das sementes. O teste de germinação é o método mais tradicional utilizado para analisar a qualidade e a viabilidade de sementes, através deste é possível determinar a proporção de sementes capazes de produzir plântulas normais, anormais deformadas e deterioradas (FERREIRA *et al.*, 2007; KOBORI *et al.*, 2012; DE PAULA, 2020).

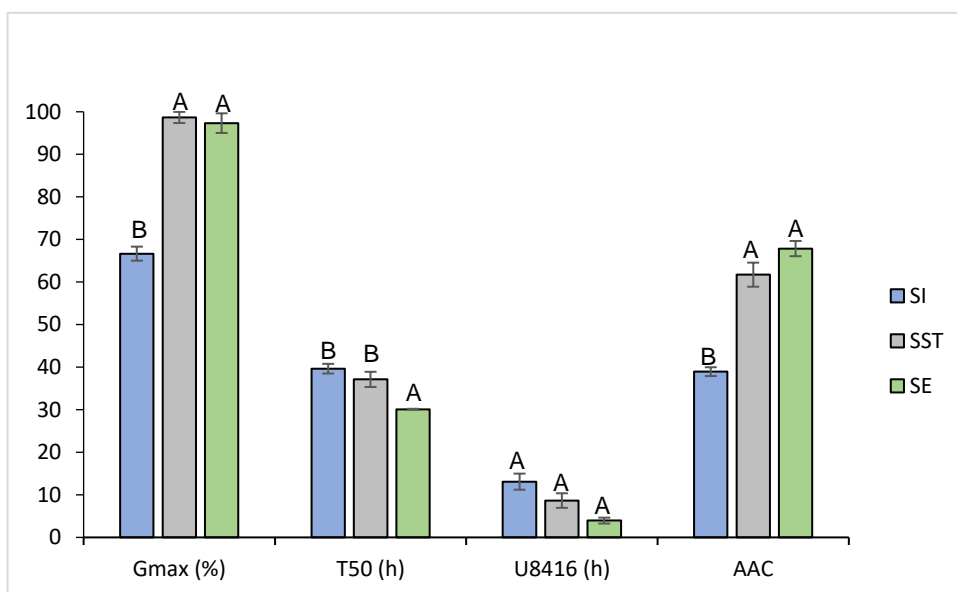
O teste de germinação é a forma mais eficiente de avaliar as sementes, entender seu vigor e viabilidade. No entanto, as sementes armazenadas por muito tempo podem desenvolver dormência, devido ao acúmulo de substâncias no tegumento, que corresponde a uma dormência física. Mas, além disso, o tegumento funciona naturalmente como uma barreira de proteção da semente, e, portanto, verificar a melhor forma de como usar as sementes para o teste de germinação é importante para entender como estas se comportam (CORTINES *et al.*, 2010; SANTOS, 2010; DAVID *et al.*, 2013; JESUS, 2016).

De acordo com os dados obtidos e descritos na Figura 32, os melhores resultados para a germinação da cultivar BRS 149 Nordestina foi as opções de sementes sem tegumento e sementes escarificadas, já que tiveram os melhores valores de Gmax, T50, U8416 e AAC. As sementes com tegumento integro (SI) foram as que demonstraram os piores resultados, provavelmente deve-se ao acúmulo de alguma substância no tegumento que impermeabiliza a entrada de água e/ou a troca gasosa, pois ao remover o tegumento ou parte deste os resultados foram significativamente superiores.

O tegumento das sementes possui várias substâncias que podem interferir no processo de germinação, a exemplo dos fenóis, ceras e substâncias inibidoras de

germinação. Além disso, o tegumento pode funcionar como um obstáculo para o crescimento do embrião, regulando a disponibilidade de água e passagem de oxigênio, interferindo nas trocas gasosas (ZUCARELI *et al.*, 2009; CORTINES *et al.*, 2010; BEWLEY *et al.*, 2013).

Figura 32 - Procedimentos pré-germinativos para sementes de mamona cultivar BRS 149 Nordestina. Sementes inteiras com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST) e sementes escarificadas (SE), germinação máxima – Gmax (%), tempo para alcançar 50% da germinação - T50 (horas), índice de uniformidade da germinação - U8416 (horas), área abaixo da curva de germinação – AAC (adimensional).



Letras iguais maiúsculas não representam diferença de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Ao se observar os parâmetros da germinação das sementes da cultivar Nordestina (Tabela 10), as sementes escarificadas apresentam os melhores resultados, incluindo o número de plântulas normais, biometria e massa seca das plântulas normais. Além disso, o resultado de porcentagem de sementes não germinadas foi de 29% nas sementes com tegumento, sendo confirmado pelo teste de tetrazólio que essas sementes não estavam mortas. Considerando estes resultados é possível afirmar que essas sementes, envelhecidas naturalmente, tiveram o acúmulo de alguma substância no tegumento, que impedem a germinação, sendo sugerido a presença de uma dormência tegumentar.

Mendes *et al.* (2009) em estudo sobre tratamentos pré-germinativos em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.), utilizaram e cindo lotes de sementes de mamona da cultivar AL-Guarany, que foram submetidas aos tratamentos com

escarificação, remoção de carúncula, remoção do tegumento, comparando com o controle (semente intacta), e germinação a 25°C. Verificaram que os melhores resultados foram com sementes submetidas a escarificação com lixa e com a remoção da carúncula ou de todo o tegumento. No entanto, considerando a praticidade de aplicação, a escarificação com lixa pode ser recomendada para acelerar e aumentar a germinação das sementes de mamona.

Tabela 10 - Parâmetros da germinação das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*: germinação realizadas com sementes inteira com tegumento (SI), sementes sem tegumento (SST), sementes escarificadas (SE). Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas (%), número de sementes não germinadas (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g).

	SI	SST	SE
Plântulas normais (%)	48 C	55 B	69 A
Plântulas anormais deformadas (%)	4 B	8 A	1 C
Plântulas anormais deterioradas (%)	15 C	36 A	27 B
Sementes mortas (%)	4 A	1 B	3 A
Sementes não germinadas (%)	29 A	0 B	0 B
Biometria plântulas normais (mm)	66 B	53 C	74 A
Massa seca plântulas normais (g)	0,3720 B	0,3493 C	0,6030 A

Letras iguais maiúsculas entre coluna não representam diferença de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Diante dos dados encontrados (Figura 32 e Tabela 10) é possível confirmar, que a melhor forma de dar continuidade a germinação das sementes da cultivar BRS 188 Nordestina é através da condição de sementes escarificadas já que a remoção do tegumento, também pode causar danos à semente, como verificado nos dados da Tabela 10 e Figura 32. Sendo utilizada então a escarificação das sementes para as posteriores análises de germinação, além da embebição das sementes por 6 horas para análises bioquímicas.

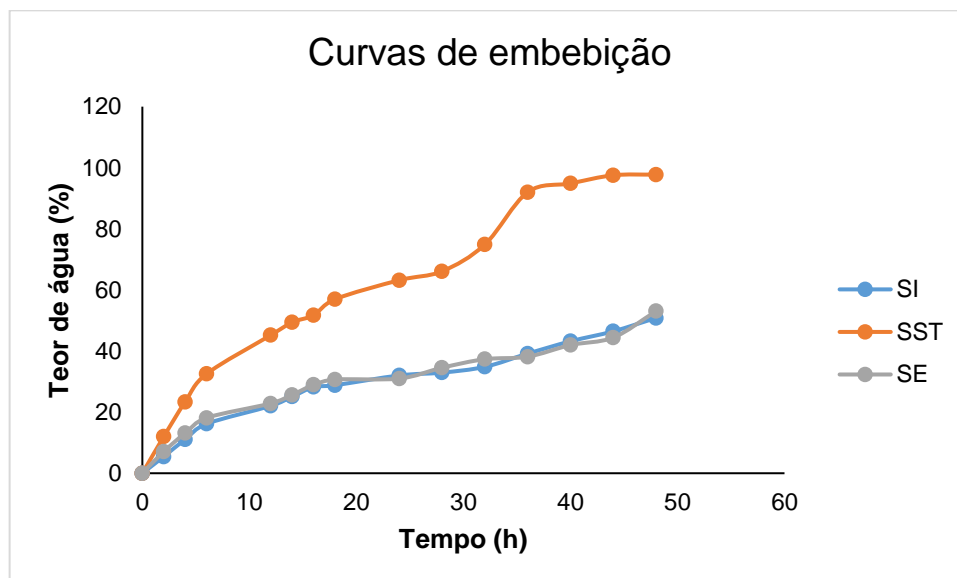
3.1.5 Curva de embebição: Semente inteira com tegumento (SI), semente sem tegumento (SST), semente escarificada (SE)

A curva de embebição por água apresenta um padrão trifásico, na fase I é uma etapa essencialmente física e a absorção de água é rápida, permite a hidratação da semente. Na fase II, a absorção começa a ficar mais lenta, as reservas das sementes passam a ser convertidas em compostos mais simples para serem utilizados durante

a germinação, é nesta fase também que ocorre a reativação dos processos metabólicos. E a fase III é caracterizada pela volta a absorção de água, intensa respiração e protusão do eixo embrionário (BEWLEY e BLACK, 1994; CARVALHO e NAKAGAWA, 2000; ZUCHI *et al.*, 2012; TELES, 2013).

De acordo com os resultados obtidos, as condições SI e SE (Figura 33 A e C) tiveram curvas com padrões muito próximos e a absorção da água foi muito maior na condição da SST, devido à ausência do tegumento nas sementes a absorção de água foi maior e mais rápida. No entanto, a ausência de tegumento se torna uma condição estressante para as sementes, já que está não tem mais barreira física a absorção de água é muito mais rápida e não a proteção para a semente dos agentes externos bióticos e abióticos (Figura 33).

Figura 33 - Curvas de embebição das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*. Sementes inteiras (SI), sementes sem tegumentos (SST) e sementes escarificadas (SE).



Apesar da absorção de água ser diferente em porcentagem, as fases apresentaram tempos próximos nas condições SI, SST e SE, a fase I foi em torno de 0 a 18 horas. Para as condições SI e SE, a fase II vai de 20 a 36 horas e fase III a partir de 40 horas. Já na condição SST, as horas foram antecipadas para a fase II que variou de 20 até 30 horas e a fase III iniciou a partir de 32 h (Figura).

Resultados semelhantes foram obtidos com a cultivar BR 188 Paraguaçu (Capítulo 3, Figura 8). Portanto, a condição mais afetada foi a condição SST, para as

duas cultivares, devido à ausência total do tegumento e ao resultado da germinação e os parâmetros da germinabilidade. Sendo mantido a embebição das sementes, na condição SE com absorção de água durante o período de 6 horas, para posteriores análises de peroxidação lipídica e ensaio enzimático com as enzimas antioxidantes.

3.1.3 Determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato das sementes

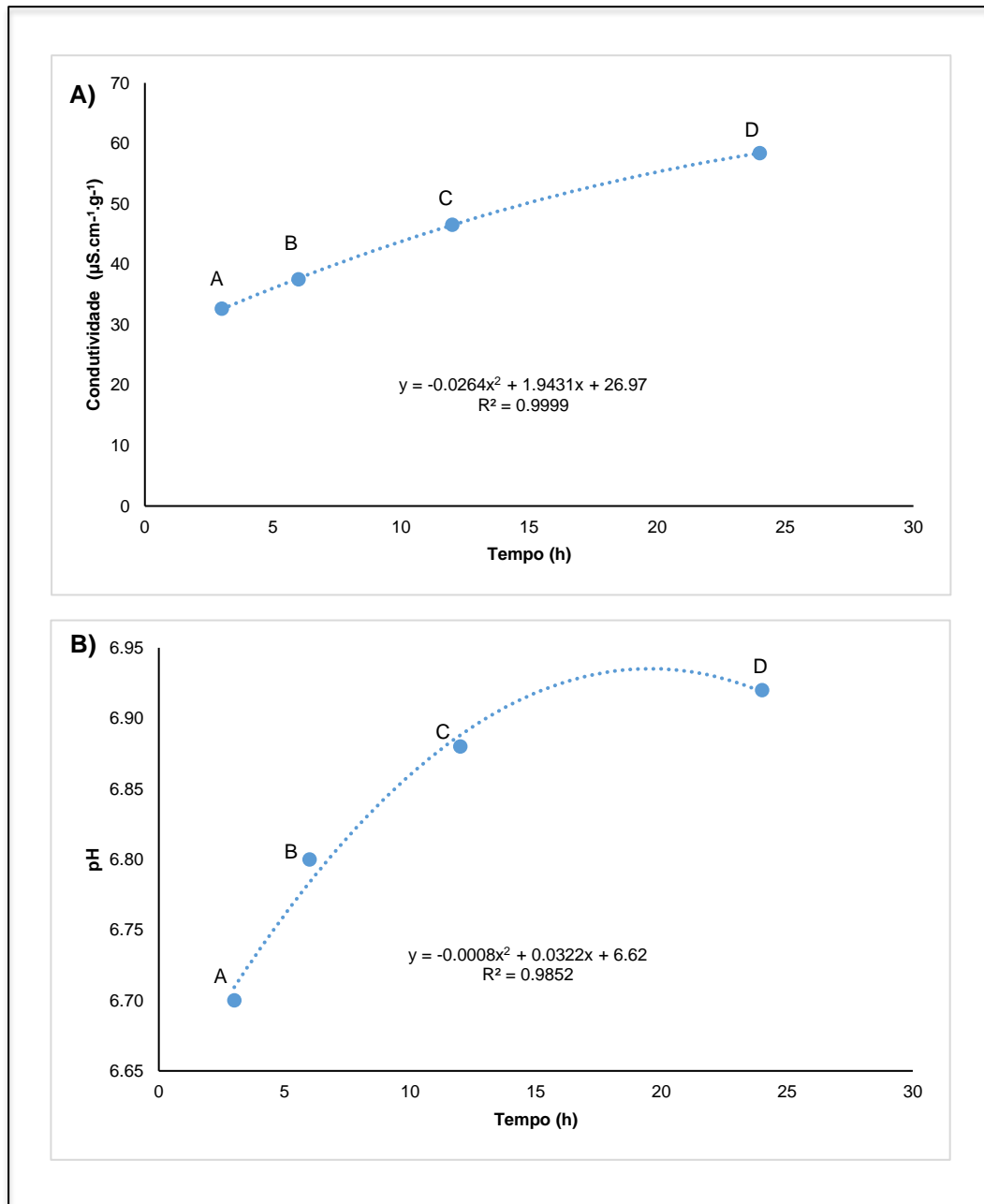
A deterioração das sementes é iniciada imediatamente com a maturidade fisiológica e a perda do vigor das sementes é determinada por um conjunto de fatores, dentre estes há a desestruturação dos sistemas das membranas celulares. Tem sido relatado como consequência da deterioração e decréscimo do vigor das sementes, a ocorrência no aumento da lixiviação de eletrólitos, resultando no aumento da condutividade elétrica do exsudato da semente. Dentre este lixiviados está o aumento da concentração de determinados íons, principalmente o potássio. Também são liberados açúcares solúveis, grãos de amido, corpos proteicos em quantidades diferentes em função do grau de deterioração das sementes. Além disso, os açúcares, ácidos orgânicos e íons de H⁺ contribuem para a acidificação do meio e provocam a diminuição do pH do exsudato de sementes, caracterizando a deterioração da semente. Portanto, medir o pH e a condutividade elétrica do exsudato possibilita o emprego de testes rápidos para avaliar a viabilidade e o vigor de sementes (CABRERA e PESKE, 2002; ALVES *et al.*, 2004; MALTA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2009).

A condutividade elétrica do exsudato das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina apresentou um aumento significativo ao longo do tempo de análise, demonstrando que havia um dano de membrana nas sementes (Figura 34). No entanto, não houve alteração no pH, provavelmente porque apesar do aumento da lixiviação de eletrólitos, não houve a liberação de compostos que são capazes de acidificar o meio.

De acordo com os resultados obtidos o melhor tempo de avaliação foi o de vinte quatro horas, já que, os valores de condutividade elétrica nos tempos de três, seis e doze horas ainda continuaram aumentando significativamente. Em alguns estudos com outras espécies de oleaginosas, tais como amendoim e soja, o período de 24 horas de embebição tem sido recomendado para a avaliação da condutividade elétrica, pois a maior sensibilidade na avaliação do vigor foi indicada em um período mais longo vinte quatro horas (LOEFFLER *et al.*, 1988; DIAS e MARCOS FILHO,

1996; VANZOLINI e NAKAGAWA, 1999; SOUZA *et al.*, 2009). O mesmo ocorreu ao avaliar as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu (Capítulo 3, Figura 9)

Figura 34 - Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) e pH de exsudato das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*, durante o período de três, seis, doze e vinte e quatro horas.



Letras maiúsculas iguais na barra não representa diferença significativa de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

O resultado da condutividade e pH corrobora o resultado da cultivar Paraguaçu citado no Capítulo 3 (Figura 9), ambos os cultivares BRS 149 Nordestina e BRS 188 Paraguaçu apresentaram um aumento significativo até as vinte e quatro horas de

embebição e não apresentaram variação significativa no pH. Já Souza *et al.* (2009) em estudo com a cultivar AL Guarany 2002 de *R. communis* realizaram a separação dos diferentes lotes em relação ao vigor, através do resultado de condutividade elétrica, que se deu a partir de 6 horas de embebição, tempo suficiente para ter um resultado significativo.

Já no estudo de Silva e Martins (2009), verificaram em diferentes lotes da cv. AL Guarany 2002, que a condutividade elétrica das sementes embebidas durante duas, quatro, seis, oito e vinte e quatro horas. E concluiu que o teste de condutividade elétrica de massa foi eficiente na detecção de diferenças de qualidade fisiológica em lotes de sementes de mamona, sendo o período de 6 horas de embebição o indicado para a realização do teste. Infere-se que o período de embebição é de grande importância para a padronização do teste de condutividade elétrica, pois influencia de forma direta no resultado do teste.

3.1.4 Teste de tetrazólio

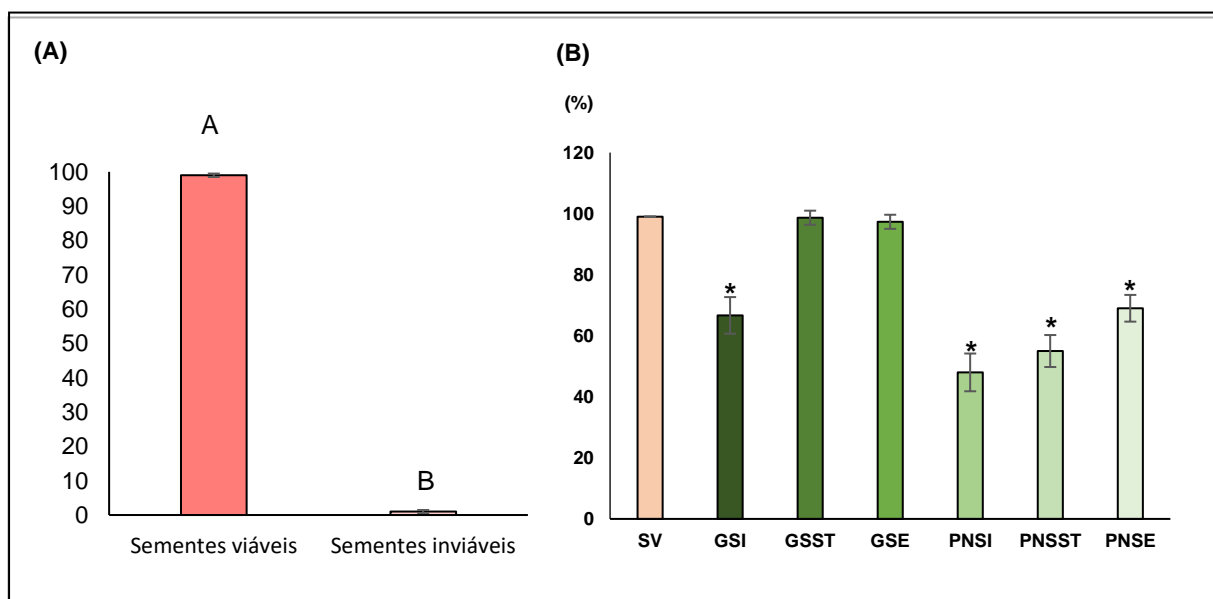
O teste de tetrazólio é capaz de determinar rapidamente a viabilidade de sementes, o princípio do teste se baseia na atividade das enzimas desidrogenases que catalisam as reações que ocorrem durante a cadeia respiratória, presentes nas mitocôndrias. A reação se baseia na respiração celular, durante esse processo há a liberação de íons de H⁺, que reagem com o sal de 2,3,5-trifenil tetrazólio, uma solução transparente que é colocada nas sementes em corte sargital. E nos tecidos viáveis ocorre uma redução da solução incolor e difusível, formando uma substância de cor vermelha, denominada formazan, delimitando os tecidos vivos das sementes (GASPAR-OLIVEIRA *et al.*, 2009; BRASIL, 2009; GARLET *et al.*, 2015; JESUS, 2016).

De acordo com o resultado do teste de tetrazólio do lote da cultivar BRS 149 Nordeste a viabilidade foi de 99% de sementes viáveis (Figura 35). Assim, como as sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu que apresentaram cerca de 96% de viabilidade nas sementes analisadas (capítulo 3, figura 10), demonstrando que independentemente da idade da semente, estas podem se manter viáveis. Além disso, ao se avaliar o resultado da germinação dessas sementes (Figura 32, Tabela 9), obteve-se que nas condições de germinação STT e SE se obteve quase 100% de germinação, no entanto, na condição SI se obteve 70% de Gmax. É importante ressaltar que nem sempre o resultado do teste de tetrazólio vai poder ser

correlacionado para explicar a germinação das sementes, como no caso da condição SI, sendo que este resultado, não está correlacionado com o resultado da porcentagem de viabilidade das sementes, pelo teste de tetrázolio. E esta deficiência do teste de tetrázólio, é justificada pela capacidade do teste em detectar se a semente está viva. No entanto, não é possível garantir que a semente viável vai realmente germinar, principalmente quando existe algum tipo de dormência nas sementes (Figura 35).

A dormência de sementes é caracterizada pelo atraso na germinação ou mesmo quando submetidas em condições favoráveis a semente mesmo viva não germina. Assim, considerando os dados de germinação das sementes com tegumento, é possível sugerir a presença de uma dormência tegumentar (Figura 32 e 35).

Figura 35 - Resultados do teste de tetrázólio em lote de das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*. (A). Comparação entre a porcentagem de Sementes Viáveis (SV) com Germinação Sementes Inteiras (GSI), Germinação Sementes Sem Tegumentos (GSST), Germinação Sementes Escarificadas (GSE), Plântulas Normais Sementes Inteiras (PNSI), Plântulas Normais Sementes Sem Tegumentos (PNSST) e Plântulas Normais Sementes Escarificadas (PNSE) (B).



Letras iguais maiúsculas nas barras representam que não há diferença significativa de acordo com o teste t de Student a 5% de probabilidade.

Valores seguidos de asterisco (*) diferem significativamente do grupo controle (SV) pelo teste de Dunnet a 5% de significância.

3.2 Análises das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina (*Ricinus communis* L.): controle e das submetidas ao EA

3.2.1 Determinação do grau de umidade da semente, UR e TA

A umidade e a temperatura são fatores que influenciam diretamente a qualidade das sementes. As sementes tendem a entrar em equilíbrio hidroscópico com o ambiente, além de serem dois fatores que aumentam a deterioração das sementes quando em altas quantidades (TOLEDO *et al.*, 2007; KAUTH e BIBER, 2014; HARTMANN FILHO *et al.*, 2016).

De acordo com os resultados obtidos e descritos na tabela 11, apesar da alta temperatura e da alta umidade relativa do EA, as sementes da cultivar BRS 149 Nordestina, após o EA não apresentaram aumento significativo na umidade da semente. Provavelmente, este resultado se deve ao tegumento da cultivar BRS 149 Nordestina, como observado nas diferentes germinações (Figura 32), avaliando a condição de SI, em comparação com as condições SST e SE.

Acredita-se que há algo no tegumento que provavelmente se acumulou com o tempo, por se tratar de um lote de sementes envelhecido naturalmente. E que impediu a troca de umidade com o meio, justificando assim, o aumento não significativo na umidade das sementes.

Tabela 11 - Comparação entre as condições controle e após EA das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*, durante o período de dez dias, nas condições: umidade interna das sementes e do ambiente (temperatura e umidade relativa).

	Semente	Ambiente	
	Umidade (%)	Temperatura (°C)	Umidade relativa (%)
Controle	5 ± 0,6 A	21 ± 0,9 A	55 ± 3,2 A
EA_10	6 ± 0,1 A	40 ± 0,2 B	78 ± 7,4 B

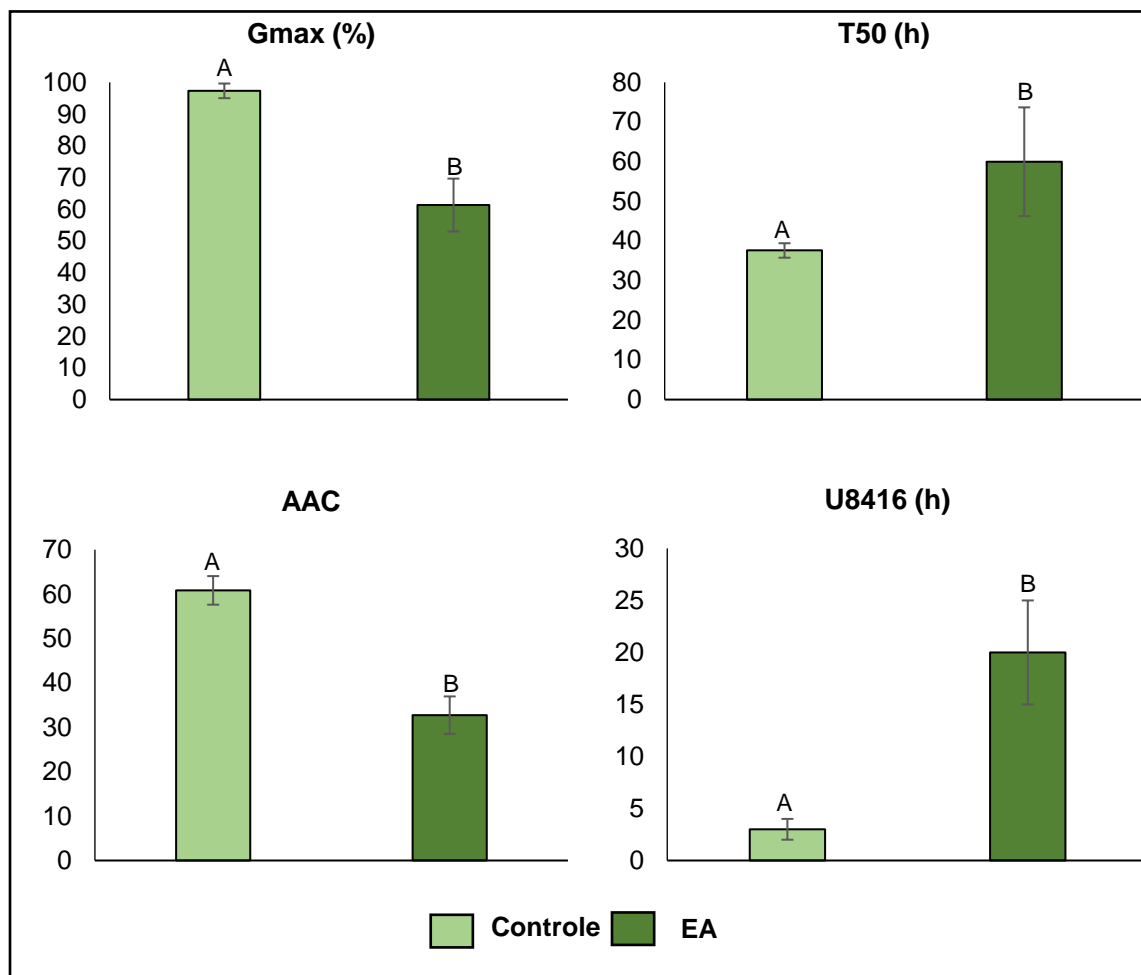
Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

3.2.2 Teste de germinação

Segundo Mondo *et al.* (2008) o teste de germinação é importante para avaliar a qualidade fisiológica das sementes, esta análise propicia melhor entendimento sobre condições favoráveis ao lote, potencial de germinação. Já que, as sementes em geral apresentam um desempenho variável em relação a germinação, qualidade do lote, temperatura, substrato. Por isso, realizar o teste de germinação é importante para entender o comportamento da semente.

A germinação das sementes da cultivar BRS 144 Nordestina, apresentou uma diminuição significativa após o EA, as sementes passaram a germinar menos (Gmax), demoraram mais tempo para germinar (T50%), apresentaram um menor valor de AAC, este último valor estar diretamente ligado a relação entre germinação e tempo para alcançar 50% da germinação. Além disso, as sementes após o tratamento passaram a ter uma germinação mais desuniformes, como pode ser verificado pelo valor de U8416 (Figura 36).

Figura 36 - Germinação de sementes da cultivar BRS 144 Nordestina de *R. communis* do controle e sementes após serem submetidas ao envelhecimento acelerado durante dez dias a 40°C e 85% UR. (A) Germinação máxima – Gmax, (B) Tempo para alcançar 50% de germinação – T50, (C) área abaixo da curva de germinação – AAC, (D) Uniformidade de germinação medindo-se o intervalo de tempo em horas entre 84% e 16% de germinação de sementes - U8416.



Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Nos parâmetros de germinabilidade houve uma redução significativa no número de plântulas normais, aumento na quantidade de sementes não germinadas, redução significativa na biometria e na massa seca das plântulas normais ao se

comparar a condição controle e o tratamento. Ficando evidente que as sementes da cultivar BRS 149 Nordestina após o tratamento perderam o vigor e a viabilidade (Tabela 12).

Tabela 12 - Germinação das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *Ricinus communis* do controle (não submetidas ao EA) e sementes após serem submetidas ao envelhecimento acelerado durante dez dias a 40°C e 85% UR. Avaliação do número de plantas normais (%), número de plântulas anormais deformadas (%), número de plântulas anormais deterioradas (%), número de sementes mortas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), número de sementes não germinadas determinadas pelo teste de tetrazólio (%), biometria das plântulas normais (mm), massa seca das plântulas normais (g).

	Germinação	
	Controle	TEA
Plântulas normais (%)	69 A	49 B
Plântulas anormais deformadas (%)	1 A	3 A
Plântulas anormais deterioradas (%)	27 A	9 B
Sementes mortas (%)	3 A	0 A
Sementes não germinadas (%)	0 B	39 A
Biometria das plântulas normais (mm)	51 A	37 B
Massa seca das plântulas normais (g)	0,4181 A	0,1913 B

Letras maiúsculas iguais entre coluna não representam diferença significativa de acordo com o teste t de Studenta 5% de probabilidade.

O aumento do teor de água é um parâmetro significativo para se analisar durante o envelhecimento das sementes, pode acontecer em virtude da umidade relativa do ar, pois a quantidade relativa de vapor de água presente no ar pode ser suficiente para o aumento do teor de água na semente. A umidade relativa associada a altas temperaturas são fatores que levam ao aumento da respiração das sementes, mobilização de reservas e liberação de energia, contribuindo para acelerar o processo de deterioração das sementes e conseqüentemente a perda de vigor e viabilidade (GUEDES *et al.*, 2011; YAGUSHI, 2011; MARCOS-FILHO, 2015). Assim, através do teste de envelhecimento acelerado é possível identificar sementes de alto vigor, estas devem manter sua viabilidade após o EA e as de baixo vigor, terão sua viabilidade reduzida.

É importante ressaltar que o envelhecimento fisiológico e o processo de deterioração das sementes, têm início antes da colheita e continua durante a colheita. O EA potencializa os efeitos, que vão desde alterações na integridade da membrana celular, alterações na atividade enzimática, redução na síntese proteica, danos ao material genético, podendo ocasionar a morte da semente. No entanto, as sementes

perdem seu vigor antes de perder a capacidade de germinar. Por isso, lotes de sementes que possuem valores semelhantes de germinação, pode ser diferente na idade fisiológica (extensão da deterioração), portanto se diferem quanto ao vigor e viabilidade das sementes (ISTA, 2009; SHABAN, 2013; PATI, 2019).

Oliveira *et al.* (2014), em estudo com envelhecimento acelerado a 42 e 45°C, por 48, 72 e 96 horas com sementes de *Jatropha curcas* obtiveram redução na germinação após o envelhecimento em relação ao tempo de exposição, ocorrendo reduções acentuadas para a temperatura a 45°C, já com a temperatura de 42°C a germinação foi menor para o tempo de 72 e 96 h. Concluíram neste trabalho que a deterioração nas sementes se torna mais intensa como o aumento do tempo de exposição. Mendes *et al.* (2010) avaliaram o potencial fisiológico de sementes de *Ricinus communis* após teste de envelhecimento acelerado a 100% UR a 41 e 45°C, durante 48, 72 e 96. Verificaram que a 41°C e 100% de UR no período de 72 horas de envelhecimento foi suficiente para permitir a separação dos lotes em diferentes níveis de vigor.

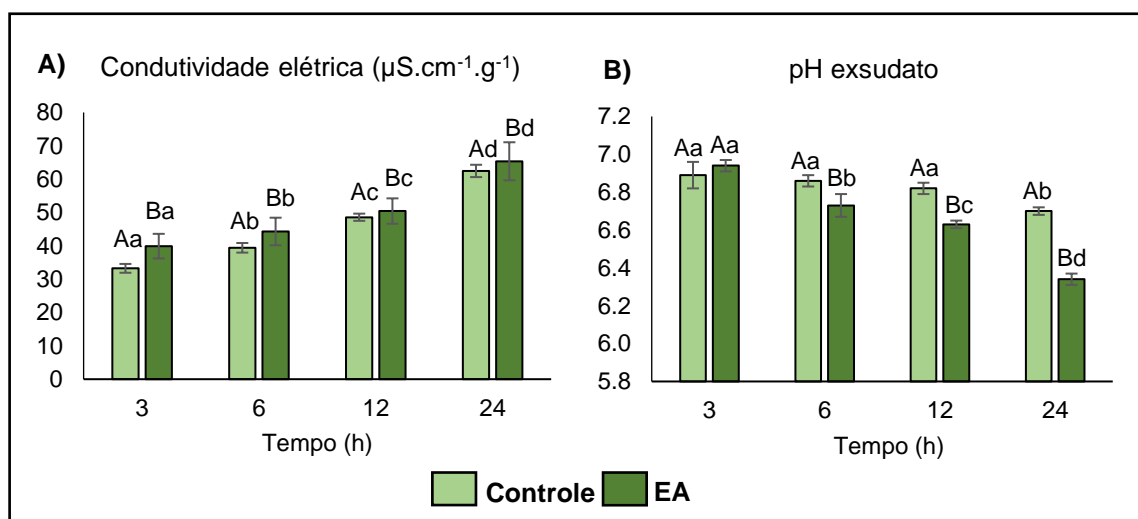
Seyyedi *et al.* (2018) em estudo de envelhecimento acelerado a 40°C e 100% UR por 96 horas com diferentes cultivares de canola, identificaram que há uma diferença significativa na germinação entre as cultivares, redução da germinação. Durante o processo de envelhecimento acelerado, parte das reservas das sementes podem ser oxidadas, reduzindo significativamente os fosfolipídios promovendo problemas nas membranas celulares, aumentando o tempo médio de germinação e reduzindo o vigor das sementes.

3.2.3 Determinação da condutividade elétrica e pH exsudato das sementes

A condutividade elétrica é utilizada para avaliar o vigor das sementes, baseando-se na permeabilidade das membranas, através a lixiviação de íons. O aumento da condutividade elétrica é proporcional ao aumento da deterioração nas sementes. Analisando o vigor das sementes da cultivar Nordeste na condição controle e tratamento, ocorreu um aumento significativo na condição após EA comparado ao controle ao longo dos tempos de três, seis, doze e vinte e quatro horas de embebição. Sendo significativo também o aumento da condutividade ao longo do tempo para ambas as condições de análise (Figura 37 A).

Outro dado importante, que pode ser correlacionado a condutividade elétrica são os dados de pH do exsudato das sementes, durante a liberação de exsudatos com o aumento da perda da integridade ou descontinuidade das membranas e com a consequente lixiviação de metabólitos como açúcares, ácidos orgânicos e íons H⁺, os quais acidificam o meio e provocam a diminuição do pH, como identificado no resultado abaixo. Após o tratamento o pH do meio reduziu significativamente ao longo do tempo de experimento, acontecendo também uma redução significativa ao comparar a pH do exsudato das sementes controles e após EA (Figura 37 B).

Figura 37 - (A) Condutividade elétrica ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$) do exsudato das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* do controle e sementes após serem submetidas ao EA durante dez dias a 40°C e 85% UR, imersas em 75 mL de água ultrapura, após diferentes períodos de embebição: 3, 6, 12 e 24 horas; (B) Valores do pH do exsudato das sementes medido no pHmetro durante os períodos de 3, 6, 12 e 24 horas.



Letras iguais maiúsculas nas colunas controle e EA representa que não há diferença estatística entre os tratamentos; letras iguais minúsculas nas barras controle e EA, representam que não há diferença significativa na mesma condição de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

Os dados encontrados para a condutividade elétrica das sementes e o pH do exsudato, podem ser correlacionados com os resultados encontrados na germinação da cultivar BRS 149 Nordestina (Figura 36 e Tabela 12). Fica claro que as sementes de Nordestina após o envelhecimento perdem seu vigor e consequentemente aumenta a deterioração nas sementes. Além disso, por se tratar de um lote de semente envelhecido naturalmente, ao ser submetido a condições estressantes, são mais susceptíveis, provavelmente perderam mecanismo de proteção natural da semente, em virtudes aos danos causados pelo envelhecimento natural. No entanto, ao se avaliar os resultados da cultivar BRS 188Paraguaçu (Capítulo 3), fica claro que sementes jovens, mesmo expostas a condições estressantes, possuem um

mecanismo de proteção que permite com que o vigor e qualidade não sejam afetados drasticamente.

Dos Santos *et al.* (2011), em estudo para avaliar o potencial fisiológico de diferentes lotes de sementes de soja, realizaram teste de condutividade elétrica e medida de pH para avaliar o vigor das sementes e separar os lotes de acordo com o vigor. A condutividade elétrica e o pH do exsudato das sementes foram alterados, no entanto, apenas o teste de condutividade elétrica foi eficiente na separação dos lotes de semente. No entanto, Barros e Marcos Filho (1990), utilizaram a medida do pH do exsudato para avaliar o vigor de diferentes lotes de sementes de soja e este foi eficiente para determinar o vigor dos lotes. Araújo e Silvia (2018), em seu estudo para a avaliação do potencial fisiológico de sementes de *Encholirium spectabile* também obtiveram resultados eficientes ao utilizar a medição do pH do exsudato para distinguir os lotes pelo seu vigor. Já Albuquerque *et al.* (2001), não obtiveram resultados eficientes com os testes de condutividade e pH para a avaliação das sementes de diferentes genótipos de girassol.

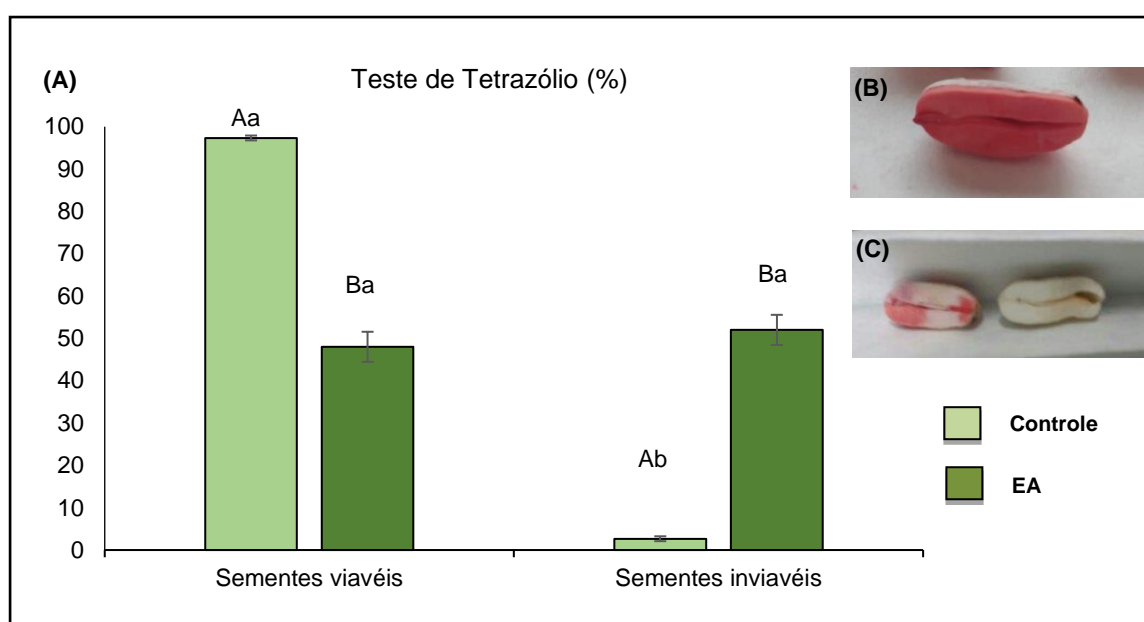
3.2.4 Teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio se mostrou um teste eficiente para determinar a viabilidade das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina. Houve diferença significativa entre a quantidade de sementes viáveis e inviáveis do controle em comparação com as sementes após EA (Figura 38).

O teste de tetrazólio pode ser correlacionado ao teste de germinação das sementes, o qual foi obtido uma germinação próxima a 100% para as sementes controle e de quase 60% para as sementes após EA (Figura 38). Já Pinto *et al.* (2009) em estudo para avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios x, concluíram que ambos os testes são eficientes para avaliar a viabilidade das sementes de pinhão manso. No entanto, Gaspar-Oliveira *et al.* (2009), em estudo da avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *R. communis* pelo teste de tetrazólio conseguiu correlacionar a qualidade dos cinco lotes de sementes com a viabilidade através do teste de tetrazólio, concluindo que os parâmetros estabelecidos são eficientes para a avaliação da viabilidade e promissor para a avaliação do vigor de sementes de mamona pelo teste de tetrazólio.

Segundo França Neto *et al.* (1999) o teste de tetrazólio tem se constituído uma importante alternativa para a determinação da viabilidade, principalmente pela eficiência e rapidez do teste, constitui-se na observação da coloração desenvolvidas em diferentes estruturas das sementes, sendo possível determinar a presença, a localização e a natureza das alterações nos tecidos analisados na semente, como a presença de deterioração.

Figura 38 - Teste de Tetrazólio do lote das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* do controle e após serem submetidas ao EA durante dez dias a 40°C e 85% UR. (A) Porcentagem de sementes viáveis; (B) Coloração das sementes viáveis e (C) Coloração das sementes inviáveis.



Letras iguais maiúsculas nas colunas controle e EA representa que não há diferença estatística entre os tratamentos; letras iguais minúsculas nas barras controle e EA, representam que não há diferença significativa na mesma condição de acordo com o teste Tukey a 5% de probabilidade.

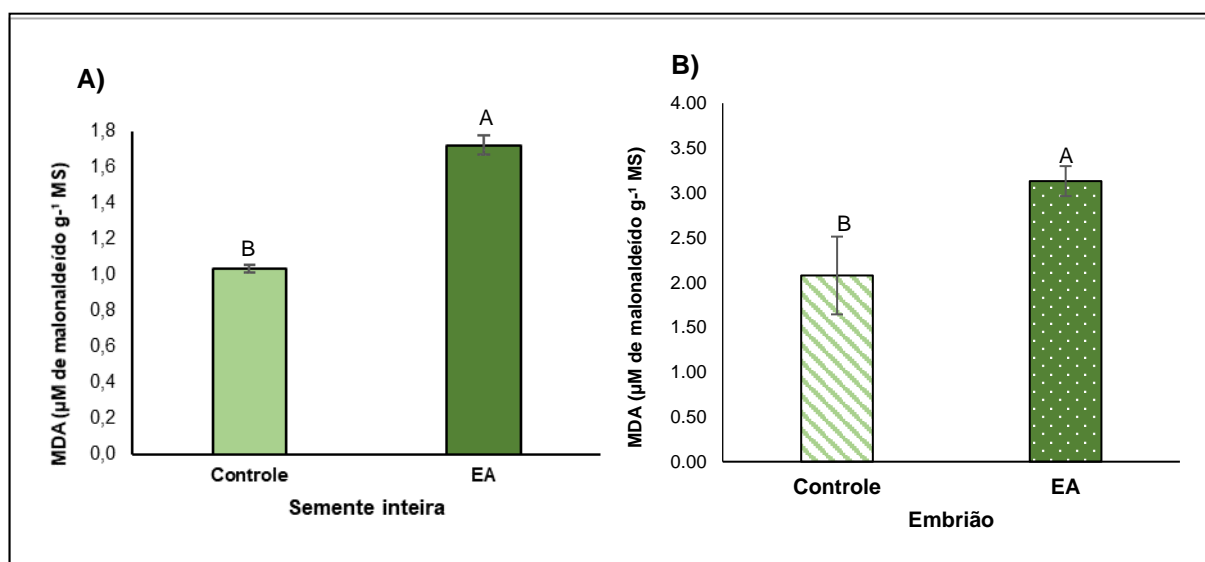
3.3 Peroxidação lipídica das sementes inteiras (sem tegumento) e embrião através da determinação de malonaldeído (MDA)

A produção de ERO acontece naturalmente, o problema é aumento exacerbado. O aumento descontrolado pode ser ocasionado por estresse biótico ou abiótico, e o envelhecimento também é um fator que gera o desbalanço na produção. O envelhecimento acelerado potencializa o efeito da deterioração nas sementes gerando os danos de membrana, através da peroxidação lipídica (LIMA e ABDALLA, 2001; FERREIRA e ABREU, 2007; SCHWEMBER e BRADFORD, 2010; ATAÍDE *et al.*, 2012).

A peroxidação lipídica gera subprodutos tóxicos, como a formação de malonaldeído (MDA), produto secundário gerado da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. A determinação de MDA é indicação de presença de estresse oxidativo, a depender do nível do dano pode existir colapso no sistema de troca de metabólitos, as alterações nas membranas levam a transtornos da permeabilidade, alterando o fluxo iônico e o fluxo de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas à célula caso seja extremo os danos pode ocorrer morte celular (BENZIE, 1996; LIMA e ABDALLA, 2001; FERREIRA e ABREU, 2007).

Os resultados do valor de MDA aumentam ao se comparar a condição controle e tratamento, nas duas análises: sementes inteiras e apenas embrião. No entanto, a peroxidação lipídica foi maior no embrião (Figura 39 A e B). Estes resultados podem ser correlacionados com os dados fisiológico obtidos neste estudo, justificando a redução do vigor e viabilidade das sementes após o TEA e pelo aumento da condutividade elétrica e redução do pH, devido ao aumento da lixiviação de íons ocorrido por danos na membrana (Figuras 37, 39).

Figura 39 – Determinação de malonaldeído (MDA) na cultivar BRS 149 Nordestina nas condições controle e após EA. (A) semente inteira sem tegumento e (B) Em embrião. (MS) massa seca.



Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Corte *et al.* (2010) ao avaliar a deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado, identificaram em seus resultados que houve uma redução progressiva no teor de lipídios no eixo embrionário

e cotilédones de sementes, devido ao aumento da deterioração. Resultados semelhantes foram observados tanto no armazenamento por 12 meses quanto no envelhecimento artificial por 72 horas. No entanto, no envelhecimento por 72 horas a peroxidação estabilizou a partir 24 horas, em ambos os compartimentos. O aumento da peroxidação de lipídios, mediado por radicais livres e peróxidos é uma das prováveis razões para a perda da viabilidade de sementes durante o armazenamento.

Já Lehner *et al.* (2008) em estudo sobre envelhecimento com grãos de trigo, através do armazenamento sob duas condições (45°C e 100% UR e 30°C e 75% UR) para investigar se a deterioração dos grãos durante o envelhecimento estava relacionada à peroxidação lipídica, verificaram uma diminuição na eficiência do sistema antioxidante. Entretanto, o conteúdo de MDA não mudou, sugerindo que não houve peroxidação de lipídeos durante esse envelhecimento das sementes. Resultado semelhante foi obtido com as sementes da cultivar Paraguaçu, na condição de análise de peroxidação lipídica no embrião, não houve um aumento significativo (Capítulo 3, Figura 20). Silvia *et al.* (2018) em estudo sobre armazenamento de sementes de *Jatropha curcas* durante dezoito meses, não verificaram aumento na produção de MDA, e não foi observada a relação entre a perda de viabilidade das sementes e o acúmulo de MDA. No entanto, os resultados obtidos no presente estudo, podem ser justificados por se tratar de sementes que tiveram seu envelhecimento natural e foram submetidas ao EA, provavelmente houve um aumento das ERO e os vários danos causados pelos estresses aos quais as sementes foram submetidas.

3.4 Determinação da atividade enzimática das enzimas antioxidantes:

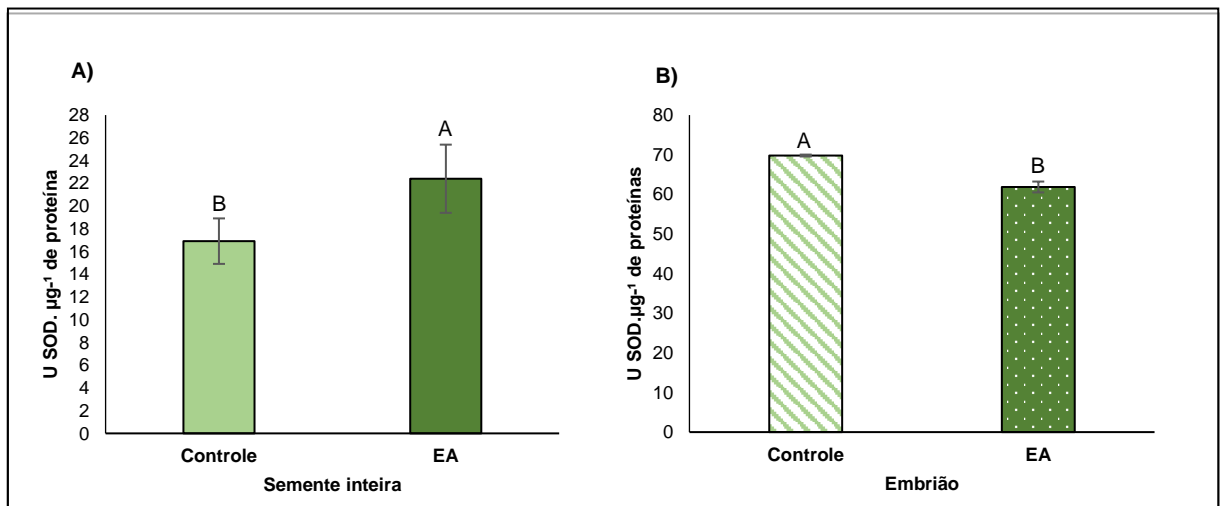
3.4.1 Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A SOD é a primeira enzima do sistema antioxidante a atuar na dismutação do superóxido, em peróxido de hidrogênio. A SOD apresentou um aumento significativo na atividade da semente inteira. No entanto, no embrião houve uma redução significativa na atividade, apesar dos valores da atividade SOD ser maior nas amostras de embrião em comparação a semente inteira. Isso pode ser justificado pelo fato de o embrião ser um tecido mais sensível e ser um tecido com alta atividade metabólica e que está em desenvolvimento. Além disso, a redução significativa no embrião pode ser justificada pelos efeitos das ERO na síntese de proteínas, que pode ter sido comprometido devido aos efeitos deletérios após o EA (Figura 40). Além disso,

houve perda de vigor das sementes, comprovada pelos dados anteriores demonstrados.

Bailly *et al.* (1996) avaliando envelhecimento acelerado em sementes de girassol a 45°C e umidade relativa 70 ou 100% verificaram que a atividade da SOD resistiu nos primeiros dias de envelhecimento, depois decaiu devido aos efeitos da alta temperatura e umidade na semente, de forma que a redução da atividade da SOD foi correlacionada com outros dados do trabalho, como a perda do vigor e a viabilidade da semente, caracterizado por uma redução na germinação das sementes.

Figura 40 – Atividade da Superóxido dismutase (U SOD.mg⁻¹ de proteína) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento e (B) Em embrião.



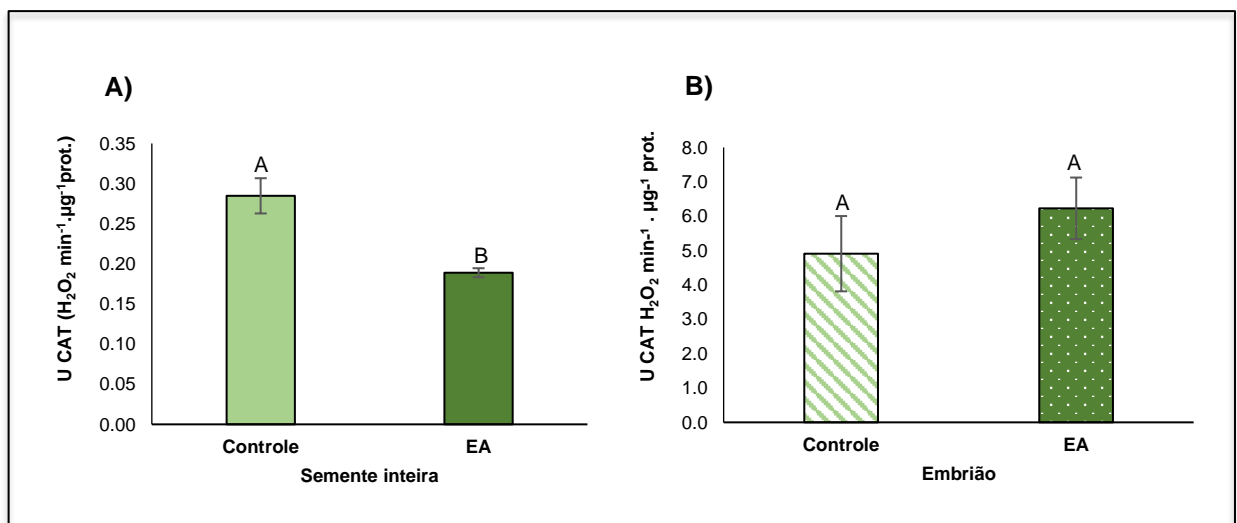
Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Moori *et al.* (2019) em estudo com semente de trigo sob envelhecimento acelerado a 40°C e 100% de umidade relativa, verificou a redução da atividade da SOD em virtude ao estresse oxidativo gerado pelo EA. Essa redução na atividade da SOD, pode ser justificado também, por se tratar de EA em uma semente oleaginosa, e estas se deterioram com o envelhecimento acelerado causado por danos nas sementes intimamente relacionados a uma diminuição nos parâmetros germinação, comprimento de plântulas, produção de matéria seca e índice de vigor (KUMAR *et al.*, 2019).

3.4.2 Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A catalase é uma enzima capaz de anular a toxicidade do peróxido de hidrogênio, capaz de decompor essa molécula em água e oxigênio. A CAT teve uma redução significativa na sua atividade na semente inteira, no entanto, sua atividade foi maior nas amostras de embrião, apesar de não haver uma alteração significativa (Figura 41).

Figura 41 – Atividade da Catalase ($\text{H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ prot.}$) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*, nas condições controle e após EA (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.



Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

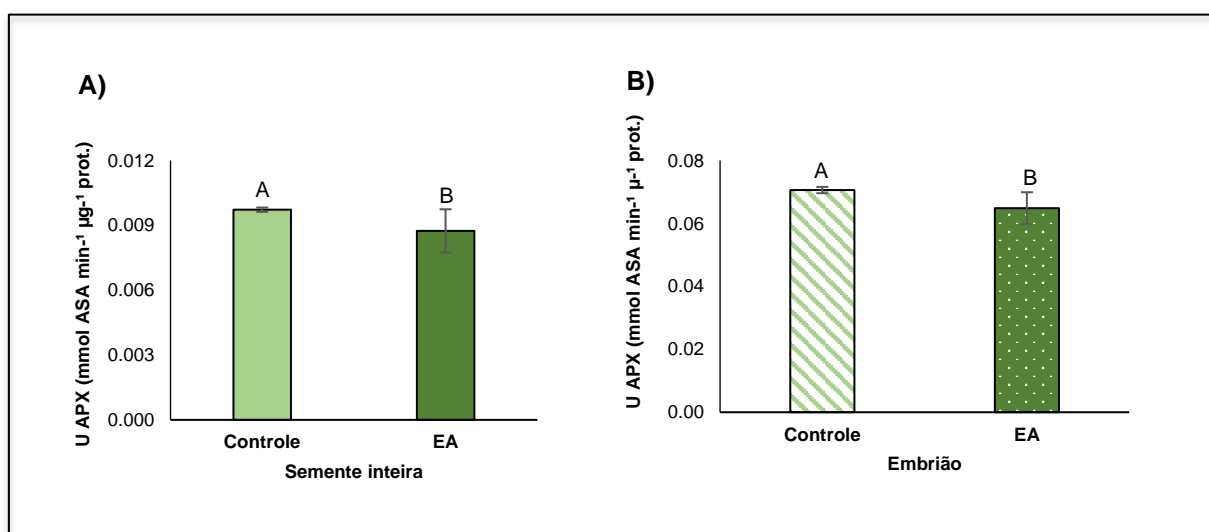
Nery *et al.* (2018) realizaram envelhecimento acelerado em sementes de gengilim, submetidas por 72h e solução de NaCl a 45°C por 48 horas, nos períodos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas. descreveram que houve redução na atividade dessa enzima resultando em uma menor prevenção contra os estresses oxidativos. Em geral a redução da atividade da CAT nas sementes, diminui o fluxo respiratório, reduzindo a capacidade do suprimento de energia (ATP) para a germinação das sementes em virtude do aumento na deterioração das sementes. Resultado semelhante foi obtido por Demirkaya *et al.* (2010) com as sementes de cebola após o envelhecimento acelerado, além da redução da atividade da CAT, também houve redução da atividade da SOD, corroborando com as evidências do envelhecimento que coincide com a desnaturação e degradação, inativação de enzimas, quebra de fosfolípidios, peroxidação lipídica, alterações na permeabilidade de membrana.

Resultado semelhante foi obtido com as sementes da cultivar Paraguaçu (Capítulo 3). Provavelmente a este resultado pode ser em virtude a existências de outras enzimas antioxidantes com a capacidade de decompor peróxido de hidrogênio ou pode corroborar com a hipótese de Bailly *et al.* (1996), que concluíram que a redução de uma enzima antioxidante pode estar ligada ao aumento da peroxidação lipídica e aumento dos efeitos de envelhecimento acelerado, ocorrendo uma relação entre vigor e atividade antioxidante (BAILLY *et al.*, 2000; BAILLY *et al.*, 2002).

3.4.3 Enzimas do ciclo do ascorbato/glutationa

A ascorbato peroxidase é uma enzima pertencente ao ciclo do AsA/GSH, esta enzima é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio na presença de ascorbato. A atividade da APX diminuiu significativamente após o tratamento do envelhecimento, nas condições de semente inteira e embrião, apesar da atividade da APX ser maior no embrião (Figura 42).

Figura 42 – Atividade da ascorbato peroxidase ($\text{mmol ASA min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.



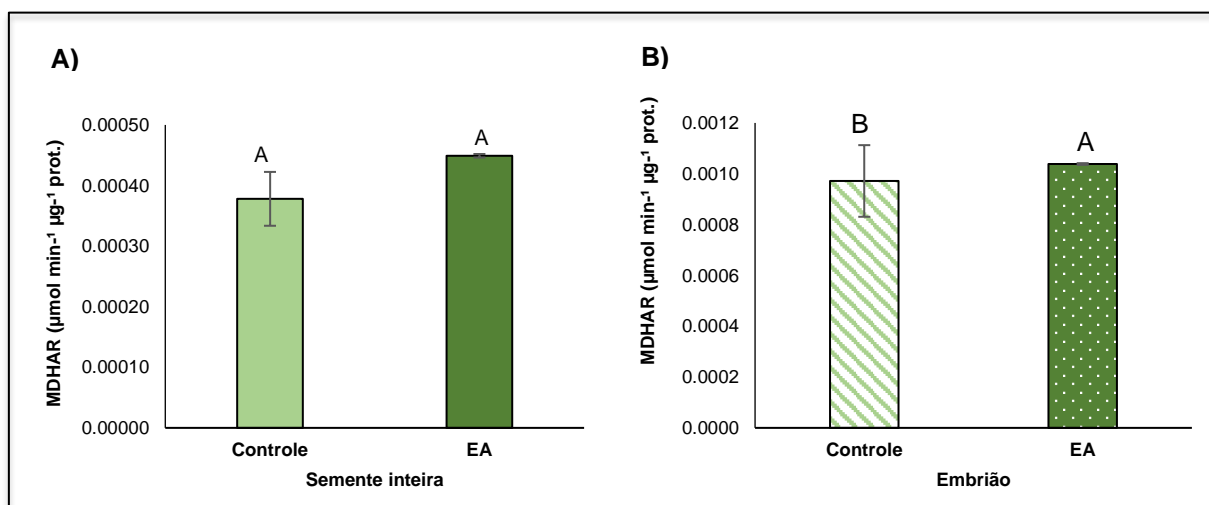
Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Bailly *et al.* (1998), em sobre envelhecimento acelerado com sementes de girassol, identificou em seus resultados que a APX não teve atividade nem nas sementes controle nem nas sementes após o envelhecimento. No entanto, Xin *et al.* (2014) avaliaram envelhecimento acelerado com sementes de soja e verificaram que a atividade da APX reduziu significativamente com os danos a sementes. Resultado semelhante foi encontrado por Goel e Sheoran (2003), em estudo sobre

envelhecimento natural, mostrando que a atividade da APX reduziu com o tempo, devido aos danos as sementes ocasionadas pelo envelhecimento natural. A atividade antioxidante foi correlacionada com os resultados fisiológicos, demonstrando que além da atividade antioxidante a germinação também foi decaindo. No entanto, o MDA e o peróxido de hidrogênio foi aumentando. Isso significa que os danos oxidativos foram aumentados com o tempo, de forma a danificar vários sistemas nas sementes, entre eles a síntese de proteína.

A MDHAR é capaz de produzir AsA usando o MDHA como substrato, através da redução do $\text{NADPH} + \text{H}^+$. A atividade da MDHAR apresentou um aumento significativo apenas nas amostras do embrião (Figura 43, B). Isso significa que mesmo com a produção de AsA no embrião a atividade da APX foi independente da presença de substrato, reafirmando que os danos nas sementes foram significantes para interferir na maquinaria de síntese proteica.

Figura 43 – Atividade da Monodehidroascorbato redutase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.



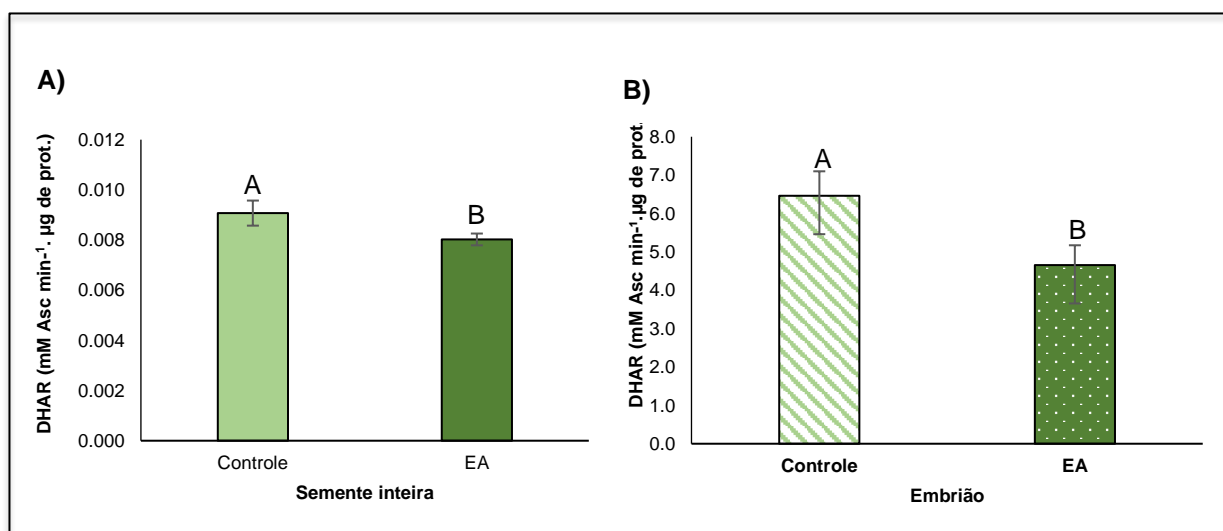
Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Yin *et al.* (2014), em estudo com envelhecimento com sementes de arroz, identificaram redução significativa da MDHAR, em correlação com a redução significativa na germinação, assim como a atividade da CAT e APX. Xin *et al.* (2014) em estudos para avaliar o efeito do envelhecimento artificial nas mitocôndrias das sementes de soja, ao avaliar a atividade antioxidantes de algumas enzimas na remoção de ERO, verificou em seu estudo que o envelhecimento acelerado afetou

significativamente algumas enzimas, dentre elas estão a SOD, APX, MDHAR, DHAR e GR.

A DHAR é uma enzima importante para fornecer AsA para a APX decompor o peróxido de hidrogênio, esta é capaz de oxidar a GSH para reduzir do DHAR em AsA. A atividade da DHAR reduziu significativamente após o EA nas sementes inteiras e apenas embrião (Figura 44). O que significa, que os danos do envelhecimento foram drásticos de forma que a DHAR não é capaz de reduzir o DHA em AsA.

Figura 44 – Atividade da Dehidroascorbato redutase ($\text{mM GSSG min}^{-1} \cdot \mu\text{g de prot.}$) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.



Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

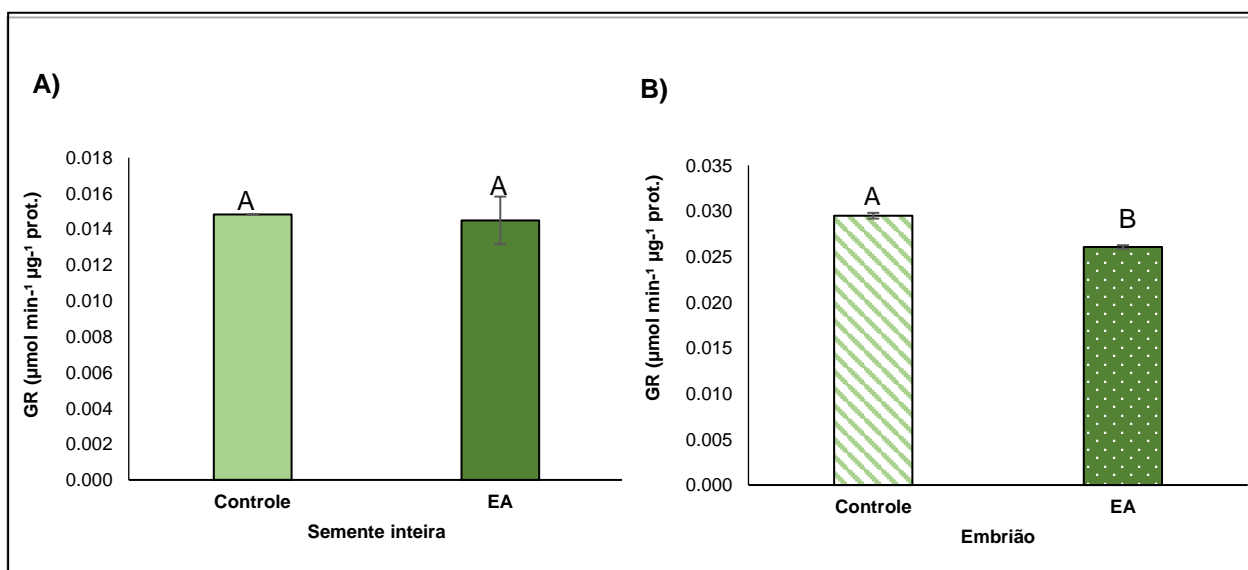
Zhao *et al.* (2017) em estudo sobre envelhecimento natural de semente em ambiente úmido e seco, verificaram que houve uma relação positiva e significativa entre capacidade de germinação e teor de umidade. As sementes em tratamento seco acumularam H_2O_2 significativamente maior do que no tratamento úmido. A atividade da superóxido dismutase, ascorbato peroxidase, dehidroascorbato redutase e guaicol peroxidase foi significativamente maior do que no tratamento seco. Neste estudo o vigor das sementes foi associado a umidade e a eliminação do conteúdo de peróxido de hidrogênio.

Xia *et al.* (2015) em estudo sobre envelhecimento de sementes de aveia, avaliaram as sementes com umidade de 4, 10 e 16%, mantidas durante 0, 8, 16, 24, 32 e 40 dias de exposição das sementes a 45°C. A atividade da DHAR e GR decaiu

entre 32 e 40 dias e a atividade das enzimas foram maiores a 4 do que 10% de umidade, e a 16% as atividades decaíram totalmente. O nível da umidade provavelmente acelerou a deterioração das sementes, mas as enzimas antioxidantes foram um fator chave para o reparo dos danos da peroxidação lipídica e manutenção da integridade da ultraestrutura celular das sementes envelhecidas em aveia durante a embebição.

A glutatona redutase é capaz de oxidar o $\text{NADPH} + \text{H}^+$ para reduzir a glutatona oxidada que pode ser utilizada na sua forma reduzida pela DHAR ou a GST e GPX. A atividade GR foi caracterizada por uma redução significativa no embrião, o que provavelmente afetou a atividade da DHAR em virtude da ausência de glutatona reduzida para a produção de AsA, reduzindo a disponibilidade de substrato para a APX (Figura 45, B).

Figura 45 – Atividade da Glutaciona redutase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.



Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

Goel e Sheoran (2003) avaliaram o envelhecimento natural em sementes de algodão, e descreveram que a redução da germinação está relacionada com o aumento do acúmulo de peróxido de hidrogênio e o aumento da quantidade de MDA, devido ao aumento da deterioração das sementes. E a atividade da GR decaiu, juntamente com a atividade da SOD, CAT, APX, POX. O resultado apoia a hipótese que as sementes de algodão envelhecidas, ocorre deterioração devido a peroxidação

lipídica causando desequilíbrio entre ERO e o sistema antioxidante. Bailly *et al.* (1996) ao avaliar a deterioração das sementes de girassol, relacionaram a baixa da viabilidade da sementes em virtude dos danos ocasionados pelo envelhecimento, como redução da germinação aumento do MDA e da condutividade elétrica com a redução da atividade antioxidante da SOD, CAT e GR. Bailly *et al.* (1998) verificaram que as ERO aumentam o efeito do envelhecimento das sementes, reduzindo a germinação e aumentando a quantidade de MDA, além de ser caracterizado pelo decréscimo na atividade da CAT e GR.

As enzimas do ciclo da ascorbato/glutathiona apresentaram alterações significativa nas amostras do embrião do cultivar Nordesteína após o EA, provavelmente por se tratar de uma estrutura sensível as alterações aos efeitos da umidade e temperatura, devido aos danos oxidativos gerados, marcados pela redução na germinação, aumento da peroxidação lipídica, aumento da condutividade elétrica redução de enzimas antioxidantes, havendo uma correlação entre os danos oxidativos, aumento da deterioração, perda da viabilidade e decréscimo da atividade antioxidante.

3.4.4 Glutathiona peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9)

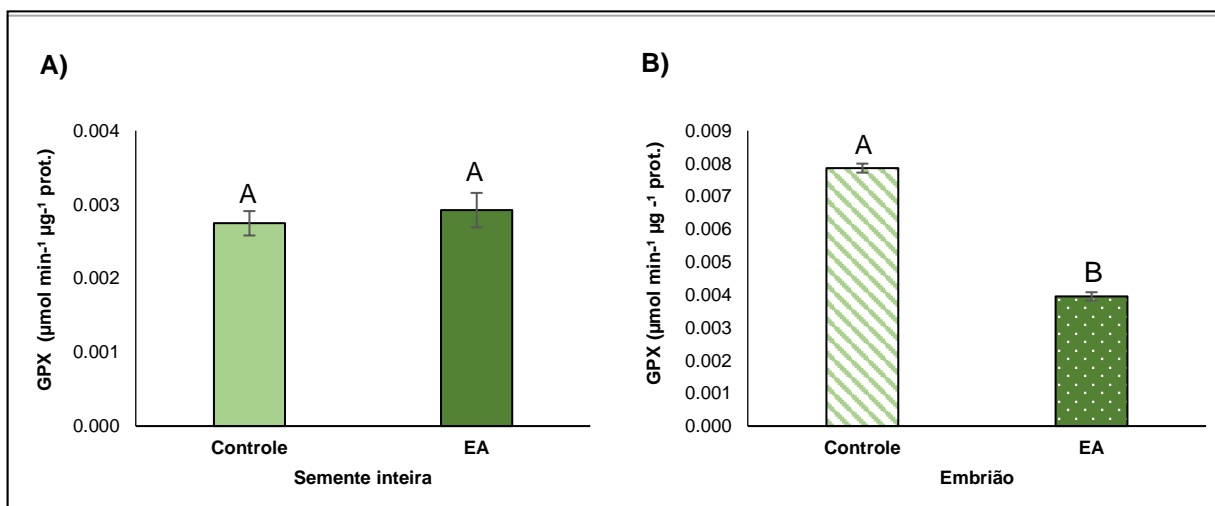
A GPX é capaz de decompor o peróxido de hidrogênio em água, através da redução de GSH. A atividade da GPX apresentou uma redução significativa na condição de análise em embrião após o TEA, essa redução pode ser correlacionando com a atividade da GR (Figura 46, B).

Carta *et al.* (2018) ao avaliar o efeito do envelhecimento em sementes de *Ranunculus baudoti*, analisaram o efeito da umidade e temperatura sob a semente no solo, a atividade da GPX na semente. Houve aumento da atividade da GPX durante o envelhecimento da semente e em condições de maior umidade. A ativação do sistema antioxidante, mesmo em condições desfavoráveis, pode recuperar sementes uma vez que todos os processos de proteção possam atuar.

A atividade da GPX pode ser correlacionada com a atividade da SOD, CAT e APX, e nenhuma destas enzimas teve um aumento na sua atividade no embrião, pelo contrário a CAT não apresentou alteração significativa e a SOD e APX, assim como a GPX, tiveram uma redução significativa na atividade, provavelmente devido ao

acúmulo de danos na semente e um provável dano na síntese de enzimas, devido ao comprometimento no sistema bioquímico e molecular das sementes.

Figura 46 – Atividade da Glutaciona peroxidase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot}$) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.



Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

3.4.5 Glutaciona S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)

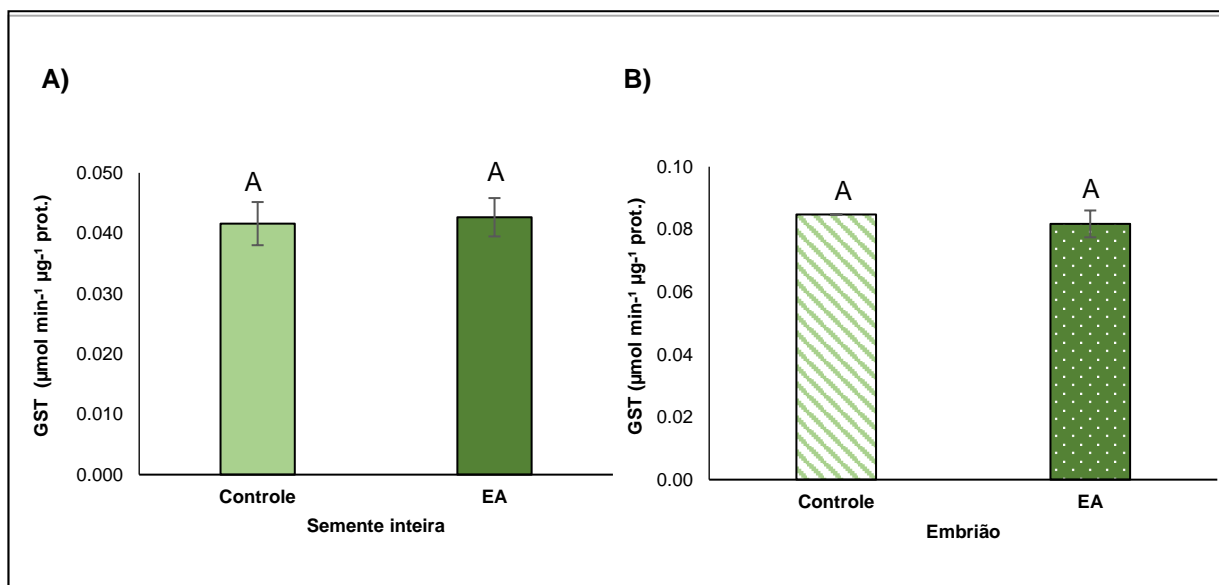
A GST é capaz de reduzir a toxicidade de compostos xenobióticos e pode atuar como uma peroxidase. No entanto, esta enzima não apresentou alteração significativa em nenhuma das condições analisadas (Figura 47, A e B).

Hsu e Sung (1997) avaliaram sementes de melancia envelhecidas, identificou em seus resultados que alterações acentuadas nos níveis de GSH e GSSG durante o envelhecimento podem estar associados com alterações simultâneas na atividade da GRA, GST e GP.

As sementes apresentam um sistema antioxidante enzimático e não enzimático para eliminar ERO. No entanto, quando o estresse na semente é muito intenso há um desbalanço entre a produção de antioxidantes e ERO, de forma a aumentar consideravelmente a produção de ERO, que pode levar as sementes a uma cascata de eventos que inicia a peroxidação de lipídios, degradação de membrana, inibição de síntese proteínas, alteração no material genético, entre outros. Esses danos irão aumentar a deterioração das sementes, levando as mesmas a morte celular. Por isso,

a importância de avaliar as sementes através de seus dados fisiológicos, bioquímicos e moleculares.

Figura 47 – Atividade da Glutaciona S-transferase ($\mu\text{mol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1} \text{prot.}$) das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis* nas condições controle e após EA. (A) Semente inteira sem tegumento (B) Em embrião.



Letras maiúsculas iguais entre barras não representam diferença significativa de acordo com o teste t de student a 5% de probabilidade.

3.5 Correlação entre as enzimas antioxidantes

Como visto no Capítulo 3, o coeficiente de correlação de Pearson (r) leva em consideração uma correlação forte, positiva e direta ($r = 1$) e correlação forte, negativa e inversamente proporcional ($r = -1$) (GALARÇA *et al.*, 2010; ROSA *et al.*, 2006). Foi avaliado a correlação das enzimas antioxidantes e levando em consideração os parâmetros de análise do trabalho: condição controle, envelhecimento acelerado, semente inteira e embrião. Verificou-se que a APX apresentou uma correlação forte, positiva e direta com a DHAR e uma correlação forte, negativa e inversamente proporcional com SOD, GST e GPX. A DHAR apresentou correlação forte, negativa e inversamente proporcional com SOD, CAT e GPX. A SOD apresentou apenas correlação forte, positiva e direta com CAT e GST. A CAT teve uma correlação forte, positiva e direta com GST e uma correlação forte, negativa e inversamente proporcional com a MDHAR. A GST também, apresentou uma correlação forte, negativa e inversamente proporcional com a MDHAR. A MDHAR e a GR apresentaram correlação forte, positiva e direta, apenas com a APX. E a GPX, apenas com a CAT (Tabela 13).

As únicas enzimas que apresentaram apenas uma correlação forte, positiva e direta foram a APX, DHAR e CAT. E a SOD, MDHAR e GPX. No entanto, a GST foi a única que apresentou uma correlação forte positiva e negativa, quando comparadas as outras enzimas. As enzimas APX e CAT são capazes de decompor o peróxido de hidrogênio, a DHAR é uma enzima do ciclo da ascorbato-glutationa responsável pela produção de ascorbato, substrato que utilizado pela APX na decomposição do peróxido. A SOD, realiza a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio, um composto menos tóxico para a célula. A GPX atua na decomposição de peróxido de hidrogênio em água e a MDHAR possui um papel importante no ciclo do ascorbato-glutationa, na oxidação do NADPH + H⁺ e formação de ascorbato. A GST pode atuar na desintoxicação de compostos xenobióticos ou atuar como peroxidase na decomposição do peróxido de hidrogênio (GUPTA *et al.*, 2010; HASANUZZAMAN *et al.*, 2012; SHARMA *et al.*, 2012; GALLÉ *et al.*, 2019; HU *et al.*, 2019; ROHMAN *et al.*, 2019).

Tabela 13 – Correlação de Pearson entre os dados das enzimas antioxidantes das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina de *R. communis*. Glutationa S-transferase (GST), Monodehidro ascorbato redutase (MDHAR), Superóxido dismutase (SOD), Glutationa redutase (GR), Catalase (CAT), Glutationa peroxidase (GPX), Ascorbato peroxidase (APX), Dehidroascorbato redutase (DHAR).

	APX	DHAR	SOD	CAT	GST	MDHAR	GR	GPX
APX	1	0.93204	-0.70207	-0.42431	-0.62404	0.15927	-0.53771	-0.84596
DHAR	1.02E-01	1	-0.62501	-0.19765	-0.34658	-0.18426	-0.59521	-0.98043
SOD	0.01092	0.02977	1	0.85322	0.79885	-0.44278	-0.21105	0.59411
CAT	0.16921	0.53805	0.00042	1	0.93364	-0.83088	-0.49307	0.11374
GST	0.03010	0.26975	0.00183	9.06E-02	1	-0.85302	-0.18225	0.21080
MDHAR	0.6210	0.56646	0.14944	0.00081	0.00042	1	0.44360	0.32959
GR	0.07137	0.04118	0.51025	0.10335	0.57077	0.14859	1	0.54350
GPX	0.00052	2.19E-04	0.04165	0.72487	0.51077	0.29547	0.06779	1

4. CONCLUSÃO

A melhor condição para testar a germinação das sementes da cultivar BRS 149 Nordestina e com o uso de sementes escarificadas, principalmente pelo fato de existir uma dormência tegumentar nestas sementes.

As sementes da cultivar BRS 149 Nordestina, mesmo após envelhecimento natural, se mostraram viáveis para uso.

Apesar do aumento da umidade das sementes não ser significativo, o EA se mostrasse como um teste quando as sementes já estão envelhecidas naturalmente, como é o caso do lote da cultivar BRS 149 Nordestina.

O EA gera aumento na condutividade elétrica e redução do pH do exsudato das sementes, comprovando a existência de danos de membrana gerados após o envelhecimento.

A viabilidade das sementes envelhecidas naturalmente, após o teste de envelhecimento acelerado reduz em cerca de cinquenta por cento.

A peroxidação lipídica das sementes aumenta após o EA, sendo identificado o aumento de MDA nas sementes tanto na condição de semente inteira como em embrião.

A atividade da SOD, APX, DHAR apresentaram alteração significativa nas sementes inteiras e em embrião após o EA. A SOD aumentou significativamente na semente após o EA e a APX e DHAR apresentou redução significativa. No entanto, em embrião a SOD, APX, DHAR apresentaram redução significativa após EA. Já MDHAR, GR e GST, apresentou alteração significativa apenas em embrião após o EA, na MDHAR ocorreu um aumento significativo, na GR e GST redução significativa.

A GST não é uma enzima interessante para avaliar sementes envelhecidas naturalmente que foram submetidas a EA.

As enzimas SOD, APX, DHAR podem ser consideradas como marcadores bioquímicos de envelhecimento natural e EA de sementes de *R. communis*.

5. REFERÊNCIA

ABREU, L. A. de S.; CARVALHO, M. L. M.; PINTO, C. A. G.; KATAOKA, V. Y.; SILVIA, T. T. de A. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Journal of Seed Science**, v. 35, n. 2, p.240-247, 2013.

Agricultura familiar dependente de chuva no Semiárido / Roseli Freire de Melo, Tadeu Vinhas Voltolini, editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa, 2019. 467 p.

ALBUQUERQUE, M. C. F. E.; MORO, F. V.; FAGIOLI, M.; RIBEIRO, M. C. Testes de condutividade elétrica e de lixiviação de potássio na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de girassol. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 23, n. 1, p.1-8, 2001.

ALFENAS, A. C. Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos. 2ª Ed. Viçosa: Ed.UFV, 2006.

ALVES, E.; CAVARIANI, C.; CORRÊA, M. R.; SOUZA, F. L. G.; CORRÊA, T. M.; NAKAGAWA, J. Efeito dos períodos de envelhecimento na lixiviação de íons e de proteínas solúveis em sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 2, p. 119-125, 2004.

ARALDI, C. G.; COELHO, C. M. M. pH do Exsudato na Avaliação da Viabilidade de Sementes de *Araucaria angustifolia*. **Floresta e Ambiente**, n. 22, v.3, p. 426-433, 2015.

ARAÚJO, A. V.; SILVIA, M. A. D. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FISIOLÓGICO DE SEMENTES DE *Encholirium spectabile* Mart.ex Schult. e Schult. f. **Ciência Florestal**, v. 28, n. 1, p. 56-66, 2018.

ATAÍDE, G. M.; FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de *Pterogyne nitens* Tull. Durante o envelhecimento artificial. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 71-76, 2012.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Antioxidant systems in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seeds as affected by priming. **Seed science research**, v. 10, p.35-42, 2000.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; COME, D. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia plantarum**, v. 97, p. 104-110, 1996.

BAILLY, C.; BENAMAR, A.; CORBINEAU, F.; CÔME, D. Free radical scavenging as affected by accelerated ageing and subsequent priming in sunflower seeds. **Physiologia Plantarum**, v. 104, p. 646-652, 1998.

BAILLY, C.; BOGATEK-LESZCZYNSKA, R.; CÔME, D.; CORBINEAU, F. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. **Seed science research**, v.12, p.47-55, 2002.

BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S.; TATIĆ, M.; ĐORĐEVIĆ, V.; NIKOLIĆ, Z; ĐUKIĆ, V. Seed viability of oil crops depending on storage conditions. **Helia**, v. 33, n. 52, p.153-160, 2010.

BARBOSA, K. B. R; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; OLIVEIRA DE PAULA, S.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v.4, n. 23, p. 629-643, 2010.

BARROS, A. S. R.; MARCOS FILHO, J. Testes para avaliação rápida da viabilidade de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 25, n. 10, p.1447-1459,1990.

BEAUCHAMP, C. O; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Biochemical Journal**, v. 44, p. 276-287, 1971.

BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Science**, v.47, p.233-261, 1996.

- BERGMEYER, N. Methoden der enzymatischen analyse. **Akademie Verlag**, v. 1, p. 636-647, 1970.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds: Physiology of Development and Germination. Second Edition. Plenum Press, New York, 1994.
- BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. 3rd ed. New York: SpringerVerlag, 2013. 376 p.
- BORGES, S.; BORGES, E. E. L.; CORREA, P. C.; BRUNE, A. Equilíbrio higroscópico e viabilidade de sementes de angico-vermelho (*Anadenanthera peregrina* (L.) Speng) em diferentes condições ambientais de armazenamento. **Scientia Forestalis**, v. 37, n. 84, p. 475-481, 2009.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRAGA JÚNIOR, J. M. **Maturação, qualidade fisiológica e testes de vigor em sementes de mamona**. 2009, 138 f. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.
- BRAGA JUNIOR, J. M.; ROCHA, M. S.; BRUNO, R. L. A.; VIANA, JEANDSON, S. V.; BELTRÃO, N. E. M. Teste de envelhecimento acelerado em sementes de mamona cultivar BRS – Energia. **Revista Eletrônica de Biologia**, v. 4, n. 1, p. 88-101, 2011.
- BRASIL. **Regras para análise de sementes**. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.
- CABRERA, A. C.; PESKE, S. T. Testes do pH do exsudato para sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, n. 1, p. 134-140, 2002.
- CAMARGO, R.; CARVALHO, M. L. M. Armazenamento a vácuo de semente de milho doce. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 1, p.131-139, 2008.
- CANGUSSÚ, V. S.; DAVID, A. M. S. S.; AMARO, H. T. R. A.; ASSIS, M. O. Efeito do tamanho de sementes no desempenho fisiológico de feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, v. 19, n. 1, p. 73-81, 2013.
- CARNEIRO, M. M. L. C.; DEUNER, S.; OLIVEIRA, P. V.; TEIXEIRA, S. B.; SOUSA, C. P.; BACARIN, M. A.; MORAES, D. M. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v.33, n.4, p.754-763, 2011.
- CARTA, A.; BOTTEGA, S.; SPANÒ. Aerobic environment ensures viability and anti-oxidant capacity when seeds are wet with negative effect when moist: implications for persistence in the soil. **Seed Science Research**, v. 28, n. 1, p. 16-23, 2018.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. Sementes, Ciência, Tecnologia e Produção. 4º Ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.

Cassia leptophylla. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 11, n. 21, p.1800-1808, 2015.

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: ZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. (Ed.). O agronegócio da mamona no Brasil. 2. ed. Ampina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 417-448.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; LEITE, H. G. L.; PEREIRA, B. L. C.; GONÇALVES, J. F. C. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 1 p.083-091, 2010.

CORTINES, E.; BIANQUINI, L. A.; DIAS, A. H. de S.; OLIVEIRA JUNIOR, J. Q.; BREIER, T. B. Superação de Dormência em Sementes da Liana *Abrus precatorius* L. **Floresta e Ambiente**, v. 17, n. 2, p. 98-103, 2010.

DAVID, A. M. S. de S; ARAÚJO, E. F.; ARAÚJO, R. F.; DIAS, D. C. F.; NOBRE, D. A. C.; NETA, I. C. S. Envelhecimento acelerado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Ricinus communis* L. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.8, n.4, p. 517-521, 2013.

DE PAULA, Alyne Dantas. **Vigor relativo: uma nova abordagem para classificação de lotes de sementes**. 2020, 58.f. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2020.

DEL RIO, L.; PASTORI, G. M.; PALMA, J. M.; SANDALIO, L. M.; SEVILLA, F.; CORPAS, F. J.; JIMÉNEZ, A; LÓPEZ-HUERTAS, E.; HERNÁNDEZ, J. A. The activated oxygen role of peroxisomes in senescence. *Plant Physiology*, v. 116, p. 1195-12000.

DELOUCHE, J. C. An accelerated aging technique for predicting relative storability of crimson clover and tall fescue seed lots. **Agronomy Abstracts**, v. 40, n.1, p. 40, 1965.

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. O teste de tetrazólio para viabilidade da semente. **AGIPLAN**, p. 103, 1976.

DEMIRKAYA, M.; DIETZ, K. J.; SIVRITEPE, H. O. Changes in Antioxidant Enzymes during Ageing of Onion Seeds. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici**, v. 38, n.1, p. 49-52, 2010.

DESIMONE, M.; HENK, A.; WAGNER, E. Oxidative stress induces partial degradation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in isolated oat chloroplasts. **Plant Physiology**, v. 111, p. 789-803, 1996.

DIAS, D.C.F.S.; MARCOS FILHO, J. Testes de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Scientia Agricola**, v.53, n.1, p.31-42, 1996.

DIAS, L. B. X.; QUEIROZ, P. A. de M.; FERREIRA, L. B. da S.; FREITAS, M. A. M. F.; LEÃO- ARAÚJO, E. F.; SILVA, P. P.; NASCIMENTO, W. M. Accelerated ageing as a vigour test on chickpea seeds. **Australian Journal of Crop Science**, v. 14, n. 02, p. 339-346, 2020.

DOS SANTOS, J. F.; ALVARENGA, R. O.; TIMÓTEO, T. S.; CONFORTO, E. C.; MARCOS FILHO, J.; VIEIRA, R. D. Avaliação do potencial fisiológico de lotes de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p.743 - 751, 2011.

Drotar, A., Phelps, P., and Fall, R. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. **Plant Science**, v. 42, p. 35—40, 1985.

FARHADI, R.; RAHMANI, M. R.; SALEHI BALASHAHRI, M.; SADEGHI, M. The effect of Artificial ageing on germination components and seedling growth of Basil (*Ocimum basilicum* L.) seeds. **Journal of Agriculture and Food Technology**, v. 2, n. 4, p. 69-72, 2012.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, n.2, p.01-08, 2007.

FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, L. M.; TONETTI, O. A. O.; DAVIDE, A. C. Comparação da viabilidade de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake – leguminosae caesalpinioideae, pelos testes de germinação e tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p.83-89, 2007.

Fisiologia vegetal / Luciano Zucuni Pes, Marlon Hilgert Arenhardt. - Santa Maria, RS : Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Politécnico, Rede e-Tec Brasil, 2015. 81 p.

FOGAÇA, J. J. N. L.; SILVA, R. A.; SANTOS, J. S.; NUNES, R. T. C.; FERREIRA, L. L.; MORAIS, O. M. Physiological quality of Creole castor seeds var. Carrapatinho depending on the raceme position. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 40, n.1, p. 87-93, 2017.

GALARÇA, S. P.; LIMA, C. S. M.; SILVEIRA, G.; RUFATO, A. de R. Correlação de pearson e análise de trilha identificando variáveis para caracterizar porta-enxerto de *Pyrus communis* L.. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 860-869, 2010.

GARLET, J.; SOUZA, G. F.; DELAZERI, P. Teste de tetrazólio em sementes de *Cassia leptophylla*. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 11, n. 21, p.1800-1808, 2015.

GASPAR-OLIVEIRA, C.; MARTINS, C.; NAKAGAWA, J. **Método de preparo das sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) para o teste de tetrazólio**. *Revista Brasileira de Sementes*, Botucatu, v. 31, n. 1, p.160-167, 2009.

GIANOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide Dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309-314, 1977.

GILL, S. S. e TUTEJA, N. Reactive species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Deli, v.48, p. 909-930, 2010.

GOEL, A.; SHEORAN, I. S. Lipid peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 429-434, 2003.

GUEDES, R. S.; ALVES, E. U.; OLIVEIRA, L. S. B.; ANDRADE, L. A.; GONÇALVES, E. P.; MELO, P. A. R. F. Envelhecimento acelerado na avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Fr. All. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 2, p. 443-450, 2011.

HARTMANN FILHO, C. P.; GONELI, A. L.; MASETTO, T. E.; MARTINS, E. A. S.; OBA, G. C. The effect of drying temperatures and storage of seeds on the growth of soybean seedlings. **Journal of Seed Science**, v.38, n.4, p.287-295, 2016.

HASANUZZAMAN, M. HOSSAIN, M. A. SILVA, J. A. T. S. FUJITA, M. Plant Response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In: VENKATESWARLU, B; SHANKER, A. K.; SHAKER, C.; MAHESWARI, M. **Crop stress and its management: perspectives and strategies**. New York: Springer; 2012. p. 261-301.

HEATH, R.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts I. Kinetics and Stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 125, p. 189-198, 1968.

HSU, J. L.; SUNG, J. M. Antioxidant role of glutathione associated with accelerated aging and hydration of triploid watermelon seeds. *Physiologia Plantarum*, v. 100, p. 967-974, 1997.

INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. International Rules for Seed Testing. Bassersdorf: ISTA, 2004. p.5.1- 5.5; 5A.1- 5A.50.

JESUS, Thamires Soares Ricardo. **Marcadores fisiológicos e bioquímicos da qualidade de sementes de *Ricinus communis* L. submetidas a diferentes condições de armazenamento**. 2016, 143 f. Dissertação apresentada ao programa Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular PMBqBM/UFBA, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

JOOSEN, R. V. L.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A. J.; LIGTERINK, W.; PLAS, L. H. W. V. P.; HILHORST, H. W. M. Germinator: a software package for highthroughput scoring and curve fitting of arabidopsis seed germination. **The Plant Journal**, Malden, v.62, p. 148-159, 2010.

JYOTI; MALIK, C. P. Seed deterioration: a review, **International Journal of Life science and Pharma Reviews**, v. 2, n. 3, p. 374-385, 2013.

KAPOOR, R.; ARYA, A.; SIDDIQUI, M.A.; AMIR, A.; KUMAR, H. Seed Deterioration in Chickpea (*Cicer arietinum*L.) under Accelerated Ageing, **Asian Journal of Plant Sciences**, v. 9, n. 3, p. 158-162, 2010.

KAUTH, P. J.; BIBER, P. D. Moisture content, temperature, and relative humidity influence seed storage and subsequent survival and germination of *Vallisneria americana* seeds. **Aquatic Botany**, v. 120, p. 297–303, 2014.

KOBORI, N. K.; CICERO, S. M.; MEDINA, P. F. Teste de raios-X na avaliação da qualidade de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 1, p. 125 - 133, 2012.

- KUMAR, M. V.; EEVERA, T.; RAMESH, D.; MASILAMANI, P. Seed deterioration in long lived sesame seeds under accelerated ageing conditions. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 3, p. 706-709, 2019.
- KUREK, K.; PLITTA-MICHALAK, B.; RATAJCZAK, E. Reactive Oxygen Species as Potential Drivers of the Seed Aging Process, **Plants**, v. 8, n. 174, 2019.
- LEE, S. E.; SHIN, H-T.; HWANG, H. J.; KIM, J. H. Antioxidant Activity of Extracts from *Alpinia katsumadai* Seed. *Phytother Research*, v. 17, p. 1041-1047, 2003.
- LEHNER, A.; MAMADOU, N.; POELS, P.; CÔME, D.; BAILLY, C.; CORBINEAU, D. Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. **Journal of Cereal Science**, v. 47, p.555–565, 2008.
- LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 3, p. 01-12, 2001.
- LIMA, M. G. S.; MENDES, C. R.; MORAES, D. M.; LOPES, N. F.; RODRIGUES, M. A. V. Caracterização da Qualidade Fisiológica de Sementes de Mamona Cultivar Guarani. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, n. 2, p. 675-677, 2007.
- LOEFFLER, T.M.; TEKRONY, D.M.; EGLI, D.B. The bulk conductivity test as an indicator of soybean seed quality. **Journal of Seed Technology**, v.12, n.1, p.37-53,1988.
- LORENTZ, L. H.; NUNES, U. R. Relações entre medidas de qualidade de lotes de sementes de arroz. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 4, p. 798-804, 2013.
- MAGALHÃES, I. D.; SOARES, C. S.; COSTA, F. E.; ALMEIDA, A. E. da S.; OLIVEIRA, A. B.; VALE, L. S. Viabilidade do consórcio mamona-gergelim para a agricultura familiar no semiárido paraibano: Influência de diferentes épocas de plantio. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 8, n. 1, p. 57- 65, 2013.
- MALTA, M. R.; PEREIRA, R. G. F. A.; CHAGAS, S. J. R. Condutividade elétrica e lixiviação de potássio do exsudato de grãos de café: alguns fatores que podem influenciar essas avaliações. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, n. 5, P. 01-06, 2005.
- MARCOS-FILHO, J. 2015. Fisiologia de sementes de plantas cultivadas. 2. ed., Londrina: ABRATES, 660p.
- MENDES, R. C.; DIAS, D. C. F. dos S.; PEREIRA, M. D.; DIAS, L. A. dos S. Vigor test for the evaluation of the physiology potencial of castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 114-120, 2010.
- MENDES, R. C.; DIAS, D. C. F. S.; PEREIRA, M. D.; BERGER, P. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p.187-194, 2009.
- MENDES, R. C.; DIAS, D. C. F. S.; PEREIRA, M. D.; DIAS, L. A. S. Vigor test for the evaluation of the physiology potencial of castor bean (*Ricinus communis* L.) seeds. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 114-120, 2010.

MISHRA, P. K.; PAROHA, S.; MISHRA, R. P. A Review on Effects of Storage on the Quality and Viability Characteristics of Major Oil Seeds. **International Journal of Current Research and Academic Review**, v. 4, n. 1, p. 108-121, 2016.

MONDO, V. H. V.; BRANCALION, P. H. CICERO, S. M.; NOVEBRES, A. D. L. C.; DOURADO NETO, D. Teste de germinação de sementes de *Parapiptadenia rigida* (benth.) brenan (fabaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 30, n. 2, p.177-183, 2008.

MOORI, S.; EISVAND, H. R.; ISMAILI, A.; SASANI, S. Effects of drought stress during seed development and subsequent accelerated ageing on wheat seed mitochondrial ultra-structure, seedling antioxidante enzymes, and malondialdehyde. **Journal of Plant Process and Function**, v. 7, n. 28, p. 01-08, 2019.

MOSAVI NIK, S. M.; GHOLAMI, T. H.; KORD, F. J. G. H.; SADEGHI, M.; SEDIGHI, E. Free fatty acid and electrical conductivity changes in cotton seed (*Gossypium hirsutum*) under seed deteriorating conditions, **International Journal of Agri Science**, v. 1, n. 2, p. 62-66, 2011.

MURSHED, R.; LOPEZ-LAURI, F.; SALLANON, H. Microplate quantification of enzymes of the plant ascorbate–glutathione cycle. *Analytical Biochemistry*, v. 383, p. 320–322, 2008.

NAKATO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. **Plant e Physiology**, v. 22, n. 5, p. 867-880, 1981.

NERY, M. C.; ROCHA, A. S.; VON PINHO, É. V.; SANTOS, H. O.; FIALHO, C. M. T.; NERY, F. C. Accelerated ageing test and behaviour investigation of isoenzymes in sesame seeds. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 40, p. 01-08, 2018.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHLEDER, E. D.; FAVERO, S. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, VIABILIDADE E VIGOR DE SEMENTES DE *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. e Hook. f. ex. S. Moore. **Revista Árvore**, v.30, n.1, p.25-32, 2006.

OLIVEIRA, G. L.; DIAS, L. A. S.; DIAS, D. C. F. S.; SOARES, M. M.; SILVA, L. J. Accelerated ageing test to evaluate vigour in *Jatropha curcas* L. seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 1, p. 120-127, 2014.

OLIVEIRA, S. S. C.; ARAÚJO NETO, J. C.; CRUZ, S. J. S.; FERREIRA, V. M. Caracterização morfométrica de sementes e plântulas E germinação de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 3, p. 643-653, 2012.

OMAR, S. A.; ELSHEERY, N. I.; KALAJI, H. M.; XU, ZENG-FU; SONG-QUAN, S. CARPERNTIER, R. LEE, C. H.; ALLAKHVERDIEVS, S. I. Dehydroascorbate Reductase and Glutathione Reductase Play an Important Role in Scavenging Hydrogen Peroxide during Natural and Artificial Dehydration of *Jatropha curcas* Seeds. **Journal plant biology**, v.55, p. 469-480, 2012.

ONAHUE, J. L.; OKPODU, C.M.; CRAMER, C. L.; GRABAU, E. A.; ALSCHER, R. G. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (Relationships to resistance). **Plant Physiology**, v.113, p. 249–257, 1997.

PÁDUA, G. P.; ZITO, R. K.; ARANTES, N. E.; FRANÇA NETO, J. B. Influência do tamanho da semente na qualidade fisiológica e na produtividade da cultura da soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 32, n. 3 p. 009-016, 2010.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PEREIRA, M. D.; MARTINS FILHO, S.; LAVIOLA, B. G. Envelhecimento acelerado de sementes de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 42, n. 1, p. 119-123, 2012.

PINTO, T. L. F.; MARCOS FILHO, J.; FORTI, V. A.; CARVALHO, C.; GOMES JUNIOR, F. G. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão manso pelos testes de tetrazólio e de raios x. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 2, p.195-2001, 2009.

QUEIROGA, V. de P.; DOS SANTOS, R. F.; QUEIROGA, D. A. N. Levantamento da produção de mamona (*Ricinus communis* L.) em uma amostra de produtores em cinco municípios do Estado da Bahia. **Revista Agro@ambiente On-line**, v. 5, n. 2, p.148-157, 2011.

REGO, S. S.; COSMO, N. L.; GOGOSZ, A. M.; KUNIYOSHI, Y. S.; NOGUEIRA, A. C. Caracterização morfológica e germinação de sementes de *Curitiba prismatica* (D. Legrand) Salywon e Landrum. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 33, nº 4 p. 616 - 625, 2011

ROSA, R. De la; KIRAN, A. I.; BARRACO, D.; LEON, L. Seedling vigour as a preselection criterion for short juvenile period in olive breeding. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, p. 477–481, 2006.

SAMBROOK, J. e RUSSEL, D. - **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Second Edition- Cold Spring Harbor Laboratory Press. Book 1, 2, 3, 2001. Section 6: 6.39-6.44.

SANTOS, Heloisa Oliveira. **Conservação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2010, 85f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em agronomia, Universidade Federal de lavras, Lavras, 2010.

SANTOS, J. F.; ALVARENGA, R. O.; TIMÓTEO, T. S.; CONFORTO, E. C.; MARCOS FILHO, J.; VIEIRA, R. D. Avaliação do potencial fisiológico de lotes de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 743-751, 2011.

SCHWEMBER, A.; BRADFORD, K. J. Quantitative trait loci associated with longevity of lettuce seeds under conventional and controlled deterioration storageconditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 15, p. 4423-4436, 2010.

SEYYEDI, S. M.; AFSHARI, R. T.; DANESHMANDI, M. S. The relationships between fatty acids and heterotrophic seedling growth in winter canola cultivars during accelerated seed aging process. **South African Journal of Botany**, v. 119, p. 353–361, 2018.

SILVA, E. N.; RIBEIRO, R. V.; FERREIRA-SILVA, S. L.; VIEIRA, S. A.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. S. Coordinate changes in photosynthesis, sugar accumulation and antioxidative enzymes improve the performance of *Jatropha curcas* plants under drought stress. **Biomass and Bioenergy**, v. 45, p. 270-279, 2012.

SILVA, L. B.; MARTINS, C. C. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fidiológica de sementes de mamona. **Ciências Agrárias**, v. 30, n.1, p. 1043-1050, 2009.

SILVIA, L. J. S.; DIAS, D. C. F. S.; SEKITA, M. C.; FINGER, F. L. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes of *Jatropha curcas* L. seeds stored at different maturity stages. **Acta Scientiarum**. v. 40, p. 02-10, 2018.

SMANIOTTO, T. A. S.; RESENDE, O.; MARÇAL, K. A. F.; OLIVEIRA, D. E. C.; SIMON, G. A. Qualidade fisiológica das sementes de soja armazenadas em diferentes condições. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.4, p.446–453, 2014.

SMITH, I. K.; VIERHELLER, T. L.; THORNE, C. A. Assay of glutathione reductase in crude tissue homogenates using 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoic acid). **Analytical biochemistry**, v. 175, n. 2, p. 408-413, 1988.

SOUZA, L. A.; CARVALHO, M. L. M.; KATAO, V. Y.; OLIVEIRA, J. A. Teste de condutividade elétrica para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamona. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 60-67, 2009.

TELES, C. A. S. **Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de *Ricinus communis* L. sob restrição hídrica**. 2013, 97f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.

TESNIER, k.; STROOKMAN-DONKERS, H. M.; VAN PIJLEN, J. G.; VAN DER GEEST, A. H. M.; BINO, R. J.; GROOT, S. P. C. **Seed Science e technology**, v. 30, p. 149-165, 2002.

TESNIER, k.; STROOKMAN-DONKERS, H. M.; VAN PIJLEN, J. G.; VAN DER GEEST, A. H. M.; BINO, R. J.; GROOT, S. P. C. **Seed Science e technology**, v. 30, p. 149-165, 2002.

TOLEDO, M. Z.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J.; ALVES, E. Efeitos do ambiente de armazenamento na qualidade de sementes de sorgo-sudão. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 2, p.44-52, 2007.

VANZOLINI, S.; NAKAGAWA, J. Teste de condutividade elétrica em sementes de amendoim: Efeitos de temperatura e períodos de embebição. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 21, n.1, p. 41-45, 1999.

VERMA, S. S.; TOMER, R. P. S.; VERMA, U. Loss of viability and vigor in Indian mustard seeds stored under Ambient conditions, **Seed research**, v. 31, n. 1, p. 98-101, 2003.

WALTERS, C.; BALLESTEROS, D.; VERTUCCI, V. A. Structural mechanics of seed deterioration: Standing the test of time. **Plant Science**, v. 179, p. 565–573, 2010.

XIA, F.; CHEN, L.; SUN, Y.; MAO, P. Relationships between ultrastructure of embryo cells and biochemical variations during ageing of oat (*Avena sativa* L.) seeds with different moisture content. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 89, p. 01-11, 2015.

XIN, X.; TIAN, Q.; YIN, G.; CHEN, X.; ZHANG, J.; Ng, S.; LU, X. Reduced mitochondrial and ascorbate–glutathione activity after artificial ageing in soybean seed. **Journal of Plant Physiology**, v.171, p.140–147, 2014.

YAGUSHI, Juliana Tieme. **Teste de envelhecimento acelerado e análise computadorizada de imagens de plântulas para avaliação do desempenho de sementes de soja durante o armazenamento**. 2011, 102 f. Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências, pela Escola de Ensino Superior de Agricultura, Piracicaba, 2011.

YIN, G.; XIN, X.; SONG, C.; CHEN, X.; ZHANG, J.; WU, S.; LI, R.; LIU, X.; LU, X. Activity levels and expression of antioxidant enzymes in the ascorbate-glutathione cycle in artificially aged rice seed. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 80, p. 01-09, 2014.

ZHAO, S.; HUANG, W.; JIANG, H.; SUN, J.; YIN, L.; LI, W. Hydrocharis dubia seeds maintain high seed vigor in ambient wet storage condition through scavenging hydrogen peroxide by antioxidant systems. **Aquatic Botany**, v. 143, p.18–24, 2017.

ZINSMEISTER, J.; LEPRINCE, O.; BUITINK, J. Molecular and environmental factors regulating seed longevity. **Biochemical Journal**, v. 477, p. 305–323, 2020.

ZUCARELI, V.; BONJOVANI, M. R.; CAVARIANI, C.; NAKAGAWA, J. Tolerância à dessecação e influência do tegumento na germinação de sementes de citrumele 'swingle' (*Citrus paradisi* MACF X *Poncirus trifoliata* (L) RAF.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 1, p. 291-295, 2009.

ZUCHI, J.; BEVILAQUA, G. A. P.; PESKE, S. T.; SILVA, S. D. A.; SEDIYAMA, C. S. S. Características agronômicas de cultivares de mamona em função do local de cultivo e da época de semeadura no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 501-506, 2010.

ZUCHI, J.; PANOZZO, L. E.; HEBERLE, E.; ARAUJO, E. F. Curva de embebição e condutividade elétrica de sementes de mamona classificadas por tamanho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 3 p. 504 - 509, 2012.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu e BRS 149 Nordestina apresentam qualidade e viabilidade nas análises iniciais, permitindo o uso dessas sementes para as posteriores análises;
- A cultivar BRS 149 Nordestina apresenta uma provável dormência tegumentar, ao se avaliar as diferentes condições de germinação, sendo a condição de semente escarificada (SE) a melhor opção para a germinação das sementes;
- A condição de semente inteira (SI) para a cultivar BRS 188 Paraguaçu, apresenta os melhores resultados de parâmetros da germinação, biometria das plântulas normais e massa seca das mesmas;
- O efeito do EA é diferente quando é levado em consideração sementes jovens e sementes naturalmente envelhecidas;
- Sementes jovens possuem mecanismo de proteção eficiente, mesmo após ação do EA;
- O efeito do EA na cultivar Paraguaçu, causa o aumento da expressão de vários genes;
- O acúmulo dos oligossacarídeos da família (RFO) foram identificados após EA na cultivar Paraguaçu, o que justifica uma proteção das sementes por efeito vítreo;
- A cultivar BRS 149 Nordestina apresenta um efeito mais drástico, quando é avaliado as suas respostas fisiológicas, quando se compara a condição controle e após o EA;
- O aumento da condutividade elétrica é comum para ambas as cultivares Paraguaçu e Nordestina. No entanto, a cultivar BRS 149 Nordestina apresenta danos mais severos de membrana que permite a liberação de íons que reduz o pH;
- A SOD e a DHAR apresentaram ser marcadores bioquímicos nas condições de semente inteira e embrião, para ambas as cultivares BRS 188 Paraguaçu e BRS 149 Nordestina.

Anexo



***Ricinus communis* L.**

Sementes, envelhecimento e estresse oxidativo

**Luzimar Gonzaga Fernandez
Thamires Soares Ricardo Jesus
Patrícia Campos Santos**
Organizadoras



Ricinus communis L., ou mamona, é uma planta oleaginosa nativa da África tropical e cultivada em regiões temperadas, tropicais e subtropicais, disseminada por quase todo o mundo, devido à capacidade de crescer em ambientes onde há poucas alternativas agrícolas, sendo cultivada de Norte a Sul do Brasil. É de grande importância socioeconômica para a região semiárida brasileira, onde seu cultivo serve como alternativa de trabalho e renda, principalmente para o pequeno agricultor, pela aplicabilidade do óleo de rícino, extraído de suas sementes. O livro *Ricinus communis* L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo é fruto de pesquisas envolvendo projetos de mestrado e doutorado desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/ICS/UFBA). Possui informações atuais, com uma linguagem clara e didática sobre esta planta e aborda sobre a caracterização da espécie; cultivo, produção e importância socioeconômica no Brasil, óleo de rícino e aplicabilidades; envelhecimento natural e artificial de sementes; metabolismo e estresse oxidativo; antioxidantes não enzimáticos e enzimas antioxidantes, biomarcadores de qualidade e do envelhecimento de sementes; técnicas utilizadas para análises bioquímicas, fisiológicas e moleculares de espécies vegetais.

Ricinus communis L.:
sementes, envelhecimento
e estresse oxidativo

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Reitor

João Carlos Salles Pires da Silva

Vice-reitor

Paulo Cesar Miguez de Oliveira



EDITORA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA

Diretora

Flávia Goulart Mota Garcia Rosa

Conselho Editorial

Alberto Brum Novaes

Angelo Szaniecki Perret Serpa

Caiuby Alves da Costa

Charbel Niño El-Hani

Cleise Furtado Mendes

Evelina de Carvalho Sá Hoisel

Maria do Carmo Soares de Freitas

Maria Vidal de Negreiros Camargo



Luzimar Gonzaga Fernandez
Thamires Soares Ricardo Jesus
Patrícia Campos Santos
Organizadoras

Ricinus communis L.:
sementes, envelhecimento
e estresse oxidativo

Salvador
UFBA
2021

2021, autoras.

Direitos para esta edição cedidos à [Edufba](#).

Feito o Depósito Legal.

Grafia atualizada conforme o Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa de 1990, em vigor no Brasil desde 2009.

Coordenação editorial	Projeto Gráfico
Susane Santos Barros	Thamires Soares Ricardo Jesus e
Coordenação gráfica	Luzimar Gonzaga Fernandez
Edson Sales	Foto da capa
Coordenação de produção	As organizadoras
Gabriela Nascimento	Revisão e normalização
Editoração e capa	TIKINET
J. Nascimento	

Sistema Universitário de Bibliotecas – UFBA

R538 Ricinus communis L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo / Luzimar Gonzaga Fernandez, Thamires Soares Ricardo Jesus, Patrícia Campos Santos, Organizadoras. - Salvador: EDUFBA, 2021.
E-book (138 p.) : il. color. ; PDF

Modo de acesso:
ISBN: 978-65-5630-234-8 (E-book)

1. Mamona. 2. Sementes - Qualidade. 3. Tecnologia de sementes. I. Fernandez, Luzimar Gonzaga. II. Jesus, Thamires Soares Ricardo. III. Santos, Patrícia Campos. IV. Título: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo.

CDU: 581.48

Elaborada por Geovana Soares Lira CRB-5: BA-001975/O

Editora afiliada à



EDUFBA

Rua Barão de Jeremoabo, s/n, Campus de Ondina,
40170-115, Salvador-BA, Brasil

Tel: +55 (71) 3283-6164

www.edufba.ufba.br | edufba@ufba.br

Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Financiadora de Estudos e Projetos (Finep), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (Fapesb), pelo apoio financeiro aos pesquisadores que participaram da pesquisa, e à Universidade Federal da Bahia (UFBA) pelo apoio científico.

Prefácio

O livro *Ricinus communis L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo* trata-se de uma compilação de publicações científicas com foco nos mais diversos mecanismos biológicos, fisiológicos e moleculares envolvidos em processos; estudados, mas nunca esgotados, principalmente em sementes de culturas agrícolas como a mamona.

O envelhecimento (de sementes) é um processo gradativo e inexorável, no entanto, a ciência tem contribuído sobre maneira para o entendimento de todos os eventos envolvidos neste processo. Para a maioria das culturas agrícolas, este conhecimento encontra-se disperso e facetado em diferentes publicações, o que, na maioria das vezes, dificulta o entendimento e o objetivo maior do conhecimento, que é o de ampliar os horizontes para os mais diversos temas científicos, principalmente aqueles que envolvem a produção de sementes.

Neste livro, as autoras trazem à luz e reúnem conhecimentos sobre qualidade de sementes, os estresses oxidativos aos quais estas estão sujeitas e mecanismos de desintoxicação, bem como metabólitos e enzimas diretamente envolvidas nos processos, que vão desde a formação até o seu desligamento da planta-mãe. E, finalmente, exploram o armazenamento e as condições ambientais que podem contribuir para o inevitável estresse oxidativo, o envelhecimento de sementes.

O leitor e a leitora poderão acessar, neste livro, conhecimento atual e apresentado de forma clara e com detalhamento e rigor científico, que é reflexo da dedicação e formação das autoras, que ao longo de 20 anos têm dedicado estudos para a espécie. A leitura permite uma reflexão da necessidade de novas pesquisas voltadas para superação e mitigação de processos deteriorativos em sementes.

O conhecimento apresentado tem como ápice a apresentação de moléculas e metabólitos que poderão ser estudados como indicadores de processos deteriorativos, não só em *Ricinus*, mas nos mais diversos gêneros de plantas.

É um livro para ser lido e revisitado no dia a dia da pesquisa. Bom estudo!

Renata Silva Mann

Apresentação

Esta obra, sobre “*Ricinus communis* L.: sementes, envelhecimento e estresse oxidativo”, foi concebido com o objetivo de apresentar um conteúdo de qualidade versando sobre as sementes de *R. communis* (mamona) em caráter científico e acessível para interessados nesta cultura e aos diversos integrantes da cadeia produtiva do agronegócio de mamona, bem como instituições de ensino, pesquisa e extensão. Pretende-se reunir neste livro informações atualizadas, considerando o crescimento da produção nacional dessa oleaginosa, na maioria das vezes, não acessíveis aos usuários.

Este livro foi resultado de pesquisas realizadas durante o mestrado e doutorado pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM). Docentes, discentes e pesquisadores que contribuíram para a construção desta obra atuam ou atuaram na Universidade Federal da Bahia (UFBA) e na Universidade de Wageningen, Holanda.

Ricinus communis L., pertencente à família das Euphorbiaceae, espécie de grande importância econômica devido às diferentes aplicações industriais do óleo de rícino extraído de suas sementes. Além de ser uma espécie cultivada em todo o Brasil, destaca-se devido a sua produtividade no semiárido nordestino, por causa da viabilidade de produção em locais com baixos índices pluviométricos. E, por ser uma espécie de impacto socioeconômico, principalmente em regiões semiáridas que apresentam características peculiares, gera empregos com fixação de mão de obra, produção de matéria-prima para a ricinoquímica, entre outras aplicações, além de promover qualidade de vida para pequenos agricultores, favorecendo o desenvolvimento da agricultura familiar.

Esta é uma espécie antiga no Brasil, que foi trazida na época da colonização pelos portugueses, devido ao grande interesse em seu óleo para ser usado nas lamparinas, entretanto ainda há muito a se investigar. Problemas relacionados com a identificação da qualidade das sementes, a fim de se evitar gastos com o cultivo, além da definição de cultivares mais adequadas às condições de plantio do semiárido nordestino são

discutidos. São abordados temas como qualidade das sementes, envelhecimento, estresse oxidativo e marcadores de qualidade para a avaliação do uso potencial das sementes. Além disso, a fisiologia, a bioquímica e os aspectos moleculares de sementes e plantas são descritas ao longo de diferentes capítulos.

Os temas selecionados e sistematizados nesta obra, juntamente com os aspectos agronômicos de *R. communis*, são foco de muitos trabalhos científicos em resposta às demandas em pesquisa. Ademais, atrelados às novas tecnologias, vêm possibilitando a ampliação do conhecimento dessa cultura em diferentes áreas e avanços significativos no estudo das sementes da espécie e seu uso. Por fim, este livro apresenta uma abordagem multidisciplinar sobre os avanços científicos no estudo de temas que servem de base para futuros estudos de sementes de *R. communis*, mas também para outras espécies vegetais multiusos e adaptadas a regiões submetidas a diferentes tipos de estresses abióticos.

Boa leitura!

As organizadoras

Sumário

Ricinus communis L. e sua importância socioeconômica	15
Origem da espécie, características e cultivo	15
Óleo de rícino e aplicabilidades	17
Produção de <i>R. communis</i> no Brasil	19
Cultivares BRS Nordeste e BRS Paraguaçu	22
Sementes e qualidade fisiológica	25
Sementes de <i>R. communis</i>	25
Desenvolvimento de sementes ortodoxas	27
Qualidade de sementes e influências externas	28
Reativação do metabolismo	31
Biomoléculas de reserva	35
Envelhecimento de sementes: natural e artificial	39
Envelhecimento e deterioração de sementes	39
Testes de envelhecimento	41
Estresse oxidativo e mecanismos de desintoxicação	47
Espécies reativas de oxigênio	47
Danos oxidativos mais frequentes	50
Antioxidantes não enzimáticos presentes nos vegetais	55
Principais mecanismos de defesa	55
Antioxidantes não enzimáticos	55
Ácido ascórbico	56
Glutationa	57
Tocoferol	59
Compostos fenólicos	60
Alcaloides	62
Carotenoides	62
Peptídeos e aminoácidos	64

Enzimas antioxidantes	65
Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	65
Catalase (CAT, EC 1.11.7.6)	67
Enzimas do Ciclo Ascorbato-Glutationa (AsA-GSH)	68
Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.1.11.1)	69
Monodehidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4)	70
Dehidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1)	72
Glutationa redutase (GR, EC 1.6.4.2)	72
Glutationa peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9)	74
Glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)	74
Biomarcadores de qualidade e do envelhecimento	77
Métodos utilizados para análise de qualidade e envelhecimento de sementes	83
Caracterização inicial de sementes	83
Análises morfométricas	84
Determinação do peso de mil sementes	84
Grau de umidade das sementes	85
Teste de germinação	86
Curva de embebição	87
Condutividade elétrica e pH do exsudado de sementes	88
Teste de tetrazólio	89
Envelhecimento acelerado	90
Análises transcriptômicas	92
Análises metabolômicas	94
Peroxidação lipídica	98
Avaliação de enzimas antioxidantes	98
Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	99
Catalase (CAT, EC 1.11.7.6)	99
Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.1.11.1)	100
Monodehidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4)	100
Glutationa redutase (GR, EC 1.6.4.2)	101
Dehidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1)	101
Glutationa peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9)	101
Glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)	101

Referências **103**

Sobre os autores **137**

Ricinus communis L. e sua importância socioeconômica

*Thamires Soares Ricardo Jesus, Patrícia Campos Santos,
Renato Delmondez de Castro, Henk Hilhorst, Wilco Ligterink e
Luzimar Gonzaga Fernandez*

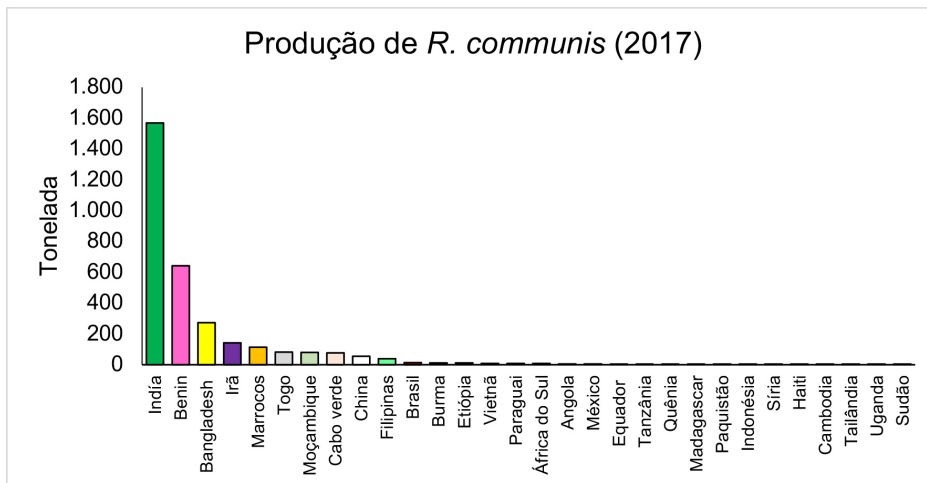
Origem da espécie, características e cultivo

Ricinus communis Liné, oleaginosa pertencente à família Euphorbiaceae, conhecida como mamona, teve sua origem apontada entre a África e Ásia, e atualmente está difundida e bem adaptada em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (POLITO et al., 2019; SINGH et al., 2018, 2015). É cultivada atualmente em mais de quinze países, tais como Brasil, Índia e China (ALLAN et al., 2008; MORAES et al., 2015). Segundo os dados da Food and Agriculture Organization of *the United Nations* (2020), os maiores produtores em tonelada no mundo são: Índia, Benin, Bangladesh, Irã, Marrocos, Togo, Moçambique, Cabo Verde, China, Filipinas e Brasil, sendo a Índia responsável por mais de 90% das exportações de óleo de mamona (Figura 1).

R. communis é uma planta perene, que apresenta grande variabilidade genética. Suas folhas e seus caules podem variar em coloração de verde de diversas tonalidades ou avermelhada, lobadas de formas e de tamanhos variados. O fruto pode possuir espinhos ou ser liso. A semente carunculada, varia em formato, tamanho, peso e coloração. É observada também variabilidade na altura das plantas, no teor de óleo, na tolerância a pragas, doenças e estresse ambiental (AMARAL, 2003; FIGUEIREDO NETO et al., 2004; SILVA et al., 2012) Além disso, apresenta autopolinização ou polinização cruzada pelo vento e tolerância a baixa pluviometria. No entanto tanto a ausência como o excesso de chuvas no período da floração podem diminuir a produtividade da planta

e comprometer a formação de frutos (MORAES et al., 2015; SOUZA et al., 2007).

Figura 1 - Produção de *R. communis* no mundo



Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020).

As características dessa espécie permitem que a cultura seja economicamente viável em ambientes semiáridos, onde há escassez de água. No Brasil, *R. communis*, além de ser de grande importância econômica, apresenta relevância social no semiárido nordestino devido a suas características, principalmente por ser relativamente bem adaptada em condições de baixa precipitação pluviométrica, apresentar baixo custo de produção, fácil manejo e um bom mercado consumidor. Também pode ser consorciada com outras culturas, tornando-se uma excelente opção para a agricultura familiar dessa região brasileira (BELTRÃO et al., 2003; CÉSAR; BATALHA, 2010; VASCONCELLOS, 2012), principalmente pela necessidade de matéria-prima para a indústria riciquímica (CHECHETTO et al., 2010). Assim, a cultura da mamona tornou-se propícia para a inclusão do pequeno agricultor, principalmente no Nordeste brasileiro, no arranjo produtivo para atender a demanda industrial (CHECHETTO; SIQUEIRA; GAMERO, 2010; QUEIROGA; SANTOS; QUEIROGA, 2011).

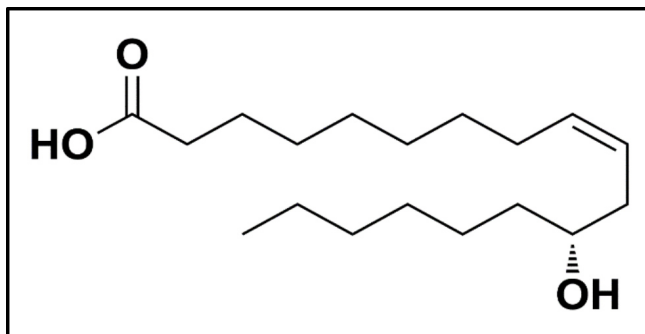
Óleo de rícino e aplicabilidades

A vasta produção de *R. communis* está relacionada diretamente ao seu óleo, que não é apenas um recurso natural barato e ecológico, é também um destaque econômico devido à diversidade em aplicações industriais, sendo utilizado como insumo na fabricação de tintas e vernizes, lubrificantes para aeronaves, fluidos hidráulicos, plásticos, vidro à prova de balas, entre outras aplicações (HAJRAH et al., 2019; OGUNNIYI, 2006; SUJATHA; REDDY; MAHASI, 2008). Comumente usado também como aditivo em alimentos, na produção de medicamentos, próteses ósseas, produtos para a pele, cosméticos, laxante e como lubrificante industrial (KIM et al., 2015; OGUNNIYI, 2006).

O óleo obtido pelas sementes é um líquido espesso, viscoso, com variação de cheiro, sabor e na coloração (incolor ao amarelo escuro), exibindo principalmente o óleo de rícino. Estes índices físicos e químicos que caracterizam o óleo variam de acordo com o cultivar, a localização, o plantio, entre outros (HAO et al., 2020; MESSETTI et al., 2010; MISHRA; PATEL, 2020; RAMAIAH et al., 2020; RIOS et al., 2019; SCHNEIDER et al., 2007) O óleo de rícino é constituído de triglicerídeo rico em 84.2-94.9% de ácido ricinoleico (12-hidroxi-cis-9-octadecenóico), e o restante é composto pelos ácidos linoleico (4,1 – 4,7%), oleico (2,2 – 3,3%), esteárico (0,7 – 1%) e menos de 1% do ácido linolênico (MUTLU; MEIER, 2010; PATEL et al., 2016).

O ácido ricinoleico (C18:1 – 1OH) apresenta, na sua constituição, insaturação entre os carbonos 9 e 10, e a presença de hidroxila, tornando-o um poliol natural (Figura 2), que confere propriedades incomuns ao óleo de mamona, como alta estabilidade, viscosidade elevada, alta densidade e solubilidade em álcool, o que fornece estabilidade oxidativa ao óleo, impedindo a formação de peróxidos (ARMENDÁRIZ et al., 2015; MESSETTI et al., 2010; RIBEIRO et al., 2015; SALIMON et al., 2010; SOUZA et al., 2010). Sua composição também detém propriedades únicas, como alto valor calorífico, número de cetanos elevados, com baixo teor de fósforo e resíduos de carbono (ARMENDÁRIZ et al., 2015; RIBEIRO et al., 2015).

Figura 2 - Estrutura química do ácido ricinoleico



A composição do óleo de rícino e localização funcional da hidroxila do ácido ricinoleico e seus derivados favorece a realização de várias reações químicas, incluindo halogenação, desidratação, alcoxilação, esterificação e sulfatação, que permitem que este possa ser submetido a diversos processos químicos para a obtenção de subprodutos utilizados em aplicações industriais nas áreas farmacêutica, cosmética, de lubrificantes, polímeros e ricinoquímica (BAFOR et al., 1991; BALDONI et al., 2011; MESSETTI et al., 2010; PATEL et al., 2016).

A composição dos ácidos graxos, que constituem os triacilgliceróis, é uma das características mais importantes reconhecidas para a boa qualidade dos óleos das culturas oleaginosas, pois os óleos vegetais são importantes para aplicação nutricional, industrial e farmacêutica. Seu emprego é determinado pela composição dos ácidos graxos, que é bastante variável dependendo da espécie vegetal ou até mesmo da variedade. Os ácidos graxos mais abundantes comumente encontrados em sementes oleaginosas são o ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0), ácido oleico (C18:1) e ácido linoleico (C18:2). Segundo Salimon e demais autores (2010), o óleo de mamona do genótipo da Malásia é constituído por: ácido linoleico (7,3%), ácido oleico (5,5%), ácido palmítico (1,3%), ácido esteárico (1,2%) e ácido linolênico (0,5%), diferindo dos valores encontrados em genótipos do Brasil e da Índia. O teor de ácidos graxos insaturados foi de 97,5% da composição total de ácidos graxos, conforme apresentado na Tabela 1 (ALENCAR, 2014; SALIMON et al., 2010).

Tabela 1 - Composição do óleo de genótipos de *Ricinus communis* produzidos na Malásia, no Brasil e na Índia

Ácidos graxos			
	Malásia	Brasil	Índia
Palmítico; C16:0	1.3	0.7	–
Esteárico; C18:0	1.2	0.9	1.0
Oleico; C18:1 ω 9c	5.5	2.8	–
Linoleico; C18:2 ω 6	7.3	4.4	4.3
Linolênico; C18:3 ω 3	0.5	0.2	–
Ricinoleico; C18:1 ω OH	84.2	90.2	94.0
Ácidos graxos saturados (AGS)	2.5	1.6	1.0
Ácidos graxos insaturados (AGPI)	97.5	97.6	98.3

Fonte: Salimon e demais autores (2010).

Apesar da grande aplicabilidade do óleo de rícino, a planta *R. communis* apresenta alta toxicidade devido à presença de ricina, uma proteína pertencente à família das proteínas inativadoras de ribossomos (PIR) encontrada exclusivamente no endosperma de sementes de mamona, de ricinina, um alcaloide neurotóxico, e da albumina 2S, uma proteína alergênica (AUDI et al., 2005; CONCEIÇÃO, 2017; SINGH et al., 2018). No entanto, o óleo de rícino não apresenta toxicidade, porque os componentes tóxicos não são extraídos juntamente com o óleo durante o processo, permanecem no restante do material (torta) (SINGH; PAROHA; MISHRA, 2017).

Produção de *R. communis* no Brasil

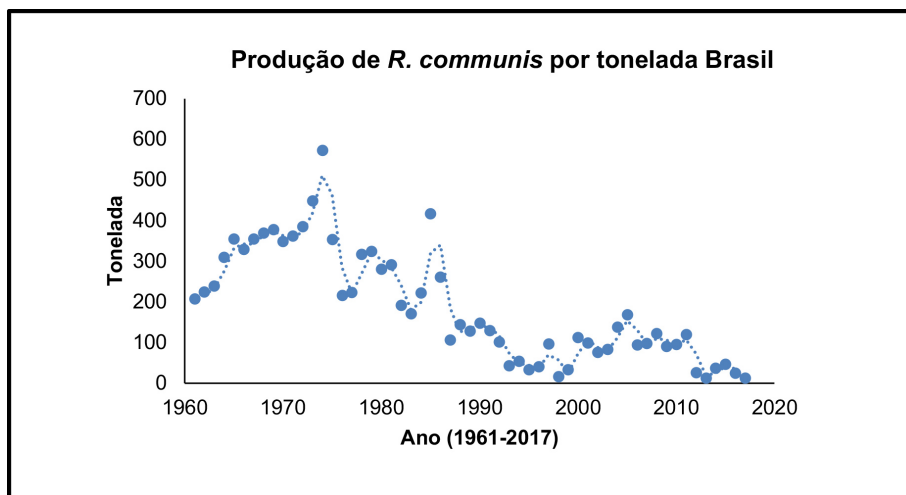
A *R. communis* foi introduzida no Brasil pelos portugueses, devido à necessidade do uso do óleo dessa espécie para iluminação por lamparinas e para a lubrificação de eixos de carroça. O clima tropical facilitou sua disseminação e, assim, a mamoneira se desenvolveu espontaneamente no país, por se aclimatar facilmente, em especial no Norte e Nordeste do Brasil. Entretanto a produção de *R. communis* não se resume apenas a estas regiões, com plantações em todas as outras regiões do país: Centro-Oeste, Sul e Sudeste (CANGEMI; SANTOS; CLARO NETO, 2010; FIGUEIREDO NETO et al., 2004).

As políticas energéticas brasileiras implementadas a partir de meados da década de 1970, com o objetivo de fomentar o uso dos biocombustíveis como fontes de energia limpa e renovável, representaram um grande avanço no que se refere à inserção, num primeiro momento, do álcool e, décadas depois, do biodiesel na matriz energética brasileira (MELO; SILVA; PEREIRA JUNIOR, 2008; ZUCHI *et al.*, 2010).

A produção de mamona no semiárido brasileiro foi apoiada pelo mercado energético do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB). Em 2003, o Governo Federal implantou o PNPB com o objetivo de incluir, a partir do ano de 2006, cerca de 2% do biodiesel no combustível diesel mineral, já que os valores de viscosidade, densidade, condutividade térmica e ponto de fluidez do óleo de mamona foram maiores que os valores de um lubrificante padrão (PATEL *et al.*, 2016), além do investimento governamental e da iniciativa privada, que também incentivou a produção em razão de sua extraordinária importância sob os pontos de vista econômico, social e ambiental. O cultivo desta espécie no semiárido foi escolhido como alternativa na geração de renda para a agricultura familiar e a possibilidade da criação de empregos nos vários setores de produção (BELTRÃO *et al.*, 2003; QUEIROGA; SANTOS, 2008; QUEIROGA; SANTOS; QUEIROGA, 2011).

O intuito de inserir o biodiesel na matriz energética brasileira aconteceu também de forma a atender às políticas internacionais de redução de emissão de gases de efeito estufa (GEE). O PNPB teve, dentre seus objetivos, a inclusão da agricultura familiar e da diversificação regional com matérias-primas para a produção do biocombustível. No entanto, devido à ausência de investimentos em tecnologia, da baixa qualificação, entre outros fatores, a capacidade de produção familiar foi prejudicada, comprometendo a produção de matéria-prima em grandes escalas. Fatores como a queda nos preços recebidos pelos produtores juntamente com a falta de ação do governo também foram determinantes para a redução na produção nacional de mamona. (ALVES; SOBRINHO; CARVALHO, 2004; FERREIRA *et al.*, 2006; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2020; SOUZA *et al.*, 2015). Na Figura 3 está representada a produção brasileira desde 1960 até 2017.

Figura 3 - Produção em toneladas de *Ricinus communis* L. no Brasil



Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2020).

O semiárido brasileiro apresenta altas temperaturas, que variam, em média, entre 15-45°C, alta umidade relativa que apresenta média de 50% e abrange o total de 969.589,4 km², ocupando os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO, 2014; ARAÚJO, 2011; MOURA et al., 2005). Para o semiárido nordestino, a cultura da *R. communis* possui grande importância para a economia, por ser uma cultura alternativa de reconhecida tolerância à seca, como fator fixador de mão de obra, gerador de empregos e matéria-prima, cultivada por pequenos e médios produtores, sendo essencial ao progresso da região (FIGUEIREDO NETO et al., 2004), além de ser uma cultura que pode ser cultivada em consórcio com culturas alimentícias e de fácil manejo.

Há no Brasil basicamente dois sistemas de cultivo de mamona: o tradicional e o tecnológico. No tradicional, a colheita é manual, com cultivares de porte médio e alto, e, em sistemas de produção com uso de tecnologias modernas, é cultivada em grandes áreas, com colheita mecanizada (MORAES et al., 2015; SOUZA et al., 2007). No entanto, para o pequeno agricultor, predomina o sistema tradicional, com uso de baixo nível tecnológico, consequentemente havendo degeneração

generalizada dos materiais cultivados, com predominância de variedades locais pouco produtivas, deiscentes, de porte alto, tardias, com baixo teor de óleo e suscetíveis às principais doenças que ocorrem na região (CHECHETTO; SIQUEIRA; GAMERO, 2010; QUEIROGA et al., 2011).

Cultivares BRS 149 Nordestina e BRS 188 Paraguaçu

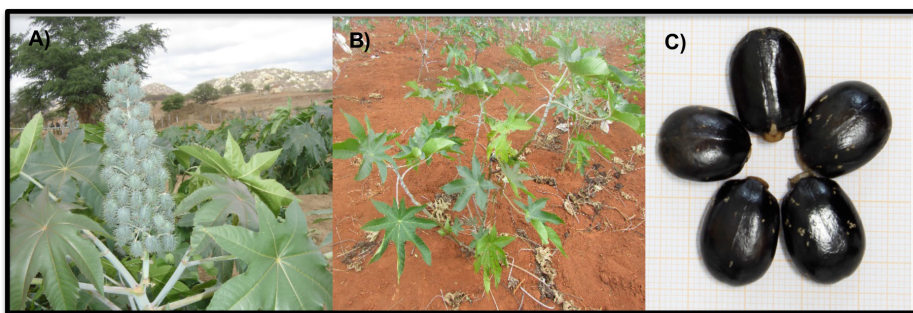
R. communis é considerada um arbusto silvestre, capaz de crescer em grande variedade de solos, sendo adequada para se desenvolver em local com baixa precipitação pluviométrica, além de vegetar em quase todos os países do mundo (FIGUEIREDO NETO et al, 2004; SEVERINO et al., 2006). Apresenta grande variabilidade genética, suas folhas podem ser verdes de diversas tonalidades ou avermelhadas, de formas e tamanhos diversos, a coloração do caule varia, apresenta sementes de diferentes tamanhos e tegumento com múltiplas colorações (FIGUEIREDO NETO et al., 2004). Há várias cultivares de *R. communis*, o que pode ser justificado por se tratar de uma espécie politípica, isto é, subespécies são geradas em função de diferenças de origens morfológica, genética e ecológica (RODRIGUES et al., 2010).

São várias as cultivares de *R. communis* produzidas no Brasil. Para garantir maior produtividade e maior retorno econômico, tornou-se necessário o uso de tecnologias e desenvolvimento de cultivares com características agronômicas desejáveis, maior produtividade, porte da planta, resistência climática, ajustando o cultivar ao ambiente de cultivo (AMARAL, 2003; SILVA et al., 2012) No entanto a maior dificuldade racional da exploração de mamona no semiárido se deve à baixa disponibilidade de sementes de cultivares adaptadas (COSTA et al., 2006; FIGUEIREDO NETO et al., 2004).

Na Embrapa, foram criadas duas cultivares para o semiárido, ambas de porte médio, frutos semi-indeiscentes e sementes grandes, com teor de óleo mínimo de 47%, são elas: BRS 149 Nordestina e BRS 188 Paraguaçu. Devido aos aspectos de irregularidade das chuvas na região do semiárido nordestino, a Embrapa recomenda a utilização dessas cultivares, que são de porte médio, pois possuem melhor adaptação às condições do semiárido, por apresentarem um sistema radicular mais

profundo e desenvolvido, cujas características lhes conferem maior tolerância aos efeitos de estiagem (QUEIROGA; SANTOS, 2008). A cultivar BRS 149 Nordestina (Figura 4) é originária de seleção individual com testes de progênie na cultivar Baianita. As plantas em condições de sequeiro no Nordeste têm altura média de 1,90 m, caule de coloração verde e ceroso, racemo (cacho) de forma cônica e sementes de coloração preta, com peso médio de 0,68 g/unidade (BELTRÃO et al., 2003). A floração ocorre em torno de 50 dias da emergência das plântulas e o teor de óleo nas sementes é em torno de 49%, sendo o ciclo anual por volta de 250 dias. Produz, em média, 1.500 kg/ha de sementes (bagas), tendo cerca de cinco a sete cachos por planta, com tamanho médio de 32 cm com em torno de 37 frutos/cacho (BELTRÃO et al., 2003).

Figura 4 - Cultivar BRS 149 Nordestina de *Ricinus communis*, caracterizada pelo caule verde e racemo cônico. A. racemo cônico; B. porte médio da cultivar; C. sementes.

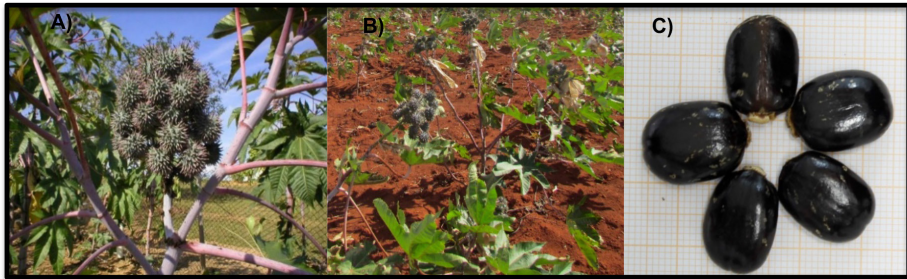


Fonte: A. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2019); B. e C. Acervo próprio.

A cultivar BRS 188 Paraguaçu (Figura 5) foi obtida pela seleção massal na cultivar local sangue-de-boi, sendo em condições ecofisiológicas, de sequeiro, no Nordeste brasileiro, de porte baixo, com média de 1,60 m de altura. Apresenta caule de coloração roxa e ceroso, com racemo de forma oval, sementes pretas com algumas manchas vermelhas, com peso médio de 0,71 g/unidade, tendo em média 48% de óleo. Os frutos e a folha têm coloração arroxeadada. Produz cerca de 1.500 kg/ha em condições de sequeiro no Nordeste brasileiro, com componentes de produção semelhantes à BRS 149-Nordestina. Ambas, em condições de irrigação, podem chegar a produtividades acima de 5.000kg/ha de bagas (BELTRÃO et al., 2003).

Ricinus communis L.: Sementes, envelhecimento e estresse oxidativo

Figura 5 - Cultivar BRS 188 Paraguaçu de *Ricinus communis*, caracterizada pelo caule roxo e racemo oval. A. racemo oval; B. planta de porte médio; C. sementes.



Fonte: A. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (2019); B. e C. Acervo próprio.

Sementes e qualidade fisiológica

*Thamires Soares Ricardo Jesus, Patrícia Campos Santos,
Henk Hilhorst, Wilco Ligterink, Renato Delmondez de Castro e
Luzimar Gonzaga Fernandez*

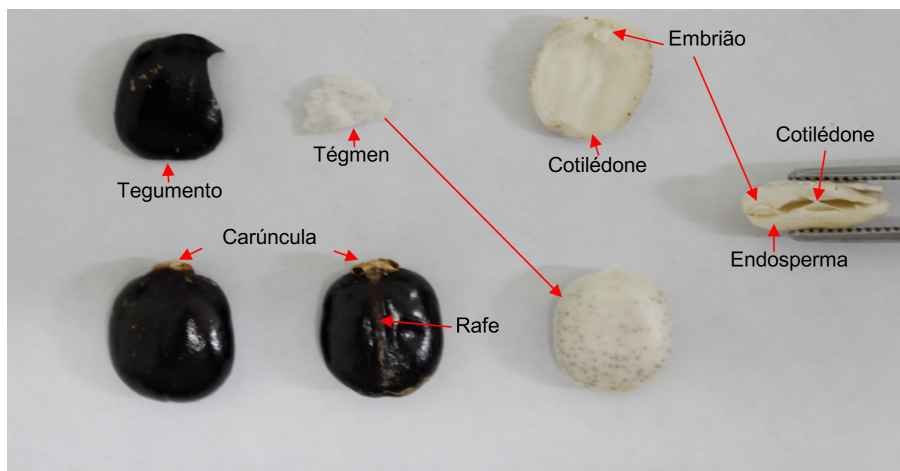
Sementes de *R. communis*

As sementes são estruturas vegetais que fazem parte da vida do homem desde o início das civilizações e possuem diversas importâncias: podem servir como alimento, na dispersão de plantas superiores e de insumos para a produção de produtos diversos (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000; MARCOS FILHO, 2005). Além disso, a semente é essencial para o plantio, sendo que a produtividade e a qualidade do produto dependem primordialmente da qualidade da semente (QUEIROGA et al., 2011).

As sementes da mamoneira são formadas a partir do óvulo da flor fertilizado, que apresentam grande variabilidade no tamanho, na forma, nas cores e no peso (Figura 6). São compostas por tegumento, rafe, micrópila, carúncula, endosperma, cotilédone e embrião (BAHIA, 2007; BELTRÃO et al., 2001; LUZ, 2012). Além disso, ressalta-se que a semente de mamona é o principal elemento para a extração do óleo de rícino.

O tegumento é uma estrutura de proteção de origem materna que envolve e protege o óvulo, este pode ser externo e interno. O externo é representado pela casca, dura e quebradiça, e o interno é o tégmen, uma película fina envolvendo o endosperma. Geralmente, esses envoltórios tornam-se secos e duros, protegendo o embrião das radiações solares que podem causar danos ao material genético, das oscilações térmicas e da ação de organismos decompositores. (BAHIA, 2007; BRASIL, 2009; LUZ, 2012; RIBEIRO FILHO, 1966).

Figura 6 - Estruturas das sementes da cultivar BRS 188 Paraguaçu de *R. communis*



O rafe é uma cicatriz alongada, acima do hilo, em oposição à micrópila, deixada pelo funículo nos óvulos curvados. A micrópila é uma pequena abertura presente no tegumento, indica sempre abaixo a posição da radícula do embrião, marcada por uma saliência no tegumento. A carúncula é uma excrescência carnosa sobre o tegumento das sementes e se forma próximo da micrópila (BAHIA, 2007; BELTRÃO et al., 2001; BRASIL, 2009; LUZ, 2012).

O endosperma é um tecido de reserva das sementes rico em óleo. Este tecido serve para proteger e nutrir o embrião durante a germinação e o desenvolvimento da plântula. O cotilédone, primeiro par de folhas embrionárias, e não uma folha verdadeira, pode se tornar o primeiro órgão fotossintetizante. O embrião está presente no interior da semente e dará origem à futura plântula, formada a partir da fecundação da oosfera, isto é, da fusão dos núcleos dos gametas femininos e masculinos da planta. Geralmente formado por um eixo mais ou menos diferenciado (eixo hipocótilo-radícula) e pela inserção dos cotilédones (BAHIA, 2007; BRASIL, 2009).

O endosperma passa por três estágios distintos no metabolismo durante sua existência. No desenvolvimento da semente, o metabolismo do endosperma é primariamente caracterizado pela rápida síntese de proteína e óleo (BROWN; CANVIN; ZILKEY, 1970). O passo inicial é a acumulação de óleo e da síntese de ácido oleico a partir da acetil-CoA,

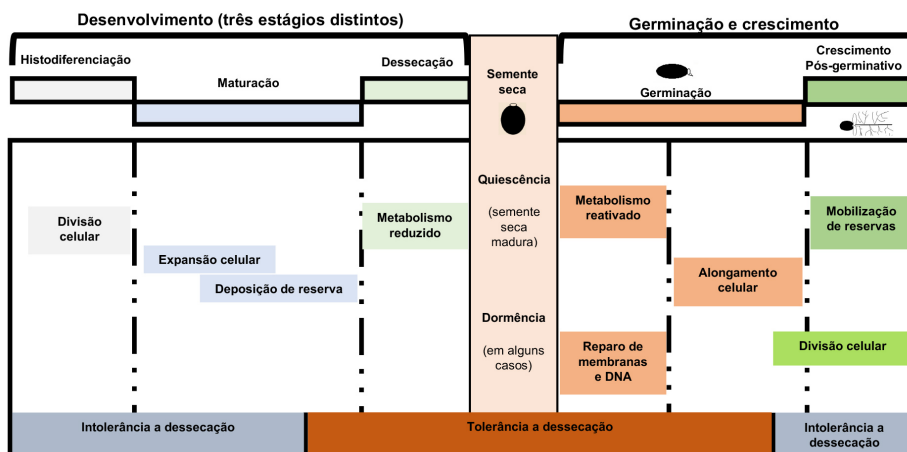
ocorrendo no proplastídeo. A síntese de óleo termina com a desidratação e maturação da semente; no momento da maturação, a semente entra em um estágio de repouso – quando a atividade metabólica é mínima (BROWN; CANVIN; SILKEY, 1970; EASTMOND; GRAHAM, 2001; GRAHAM, 2008). Sob condições adequadas, as sementes germinam e, após dois dias, o metabolismo do endosperma está agora principalmente direcionado ao rápido catabolismo das reservas de óleo. Neste processo, as reservas de óleo são convertidas em sacarose, e um componente importante desse mecanismo é o ciclo do glioxilato, que ocorre no glioxissomo. O glioxissomo, no entanto, não persiste, desaparece com a completa degradação e absorção do endosperma pelos cotilédones em rápida expansão (BROW et al., 1970; GRAHAM, 2008).

Desenvolvimento de sementes ortodoxas

É possível descrever o desenvolvimento de sementes ortodoxas em três estágios distintos (Figura 7). A primeira fase da embriogênese é caracterizada pela formação de tecidos e partes embrionárias (histodiferenciação). Esta fase é marcada por uma atividade inicial intensa de síntese de DNA e abundante rede de citoesqueleto (microtubular cortical e mitótico), resultando na multiplicação celular (CASTRO, 1998; CASTRO; BRADFOD; HILHORST, 2004).

A maturação é considerada a segunda fase, em que há um depósito de nutrientes e reservas no endosperma e no embrião, acompanhando as mudanças relacionadas à forma, ao tamanho e ao peso fresco e seco da semente e do embrião. Esta é caracterizada pela detecção apenas do citoesqueleto microtubular cortical abundante, o qual, na ausência de síntese de DNA e divisões celulares, leva ao crescimento imediato do embrião por expansão celular (CASTRO, 1998; CASTRO; BRADFOD; HILHORST, 2004; VASCONCELOS, 2015). Nesta fase, o embrião atinge sua forma final, coincidindo com os valores máximos de peso seco e aquisição da maturidade fisiológica. A terceira é denominada como dessecação, há redução gradual no metabolismo da semente e do embrião, passando para um estado de metabolismo mínimo ou estado quiescente (CASTRO, 1998; CASTRO; BRADFOD; HILHORST, 2004; VASCONCELOS, 2015).

Figura 7 - Desenvolvimento e germinação de sementes.



Nota: Um esquema geral de eventos associados com as diferentes fases de desenvolvimento, germinação e crescimento pós-germinativo de sementes, incluindo ciclo celular, eventos metabólicos e de reparo, e períodos em que a semente (embrião) é intolerante ou tolerante à dessecação. Fonte: adaptado de Castro, Bradford e Hilhorst (2004).

Qualidade de sementes e influências externas

Para o agricultor familiar, a qualidade da semente é de fundamental importância, pois o elevado vigor e viabilidade das sementes proporciona maior produtividade. A longevidade das sementes é um fator-chave complexo, de importância ecológica, agrônômica, econômica e científica vital, relacionada à resistência das sementes e a uma série de fatores internos – genéticos, estruturais e fisiológicos – e externos (BAILLY, 2004; HUANG et al., 2015; KUREK; PLITTA-MICHALAK; RATAJCZAK, 2019; MIRA et al., 2020). As sementes passam por processos de envelhecimento que limitam sua viabilidade e acabam causando danos ao DNA, acúmulo de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. Estes, em geral, são considerados os maiores contribuidores para a deterioração de sementes, sendo capaz de causar perda da propriedade básica da semente, ou seja, a capacidade de germinar.

As sementes de mamona são o principal insumo para a extração de óleo de rícino. Desse modo, saber como garantir a qualidade dessas sementes é muito importante para uma boa produção, considerando fatores intrínsecos e extrínsecos. A qualidade pode ser influenciada por

vários fatores (internos e externos), que influenciam no desempenho de determinado lote de sementes e na produção de plantas vigorosas. Fatores internos como genética, pureza, saúde, capacidade de germinação, fatores externos como tempo de colheita, processo de manipulação, local e época de cultivo, condições de armazenamento, temperatura, umidade, entre outros são responsáveis pela manutenção ou perda da viabilidade e do vigor das sementes (HUANG et al., 2015; RAHMAN; CHO, 2016; MEDEIROS et al., 2020). Outro fator que leva à redução da qualidade das sementes é a interrupção da transferência de matéria seca da planta para as sementes, ocorrendo deterioração influenciada pelos fatores ambientais, especialmente aqueles predominantes na fase final de maturação (FIGUEIREDO, 2006; OLIVEIRA, 2012; SINGH; PAROHA; MISHRA, 2017; VASCONCELOS, 2015).

A manutenção da qualidade das sementes no decorrer do tempo depende diretamente da longevidade inerente à espécie, da qualidade inicial do lote e do ambiente de armazenamento. O teor de umidade, os danos mecânicos, as pesticidas, embalagens, o envelhecimento, a temperatura e a umidade relativa (UR) do ambiente são responsáveis pelo declínio da qualidade de sementes durante o armazenamento (CARVALHO et al., 2016; DRUMOND et al., 2019; FIGUEIREDO, 2006; QUEIROGA; BELTRÃO, 2004; SINGH; PAROHA; MISHRA, 2017; SINGH et al., 2015; TRZECIAK, 2012).

Condições adequadas de armazenamento são importantes para garantir a qualidade nos aspectos físicos, fisiológicos e sanitários, e permitem manter a viabilidade da semente por um maior período (DRUMOND et al., 2020; MARCOS-FILHO, 2015b; SINGH; PAROHA; MISHRA, 2017; SINGH et al., 2015). Condições adequadas de armazenamento são importantes para garantir a qualidade da semente quanto aos aspectos físicos, fisiológicos e sanitários. Um bom armazenamento permitirá manter a qualidade e a viabilidade da semente por maior período (SINGH et al., 2015).

Altas temperaturas e elevada umidade relativa causam rápida deterioração nas sementes, principalmente em oleaginosas, por apresentarem altos teores de lipídeos e serem mais susceptíveis à deterioração. Isso porque esses fatores levam a alterações bioquímicas, tais como: aumento da atividade hidrolítica, aumento da respiração, danos à

membrana celular, peroxidação lipídica e, conseqüentemente, à geração de subprodutos tóxicos, causando redução da viabilidade e do vigor. Acontecem também alterações enzimáticas, como degradação e inativação de enzimas importantes para diferentes processos metabólicos (ABREU et al., 2013; MARCOS FILHO, 2015; SHARMA et al., 2012; TRZECIAK, 2012).

A temperatura pode agir de forma diferente na semente: temperatura ótima atua de forma favorável durante o armazenamento e para as reações metabólicas durante a germinação. No entanto temperaturas extremas trazem ação danosa, de forma que a germinação raramente ocorre, porque altas temperaturas alteram a estrutura tridimensional de proteínas, muda a fluidez da membrana e aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Baixas temperaturas inativam enzimas, geram mudança de fase da membrana e redução da taxa metabólica (BEWLEY; BLACK, 1994; CASTRO; BRADFOD; HILHORST, 2004; TOZZI, 2010).

A umidade relativa elevada aumenta a taxa de deterioração das sementes, provoca menor integridade do sistema de membranas das sementes e/ou menor seletividade, permitindo, assim, a entrada de água mais rapidamente nas células e a elevação da umidade da semente. A ação de alta umidade relativa e temperatura resulta em maior perda de constituintes celulares, causada pela perda da integridade das membranas celulares (BINOTTI et al, 2008; SANTOS; MENEZES; VILLELA, 2004) A semente é um material higroscópico, então a viabilidade da semente irá diminuir a depender da alta umidade relativa e temperatura do ambiente em que as sementes são armazenadas (JESUS, 2016).

A perda de viabilidade e do vigor devido ao envelhecimento das sementes representa um grande desafio para o armazenamento, principalmente quando envolve armazenamento em bancos de sementes, visando proteção da variabilidade do material genético. Portanto é preciso avaliar os mecanismos que regulam o envelhecimento das sementes para identificar possíveis marcadores bioquímicos, fisiológicos, moleculares e genéticos associados à qualidade das sementes e monitorar, de maneira rápida e confiável, o grau de envelhecimento e a viabilidade das sementes durante o armazenamento a curto e longo prazo (BIRTIC et

al., 2011; CORBINEAU et al., 2002; HU et al., 2012; KRANNER et al., 2006; NAGEL et al., 2014; WALTERS et al., 1998; YAO et al., 2012).

A umidade relativa e a temperatura são fatores determinantes para o armazenamento adequado, segundo Jesus (2016), que estudou as condições de armazenamento de sementes das cultivares Nordeste e Paraguaçu de *R. communis*. Utilizou quatro diferentes condições: 1. com a umidade relativa e a temperatura controlada – URTC; 2. com o controle da umidade relativa – URC; 3. com o controle da temperatura – TC; 4. com umidade relativa e temperatura do ambiente de laboratório – URTAL. Concluiu que as sementes mantidas nas condições sem controle de umidade relativa apresentam redução significativa na qualidade, sofrendo grandes influências do ambiente de armazenamento. Já Santos, Parwata e Jaia (2015), ao armazenar sementes usando diferentes embalagens (saco plástico de polipropileno, juta e tecido), verificaram que a viabilidade e o teor de óleo reduziram durante o período de armazenamento em todas as condições. A melhor embalagem para estas sementes foi a plástica de polipropileno, pois conseguiu manter a viabilidade acima de 80%. Isso porque as embalagens de juta e tecido foram afetadas pela umidade relativa do ambiente, alterando a umidade da semente e reduzindo a viabilidade. O baixo teor de umidade reduz a respiração e a deterioração, melhorando a qualidade das sementes armazenadas (CHEEMA et al., 2010).

Reativação do metabolismo

Em geral, a maioria das variedades de mamona, quando selecionadas para o cultivo, apresentam sementes com germinação desuniforme e lenta. Dessa forma, as sementes ficam expostas a fatores bióticos e abióticos. Isso tem sido atribuído à dificuldade na absorção de água pelas sementes devido à espessura e rigidez do tegumento ou a uma possível dormência (LAGO et al., 1979; MENDES et al., 2009; NOBRE et al., 2014) Do ponto de vista agrônomo, o ideal seria uma emergência rápida e uniforme, o que é importante, pois plantas bem desenvolvidas facilitam o manejo durante a colheita e o processamento, permitindo um reflexo positivo na produtividade da lavoura e no rendimento do óleo (MENDES et al., 2009).

A água é um dos componentes mais importantes para o processo de germinação, sendo responsável pela hidratação inicial dos tecidos das sementes. Em paralelo, ela intensifica a respiração e todos os processos metabólicos necessários para a digestão e mobilização de reservas, reativação morfo genética da semente (processos de expansão e divisão celular), que resultam na retomada do crescimento do eixo embrionário e na formação da plântula (BEWLEY; BLACK, 1994; MENDES et al., 2009; VASCONCELOS, 2015).

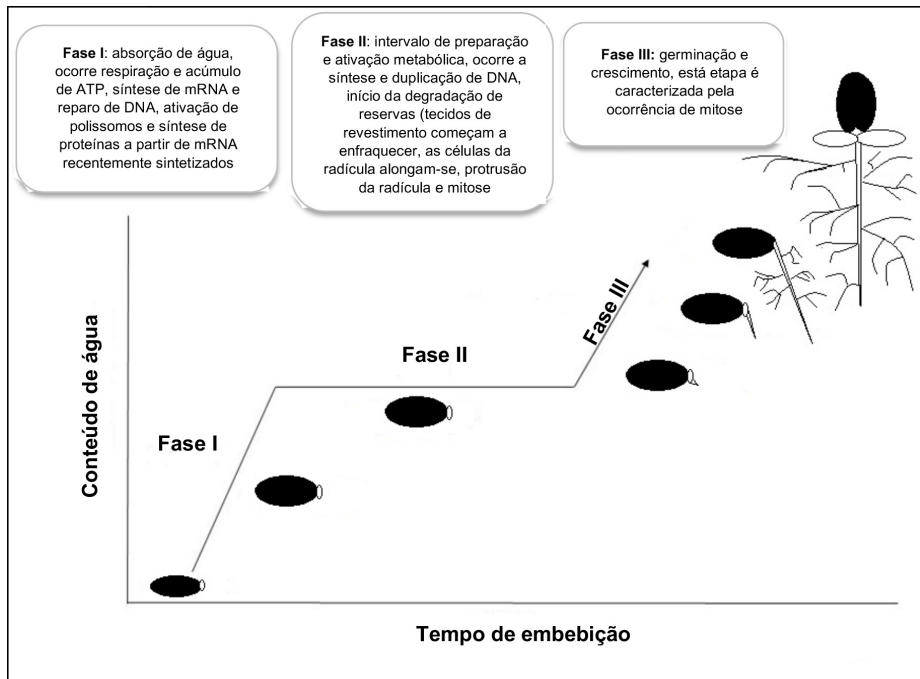
Fatores como a temperatura e o potencial fisiológico das sementes também podem influenciar o processo de absorção de água, temperaturas mais altas aumentam a taxa de respiração celular, assim como também aumentam a velocidade de reações metabólicas. Sementes com potencial fisiológico inferior apresentam deficiências no processo de reparo e/ou proteção ao sistema de membrana durante a fase de embebição (ATAÍDE et al., 2014; COSTA; HUANG, 2007).

A germinação é um processo fisiológico complexo que se inicia com a entrada de água na semente e termina com a ruptura do tegumento pela radícula e emergência de parte do eixo embrionário de dentro dos envoltórios seminais (BEWLEY, 1997; NOLETO; PEREIRA; AMARAL, 2010). Um fator importante para a germinação está diretamente associado à água presente nas células. Para que uma semente germine, é necessário que o meio forneça água suficiente para ativação das reações químicas e, durante este processo, há concomitantemente a reativação de mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares para a desenvolvimento do embrião (ALBUQUERQUE et al., 2009; ATAÍDE et al., 2014; BEWLEY; BLACK, 1994; MARCOS FILHO, 2005). Esse processo, na maioria dos casos, ocorre em um padrão trifásico (Figura 8).

Na fase I, ocorre o início do processo de embebição por parte da semente. É uma fase caracterizada pelo aumento rápido do potencial hídrico do embrião. Nesta fase, ocorre rápido aumento da respiração e de absorção de água de maneira física. Devido a um gradiente de potencial hídrico, a água é transportada para o interior da semente. Na fase II, os potenciais hídricos estão bem próximos, por isso há acentuada redução na absorção de água. Dessa forma, é estabelecido um platô, onde se inicia a reativação do metabolismo. Fase caracterizada por síntese e duplicação do DNA, degradação de reservas, protrusão

da radícula e o alongamento das estruturas (BEWLEY; BLACK 1994; CASTRO; HILHORST, 2004; TOZZI, 2010; VASCONCELOS, 2015). Por fim, na fase III, a absorção de água é retomada, aumentando consideravelmente a curva de embebição (CASTRO; HILHORST, 2004; VASCONCELOS, 2015).

Figura 8 - Representação esquemática do padrão trifásico de absorção de água durante a embebição de sementes, em relação aos conteúdos aproximados de água, em que os diferentes eventos do processo germinativo são iniciados.



A sacarose, os oligossacarídeos da série rafínosica, o amido e os polissacarídeos de parede celular, são considerados os principais compostos derivados de carboidratos que desempenham a função de reserva nas sementes. Há quatro grandes grupos de proteínas que atuam na reserva: albuminas, globulinas, prolaminas e as glutelinas. Os triacilgliceróis (TAG) são a forma de armazenamento dos lipídeos de reserva (ALENCAR, 2014; VASCONCELOS, 2017). É importante ressaltar que os carboidratos e os lipídeos servem como fonte de energia e carbono para a germinação das sementes e o desenvolvimento de plântulas. Já as proteínas são importantes para o fornecimento de

enxofre e nitrogênio na síntese de novas proteínas, de ácido nucleico e de compostos secundários significativos no desenvolvimento das plântulas (ALENCAR, 2014; CORTE et al., 2006; RAHOUI et al., 2015; VASCONCELOS, 2017).

Iniciada a embebição, a atividade respiratória é aumentada, juntamente com o metabolismo celular, em que esta reativação metabólica provoca uma série de mudanças fisiológicas, levando ao consumo das reservas energéticas existentes no endosperma ou nos cotilédones, tais como carboidratos, lipídios e proteínas, principais compostos de reserva estocados durante os estados tardios de desenvolvimento das sementes (ALENCAR, 2014; SUDA; GIORGINI, 2000). Nesse momento, há a hidrólise dos triacilgliceróis e degradação de ácidos graxos por β -oxidação, produção de açúcares, fitormônios e diversas enzimas hidrolíticas (proteases, β -galactosidases, α -amilases, β -glucanases, nucleases). Ocorre também a utilização de amido ou outros polissacarídeos de reserva, proteínas e aminoácidos em parte na respiração, cuja taxa elevada se deve ao crescimento do eixo embrionário (ALENCAR, 2014; BUCHANAN; GRUISSEM; JONES, 2000).

Biomoléculas de reserva

*Thamires Soares Ricardo Jesus, Patrícia Campos Santos,
Paulo Roberto Ribeiro de Jesus, Henk Hilhorst, Wilco Ligterink e
Luzimar Gonzaga Fernandez*

As sementes apresentam biomoléculas, como reservas nutritivas, que são importantes para a retomada do desenvolvimento. As reservas podem ser armazenadas na forma de carboidrato, proteína e lipídeo. Durante a germinação, as biomoléculas são consumidas para o desenvolvimento do embrião até a formação de plântula. Os carboidratos e lipídeos são as principais fontes de energia química e carbono. Já as proteínas são fontes de nitrogênio e enxofre, indispensáveis para a síntese de novas proteínas, enzimas, ácidos nucleicos e compostos do metabolismo secundário para o desenvolvimento das plântulas (BUCKERIDGE et al., 2004; DIAS; OLIVEIRA; ROCHA, 2018; HENNING et al., 2010; MAGALHÃES; BORGES; BERGER, 2010; MELLO, 2008). Além disso, os carboidratos pré-formados na semente podem ser utilizados como substrato da respiração durante o período germinativo (DIAS; OLIVEIRA; ROCHA, 2018).

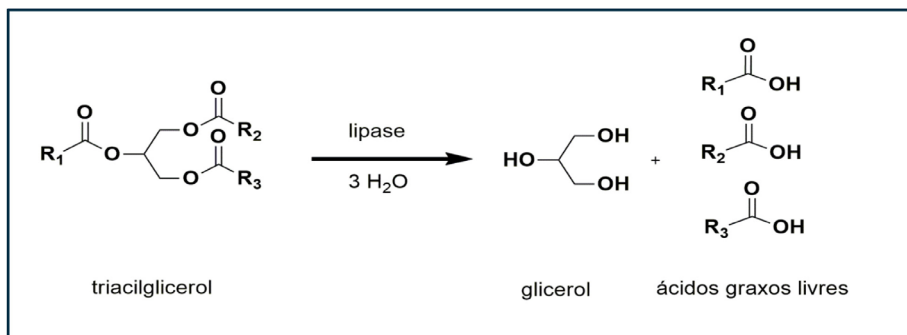
A composição química das reservas das sementes tem sido estudada não apenas pelo teor nutritivo, mas pelo fato de as reservas serem úteis na confecção de produtos industrializados para diversos fins. Além disso, tanto o vigor quanto o potencial de armazenamento das sementes são influenciados pelos teores dos compostos presentes (CORTE et al., 2006). *R. communis* é uma semente oleaginosa, o óleo de mamona é composto por triglicerídeos constituídos por ácido ricinoleico, ácido palmítico, esteárico, oleico, linoleico e outros. O ácido ricinoleico é uma molécula longa de 18 carbonos monoinsaturados (Figura 2), dominante na composição total do óleo (NGUEDAP et al., 2020; YEBOAH et al., 2020).

As biomoléculas de reservas das sementes podem estar presentes no eixo embrionário ou, mais raramente, no perisperma, ou em uma

combinação dessas partes das sementes. No entanto os principais órgãos com função de reserva são o endosperma e os cotilédones, apesar de alguns endospermas sejam principalmente reservas de lipídeos e proteína. Quando a reserva é de carboidrato, o amido é encontrado, em geral, nos endospermas de cereais, enquanto os galactomananos são característicos nas leguminosas. Já os cotilédones possuem uma variedade relativamente maior de compostos de reserva, armazenando carboidratos, que podem ser amido e polissacarídeos de reserva de parede celular, juntamente com proteínas e lipídeos (SASAKI, 2008; HENNING et al., 2010)

Os triacilgliceróis (TAG) são substâncias nas quais os três grupos hidroxila do glicerol são esterificados com ácidos graxos (Figura 9). É a principal forma de estocagem de lipídeos nas sementes oleaginosas, sendo armazenados na organela denominada oleossomo ou corpo lipídico. A matriz de um corpo lipídico é envolvida por uma monocamada de fosfolipídios, na qual está inserida a proteína chamada de oleosina, responsável por regular o tamanho e formato do copo lipídico. O tamanho do corpo lipídico está diretamente correlacionado com a velocidade de degradação durante a germinação (ALENCAR, 2014; JOLIVET et al., 2004; NELSON; COX, 2014).

Figura 9 - Esquema mostrando a reação de hidrólise catalisada pela lipase.

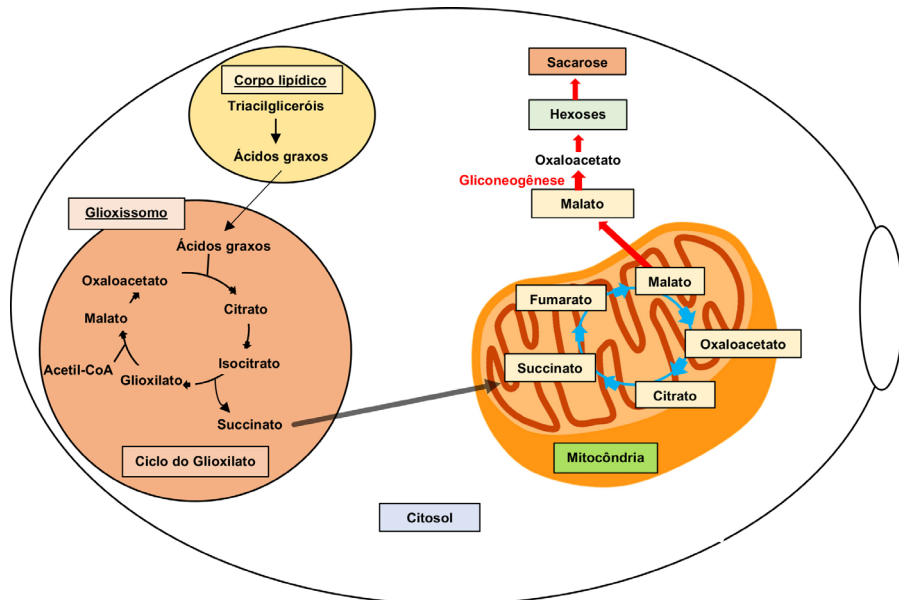


O metabolismo dos TAG nos corpos lipídicos se inicia com a ação das lipases (E.C.3.1.1.3). Inicialmente, o TAG é hidrolisado pela enzima triacilglicerol lipase (Figura 9), liberando ácido graxo livre (AGL) e 1,2-diacilglicerol (DAG). Em seguida, o DAG é hidrolisado

pela DAG lipase, liberando AGL e 2-monoacilglicerol (MAG). Por fim, o MAG é hidrolisado pela MAG lipase liberando AGL e glicerol (GRAHAM, 2008; LASO; OGONOWSKI, 2010; MELO, 2013; TOZZI, 2010; VASCONCELOS, 2017).

O glicerol é usado como fonte de carbono para a síntese de glicose, e os ácidos graxos liberados entram nos glioxissomos, onde serão β -oxidados para a produção de acetil-CoA. A acetil-CoA é convertida em citrato ao reagir com o oxaloacetato, sob ação da citrato sintase, no ciclo do glioxalato (Figura 10). A aconitase promove a conversão do citrato em isocitrato, que é então convertido em glioxalato e succinato pela isocitrato liase. O glioxalato reage com outra molécula de acetil-CoA, catalisada pela malato sintase, formando o malato que, sob a atividade da malato desidrogenase, forma oxaloacetato. O succinato é transportado do glioxissomo para a mitocôndria, entra no ciclo do ácido cítrico, onde é convertido primeiro em malato. O processo termina no citosol, com a conversão do malato em oxaloacetato, que é utilizado para produzir glicose via glicogênese e, assim, produzindo a sacarose (EASTMOND; GRAHAM, 2001; GRAHAM, 2008; NELSON; COX, 2014).

Figura 10 - Metabolismo dos lipídios e o ciclo do glioxilato



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2014).

A sacarose, produzida a partir dos órgãos de reserva das sementes (Figura 10), é transportada para o eixo embrionário e serve de energia química para o crescimento e desenvolvimento da plântula (MELO, 2013; GRAHAM, 2008; TOZZI, 2010; VASCONCELOS, 2017).

Assim, as sementes em germinação podem converter os lipídeos dos tecidos de reserva (endosperma e cotilédone) em acetil-CoA e, posteriormente, por gliconeogênese em glicose e outros carboidratos (Figura 10) para fornecer energia química para a germinação e crescimento das plântulas antes que a planta se torne fotossinteticamente ativa (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2007. No entanto, condições de estresse retardam a mobilização de reserva. Condições desfavoráveis ao abastecimento de água e condições extremas de umidade e temperatura podem alterar ou interromper a mobilização de reservas, prejudicando a germinação e o desenvolvimento de plântulas (MENGARDA et al., 2015; VASCONCELOS, 2017).

Envelhecimento de sementes: natural e artificial

*Thamires Soares Ricardo Jesus, Cristiane Dantas de Brito,
Patrícia Campos Santos, Renato Delmondez de Castro,
Henk Hilhorst, Wilco Ligterink e Luzimar Gonzaga Fernandez*

Envelhecimento e deterioração de sementes

O envelhecimento é um processo natural para todos os organismos. Nas sementes, inicia-se imediatamente após a maturidade fisiológica e prossegue enquanto as sementes permanecem no campo, durante a colheita e o armazenamento. Os processos de deterioração são comuns durante o envelhecimento, em que a soma de mecanismos bioquímicos, fisiológicos e moleculares eventualmente levam à morte da semente. Para fins práticos, uma semente é considerada morta quando está em condição adequada para a germinação (água, umidade, luz e temperatura) e na ausência de dormência, mas não germina (DELOUCHE; BASKIN, 1973; MATTHEWS, 1985).

O envelhecimento pode ser detectado no nível da população, em sementes individuais, em tecidos e nas células. Quando as sementes se deterioram, perdem vigor, tornam-se mais sensíveis ao estresse durante a germinação e podem se tornar incapazes de germinar. A taxa de envelhecimento é fortemente influenciada por fatores genéticos, pela qualidade da semente e por fatores ambientais, tais como temperatura, teor de umidade e condições de armazenamento, que podem ser controlados para aumentar a longevidade da semente (CORTE et al., 2010; SANTOS, 2018; SATHISH et al., 2015).

A deterioração é um processo irreversível nas sementes, relacionando-se a um processo multifatorial combinado associado a várias alterações celulares, metabólicas e químicas, que leva ao declínio na germinação. A rápida deterioração pode estar diretamente ligada a danos causados na

membrana, nos níveis de lipídeos e proteínas e ácidos nucleicos. Devido à degradação de lipídeos de membrana e mudança na composição de ácidos graxos insaturados, ocorre a perda da integridade dos sistemas de membranas da célula que leva a um aumento da permeabilidade, gerando lixiviação de eletrólitos e uma maior condutividade elétrica. Tudo isso ocasiona a perda de vigor, tornando as sementes mais sensíveis a estresse ambientais e, eventualmente, fazendo que elas percam a capacidade de germinar. (CHHABRA; SINGH, 2019; CORTE et al., 2010; SANTOS, 2018; SATHISH et al., 2015).

A peroxidação de ácidos graxos insaturados é considerada uma das principais razões para a perda de vigor, longevidade e viabilidade das sementes. A oxidação de lipídios aumenta o conteúdo de ácidos graxos livres, há a produção de hidroperóxidos, resultantes da oxidação de cadeias de hidrocarbonetos insaturados. Isso afeta a natureza da bicamada lipídica das membranas celulares e aumenta a permeabilidade das membranas por inativação de proteínas de membranas (CHHABRA; SINGH, 2019; MAHJABIN; ABIDI, 2015; SILVA et al., 2016). Além disso, acontecem também alterações degenerativas como a desestabilização nas atividades de enzimas, mudanças na respiração das sementes, acúmulo de substâncias tóxicas, danos às proteínas e ácidos nucleicos, que resultam em deterioração das organelas celulares e, conseqüentemente, no envelhecimento das sementes. Quando as mitocôndrias se tornam não funcionais, é esperado o início da respiração anaeróbica para fornecer energia para processos metabólicos (ABDUL-BAKI; ANDERSON, 1972; CHHABRA; SINGH, 2019; PERTEL, 2004; WALTERS, 1998).

Dessa forma, há uma relação entre produção de etanol oriundo da respiração anaeróbica e deterioração de sementes, pois acredita-se que a principal mudança fisiológica causada pelo envelhecimento das sementes seja danos à membrana celular e o dano ao interior da membrana mitocondrial, resultando no comprometimento da geração de energia pela via aeróbica e fosforilação oxidativa reduzida, proporcionando maior participação na geração de energia pela via anaeróbica, produção de energia metabólica por fermentação anaeróbica, da qual os produtos finais são etanol e ácido láctico (BENAMAR; TALLON; MACHEREL, 2003; BEWLEY; BLACK, 1994; BORGES, 2018; BUCKLEY;

HUANG, 2011; DAMRONGVUDHI et al., 2019; KENNEDY et al., 1992; MCDONALD, 1999; ORNELLASA et al., 2019).

Sementes deterioradas apresentam alteração degenerativa na sua qualidade. Desempenho reduzido durante a germinação, menor produtividade, menor uniformidade na germinação, redução na tolerância às condições ambientais adversas, redução no potencial de conservação, adiamento na emergência de plântulas, menor crescimento de raiz e parte aérea, aumento de plântulas anormais e deterioradas, redução no vigor, perda da capacidade de germinar, mudança na coloração do tegumento de sementes submetidas a alta temperatura e condições de estresse (devido a reações oxidativas) podem ser observados (ABDULBAKI; ANDERSON, 1972; CHHABRA; SINGH, 2019; PERTEL, 2004; WALTERS, 1998).

Testes de envelhecimento

O envelhecimento nas sementes pode ser natural e potencializado por fatores ambientais. Entretanto existem testes para avaliar o vigor das sementes baseando-se na submissão de sementes a temperatura e umidade relativa elevadas, com o objetivo de aumentar a deterioração. Estes são considerados os principais fatores ambientais que influenciam na intensidade e na velocidade de deterioração das sementes. O teste de envelhecimento acelerado (TEA), desenvolvido por Delouche em 1965, é um exemplo. O princípio deste teste estabelece que a taxa de deterioração é acelerada consideravelmente quando as sementes são expostas a temperatura (entre 40 e 45°C) e umidade relativa elevadas. Como resultado, verifica-se que as amostras com baixo vigor apresentam queda mais acentuada da viabilidade, quando submetidas às condições do teste, enquanto as mais vigorosas geralmente são menos afetadas em sua capacidade de produzir plântulas normais (BRAGA JÚNIOR, 2009; ROSSETTO; MARCOS FILHO, 1995; MARCOS FILHO; NOVEMBRE; CHAMMA, 2000; LOPES et al., 2008).

O TEA é indicado para a avaliação do vigor de sementes submetidas a condições de temperatura e umidade relativa elevadas, entretanto pode apresentar limitações para a maioria das oleaginosas. Nestas espécies, pode ocorrer desuniformidade de absorção de água entre as amostras,

o que pode resultar em deterioração diferenciada, comprometendo os resultados pós-envelhecimento. Por isso, Jianhua e McDonald (1997) sugeriram a substituição de água por soluções saturadas de sais durante a condução do teste, método chamado de envelhecimento acelerado com o uso de soluções saturadas de sal. A utilização do sal permite a redução da umidade relativa do ambiente, já que o sal é um composto higroscópico, retardando assim a absorção de água pelas sementes. De acordo com a solução utilizada, são obtidos níveis específicos de umidade relativa do ar, por exemplo, ao usar cloreto de sódio (NaCl), pode-se obter 76%UR; com cloreto de potássio (KCl), 87%UR; e 55%UR ao usar brometo de sódio (NaBr). Os níveis específicos de UR permitem reduzir a taxa de absorção de água, a velocidade e a intensidade de deterioração das sementes sem reduzir a sensibilidade do teste (BRAGA JÚNIOR, 2009; CARVALHO et al., 2019; EBONE et al., 2020; JIANHUA; MCDONALD, 1997; MARCOS FILHO et al., 2000; SILVA et al., 2019).

Outro teste de vigor é o teste de deterioração controlada (TDC), no entanto este apresenta um controle mais preciso da temperatura e umidade durante o período de envelhecimento. Neste teste, as sementes são submetidas a condições idênticas de deterioração, resultando em maior precisão e eficiência na distinção do potencial fisiológico dos lotes de sementes. O que diferencia o TEA do TDC é que neste último, o teor de água das sementes de todos os lotes é uniformizado antes da exposição das sementes a temperatura e UR elevadas. Dessa forma, o teor de água permanece constante durante o período de deterioração, fato não verificado no teste de envelhecimento acelerado (FENOLLOSA; JENÉ; MUNNÉ-BOSCH, 2020; HAMPTON; TEKRONY, 1995; MA et al., 2020; SILVEIRA, 2006; ZUCARELI et al., 2011).

A uniformização antecipada do teor de água inicial das sementes no TDC é importante porque permite que as sementes atinjam, antecipadamente, o ponto de equilíbrio, sendo submetidas a um estresse mais rigoroso que no TEA, onde o teor de água aumenta descontroladamente entre as sementes, até atingirem o equilíbrio. O teste de envelhecimento acelerado avalia a resposta das sementes às condições de temperatura e umidade relativa elevada, enquanto o de deterioração controlada utiliza sementes com elevado conteúdo de água, de forma que neste teste o efeito da umidade é direto. No entanto os testes de

TDC e o de TEA têm como princípio acelerar o processo de deterioração em função da exposição da semente a temperatura e umidade elevadas por determinado período. Esses testes não têm revelado claramente as diferenças entre lotes de vigor médio, mas apenas entre lotes de vigor baixo e alto (FLORES et al., 2019; KRZYZANOWSKI; WEST; FRANÇA NETO, 2001; MARCOS FILHO et al., 2000; ROSSETTO; MARCOS FILHO, 1995; ZUCARELI, 2002; ZUCARELI et al., 2011).

O teste de vigor para a detecção da deterioração de sementes pode ser entendido como um componente importante na avaliação da qualidade fisiológica, contribuindo diretamente para as indústrias de sementes que apresentam dificuldade com o armazenamento. O principal desafio das pesquisas sobre teste de vigor está na identificação de parâmetros relacionados à deterioração das sementes que precedam a perda da capacidade germinativa, ocasionados por processos degenerativos que causam alterações física, fisiológica ou bioquímica que caracterizem a deterioração (GUPTA; PUNIA; DHAIYA, 2017; SPINOLA; CÍCERO; MELO, 2000). O envelhecimento diminui a viabilidade das sementes durante o armazenamento e é um grande problema para o sucesso do crescimento e produtividade da planta, pois leva à deterioração das sementes. Na produção agrícola, sementes envelhecidas causam perdas comerciais e genéticas.

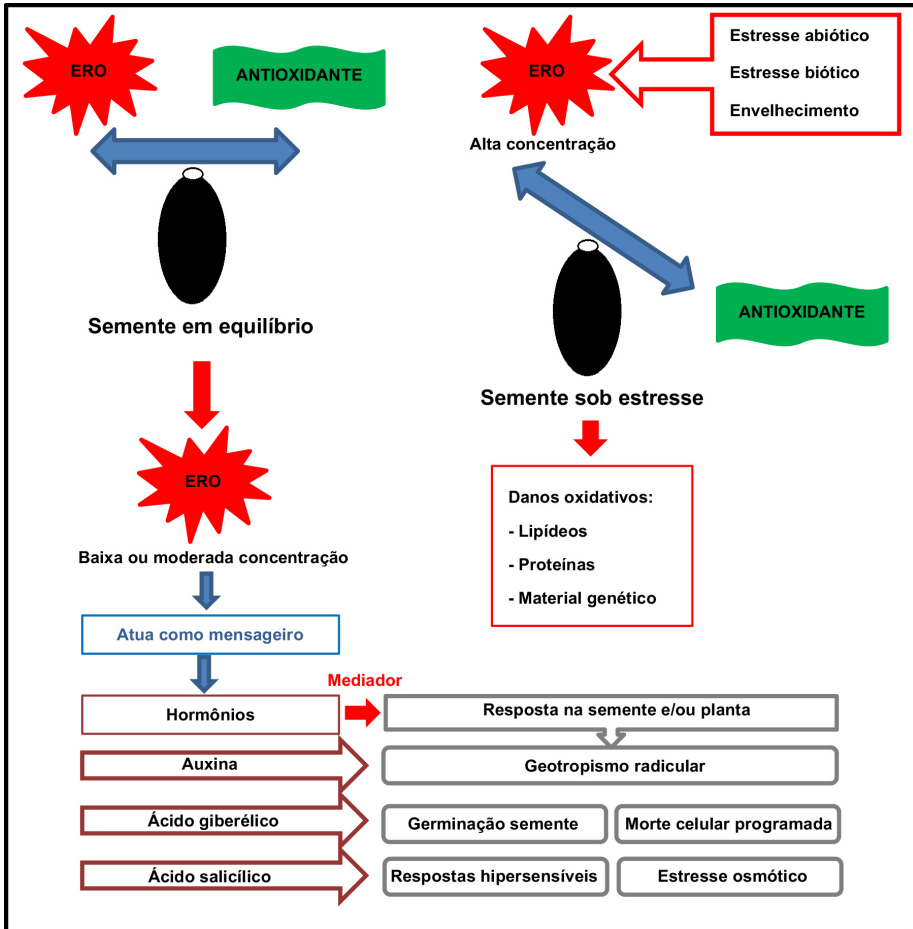
Embora os mecanismos do envelhecimento das sementes ainda estejam em estudo, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é considerada como fator que contribui para o envelhecimento das sementes e pode estar relacionada com fatores bióticos e/ou abióticos. O oxigênio também contribui para o envelhecimento da semente, já que ocasiona diretamente um desequilíbrio na produção excessiva de ERO (Figura 11). O acúmulo de ERO leva a dano de lipídios, proteínas, material genético e, conseqüentemente, contribui para a diminuição da germinação e a perda de vigor das sementes (BAILLY; EL-MAAROUF-BOUTEAU; CORBINEAU, 2008; HASANUZZAMAN et al., 2012; RATAJCZAK et al., 2015, 2019; YAO et al., 2012).

ERO estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento, germinação, dormência, envelhecimento, sendo um fator-chave no desenvolvimento e na qualidade da semente (BAILLY, 2004, 2019; SHARMA et al., 2012). Portanto espécies reativas de oxigênio não possuem apenas

uma função deletéria, em baixa ou moderada concentração podem atuar nas respostas celulares mediadas por hormônios em vários processos nas sementes e/ou plantas, gerando uma cascata de sinalização, presente no fechamento de estômatos, morte celular programada, geotropismo, aquisição de tolerância a estresse biótico ou abiótico (Figura 11). As plantas e/ou sementes podem detectar, traduzir e converter o sinal de ERO em respostas celulares com ajuda de algumas proteínas sensíveis a redução, mobilização de cálcio, fosforilação de proteínas e expressão de genes. No entanto a reatividade, o tempo de vida e a sinalização através de ERO depende do equilíbrio entre produção de oxidantes e remoção destas pelos antioxidantes (BAILLY, 2004, 2019; JASPERS; KANGASJÄRVI, 2010; SHARMA et al., 2012).

A exposição de sementes a altas umidades e temperaturas causa redução no vigor. Mendes e demais autores (2010), ao avaliar a eficiência de métodos para determinar o potencial fisiológico de sementes de mamona, incluindo o envelhecimento acelerado a 41°C e 45°C e 100% e UR, por 48, 72 e 96 horas, verificaram que o envelhecimento acelerado foi eficiente para avaliação do potencial fisiológico de sementes de mamona, permitindo classificação de lotes quanto ao vigor semelhante à emergência de plântulas em solo. Lopes *et al.*, (2008) submetem sementes de mamona ao envelhecimento acelerado e verificaram que os genótipos de mamona apresentaram, de forma geral, comportamento diferenciado entre as plantas originadas de sementes não tratadas e tratadas, com superioridade para as sementes não envelhecidas. O envelhecimento das sementes reduziu em até 16% a altura e 8% o diâmetro caulinar das plantas dos genótipos estudados e ainda causou retardo no crescimento da área foliar. Drumond *et al.*, (2019), ao avaliar sementes de *R. communis* após envelhecimento acelerado, verificaram redução na qualidade fisiológica após o envelhecimento acelerado.

Figura 11 - Representação esquemática sobre ação de espécies reativas de oxigênio (ERO).



Nota: Equilíbrio e desequilíbrio entre produção de ERO e antioxidantes; ERO em quantidade moderada ou baixa atuam na sinalização e, quando em grande concentração, causam vários danos celulares.

Estresse oxidativo e mecanismos de desintoxicação

*Thamires Soares Ricardo Jesus, Patrícia Campos Santos,
Henk Hilhorst, Wilco Ligterink e Luzimar Gonzaga Fernandez*

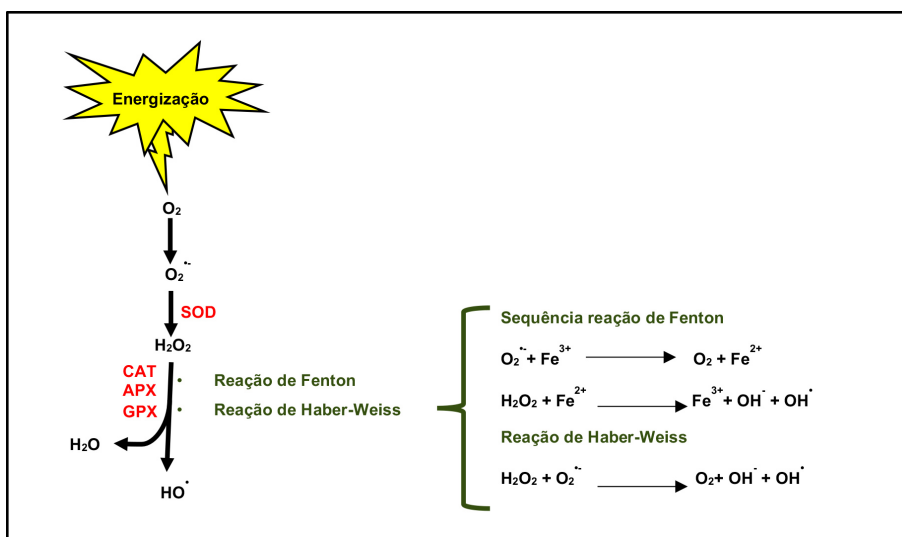
Espécies reativas de oxigênio

Todos os organismos aeróbicos produzem ERO em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbico. Espécies reativas de oxigênio podem ser definidas como átomos, moléculas ou radicais que são formados através da desestabilização eletrônica, tornando-se átomos ou moléculas altamente reativas. Estas espécies contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica, e o não emparelhamento de elétrons é que confere alta reatividade a esses átomos, moléculas ou radicais (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MITTLER et al., 2004; SHARMA et al., 2012). No entanto há ERO que não apresentam elétrons desemparelhados em sua última camada. ANGELI, 2011; MITTLER et al., 2004; SHARMA et al., 2012).

Os radicais livres são formados em um cenário de reações de óxido-redução, em que é cedido o elétron solitário, onde a molécula oxida-se ou recebe outro elétron, reduzindo-se. Portanto os radicais livres provocam ou resultam dessas reações de óxido-redução (ANGELI, 2011; MITTLER et al., 2014; SHARMA et al., 2012). Dentre as ERO radicalares derivadas do oxigênio (Figura 12) há o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$); radical perhidroxila (HOO^{\bullet}); radical hidroxil (HO^{\bullet}); hidroxila (OH^-); hidroperoxila (HO_2^{\bullet}); radical alcoxila (RO^{\bullet}); radical peroxila (ROO^{\bullet}); radical ânion carbonato ($CO_3^{\bullet-}$); e, também, espécies não radicalares, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2); ácido hipocloroso ($HOCl$); oxigênio singlete (1O_2); hidroperóxidos orgânicos ($ROOH$); e ozônio (O_3) (ANGELI, 2011; ARAUJO et al., 2018; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

As ERO podem ser produzidas a partir de fonte endógena ou exógena. Dentre as fontes endógenas mais comuns em sementes estão a mitocôndria, através da cadeia de transporte de elétrons, e os peroxissomos, produtores de peróxido de hidrogênio. As fontes exógenas mais comuns são: temperaturas e umidade altas, salinidade, seca, radiação UV, metais tóxicos, déficits de nutrientes, excesso de água e contaminação por microrganismo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HASANUZZAMAN et al., 2012; SILVA; GONÇALVES, 2010).

Figura 12 - Processo de redução sequencial de oxigênio molecular (O_2).

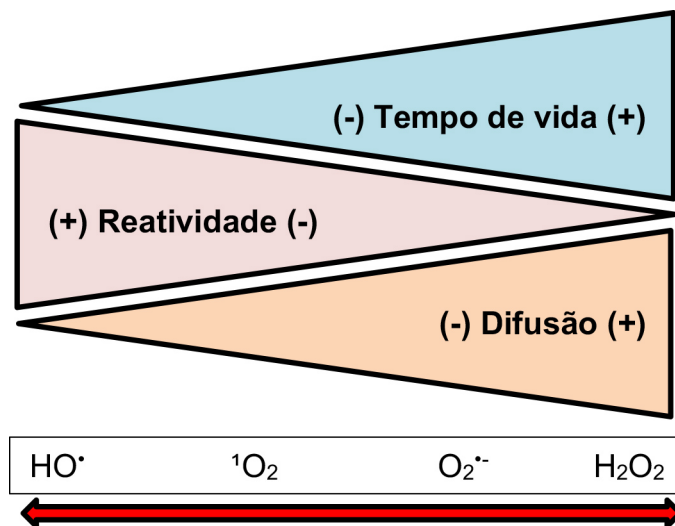


Nota: formação dos intermediários reativos como radicais superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxil (HO^{\bullet}). A formação do radical hidroxil pode ocorrer pela reação de Fenton ou reação de Haber-Weiss.

A reatividade, o tempo de vida e a difusão das ERO são diretamente relacionadas com a velocidade com que estas espécies reagem com a molécula (alvo) presente no ambiente, além da concentração do substrato oxidante (Figura 13). Por exemplo, o tempo de vida, a reatividade e a difusão de radical hidroxil (HO^{\bullet}), oxigênio singlete (1O_2), superóxido ($O_2^{\bullet -}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) varia muito (BARBOSA et al, 2010; BARREIROS; DAVID, 2006; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; GARCIA, 2005; SILVA; GONÇALVES, 2010).

O radical hidroxil é o mais reativo que se conhece nos sistemas biológicos, com meia-vida curta (aproximadamente 10^{-9} segundos), por isso, quando produzido, este causa danos em região próxima ao local onde foi sintetizado (Pastor, et al., 2000). Devido à alta reatividade deste radical, participa de reações rápidas e inespecíficas com distintos substratos, reagindo, portanto, com diferentes tipos de moléculas biológicas (AGUIAR; FERRAZ, 2007; BARBOSA et al., 2014; MYLONA; POLIDOROS, 2010). O radical HO^\bullet reage amplamente com aminoácidos, ácidos nucleicos (DNA e RNA) e oxida ácidos graxos poli-insaturados dos lipídeos das membranas celulares. O oxigênio singleto é um potente oxidante diante de compostos com alta densidade eletrônica, sendo capaz de reagir com proteínas, ácido nucléico e sistema organizado de membrana. Além disso, apresenta tempo de vida maior que HO^\bullet , por isso se difunde mais, no entanto é menos reativo que o radical hidroxila (BARBOSA et al., 2010; BARREIROS; DAVID, 2006; GARCIA, 2005; SILVA; GONÇALVES, 2010).

Figura 13 - Relação entre tempo de vida, reatividade e difusão de ERO



Fonte: adaptado de Angeli (2011).

O $\text{O}_2^{\bullet-}$ é instável, com vida média de milissegundos, e dificilmente atravessa as membranas. No entanto apresenta meia-vida mais longa

que o radical hidroxil, sendo capaz de reagir com as moléculas por mais tempo. É instável em meio aquoso e pode sofrer dismutação espontânea ou enzimática para produzir peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. É um agente oxidante fraco, que causa danos aos aminoácidos ou perda da função proteica. Além disso, é capaz de produzir outros radicais livres mais citotóxicos e reativos que ele (BARBOSA et al, 2010; BARREIROS; DAVID, 2006; SILVA; GONÇALVES, 2010).

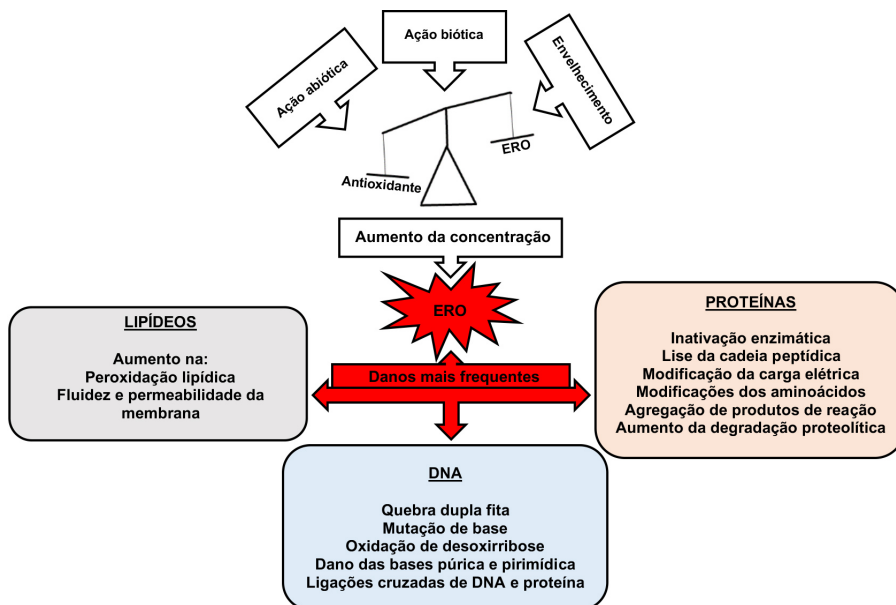
O peróxido de hidrogênio é moderadamente reativo, possui meia-vida longa e tem capacidade de difundir-se livremente através das membranas e reagir com metais de transição e algumas hemoproteínas. Pode induzir alterações cromossômicas, romper a cadeia de DNA e oxidar compostos sulfidril (-SH). É uma ERO extremamente deletéria, pois participa de reações que produzem o HO[•], através da reação de Fenton (ANGELI, 2011; BARBOSA et al., 2010; SILVA; GONÇALVES, 2010).

O radical hidroxil é formado pela fissão homóloga da ligação O-O da molécula de H₂O₂, pela reação do H₂O₂ com o íon ferroso (Fe²⁺), conhecida como reação de Fenton (Figura 12), ou pela interação do H₂O₂ com o radical superóxido (O₂^{•-}), pela reação de Haber-Weiss (ANDRADE, 2013; ANDRADE JUNIOR et al., 2005; BARBOSA et al., 2010; BARREIROS; DAVID, 2006; SILVA; GONÇALVES, 2010).

Danos oxidativos mais frequentes

Todos os organismos aeróbicos produzem espécies reativas de oxigênio, e estas atuam como sinalizadoras e em vários processos celulares, entretanto são tóxicas para as células quando há aumento na concentração e as ERO superam a quantidade de moléculas de proteção celular, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; GILL; TUTEJA, 2010). Em geral, o estresse gerado pode ser ocasionado por um fator abiótico, biótico e o próprio envelhecimento celular. Estes são responsáveis pelo desequilíbrio e aumento na produção de ERO (Figura 14). O desequilíbrio entre a quantidade de moléculas antioxidantes e ERO é ocasionado por várias condições estressantes, como salinidade, seca, luz alta, toxidades, metais pesados, patógenos, entre outros (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012)

Figura 14 - Esquema representando o aumento e a atuação de espécies reativas de oxigênio



Nota: A ação abiótica, biótica e o envelhecimento celular são responsáveis por gerar o desequilíbrio entre a produção de ERO e ação antioxidante. O aumento da concentração de ERO causa danos mais frequentes em lipídeos, proteínas e DNA.

O aumento na produção de ERO pode causar danos diretamente nos lipídeos, nas proteínas e no material genético. Nos lipídeos, essas alterações podem gerar aumento da fluidez e permeabilidade da membrana, peroxidarão lipídica. Nas proteínas, pode ocorrer modificações dos aminoácidos, quebra de cadeia peptídica, aumento da degradação proteolítica e inativação enzimática. E no DNA pode ocorrer lise da dupla fita, danos às bases púricas e pirimídicas, mutação de base, ligações cruzadas de DNA e proteína, oxidação de desoxirribose e remoção de nucleotídeo, conforme observado na Figura 14 (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; GILL; TUTEJA, 2010; SHARMA et al., 2012).

Os lipídios formam a maior parte da membrana plasmática, envolvendo as células e ajudando-as a se adaptar às mudanças ambientais, além de desempenharem diversas funções celulares. As membranas das células e organelas contêm grandes quantidades de lipídeos ricos

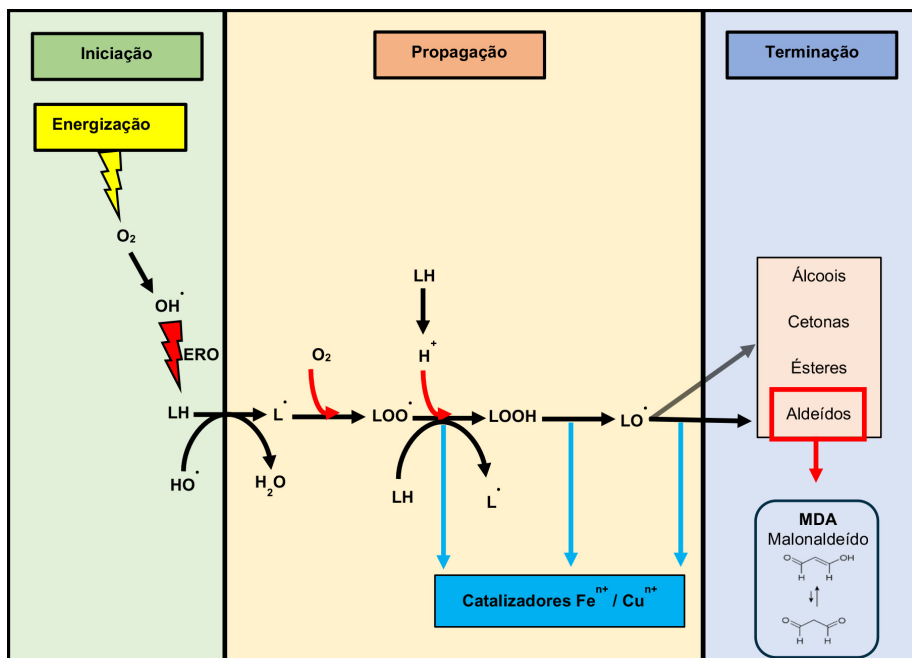
em ácidos graxos poli-insaturados. A fluidez da membrana depende da existência de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol, e danos nessas estruturas tendem a aumentar a fluidez da membrana. No geral, a peroxidação lipídica aumenta a fluidez e altera a permeabilidade da membrana, causando o vazamento de substâncias que normalmente passariam por canais ou proteínas específicas, alterando o fluxo iônico e o de outras substâncias, o que resulta na perda da seletividade para entrada e/ou saída de nutrientes e substâncias tóxicas, oxidação do colesterol e comprometimento dos componentes da matriz extracelular e morte celular (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; MAFRA et al., 1999).

A peroxidação lipídica por ERO é um tipo de degradação oxidativa de biomoléculas, em que o peróxido é formado de um substrato lipídico. Lipídeos são especialmente propensos a peroxidação, principalmente os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), seja na forma de triacilglicerol ou ácidos graxos livres, como também fosfolipídios polares contendo AGPI (glicolipídios, glicerofosfolipídios e esfingolipídios) e colesterol, devido à presença de grupos metileno adjacentes a ligações duplas (FÉLIX et al., 2020; LIMA; ABDALLA, 2001).

A peroxidação lipídica é tão prejudicial à célula, que se torna o principal parâmetro para avaliar os danos aos lipídeos da célula. Os dois principais alvos das ERO nos fosfolipídios da membrana são a dupla ligação entre os átomos carbono (C=C) e a ligação éster entre o glicerol e os ácidos graxos. Os ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido linoleico e linolênico, componentes importantes da membrana plasmática, são os pontos críticos para os danos de ERO, e são especificamente propensos ao ataque por ERO como $^1\text{O}_2$ e OH^\bullet (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; FÉLIX et al., 2020; MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999; GILL; TUJETA, 2010; SHARMA et al., 2012).

O processo de peroxidação lipídica pode ser dividido em três fases distintas (Figura 15): iniciação, propagação e terminação (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; FÉLIX et al., 2020; GILL; TUJETA, 2010; MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999; SHARMA et al., 2012).

Figura 15 - Etapas da peroxidação lipídica.



Nota: A etapa de iniciação envolve o processo de energização do oxigênio (O_2) e formação de espécie reativa de oxigênio (ERO), por exemplo, o radical hidroxila (OH^\bullet). Nesta fase inicial da peroxidação, o OH^\bullet abstrai um hidrogênio da cadeia lateral do ácido graxo (LH), ocorrendo a formação do radical alquila (L^\bullet). Na propagação, o L^\bullet formado se combina com o oxigênio, formando o radical peroxila (LOO^\bullet), o qual abstrai o hidrogênio do LH formando o hidroperóxido lipídico (LOOH). Seguindo a formação de alcoxila (LO^\bullet), as etapas da propagação podem ser catalisadas por Fe^{n+}/Cu^{n+} . Por fim, na etapa de terminação, ocorre a neutralização dos radicais e formação de álcoois, cetonas, ésteres e aldeídos. E um dos marcadores mais utilizados para avaliar peroxidação lipídica é o subproduto formado, o malonaldeído (MDA).

Na etapa de terminação, ocorre a neutralização dos radicais formados originando produtos não radicais. Os radicais alcoxila (LO^\bullet) e o peroxila (LOO^\bullet) podem sofrer dismutação ou clivagem formando aldeídos; formar uma ligação covalente com resíduos de aminoácidos e sofrer um rearranjo originando produtos secundários (álcoois, cetonas, ésteres) da peroxidação lipídica (DAS; ROYCHOUDHURY, 2014; FÉLIX et al., 2020; LIMA; ABDALLA, 2001; SANTOS et al., 2007).

Um dos principais produtos da peroxidação lipídica é o malonaldeído (MDA), um aldeído de cadeia curta, formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados por cisão beta dos AGPI peroxidados, principalmente o ácido araquidônico. O MDA é utilizado como um biomarcador para peroxidação lipídica, por

ser facilmente detectado pela reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) (FÉLIX et al., 2020; LIMA; ABDALLA, 2001; MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999).

As ERO podem e gerar diversos danos às proteínas. A oxidação de proteínas ocorre principalmente devido à ação do $O_2^{\bullet-}$ e OH^{\bullet} . Os danos nas proteínas podem ser gerados devido à oxidação dos resíduos de aminoácido das cadeias laterais, formação de ligações cruzadas proteína-proteína, oxidação do molde da sequência da proteína e quebra da cadeia polipeptídica, oxidação do sítio catalítico, mudanças conformacionais, alteração da carga elétrica, aumento da susceptibilidade a proteólise e inativação enzimática (ANSCHAU, 2011; BERLETT; STADTMAN, 1997; CECARINI et al., 2007; ROTTA, 2007; SHACTER, 2000). A oxidação de proteína pode rapidamente contribuir para o estresse oxidativo, afetando a sinalização e a estrutura celular, e processos enzimáticos no metabolismo. Outra consequência da oxidação é a geração de proteína carbonilada. Esta pode reagir com produtos da peroxidação lipídica, metabólitos oxidados ou açúcares redutores. O grupamento carbonila pode promover ligações intra ou intermoleculares e formar os agregados proteicos, portanto as proteínas carboniladas podem ser utilizadas como um biomarcador do estresse oxidativo de proteínas enzimática. (ANSCHAU, 2011; BERLETT; STADTMAN, 1997; CECARINI et al., 2007; ROTTA, 2007; SHACTER, 2000).

As ERO também causam danos diretamente aos ácidos nucleicos, incluindo rompimento da dupla fita do DNA, modificações nas bases purínicas e pirimídicas e no açúcar desoxirribose, geração de danos sem reparo, mutação, alterações na expressão e apoptose celular. A principal ERO que causa danos ao DNA é a OH^{\bullet} , sendo capaz de danificar as bases nitrogenadas purínicas e pirimídicas, como também na estrutura da desoxirribose, reage também com os aminoácidos e RNA. Quando o radical OH^{\bullet} ataca a desoxirribose, este ataque ao açúcar pode ser realizado por abstração de um átomo de hidrogênio, podendo ocasionar ligação cruzada de DNA com proteínas, bases modificadas, defeitos no processo de replicação. E o H_2O_2 é capaz de romper a fita de DNA, além de induzir alterações cromossômicas (ANDRADE JÚNIOR et al., 2005; ANSCHAU, 2011; SILVA; GONÇALVES, 2010; VALKO et al., 2007).

Antioxidantes não enzimáticos presentes nos vegetais

*Thamires Soares Ricardo Jesus, Patrícia Campos Santos,
Paulo Roberto Ribeiro de Jesus, Henk Hilhorst, Wilco Ligterink e
Luzimar Gonzaga Fernandez*

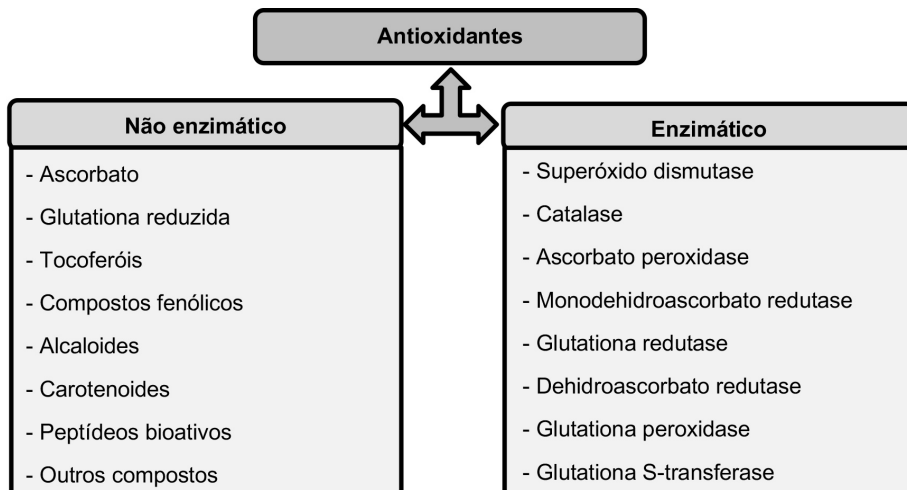
Principais mecanismos de defesa

As espécies reativas de oxigênio têm influência direta ou indireta na deterioração das sementes, afetando vários processos metabólicos, podendo levar a alterações oxidativas nas células, aumentando a taxa de mutação. No entanto há um complexo de defesa para proteger contra os danos causados durante o processo de deterioração das sementes. O mecanismo de defesa é composto por componentes não enzimáticos e enzimáticos (Figura 16) que neutralizam as espécies reativas de oxigênio (CAVERZAN et al., 2019; HASANUZZAMAN et al., 2012; SHARMA et al., 2012).

Antioxidantes não enzimáticos

Os componentes não enzimáticos são: vitamina E, A e C, dentre elas ascorbato (AsA) e tocoferol; glutathiona reduzida (GSH); terpenos; compostos fenólicos, alcaloides, carotenoides; ácido úrico; ubiquinona ou coenzima Q10; melatonina; bilirrubina; poliaminas e aminoácidos não proteicos (BARREIROS; DAVID, 2006; BIRBEN et al., 2012; FERREIRA; ABREU, 2007; HASANUZZAMAN et al., 2020; JEVAS, 2016; MIRONCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018; RESENDE; SALGADO; CHAVES, 2003; SHARMA et al., 2012).

Figura 16 - Biomoléculas antioxidantes de defesa em plantas, sistemas não enzimático e enzimático



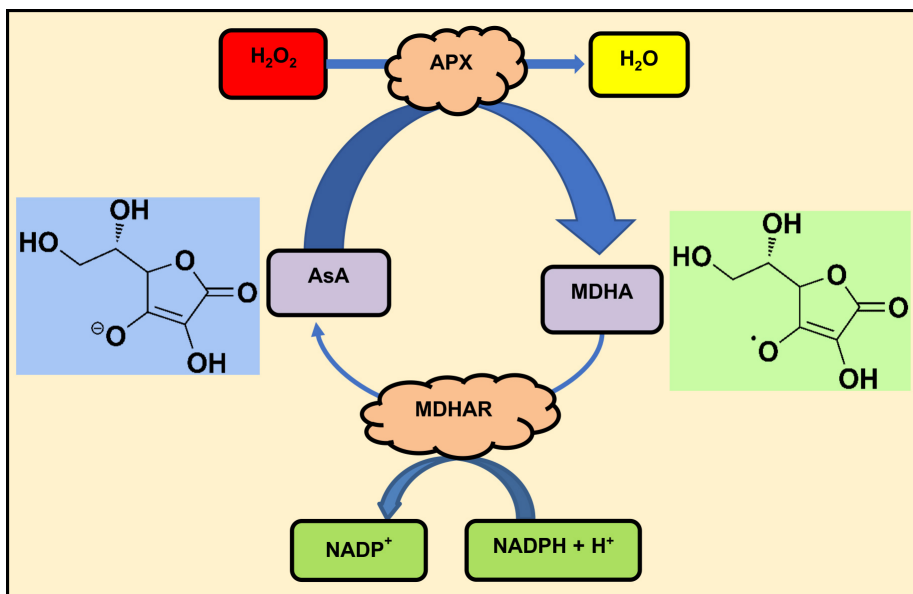
Ácido ascórbico

A vitamina C, ou ácido ascórbico (ácido 2,3-enediol-L-gulônico), ou ascorbato (AsA) é um antioxidante importante nos tecidos vegetais, sintetizado no citosol de plantas superiores, principalmente a partir da conversão de D-glicose em AsA. O ascorbato reage com ERO, tais como: H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$ e 1O_2 , que são a base da sua ação antioxidante. O AsA é o doador terminal de elétrons nesses processos, elimina radicais livres nos ambientes hidrofílicos das células vegetais e OH^{\bullet} em taxas controladas por difusão. AsA possui papel importante no ciclo do ascorbato-glutaciona (AsA-GSH); duas moléculas de ascorbato são utilizadas pela ascorbato peroxidase (APX) para reduzir o peróxido de hidrogênio em água com a geração simultânea de monodehidroascorbato (MDHA). É um radical de vida útil curta que pode ser desproporcional ao dehidro (DHA) e ascorbato (Figura 17). O doador de elétrons geralmente é o $NADPH + H^+$, e a reação é catalisada por monodehidroascorbato redutase (MDHAR) (HASANUZZAMAN et al., 2012; SHARMA et al., 2012; SMERILLI et al., 2019).

Quando o ascorbato é oxidado por um ou dois elétrons, ele produz o radical ascorbila e o ácido desidroascórbico/dehidroascorbato. O radical ascorbila é considerado um radical relativamente não reativo,

quando comparado a outros radicais livres. Isso é importante porque esta propriedade torna o ácido ascórbico um eficiente antioxidante, eficaz para eliminar espécies altamente reativas, produzindo um radical com baixa reatividade. Já o radical ascorbilo pode ser convertido novamente em ácido ascórbico por redutase dependente de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), ou por dismutação de duas moléculas do radical em uma de ascorbato e uma de ácido desidroascórbico. No entanto o ácido desidroascórbico é uma molécula pouco estável em pH fisiológico, geralmente reduzido a ascorbato ou hidrolisado irreversivelmente (BEYER, 1994; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Figura 17 - O ascorbato faz parte do ciclo do ascorbato – glutatona.



Nota: Componente importante para que a ascorbato peroxidase (APX) seja capaz de decompor o peróxido de hidrogênio em água (H_2O). O AsA é restabelecido no ciclo pela ação da monodehidroascorbato redutase, que oxida o $NADPH + H^+$ e disponibiliza um elétron para a formação de AsA a partir de MDHA.

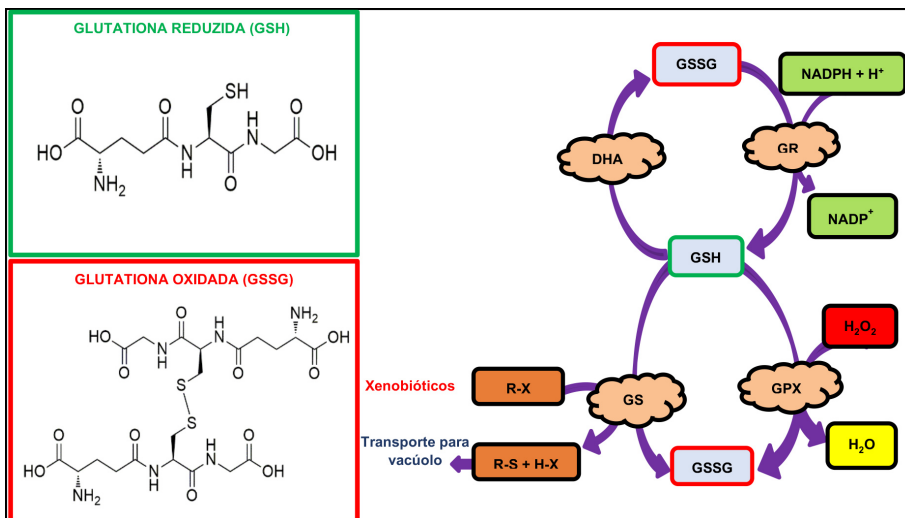
Glutationa

A glutatona reduzida (GSH) é um antioxidante que está diretamente relacionado à redução de espécie reativa de oxigênio. Além disso, o GSH desempenha um papel fundamental na ação antioxidante no sistema de defesa que regenera outros potenciais antioxidantes solúveis

em água, como AsA, através do ciclo ascorbato-glutationa (AsA-GSH). A GSH desempenha papel indireto na proteção das membranas, mantendo tocoferol e zeaxantina em estado reduzido, e é responsável por evitar a desnaturação de proteínas, causada pela oxidação dos grupos tiol das proteínas sob estresse. A glutatona reduzida também é substrato para glutatona peroxidase (GPX) e glutatona S-transferase (GST), que também estão envolvidos na remoção de ERO. Outra função importante da GSH é a participação na desintoxicação de xenobióticos, atuando no armazenamento e transporte de enxofre reduzido e outras moléculas (HASANUZZAMAN et al., 2012; SHARMA et al., 2012; SMERILLI et al., 2019; TIWARI; YADAV, 2019)

Três grupos de enzimas podem ser identificados no ciclo catalítico da glutatona (Figura 18): glutatona peroxidase (GPX), glutatona S-transferase (GST) e glutatona redutase (GR), considerando que esta última é responsável pela regeneração da glutatona reduzida (GSH) a partir da glutatona oxidada (GSSG) em um processo dependente de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzido (NADPH + H⁺). Além disso, a enzima glutatona redutase faz parte do ciclo do ascorbato-glutationa (HASANUZZAMAN et al., 2012; NIMSE; PAL, 2015).

Figura 18 - Conversão da glutatona reduzida para sua forma oxidada pelas enzimas GST e GPX, e da sua forma oxidada em sua forma reduzida pela enzima GR.



Nota: Enzimas do ciclo do ascorbato-glutationa (AsA-GSH). Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH + H⁺), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada (NADP⁺), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutatona oxidada (GSSG), glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase (GR), glutatona S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPX); seta vermelha significa conversão não enzimática; R pode ser grupos alifáticos, aromáticos ou heterocíclico; X pode ser sulfato, nitrito ou haletos.

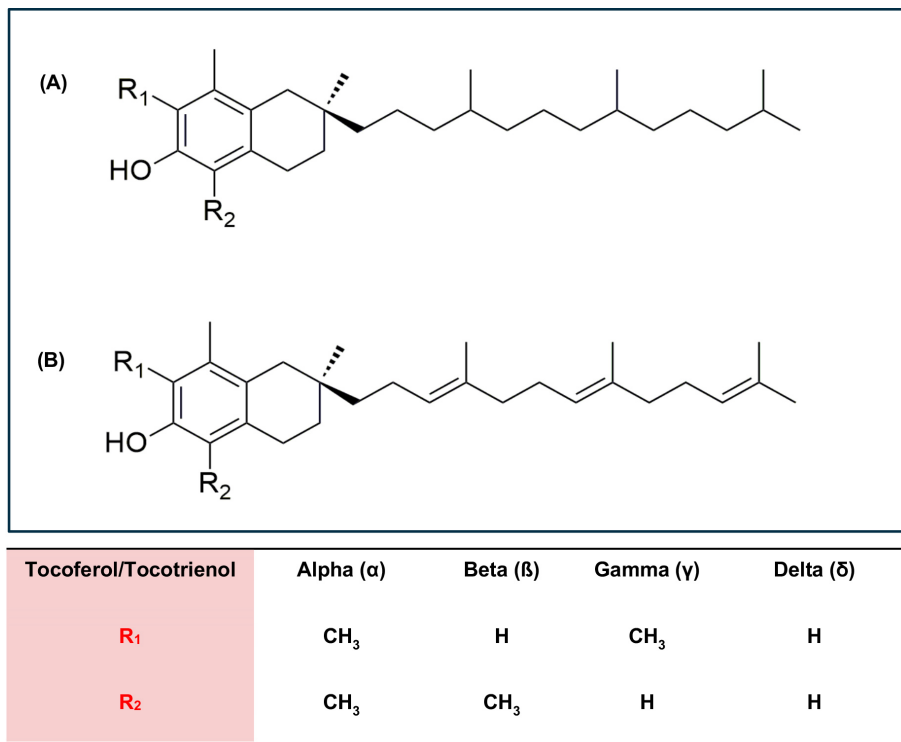
Tocoferol

Os tocoferóis são compostos que possuem grupamentos metil-substituintes e cadeia lateral saturada. Estes são derivados do tocol e apresentam cadeia lateral saturada com 16 átomos de carbono. Existem quatro estruturas isoméricas dos tocoferóis: o α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol e o δ -tocoferol (Figura 19). E há os isômeros tocotrienol (α , β , γ , δ), que apresentam estrutura idêntica, exceto pela presença de três duplas ligações na cadeia carbônica. Além disso, possuem uma cadeia lateral insaturada contendo 16 átomos de carbono (Figura 19). (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; LUZ, 2011; NIKI; ABE, 2019).

Os tocoferóis são muito abundantes nas membranas dos tilacoides que contêm ácidos graxos poli-insaturados e estão próximos das ERO produzidas durante a fotossíntese. Os tocoferóis contribuem para reduzir os níveis de ERO (principalmente ¹O₂ e OH[•]) nas membranas fotossintéticas e limitam a extensão da peroxidação lipídica

reduzindo os radicais peroxila (LOO^\bullet) aos hidroperóxidos correspondentes (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HASANUZZAMAN *et al.*, 2012; MISHRA; CHANDC; SANGWANA, 2019).

Figura 19 - Estrutura química do tocoferol A. e tocotrienol B.



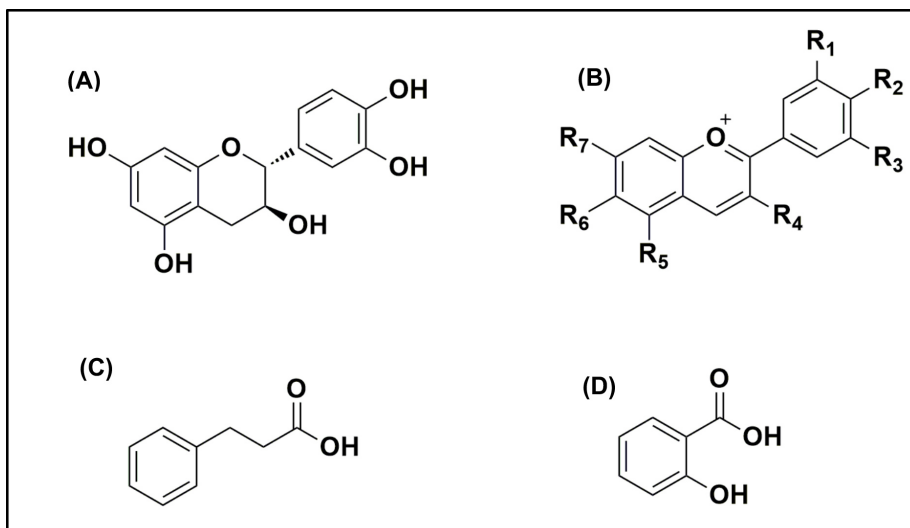
Nota: Os tocoferóis são compostos que possuem grupamentos metil-substituintes e cadeia lateral saturada. Já os tocotrienóis apresentam estrutura idêntica, exceto pela presença de três duplas ligações na cadeia carbônica. R1 e R2 representam os radicais orgânicos

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza, compondo um grande grupo sintetizado por plantas sob diferentes condições ambientais e de estresse. Podem ser pigmentos que dão a aparência colorida aos alimentos ou produtos do metabolismo secundário (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; SILVA *et al.*, 2010). Os compostos fenólicos são formados por dois grupos diversificados, podendo ser classificados em simples e complexos. Dentre os compostos fenólicos produzidos no metabolismo secundário de plantas

há estruturas diversas, desde polifenóis tipo flavonoides, sendo que catequinas e antocianinas são os mais comumente encontrados, e não flavonoides (fenóis simples ou ácidos), a exemplo dos derivados do ácido hidroxicinâmico e do ácido hidroxibenzoico (Figura 20), como também as ligninas e os taninos. Além desses compostos, estruturas fenólicas são encontradas fazendo parte de proteínas, alcaloides e terpenoides (MELO; GUERRA, 2002; SILVA et al., 2010).

Figura 20 - Estrutura de diferentes compostos fenólicos. A. catequina; B. antocianinas; C. ácido hidroxicinâmico; e D. ácido hidroxibenzoico.



Os compostos fenólicos agem como antioxidantes não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também funcionam como sequestradores de radicais e, em alguns momentos, como quelantes de metais. Podem agir tanto durante a etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; SILVA et al., 2010).

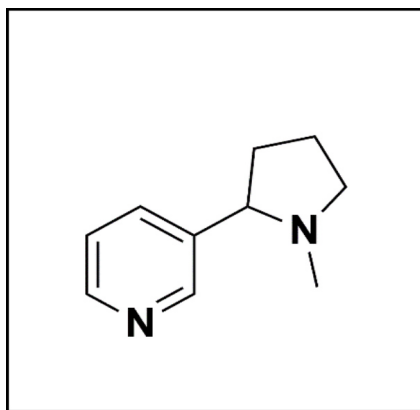
Os produtos intermediários formados pela ação dos compostos fenólicos são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático apresentada por estas substâncias. A atividade antioxidante destes está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas, e a proximidade

do grupo (COOH) em relação ao grupo fenil. A capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta é maior quanto mais próximo o grupo (CO₂H) estiver do fenil (CHOUGUI et al., 2013; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; HRAZDINA; BORZEL; ROBINSON, 1970; SILVA et al., 2010; SOARES, 2002).

Alcaloides

Os alcaloides em geral são derivados de uma rota biosintética de um aminoácido. Além disso, são metabólitos secundários, heterocíclicos, que possuem pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel carbônico, a exemplo da nicotina (Figura 21), e são solúveis em água.

Figura 21 - Estrutura da nicotina



Em relação às suas propriedades, em sua maioria, os alcalóides apresentam caráter básico e são cristalinos, entretanto alguns formam precipitados amorfos, uns são líquidos a temperatura ambiente, outros não possuem cheiro, são amargos e, em geral, incolor. Os alcaloides apresentam função importante na proteção contra radiação UV, ação antimicrobiana, ação antioxidante e antimutagênica (GARCÍA; CARRIL, 2009; HENNING, 2013; MAGEDANS, 2017; SACHAN et al., 2010; SOARES; MACHADO, 2007).

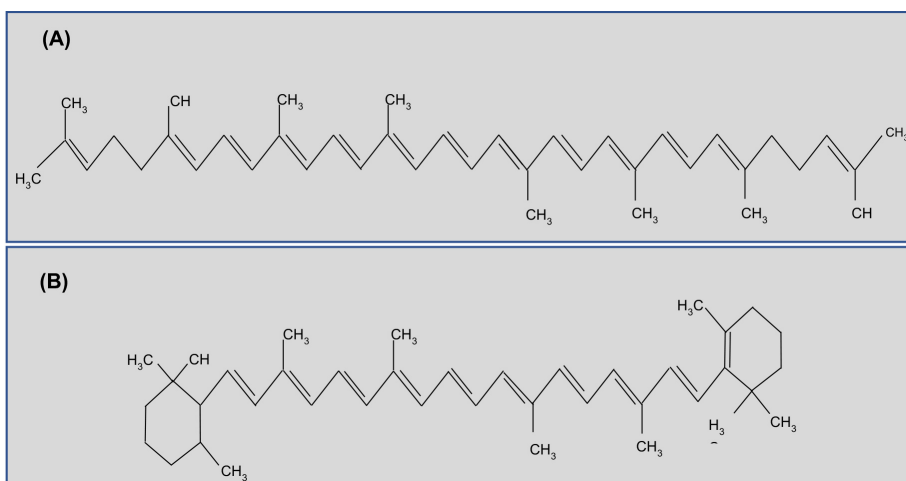
Carotenoides

Os carotenoides são responsáveis por muitos dos tons vermelho, laranja e amarelo das folhas, frutas e flores das plantas, além das cores de alguns pássaros, insetos, peixes e crustáceos. Os carotenoides só

podem ser sintetizados em plantas, bactérias, fungos e algas, mas muitos animais os incorporam a partir de sua dieta e, assim, os carotenoides servem como antioxidantes nos animais. Uma alimentação rica em carotenoide está associada com sua atividade antioxidante, protegendo as células e tecidos contra danos oxidativos (OLIVEIRA, 2010; STAHL; SIES, 2003; UENOJO et al., 2007).

Os carotenoides, geralmente, são constituídos por oito unidades de isoprenos, formando uma longa cadeia de polieno, este pode conter de duas a quinze duplas ligações conjugadas, permitindo muitas configurações *CIS* e *TRAS* (Figura 22).

Figura 22 - Estrutura de carotenoides. A. licopeno; B. β -caroteno



A propriedade antioxidante está relacionada à estrutura destes compostos, especialmente o sistema de dupla ligações conjugadas, permitindo a possível captação de radicais livres, principalmente os radicais alquilperoxila (ROO^{\bullet}). Além da captação de radicais livres, os carotenoides captam energia do oxigênio singleto, que volta ao estado fundamental (CERQUEIRA *et al.*, 2007; FRASER; BRAMLEY, 2004; OLIVEIRA, 2010; STAHL; SIES, 2003; UENOJO et al., 2007).

Em plantas, estes antioxidantes estão presentes em membrana plasmática, em membranas dos cloroplastos e vacúolos, mas podem estar presentes em outras organelas. Sua principal função está relacionada à proteção da membrana plasmática, não permitindo que ocorra

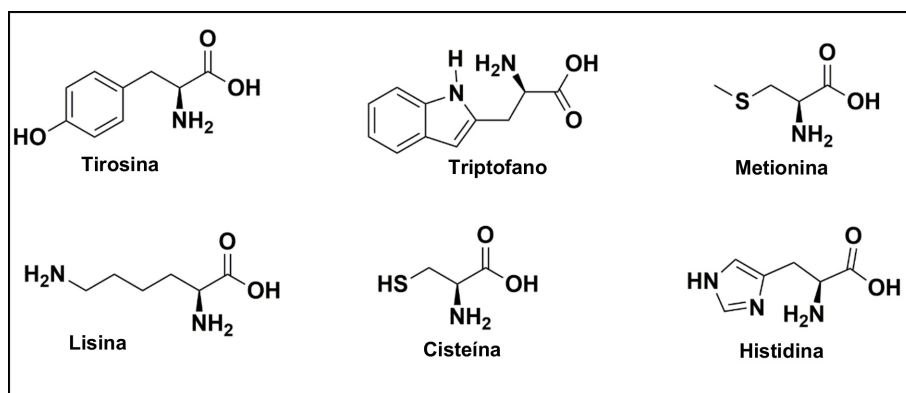
a perda da integridade da membrana através da peroxidação lipídica, fotoproteção e combate ao oxigênio singlete (OLIVEIRA, 2010; STAHL; SIES, 2003; UENOJO et al., 2007)

Peptídeos e aminoácidos

Os peptídeos bioativos apresentam utilidade na saúde do indivíduo e como antioxidantes naturais, constituídos de cadeias de aminoácidos de pequeno tamanho, entre dois a quinze resíduos inativos quando ligados à estrutura primária da proteína. Podem ser liberados através da hidrólise, desempenhando efeitos benéficos para o organismo, mas sua atividade irá depender da composição de aminoácidos e do peso molecular (DU et al., 2020; OLIVEIRA, 2016; PIOTROWICZ, 2016).

Existem aminoácidos que apresentam função antioxidante, por exemplo: tirosina, triptofano, metionina, lisina, cisteína e histidina (Figura 23). Aminoácidos com resíduos aromáticos podem doar prótons para radicais deficientes em elétrons. Peptídeos que contêm resíduos de histidina possuem função antioxidante, através da doação de hidrogênio. Além de possuir a capacidade de reter radicais peróxido e/ou a habilidade quelante de metais, apresentada pelo grupo imidazol. O grupo -SH da cisteína tem ação antioxidante importante devido a sua interação direta com radicais (CENTENARO, 2011; NELSON; COX, 2014; OLIVEIRA, 2016; PIOTROWICZ, 2016).

Figura 23 - Estruturas dos aminoácidos tirosina, triptofano, metionina, lisina, cisteína e histidina, que são antioxidantes



Enzimas antioxidantes

*Thamires Soares Ricardo Jesus, Thales Guimarães Bezerra,
Patrícia Campos Santos, Henk Hilhorst, Wilco Ligterink e
Luzimar Gonzaga Fernandez*

O outro sistema de limpeza das espécies reativas de oxigênio são as enzimas antioxidantes, que estão localizadas em diferentes compartimentos nas células e trabalham juntas na desintoxicação de ERO. As principais enzimas antioxidantes (Figura 24) são: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPX) e glutatona S-transferase (GST), e as enzimas do ciclo do ascorbato-glutatona (AsA-GSH) (HASANUZZAMAN et al., 2012).

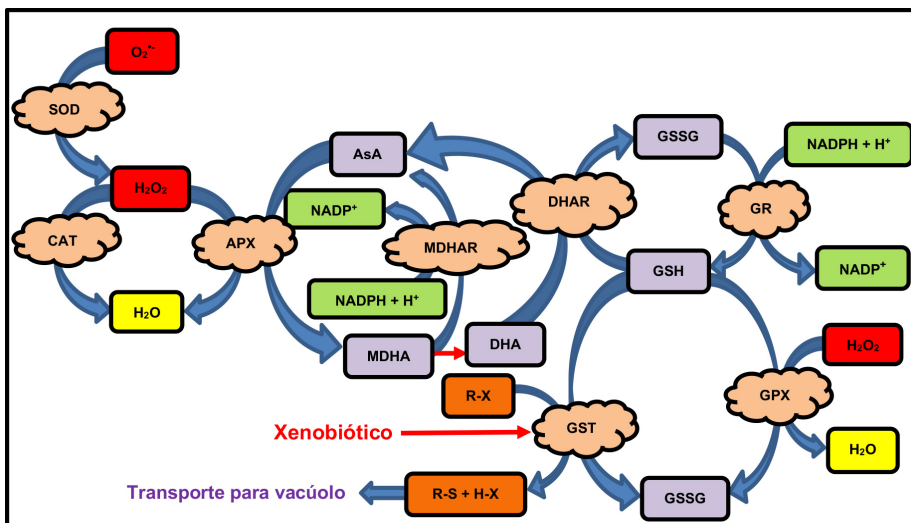
O ciclo AsA-GSH envolve quatro enzimas (Figura 24): ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), dehidroascorbato redutase (DHAR) e glutatona redutase (GR). Juntamente com os antioxidantes não enzimáticos AsA, GSH e nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida (NADPH + H⁺), promovem a desintoxicação do peróxido de hidrogênio em uma série de reações cíclicas, além de regenerar o AsA e GSH (HASANUZZAMAN et al., 2012; HO; MURTHY; PARK, 2020; LI; LIU; ZHANG, 2010; MA et al., 2019)

Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) é uma enzima muito importante para o sistema antioxidante enzimático. É a primeira enzima a ser ativada e capaz de realizar a detoxificação do radical superóxido (O₂^{•-}) do sistema, presente no citosol, mitocôndrias e cloroplasto de plantas (Tabela 2). A atividade da SOD é realizada através da dismutação de duas moléculas de superóxido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio molecular (O₂). A dismutação é um tipo especial de reação, em que duas meias reações opostas ocorrem em duas moléculas separadas (AHMAD; SARWAT; SHARMA, 2008; BAILLY, 2004; HU et

al., 2019; IGHODARO; AKINLOYE, 2018; KIM et al., 2015; MILLER, 2012; WOLFE-SIMON; GRZEBYK; SCHOFIELD, 2005)

Figura 24 - Mecanismo de desintoxicação de Espécies Reativas de Oxigênio por diferentes enzimas antioxidantes.



Nota: Seta vermelha significa indica conversão não enzimática; R representa grupos alifáticos, aromáticos ou heterocíclico; X representa sulfato, nitrito, haletos. Superóxido ($O_2^{\bullet -}$); superóxido dismutase (SOD); peróxido de hidrogênio (H_2O_2); catalase (CAT); água (H_2O); ascorbato peroxidase (APX); ascorbato (AsA); nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida ($NADPH + H^+$); nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada ($NADP^+$); monodehidroascorbato (MDHA); dehidroascorbato (DHA); monodehidroascorbato redutase (MDHAR); dehidroascorbato redutase (DHAR); glutatona oxidada (GSSG); glutatona reduzida (GSH); glutatona redutase (GR); glutatona S-transferase (GST); glutatona peroxidase (GPX). **Fonte:** adaptado de Hasanuzzaman e demais autores (2012).

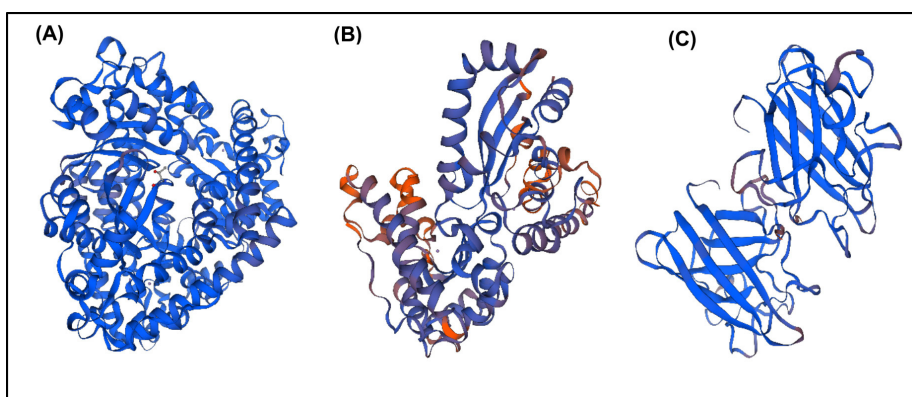
Tabela 2 - Reação catalisada pela SOD e locais de atuação em plantas

Enzima	Reação	Locais de reação
SOD	$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Cloroplasto, citosol, mitocôndria
Fe-SOD		Cloroplasto
Mn-SOD		Mitocôndria
Cu/Zn-SOD		Cloroplasto e citosol
Ni-SOD		Algas, cianobactérias e bactérias.

A superóxido dismutase corresponde a uma família de proteínas do tipo metaloenzima, assim a SOD requer um metal como cofator, sendo classificadas com base no íon metálico em seu sítio ativo

(HASANUZZAMAN et al., 2012; MILLER, 2012; MORAES et al., 2015; WOLFE-SIMON; GRZEBYK; SCHOFIELD, 2005). Os íons metálicos normalmente ligados à SOD são: ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn). Nesse sentido, a SOD pode ser classificada em Fe-SOD, comumente encontrada em procariontes e cloroplasto de algumas plantas; Mn-SOD, presente em procariontes e mitocôndrias de eucariotos; Cu/Zn-SOD é predominante em eucariotos e mais distribuída no citosol, mas também encontrada em cloroplastos (Figura 25). Há também SOD ligada a níquel (Ni), mas só há evidências de sua existência até o momento em algas, cianobactérias e bactérias. Nenhuma evidência para Ni-SOD foi encontrada em plantas (AHMAD; SARWAT; SHARMA, 2008; BAILLY, 2004; HU et al., 2019; IGHODARO; AKINLOYE, 2018; KIM et al., 2015; MILLER, 2012; WOLFE-SIMON et al., 2005).

Figura 25 - Estrutura tridimensional de superóxido dismutase de *Ricinus communis* L.: A. Mn-SOD mitocondrial; B. Fe-SOD cloroplasto; C. Cu/Zn-SOD cloroplasto.



Fonte: Programa para delineamento de estrutura tridimensional SWISS-MODEL¹. Sequência da proteína obtidas no NCBI².

Catalase (CAT, EC 1.11.7.6)

Catalases (CAT, EC 1.11.7.6) são as principais enzimas que eliminam diretamente o H₂O₂ e são indispensáveis para a desintoxicação de ERO durante o estresse oxidativo. A Catalase é capaz de realizar a dismutação de duas moléculas de peróxido de hidrogênio em água e

1 Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/>. Acesso em: 20 mar. 2020.

2 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20 mar. 2020. NCBI Referência das sequências: A. XP_015575765.1; B. XP_015575802.1; e C. XP_002523728.1.

oxigênio (Tabela 3). Apesar de possuir alta especificidade para H_2O_2 , tem fraca atividade contra peróxido orgânico. As plantas contêm vários tipos de enzimas capazes de degradar o H_2O_2 , no entanto as CAT são as únicas que não requerem redução equivalente (AHMAD; SARWAT; SHARMA, 2008; BAILLY et al., 2004; HASANUZZAMAN et al., 2012; KURAMA et al., 2002; SHARMA et al., 2012).

Tabela 3 - Reação catalisada pela catalase e locais de atuação em plantas

Enzima	Reação	Locais de reação
CAT	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + \frac{1}{2}O_2$	Peroxisomo, cloroplasto, mitocôndria
CAT I		Peroxisomos e cloroplasto
CAT II		Peroxisomos
CATIII		mitocôndria.

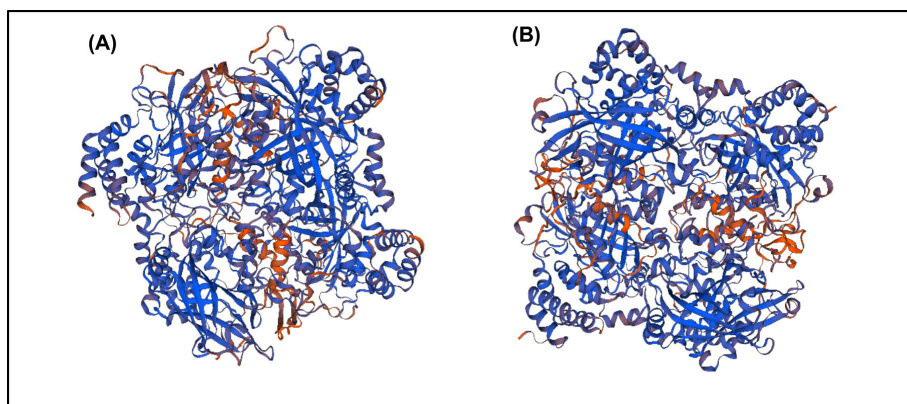
A catalase apresenta menor afinidade pelo peróxido que a APX. Os peroxissomos são os principais locais de produção de peróxido de hidrogênio, a catalase elimina os H_2O_2 formados nessa organela durante a oxidação fotorrespiratória, β -oxidação de ácidos graxos e outros sistemas enzimáticos como o produto da ação da SOD. Até o momento, todas as espécies de angiospermas estudadas contêm três genes CAT. São classificadas em CAT I, isoformas expressas em tecidos fotossintéticos; CAT II são expressas em altos níveis nos tecidos vasculares; enquanto a CAT III é altamente abundante em sementes e mudas jovens. No entanto, em *Ricinus communis* L., são expressas apenas as isoformas CAT I e II (Figura 26) (AHMAD; SARWAT; SHARMA et al, 2008; BAILLY et al., 2004; HASANUZZAMAN et al., 2012; SHARMA et al., 2012).

Enzimas do Ciclo Ascorbato-Glutationa (AsA-GSH)

O Ciclo do AsA-GSH é o maior sistema de defesa contra as ERO no cloroplasto, no citosol, na mitocôndria, no peroxissomo e no aploplasto (Figura 24). O ciclo da AsA-GSH envolve enzimas (APX, MDHAR, DHAR e GR), bem como o AsA, GSH e NADPH + H^+ trabalhando juntos na detoxificação do H_2O_2 em séries de reações cíclicas e de regeneração do AsA e GSH. Neste ciclo, a APX catalisa a redução do H_2O_2 para água (H_2O) com simultâneas gerações de monodehidroascorbato

(MDHA), que é convertido para AsA com a ação de NAP-dependente de MDHAR ou desproporcionalmente não enzimaticamente ao AsA e ao dehidroascorbato (DHA). O DHA sofre hidrólise irreversível em ácido 2,3-dicetogulônico ou é reciclado para AsA pela DHAR, que usa o GSH como agente redutor. Isso resulta na geração de GSSG, que é regenerada em GSH pela GR (HASANUZZAMAN et al., 2012; LI; LIU; ZHANG, 2010; MA et al., 2019; SHARMA et al., 2012; TIWARI; YADAV, 2019).

Figura 26 - Estrutura tridimensional da catalase de *Ricinus communis* L.: A. CAT I; B. CAT II



Fonte: Programa para delimitação de estrutura tridimensional SWISS-MODEL³. Sequências da proteína obtida no NCBI⁴.

Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.1.11.1)

A ascorbato peroxidase (APX, EC1.1.11.1) faz parte do primeiro passo do ciclo do AsA-GSH para desintoxicação do H₂O₂. A APX desempenha papel essencial na eliminação de ERO e na proteção das células das plantas (Tabela 4). Esta enzima está envolvida na transformação de peróxido de hidrogênio em água no ciclo do ascorbato glutationa. A APX usa duas moléculas de AsA para a redução de H₂O₂ em água e a geração concomitante de duas moléculas de MDHA (HASANUZZAMAN et al., 2012; KARYOTOU; DONALDSON, 2004; SHARMA et al., 2012).

3 Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/>. Acesso em: 20 mar. 2020.

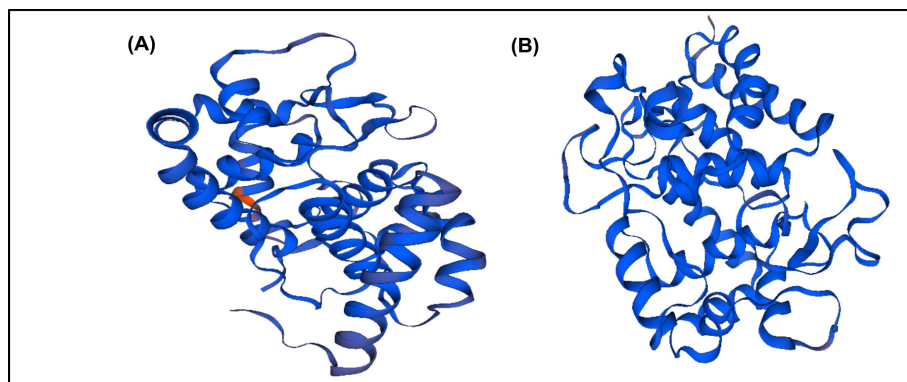
4 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20 mar. 2020. NCBI Referência das sequências: A. BAA04697.1; B. BAA04698.1.

Tabela 4 - Reação catalisada pela Ascorbato peroxidase e locais de atuação em plantas

Enzima	Reação	Locais de reação
APX	$H_2O_2 + 2AsA \rightarrow 2H_2O + 2MDHA$	Cloroplasto, citosol, mitocôndria, peroxissomo, apoplasto

A APX é membro da classe I de superfamília de heme peroxidase. Além de consistir em diferentes isoformas presentes em compartimentos distintos, foram identificadas cinco isoenzimas (Figura 27): mitocondrial (mAPX), tilacoide (tAPX), membrana glioxissomos (gmAPX), estroma cloroplasto (sAPX) e citosólica (cAPX). A atividade da APX em plantas é alterada em resposta para diferentes condições de estresses (HASANUZZAMAN et al., 2012; KARYOTOU; DONALDSON, 2004; SHARMA et al., 2012).

Figura 27 - Estrutura tridimensional da ascorbato peroxidase de *Ricinus communis* L.: A. APX citosólica; B. APX cloroplasto/mitocôndria.



Fonte: Programa para delimitação de estrutura tridimensional SWISS-MODEL⁵. Sequência da proteína obtida no NCBI⁶.

Monodehidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4)

Monodehidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4), no ciclo AsA-GSH, a oxidação do AsA leva a formação de monodehidroascorbato (MDHA) se o MDHA não for reduzido novamente para ascorbato pela MDHAR, que será espontaneamente transformado em AsA e DHA.

5 Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/>, Acesso em: 20 mar. 2020.

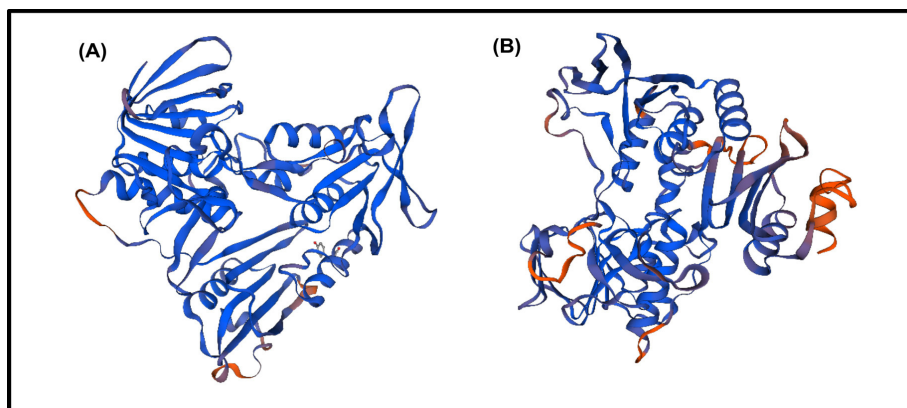
6 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20 mar. 2020. NCBI Referência das sequências: A. EEF31563.1; B. XP_015575410.

Monodehidroascorbato redutase é uma enzima FAD dependente que catalisa a regeneração de AsA do radical MDHA usando NAD(P)H + H⁺ como doador de elétrons (Tabela 5). Atividade de MDHAR é generalizada em plantas. As isoenzimas da MDHAR estão presentes em vários compartimentos celulares, como cloroplastos, citosol, mitocôndrias e peroxissomo (Figura 28). Nos cloroplastos, a MDHAR possui duas funções fisiológicas: a regeneração de AsA por MDHA e a mediação da fotorredução de oxigênio para O₂^{•-} quando o substrato MDHA está ausente (HASANUZZAMAN et al., 2012; PARK et al., 2019; SHARMA et al., 2012).

Tabela 5 - Reação catalisada pelo monodehidroascorbato redutase e locais de atuação em plantas

Enzima	Reação	Locais de reação
MDHAR	$\text{NADPH} + \text{H}^+ + 2\text{MDHA} \rightarrow 2\text{AsA} + \text{NADP}^+$	Cloroplasto, citosol, mitocôndria, peroxissomo

Figura 28 - Estrutura tridimensional da Monodehidroascorbato redutase de *Ricinus communis* L.: A. MDHAR peroxissomo; B. MDHAR cloroplasto/mitocôndria



Fonte: Programa para delineamento de estrutura tridimensional SWISS-MODEL⁷. Sequência da proteína obtida no NCBI⁸.

7 Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/>. Acesso em: 20 mar. 2020.

8 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20 mar. 2020. NCBI Referência das sequências: A. XP_002521454.1; B. XP_002509856.

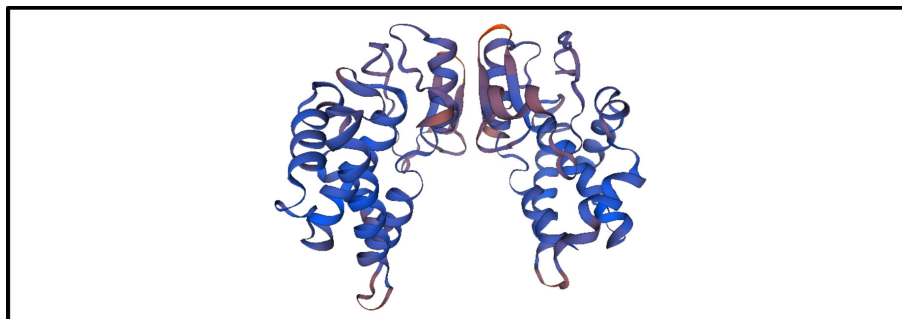
Dehidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1)

A dehidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1) catalisa a redução de DHA para AsA usando como substrato redutor GSH; a DHAR desempenha papel importante na regeneração do AsA (Tabela 6). Apesar da possibilidade da regeneração de AsA diretamente do MDHA, alguns DHA são produzidos quando o AsA é oxidado em folhas e outros tecidos. O DHA é um produto químico de vida curta, pode ser hidrolisado irreversivelmente em ácido 2,3-dicetogulônico ou reciclado para AsA pela DHAR. As DHAR (Figura 29) podem ser encontradas no cloroplasto, citosol e mitocôndria de vegetais (Figura 29) (HASANUZZAMAN *et al.*, 2012; ROHMAN *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2012).

Tabela 6 - Reação catalisada pela dehidroascorbato redutase e locais de atuação em plantas

Enzima	Principal reação catalisada	Locais de reação
DHAR	$DHA + 2GSH \rightarrow AsA + GSSG$	Cloroplasto, citosol, mitocôndria

Figura 29 - Estrutura tridimensional da dehidroascorbato redutase de *Ricinus communis* L.



Fonte: Programa para delineamento de estrutura tridimensional SWISS-MODEL⁹. Sequência da proteína obtida no NCBI¹⁰.

Glutationa redutase (GR, EC 1.6.4.2)

Glutationa redutase (GR, EC 1.6.4.2) é essencial na desintoxicação de ERO pelo ciclo do AsA-GSH. O aumento da atividade da GR confere tolerância ao estresse, e essa enzima reduz o GSH, envolvida em

⁹ Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/>. Acesso em: 20 mar. 2020.

¹⁰ Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20 mar. 2020. NCBI Referência das sequências: QCQ84564.1.

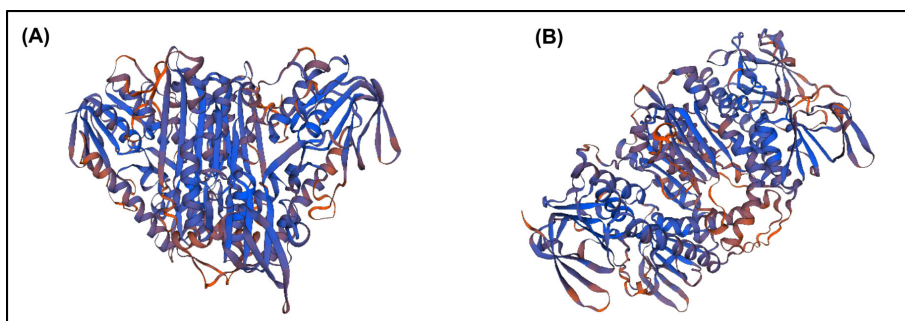
algumas regulações metabólicas e processos antioxidantes de plantas. A GR é uma enzima NAD(P)H dependente que catalisa a redução de glutatona oxidada (GSSG) para GSH (Tabela 7) (HASANUZZAMAN et al., 2012; LOGAN et al., 2006; SHARMA et al., 2012).

Tabela 7 - Reação catalisada pela glutatona redutase e locais de atuação em plantas

Enzima	Principal reação catalisada	Locais de reação
GR	$\text{NADPH} + \text{H}^+ + \text{H}^+ + \text{GSSG} \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$	Cloroplasto, citosol, mitocôndria

A GR também mantém a alta proporção de GSH/GSSG nas células vegetais, necessária para acelerar a via de eliminação do H_2O_2 , particularmente em condição de estresse. A GR desempenha papel crucial na determinação da tolerância de uma planta sob vários estresses, mantendo a maquinaria antioxidante da célula e conferindo tolerância ao estresse. A glutatona redutase atua no cloroplasto, no citosol e na mitocôndria, e pertence a um grupo de flavoenzimas, contendo um grupo dissulfeto essencial, conforme se observa na Tabela 7 e na Figura 30 (HASANUZZAMAN et al., 2012; LOGAN et al., 2006; SHARMA et al., 2012).

Figura 30 - Estrutura tridimensional da glutatona redutase de *Ricinus communis* L.: A. GR cloroplasto; B. GR citosol.



Fonte: Programa para delimitação de estrutura tridimensional SWISS-MODEL¹¹. Sequência da proteína obtida no NCBI¹².

11 Disponível em: <https://swissmodel.expasy.org/>. Acesso em 20 mar. 2020.

12 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 20 mar. 2020. NCBI Referência das sequências: A. XP_002520986.1; B. XP_00251818.1.

Glutationa peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9)

Glutationa peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9) faz parte de uma grande família com diversas isoformas envolvidas na eliminação de ERO, e apenas recentemente essa enzima foi descrita em plantas. A GPX utiliza o GSH para reduzir H_2O_2 , hidroperóxidos orgânicos e lipídeos (Tabela 8). Esta enzima é importante para combater a peroxidação lipídica e um importante protetor da membrana contra danos. Seus principais locais de atuação são citosol e mitocôndria. Além de atuar na degradação de H_2O_2 , a GPX funciona como um transdutor de sinal oxidativo (ESH DAT et al., 1997; HUBER; ALMEIDA, 2008; GUPTA et al., 2010; HASANUZZAMAN et al., 2012).

Tabela 8 - Reação catalisada pela glutationa peroxidase e locais de atuação em plantas

Enzima	Reação	Locais de Reação
GPX	$2GSH + ROOH (H_2O_2) \rightarrow GSSG + ROH + H_2O ({}_2H_2O)$	Citosol, mitocôndria

Glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)

A glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18) em plantas pertence à superfamília de enzimas multifuncionais, que catalisa a conjugação de GSH com centros eletrofílicos de diversos substratos exógenos, como xenobióticos. Atua principalmente no cloroplasto, no citosol e na mitocôndria (Tabela 9). Entre as enzimas relacionadas ao metabolismo do GSH, as isoenzimas da GST representam aproximadamente 1% da proteína solúvel total da planta. A GST catalisa a ligação de vários xenobióticos (incluindo numerosos pesticidas) e seus centros eletrofílicos com a GSH para produzir conjugados menos tóxicos e mais solúveis em água. Além de catalisar a conjugação de compostos eletrofílicos para GSH, as isoenzimas GST também exibem atividade peroxidase (POX). Vários estresses abióticos são poderosos indutores da atividade GST nas plantas. Essas enzimas em plantas também estão associadas a respostas de várias formas de estresses abióticos e conferem

tolerância às plantas (GALLÉ et al., 2019; HASANUZZAMAN et al., 2012; SHARMA et al., 2012).

Tabela 9 - Reação catalisada pela glutathione S-transferase e locais de atuação em plantas

Enzima	Principal reação catalisada	Locais de reação
GST	$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSGRX + GSH \rightarrow HX + GS-R$	cloroplasto, citosol, mitocôndria

Biomarcadores de qualidade e do envelhecimento

*Thamires Soares Ricardo Jesus, Patrícia Campos Santos,
Henk Hilhorst, Wilco Ligterink e Luzimar Gonzaga Fernandez*

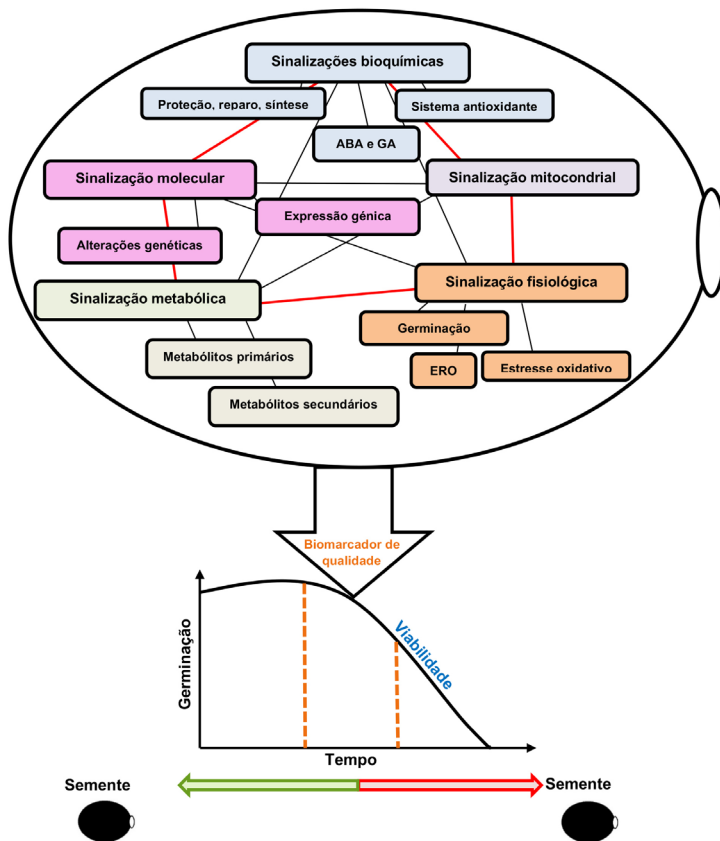
Na agricultura, os parâmetros de germinação das sementes e a emergência de plântulas são influenciados por diferentes fatores ambientais (estresses biótico e abiótico), deterioração das sementes e pela redução da qualidade das sementes. Estes fatores geram respostas nas sementes que ocasionam o declínio na germinação, no índice de vigor e na qualidade das sementes, resultando no atraso da emergência das plântulas, da floração e da maturidade, seguido de um declínio da taxa de crescimento (BAILLY, 2004; CHHABRA; SINGH, 2019; FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015; SANO et al., 2016).

O envelhecimento das sementes é uma característica biológica complexa que envolve uma rede de processos moleculares, bioquímicos, fisiológicos, metabólicos e mitocondriais (Figura 31). Portanto entender estes processos, aliados ao comportamento da semente, fornece dados que serão de grande utilidade para melhor entendimento sobre a qualidade e viabilidade das sementes e sua futura aplicação na indústria ou no plantio (CAVERZAN et al., 2019; BAILLY, 2004; FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015; SANO et al., 2016).

Durante o processo de germinação das sementes, estão envolvidas a atividade de várias enzimas e reações metabólicas relacionadas à síntese e à degradação de moléculas, assim essas enzimas podem ser utilizadas como marcadores moleculares para elucidar eventos que ocorrem durante os processos da germinação, mas não apenas isso. Por exemplo, as enzimas antioxidantes removedoras de ERO podem ser utilizadas como biomarcadores para avaliar a qualidade de sementes, pois os radicais livres também podem causar alterações na estrutura proteica. Proteínas solúveis são mais suscetíveis a radicais do que proteínas da membrana.

Certos aminoácidos, como cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, são mais sensíveis e suscetíveis a dano oxidativo (BAILLY, 2004; CAVERZAN et al., 2019; FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015; SANO et al., 2016). Os sistemas antioxidantes não enzimático e enzimático apresentam grande importância em sementes e plantas, pois têm a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria das ERO, portanto podem ser bons biomarcadores.

Figura 31 - Sinalizações envolvidas no processo de envelhecimento.



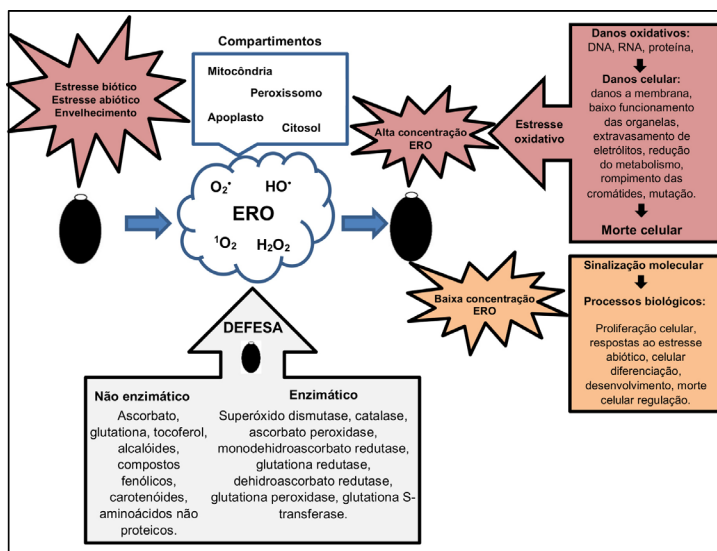
Nota: Interconectadas por linhas vermelhas, em seu potencial uso como marcadores de viabilidade para a previsão precoce da perda de viabilidade de sementes ao longo do tempo; linhas pretas contínuas: conexões entre as sinalizações e acontecimentos relacionados; linhas pontilhadas laranjas: melhor local para a predição de biomarcadores; ácido abscísico (ABA); ácido giberélico (GA); espécies reativas de oxigênio (ERO).

Fonte: adaptada de Fu, Ahmed e Diederichsen (2015).

O sistema de defesa antioxidante trabalha em conjunto para controlar as cascatas de oxidação descontrolada e proteger a célula vegetal dos danos oxidativos das ERO, além de permitir o desenvolvimento da semente ou planta de forma adequada. Por muito tempo acreditava-se que as ERO causavam apenas danos às células, no entanto, em baixas concentrações, as ERO fazem parte da sinalização celular. Elas estão envolvidas no processo de crescimento que ocorre na embriogênese inicial durante o desenvolvimento da semente e participam do mecanismo adjacente de protrusão de raiz durante a germinação (BAILLY, 2004, 2019 CAVERZAN et al., 2019).

As ERO também podem ter função reguladora nas mudanças na expressão gênica durante o desenvolvimento, a dormência e a germinação da semente. Por isso, sugere-se que as ERO sejam consideradas como componentes-chave de uma rede de sinalização integrada (Figura 32) em muitos aspectos da fisiologia da semente, sendo identificados como biomarcadores (BAILLY, 2004, 2019; CAVERZAN et al., 2019).

Figura 32 - Espécies reativas de oxigênio e antioxidantes como biomarcadores de estresses oxidativos e envelhecimento.



Nota: Fatores que podem levar ao aumento da geração de espécies reativas de oxigênio em diferentes compartimentos celulares e as consequências biológicas. A produção de ERO em alto nível resulta em estresse oxidativo, danos oxidativos e celulares e até morte celular, além, dos principais antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que atuam para eliminar as moléculas tóxicas e restaurar o equilíbrio redox, identificados como biomarcadores.

O estresse oxidativo causa um aumento da peroxidação lipídica e diminuição das atividades de enzimas antioxidantes, sendo considerado crítico no envelhecimento de sementes em várias espécies de plantas. Além disso, as novas metodologias utilizadas na genômica funcional podem ser importantes no desenvolvimento de biomarcadores do vigor das sementes e no desenvolvimento de muitos biomarcadores baseados em sinais bioquímicos que podem ser desenvolvidos (BAILLY, 2004; FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015; MITTLER et al., 2004).

Identificar biomarcadores para a avaliação da qualidade de sementes é importante para avaliar e identificar componentes relacionados ao envelhecimento, desenvolvimento, metabolismo e à resposta filológica. Além da avaliação de alterações bioquímicas associadas ao envelhecimento das sementes, a busca de identificação de biomarcadores inclui a avaliação do comprometimento da síntese e inativação proteica, de alterações nas atividades enzimáticas, hidrólise de proteínas e modificações pós-tradução. Ademais, a identificação de como a inativação de proteínas diminui a capacidade metabólica e reduz a capacidade dos sistemas biológicos para reparar danos celulares (ALBUQUERQUE et al., 2009; BAILLY, 2004, 2019; FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015).

O desenvolvimento de marcadores moleculares é importante para detectar a expressão de genes que codificam proteínas específicas, transcrição de mRNA, danos ao DNA, eventos de mutação, mudanças no material genético, alteração no comprimento dos telômeros, metilação do DNA, aberrações cromossômicas, fragmentação do material genético e outras, informações importantes que podem ser utilizadas para detectar envelhecimento e deterioração. Essas informações são importantes, pois podem ajudar a entender a longevidade e qualidade das sementes (FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015; SANO et al., 2016).

Sinais fisiológicos são importantes para entender o envelhecimento das sementes. Os processos fisiológicos são significativamente influenciados nas sementes pelo teor de umidade, pela temperatura, peroxidação lipídica e ruptura de membranas celulares, pelo aumento de ERO, desequilíbrio na regulação do crescimento, comprometimento no metabolismo, desequilíbrio hormonais e pela perda do estado vítreo citoplasmático. Os processos fisiológicos são interdependentes e, uma vez iniciado o mau funcionamento de um processo, desencadeia outros

eventos. O citoplasma de uma semente, por exemplo, entra em um estado vítreo, como uma proteção. Durante este estado, o citoplasma é tão viscoso que o movimento difusional e muitas reações de deterioração são detidos. A aquisição de um estado vítreo depende de teor de umidade, temperatura e quantidade de vários açúcares, como sacarose, rafinose, estaquiose e verbascose, metabólitos que podem funcionar como biomarcadores. Qualquer mudança fisiológica que afete o estado vítreo das sementes levará à deterioração das sementes (CHHABRA; SINGH, 2019; FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015; SANO et al., 2016; HO; MURTHY; PARK, 2020).

Sinais metabólicos são importantes para determinar o papel do metabolismo no desenvolvimento e na germinação das sementes. Analisar alterações metabólicas nas sementes é importante para desenvolver biomarcadores, principalmente as alterações durante o envelhecimento das sementes. O metabolismo é o conjunto de reações químicas que continuamente ocorre nas células vegetais, sendo que no metabolismo há várias rotas metabólicas, com diversas enzimas. São basicamente reações de catabolismo ou anabolismo que acontecem continuamente. Os vegetais possuem o metabolismo primário, onde há processos essenciais à vida e desenvolvimento; e o metabolismo secundário, que se distingue pela biossíntese de biomoléculas com diversidade e complexidade estrutural, produção em pequena escala, distribuição restrita e especificidade, tendo papel adaptativo ao meio, defesa contra o estresse ambiental biótico e abiótico, atração de polinizadores e atração de animais dispersores de sementes. É possível caracterizar grandes mudanças metabólicas durante o desenvolvimento e nas sementes, que podem identificar biomarcadores úteis (CAVERZAN et al., 2019; CHHABRA; SINGH, 2019; FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015).

As sementes permitem a sobrevivência das plantas em condições ambientais adversas, e, via sementes, as informações genéticas são transferidas para a nova geração. Entretanto a viabilidade das sementes diminui a longo prazo, devido às condições de armazenamento e ao envelhecimento. Portanto é importante compreender as reduções na viabilidade das sementes não apenas o processo de envelhecimento iniciado nas sementes, mas também a sequência de eventos desse processo. As mitocôndrias são a principal fonte de produção de espécies reativas

de oxigênio (ERO) e esta organela é exposta mais rápida e fortemente a agentes oxidativos e danos do que outras organelas. O sistema antioxidante mitocondrial também é menos ativo que os antioxidantes de outras organelas, portanto essas 'deficiências' mitocondriais podem afetar fortemente vários processos celulares, incluindo o envelhecimento das sementes (BAILLY, 2004; CAVERZAN et al., 2019; FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015).

Nas sementes, a mitocôndria é a principal organela de suprimento de energia. Sua função está fortemente acoplada a muitos outros processos celulares associados à germinação de sementes, como sinalização, diferenciação celular, morte celular e proliferação celular. As mitocôndrias são um dos principais alvos de danos gerados pelo estresse oxidativo, portanto as espécies reativas de oxigênio têm muitos efeitos deletérios nas membranas mitocondriais, levando à liberação do citocromo c no citosol para ativar a morte celular apoptótica. O DNA mitocondrial é mais suscetível aos danos das ERO, porque carece de membrana protetora e não tem proteínas histonas associadas a ele. O dano ao DNA mitocondrial pode levar à disfunção das mitocôndrias, que é considerado um componente importante do envelhecimento das sementes (FU; AHMED; DIEDERICHSEN, 2015; KUREK; PLITTA-MICHALAK; RATAJCZAK, 2019; SANO et al., 2016).

Com base nesses sinais, muitos biomarcadores podem ser desenvolvidos para avaliar o desenvolvimento, o vigor, a viabilidade e a germinação das sementes. Contudo poucos estudos foram realizados para avaliar e comparar a eficácia desses biomarcadores na detecção de sinais de envelhecimento em espécies diferentes e, por conseguinte, raramente são aplicadas a avaliar o envelhecimento das sementes. Muitas ferramentas estão disponíveis para avaliar a deterioração das sementes, no entanto é necessário realizar uma pesquisa abrangente para avaliar a eficácia e aplicabilidade dos sistemas existentes. Há vários sinais interessantes de envelhecimento: são as mudanças refletidas nas ERO, morte celular programada, mitocondriais, expressão de genes, antioxidantes, reparo de DNA, proteínas e comprimento dos telômeros. Embora existam desafios e os sinais do envelhecimento não tenham sido totalmente elucidados, há informações importantes que podem ser exploradas e usadas como biomarcadores para desempenhar um papel no monitoramento da viabilidade e na conservação de sementes.

Métodos utilizados para análise de qualidade e envelhecimento de sementes

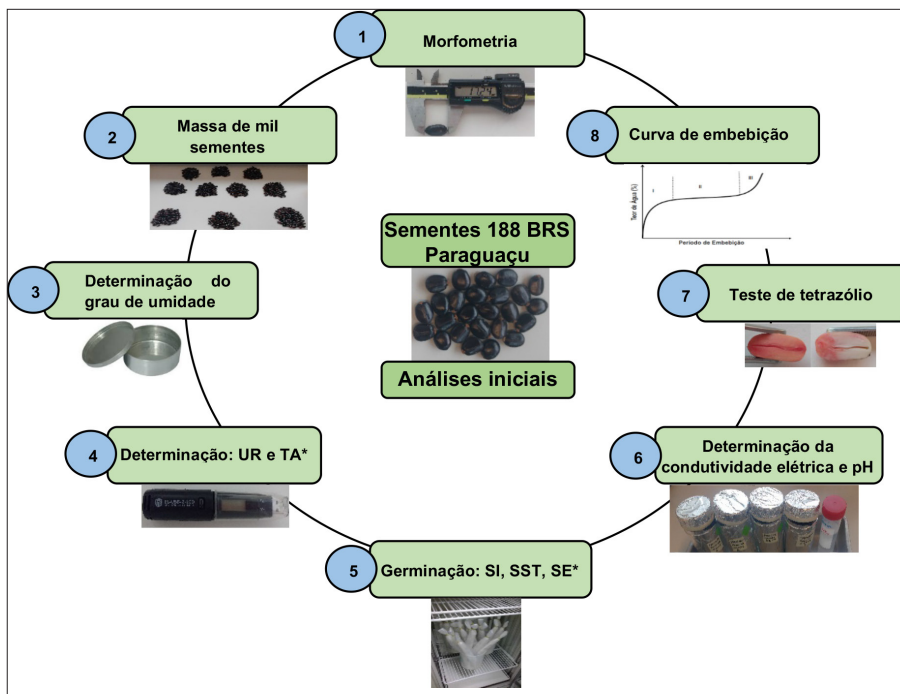
*Thamires Soares Ricardo Jesus, Patrícia Campos Santos,
Thales Guimarães Bezerra, Henk Hilhorst, Wilco Ligterink e
Luzimar Gonzaga Fernandez*

Caracterização inicial de sementes

A caracterização das sementes permite um conhecimento prévio sobre como está o lote adquirido. Estes dados associados à germinação são parâmetros importantes para a identificação e diferenciação de espécies, lotes, variedades, genótipos e identificação da variabilidade genética dentro de uma população de uma mesma espécie, além de fornecer elementos que podem auxiliar no entendimento sobre vigor, armazenamento, viabilidade e métodos de propagação da espécie (AQUINO; BARNOSA, 2009; BORGES; RENA, 1993; MATHEUS; LOPES, 2007; SCHULZ et al., 2014; SOUZA; SOUZA; PANOBIANCO, 2018).

As sementes a serem utilizadas devem ser coletadas de acordo com as Regras de Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). O local de coleta deve ser georreferenciado e caracterizado, as amostras devidamente identificadas e transportadas ao laboratório, seguindo protocolos específicos para as análises posteriores a serem realizadas. A caracterização inicial das sementes pode ser realizada através das análises morfométricas, massa de mil sementes, determinação do grau de umidade das sementes, análises de germinação, curva de embebição, teste de tetrazólio, dentre outras análises, considerando os experimentos a serem conduzidos (Figura 33).

Figura 33 - Fluxograma de análises iniciais com as sementes da cultivar Paraguaçu de *Ricinus communis*.



Nota: 1. Determinação da morfometria das sementes; 2. massa de mil sementes; 3. do grau de umidade das sementes; 4. da umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA)*; 5. realização da padronização do teste de germinação: semente inteira com tegumento, mas sem carúncula (SI), semente sem tegumento (SST), semente escarificada (SE); 6. determinação da condutividade elétrica e pH exsudado; 7. teste de tetrazólio; 8. curva de embebição: semente inteira com tegumento (SI), semente sem tegumento (SST), semente escarificada (SE).

Análises morfométricas

As análises morfométricas consistem na determinação da altura, largura e espessura com o auxílio de paquímetro, de acordo com a RAS (BRASIL, 2009). Em geral, são selecionadas aleatoriamente cem sementes para constituir quatro grupos de 25 sementes (replicatas).

Determinação do peso de mil sementes

O peso de mil sementes é importante para calcular a densidade de sementeira, o número de sementes por embalagem e o peso da amostra de trabalho para análise de pureza quando não especificado

nas RAS (BRASIL, 2009). É uma informação que dá ideia do tamanho das sementes, assim como do estado de maturidade e de sanidade. O peso de mil sementes normalmente é realizado utilizando dez repetições de cem sementes, para determinar a massa média, que pode ser expresso em gramas (g) ou outras unidades. A partir do peso médio, é calculado o peso de mil sementes utilizando a seguinte fórmula: **Peso de mil sementes (g) = Y × 10**, em que Y é a média das dez repetições das cem sementes. O valor de Y é multiplicado por 10, obtendo-se o resultado do teste (BRASIL, 2009).

Grau de umidade das sementes

A umidade da semente é um fator de grande importância para a qualidade da semente, assim como a variação da temperatura e a umidade relativa do ambiente. As sementes tendem a entrar em equilíbrio higroscópico com o ambiente, e quanto maior a umidade do ambiente, maior a umidade das sementes. A determinação do grau de umidade das sementes pode ser realizada por gravimetria (BRASIL, 2009). As sementes são colocadas em recipientes de alumínio, por exemplo, e cortadas antes da pesagem (sementes frescas e recipientes juntos (**P**)). Os recipientes com sementes são colocados na estufa de secagem a 105°C por 24 horas. Após as 24 horas, os recipientes com as sementes são colocados em dessecador por tempo necessário para esfriar os recipientes. Posteriormente, realiza-se a pesagem final e a anotação dos valores obtidos (sementes secas juntamente com os recipientes (**p**)). Por fim, a porcentagem de umidade é calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{100 (P-p)}{P-t}$$

Onde:

P = Peso Inicial (Peso do recipiente e sua tampa adicionado ao peso da semente

fresca (g));

p = Peso Final (Peso do recipiente e sua tampa adicionado ao peso da semente seca (g));

t = Tara (peso inicial do recipiente com sua tampa (g)).

Teste de germinação

A germinação das sementes é um processo crítico de desenvolvimento do ciclo de vida de espermatófitos. Uma germinação bem-sucedida e o desenvolvimento de plântulas normais são fatores decisivos para o desenvolvimento da planta e boa produção. As atividades metabólicas do eixo embrionário são retomadas durante a germinação, após a embebição de água. Essa é uma etapa crítica para o biociclo vegetal pelo fato de o processo estar associado a vários fatores de natureza extrínseca (fatores do ambiente físico) e intrínseca, ou seja, a processos fisiometabólicos (BARBOSA, 2020; FAGUNDES; CAMARGOS; COSTA, 2011; NERY et al., 2007; SANTOS, 1999), que devem ser considerados durante a realização do experimento.

Parâmetros da germinação de sementes são de grande importância para avaliar a qualidade das sementes e assim determinar o vigor do lote. A germinação máxima (Gmax) serve para avaliar a qualidade das sementes quanto à germinação; através do T50 (tempo para alcançar 50% da germinação), analisa-se a viabilidade e o vigor das sementes; o índice de uniformidade (U8416) corresponde ao tempo que as sementes de determinado lote germinam dentro do espaço de tempo específico, permitindo avaliar o quanto uniforme é a germinação; a área abaixo da curva de germinação (AAC) é um parâmetro que permite avaliar o vigor das sementes a partir do Gmax e T50. Para a avaliação da germinabilidade e dos parâmetros de germinação (Gmax, T50, U8416, AAC), pode ser utilizado o software Germinator (JOOSEN et al., 2010).

O teste de germinação deve ser realizado com sementes desinfestadas utilizando, por exemplo, solução de hipoclorito 0,5% e *tween* 20. Para isso, as sementes são submersas na solução de hipoclorito por vinte minutos sob agitação constante. Em seguida, as sementes são lavadas com água destilada para a remoção do hipoclorito e do *tween* 20. Posteriormente, as sementes são colocadas para secar em cima de papel toalha. Inicialmente, é necessário realizar diferentes testes de germinação para verificar a melhor forma, considerando o tipo de semente, para continuidade dos experimentos.

O tegumento funciona como um protetor das sementes e sua remoção facilita o processo de penetração da água e nutrientes para

dentro da semente. Além do fato de acelerar a embebição, pode existir alguma substância química presente no tegumento que iniba a germinação. No entanto sua parcial ou total ausência faz que os processos metabólitos das sementes aumente de forma muito rápida. Para facilitar o processo e garantir maior uniformidade da embebição, são removidas as carúnculas das sementes ou realiza-se teste com sementes inteiras (incluindo o tegumento), com sementes sem tegumento e sementes escarificadas. Entretanto a remoção do tegumento pode facilitar a contaminação por fungos e bactérias, e a ocorrência de danos ao embrião (FOGAÇA, 2000; MORAES, 2007; OLIVEIRA; SCHLEDER; FAVERO, 2006; SOETISNA et al., 1985).

Após a germinação e produção de plântulas, os seguintes parâmetros são avaliados: plântulas normais (%), plântulas anormais deformadas (%), plântulas anormais deterioradas (%), sementes mortas (confirmadas pelo teste de tetrazólio), sementes não germinadas, biometria das plântulas normais (mm) e massa seca das plântulas normais (g). Importante salientar que, após a contagem e medição das plântulas normais, estas são colocadas para secar na estufa a 80°C até peso constante, para se obter o valor da massa seca.

Curva de embebição

As células dos tecidos embrionários e demais tecidos das sementes apresentam potencial hídrico que pode ser específico a cada tecido, célula ou até mesmo a cada compartimento celular e espécie analisada. A embebição das sementes constitui um importante procedimento técnico para auxiliar na identificação da especificidade de dormência, sobretudo quando associado à dureza e à impermeabilidade de tegumento. Ocorrem diferenças no padrão de absorção de água na mesma cultivar em função da presença ou não do tegumento, do teor de água inicial dos tecidos e do lote de sementes avaliado. Assim, o processo e curva de embebição, além de ser uma característica do genótipo/lote avaliado, também é influenciado por variáveis ambientais. Portanto o estudo da embebição de água nas sementes, mesmo sendo da mesma espécie e cultivar, é importante em pesquisas científicas, pois o conhecimento desse processo permite o entendimento das etapas iniciais do processo germinativo e

possibilita o desenvolvimento de técnicas que visam avaliar e melhorar a qualidade das sementes, utilizando diferentes tratamentos (CASTRO; HILHORST, 2004; LUZ, 2012; PINHO; CARVALHO; DELACHIAVE, 2004; TELES, 2013). O procedimento para determinação da curva de embebição de sementes é padronizado em função da espécie, e várias adaptações são realizadas a partir do método-padrão.

Condutividade elétrica e pH do exsudado de sementes

O teste de condutividade elétrica é uma forma simples de avaliar o vigor das sementes, baseando-se na integridade das membranas celulares, possibilitando que o processo de deterioração seja detectado. Tem como princípio o aumento da permeabilidade da membrana, à medida que a semente se deteriora e causa desorganização na estrutura das membranas, proporcionando aumento na quantidade de lixiviados que são exsudados pelas células, resultando em uma maior perda biomoléculas e, principalmente, íons inorgânicos, tais como K^+ , Ca^{++} , Mg^{++} e Na^+ (ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS, 1983; DOIJODE, 1988; MORAES 2007). Para a determinação da condutividade elétrica do exsudado das sementes, há várias indicações a partir do método básico (FOGAÇA et al., 2017; LIMA; ABDALLA, 2001; ZUCHI et al., 2012). Os resultados são expressos em $\mu S.cm^{-1}.g^{-1}$.

A avaliação do pH do exsudato da água, durante o mesmo período de análise da condutividade elétrica, é realizada para avaliar se ocorreu alterações no pH (ARALDI; COELHO, 2015; SANTOS *et al.*, 2011). O teste é baseado na permeabilidade de membranas, envolvendo a lixiviação de solutos e a integridade do tegumento. O método se baseia no mesmo princípio da condutividade elétrica. Durante a embebição das sementes em água, ocorre a liberação de metabólitos como açúcares, ácidos orgânicos e íons H^+ , os quais acidificam o meio e provocam a diminuição do pH do exsudato das sementes. Isso ocorre com as sementes com danos de membrana, principalmente as deterioradas, que liberam maior quantidade de íons, resultando em menores valores de pH (ARALDI; COELHO, 2015; CARVALHO; SILVA; DAVIDE, 2006; SANTOS et al., 2011).

Teste de tetrazólio

O teste de tetrazólio é utilizado para avaliar o vigor e a viabilidade das sementes. Baseia-se na atividade das desidrogenases nos tecidos vivos, enzimas que catalisam reações nas mitocôndrias durante a glicólise e o ciclo de Krebs. A liberação de íons de hidrogênio (H^+) ocorre durante o processo de respiração celular dos tecidos vivos e são transferidos por um grupo de enzimas desidrogenases, particularmente a desidrogenase do ácido málico. Nesse teste, os íons de hidrogênio são transferidos para o sal 2,3,5-trifenil cloreto de tetrazólio, substância de coloração incolor, solúvel e difusível que atua como receptor. Ao reagir com os íons de hidrogênio, o tetrazólio forma uma substância estável, de coloração vermelha e insolúvel, denominada de trifenilformazam não difusível. A formação de produto indica que as desidrogenases estão ativas e, conseqüentemente, que há atividade respiratória nas mitocôndrias, portanto há viabilidade celular e do tecido. Esta reação se processa no interior das células vivas e o composto se difunde, portanto há nítida separação dos tecidos vivos e coloridos que respiram daqueles mortos e que não colorem (DELOUCHE; BASKIN, 1973; GARLET; SOUZA; DELAZERI, 2015; GASPAR-OLIVEIRA; MARTINS; NAKAGAWA, 2009, 2010, 2011; MORAES, 2007).

Nas sementes deterioradas ou danificadas mecanicamente, as enzimas desidrogenases estão inativadas e por isso não ocorre a reação com o sal de tetrazólio, conseqüentemente, não desenvolvem uma coloração, enquanto as vigorosas apresentam coloração rósea a vermelha brilhante. Segundo Gaspar-Oliveira, Martins e Nakagawa (2010) e as RAS (BRASIL, 2009), um fator de extrema importância é a identificação de alterações nos tecidos das sementes e a identificação das sementes viáveis ou inviáveis pelo manipulador do teste, considerando o padrão de coloração para a seleção das sementes. Sementes com 50% do endosperma e 100% do embrião corado de vermelho são consideradas viáveis e sementes com menor proporção de coloração são consideradas inviáveis (Figura 34).

Figura 34 - Teste de tetrazólio em sementes da cultivar 188 BRS Paraguaçu de *Ricinus communis* L., padrões de sementes inviáveis (com menos de 50% do endosperma corado e menos de 100% do embrião corado) e viáveis (com mais de 50% do endosperma corado e 100% do embrião corado). A e B. sementes inviáveis; C. semente viável.



Envelhecimento acelerado

Existem alguns testes para análise do envelhecimento de sementes. Aqui será tratado sobre o teste de envelhecimento acelerado (TEA). Esse teste consiste em submeter as sementes a altas condições de umidade e temperatura, e baseia-se no fato de que a taxa de deterioração das sementes é aumentada consideravelmente através de sua exposição a níveis elevados de temperatura e umidade relativa. Devido a isso, sementes de menor qualidade deterioram-se mais rapidamente do que as mais vigorosas, com reflexos na germinação após o TEA. Além disso, é reconhecido como um teste para a avaliação de vigor que é capaz de proporcionar informações com alto grau de consistência (MORAES, 2007; SILVEIRA, 2006; TESNIER, 2002).

É importante ressaltar que, ao realizar o TEA, há dois estresses submetidos sob a semente, que é o térmico e o outro por umidade, levando em consideração a umidade da semente e a alta UR à qual foi submetida durante o TEA. A umidade desencadeia deterioração causando alterações físicas, por exemplo, sucessivas expansões e contrações do volume das sementes ocasionam a formação de enrugamento. Além de acontecer o cansaço físico dos tecidos, que pode resultar em ruptura do tegumento e dos tecidos embrionários, comprometendo o desempenho das membranas aos níveis celular e subcelular. A deterioração causada por umidade também é capaz de deixar a semente vulnerável a impacto mecânico e contaminação por microorganismo (FRANÇA

NETO; HENNING, 1984; FRANÇA NETO; KRYZANOWSKI; SILVA, 2005; HUTH, 2015).

O estresse térmico causa grandes lesões na semente devido à submissão a altas temperaturas, gerando agregação e desnaturação de proteínas, aumento na fluidez dos lipídeos de membrana, indiretas ou baixas lesões que incluem a inativação de enzimas no cloroplasto e mitocôndrias, inibição da síntese proteica, degradação e perda da integridade da membrana, afeta na organização de microtúbulos e na divisão e/ou alongamento do eixo e formação de microtúbulos. Essas lesões acabam levando à inibição no crescimento, redução do fluxo iônico, produção de compostos tóxicos e síntese de erro (HOWARTH, 2005; SMERTENKO et al., 1997; WAHID et al., 2007).

A deficiência de água impede a ativação de processos bioquímicos, físicos e fisiológicos, que define a retomada do crescimento do embrião. Contudo a umidade da semente não pode ser demasiada, porque pode limitar a aeração e prejudicar a germinação. Ao longo da realização do teste de germinação, restrições de oxigênio podem provocar atraso ou paralisação no desenvolvimento das plântulas, ou a ocorrência de anormalidades, como a presença de plântulas anormais deformadas e deterioradas, associadas a acontecimentos citados anteriormente e que também normalmente são avaliados. O estresse térmico também afeta diretamente o tamanho e desenvolvimento da plântula, reduzindo significativamente a massa seca das plântulas (COIMBRA et al., 2007; INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION, 2004; PHANEENDRANATH, 1980), por isso esses parâmetros devem ser analisados.

Para padronização do teste de envelhecimento acelerado as sementes devem ser submetidas a diversas análises, dentre elas: teste de germinação; determinação do grau de umidade das sementes; determinação UR e TA; condutividade elétrica e pH do exsudato das sementes; teste de tetrazólio, entre outras. Após a padronização e realização do TEA, é necessário verificar como o estresse ao qual a semente foi submetida afeta as sementes e plântulas produzidas. Há uma série de análises que podem ser realizadas, entre elas indicamos análises morfofisiológicas, avaliar os parâmetros de germinação, determinar o grau de umidade das sementes, a condutividade elétrica e pH do exsudato das sementes,

e realizar o teste de tetrazólio. Também, a análise de RNA-seq, da peroxidação lipídica, determinação da atividade antioxidante e de enzimas antioxidantes, determinação dos metabólitos e identificação de biomarcadores de envelhecimento, como representado na Figura 35.

Para a realização dessas análises, deve-se determinar o tecido a ser analisado, as condições experimentais, a exemplo do tempo de embebição e fase do crescimento a ser verificado. Os estudos realizados por Jianhua e McDonald (1997), Marcos Filho e demais autores (2000), Braga Júnior (2009) e Garza-Caligaris e demais autores (2012) demonstram diferentes adaptações que devem ser feitas para condução do TEA, considerando a espécie estudada. Durante o experimento de TEA, é muito importante monitorar a umidade nas sementes, da temperatura e umidade relativa do ambiente.

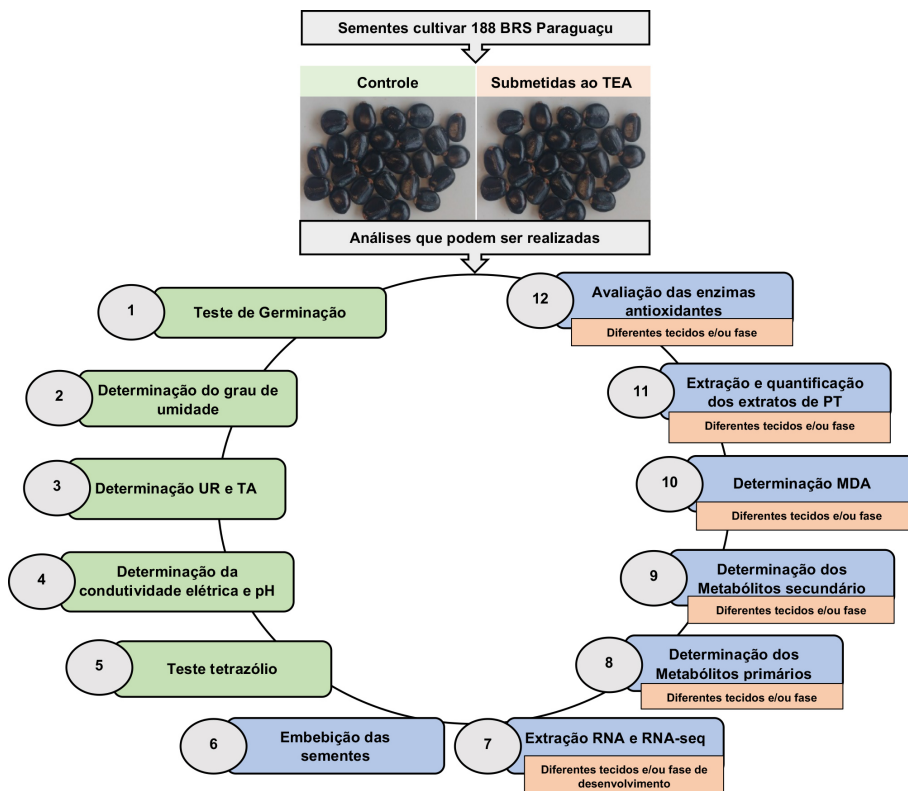
Análises transcriptômicas

As tecnologias ômicas, como a genômica, proteômica, transcriptômica, fenômica e metabolômica, proporcionaram grande progresso na análise e compreensão dos mecanismos bioquímicos e moleculares dos processos biológicos e de respostas a estresses bióticos e abióticos que os organismos, em especial as plantas, são submetidas ao longo do ciclo de vida. As plataformas ômicas permitem a análise completa de sistemas biológicos, caracterizando, identificando e quantificando produtos de determinada classe, como os genes (genoma), mRNA (transcriptoma), proteínas (proteoma) e metabólitos (metaboloma).

Quando as sementes são expostas a diferentes fatores estressores, ocorre percepção dos sinais e mudanças no nível molecular, alterando a expressão de genes e acúmulo de transcritos. Assim, há aumento ou diminuição da síntese de proteínas relacionadas ao estresse e a tolerância. A percepção do estresse e transmissão de sinais associados a uma resposta adaptativa desencadeiam mecanismos-chaves para a tolerância ao estresse que podem ser avaliados e correlacionados com outras análises complementares. Geralmente, a resposta ao estresse envolve sinalização via sistema redox, sinalização através de ERO, cálcio (Ca^{2+}), ativação de hormônios e reprogramação genômica via cascata

de sinalização envolvendo vias metabólicas que afetam a fisiologia da semente e da planta.

Figura 35 - Análises das sementes da cultivar 188 BRS Paraguaçu de *Ricinus communis* L. Sementes do teste controle e submetidas ao TEA



Nota: Determinação do grau de umidade, umidade relativa (UR) e temperatura do ambiente (TA); teste de germinação, determinação da condutividade elétrica e pH do exsudato da semente; teste de tetrazólio. Embebição das sementes em água, seguida da extração de RNA das sementes; realização da análise de RNA-seq; determinação dos metabólitos primários (8) e secundários das sementes (9); peroxidação lipídica (10) através da determinação de malonaldeído (MDA); extração e quantificação (11) de proteínas totais (PT); determinação da atividade das enzimas antioxidantes (12): superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), monodehidroascorbato redutase (MDHAR), glutatona redutase (GR), dehidroascorbato redutase (DHAR), glutatona peroxidase (GPX), glutatona S-transferase (GST).

O transcriptoma é considerado como o conjunto completo de transcritos em uma célula. Entender o transcriptoma é essencial para interpretar os elementos funcionais do genoma e revelar os constituintes moleculares de células e tecidos, e para entender o desenvolvimento e a resposta a diversos fatores. Os principais objetivos de transcriptômica

são: catalogar todas as espécies de transcritos, incluindo os mRNA (RNA mensageiro), ncRNA (RNA não codificante), miRNA (RNA de interferência). Além de determinar a estrutura transcricional dos genes, em termo de seus locais de partida (extremidade 5'-3'), avaliam-se padrões de *splicing* e outras modificações pós-transcricionais; mudança nos níveis de expressão de cada transcrição durante o desenvolvimento e sob diferentes condições (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Estudos utilizando esta abordagem alteraram a visão sobre a extensão e complexidade de transcriptomas.

O sequenciamento é a principal ferramenta nas avaliações transcriptômicas, sendo necessário para, por exemplo, a análise de RNA-Seq, técnica desenvolvida para perfis de transcriptoma. O RNA-Seq é uma ferramenta poderosa, com variedade notavelmente diversificada de aplicações em estudos de plantas, que utiliza tecnologia de sequenciamento de segunda geração para formar o perfil de RNA mensageiro, originando milhões de fragmentos de sequências curtas. É indicada para a análise quantitativa de níveis de expressão de transcritos, fornecendo uma medição muito mais precisa, em uma ou mais condições, e de suas isoformas, em comparação a outros métodos, além de possuir elevada sensibilidade, que permite a detecção em mais de determinado tipo celular (FAGUNDES; CAGLIARI, 2019; GONÇALVES, 2015; MARGUERAT; BÄHLER, 2010; TRAPNELL; PACHTER; SALZBERG, 2009; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Análises metabolômicas

A análise dos metabólitos tem sido parte da ciência da vida por várias décadas, constituindo um papel muito importante no desenvolvimento dos métodos para diagnósticos de doenças, de caracterização fenotípica, linhagens e cultivares, controle de qualidade de produtos alimentares e para estudar o estado fisiológico de diferentes organismos (HALL, 2006).

As plantas são organismos que apresentam grande disseminação, além de rotas metabólicas com produção de uma variedade de metabólitos primários e secundários. Portanto o estudo desses organismos proporciona uma importância significativa para o avanço tecnológico

através da elucidação de seus metabólitos, principalmente quando relacionados a respostas das plantas a diferentes estresses bióticos e abióticos, como também para a identificação e o isolamento de biomoléculas importantes para o desenvolvimento humano, podendo ser a base para novas descobertas (ABDELNUR, 2011).

Os metabólitos apresentam um conjunto de diversos arranjos atômicos, proporcionando uma ampla variação nas propriedades físicas e químicas. As análises de metabólitos primários e secundários com baixo peso molecular, polares, não polares e voláteis é indicado por grau de diversidade (ABDELNUR, 2011; DUNN; ELLIS, 2005). Os metabólitos primários são produzidos pelos processos essenciais à vida, que se caracterizam por grande produção e distribuição universal, e com funções essenciais, sendo comum a todos os organismos (LEHNINGER; COX; NELSON, 2011).

O metabolismo secundário caracteriza-se pela biossíntese de biomoléculas com grande diversidade e complexidade estrutural, produção de pequena escala, distribuição restrita e especificidade, tendo papel adaptativo ao meio, defesa contra herbívoro e microrganismos, proteção contra raios UV, atrações de polinizadores e atrações de animais dispersores de sementes (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os metabólitos secundários têm sido alvo de interesse de muitos estudos por apresentar atividade biológica interessantes, sendo de grande interesse principalmente para as áreas farmacêutica, alimentícia, agrônômica e na indústria de cosméticos. Para realizar a caracterização e quantificação destes compostos, é necessário utilizar metodologias e equipamentos específicos, de acordo com os metabólitos e a via metabólica de interesse ou a pergunta biológica que se tem (ABDELNUR, 2011).

A tecnologia voltada para fornecimento de uma visão geral compreensiva qualitativa e quantitativa dos metabólitos presentes em um organismo é chamada de metabolômica Rolim *et al.*, (2015). A metabolômica pode ser definida como uma plataforma de análise orientada de forma não imparcial de metabólitos celulares em amostras biológicas, e pode ser considerada um paradigma no campo da bioquímica analítica, que teve seu início na era genômica. É utilizada para identificar origem de grãos de diferentes espécies, identificação de populações de determinadas plantas, de diferentes genótipos e cultivares, para avaliar

variação de metabólitos de uma mesma espécie em diferentes regiões, para avaliar resistência de plantas a herbicidas e tolerância à seca, entre outras avaliações (BRUNETTI et al., 2013).

Abordagens metabolômicas oferecem oportunidades únicas para examinar o fenótipo funcional dos organismos, por fazer uma percepção tão poderosa em respostas das plantas a variações abióticas ou bióticas, a nível individual ou na população e, portanto, contribuir significativamente para avaliação de questões ecológicas, principalmente relacionadas ao habitat ambiental. Isso é possível através do estudo do metaboloma e multivariadas, e subsequentes análises estatísticas de espécies dentro de um gênero, distribuídos em muitas populações locais. O uso de perfis metabólitos em diagnósticos é uma ferramenta fundamental quando aliada à estatística, para esclarecer as principais alterações metabólicas causadas por qualquer perturbação (BRUNETTI et al., 2013; SCHAUER; FERNIE, 2006).

A metabolômica tem sido muito utilizada, no entanto ainda é algo complexo que apresenta muitas limitações. Contudo, com os avanços de tecnologias aplicadas à análise química, combinada com a revolução genômica e identificação do genoma de diferentes sistemas biológicos, ficou muito mais fácil a identificação e quantificação dos metabólitos e o estudo do metaboloma (VILLAS-BÔAS et al., 2005). A análise de metabólitos pode ser realizada por meio de vários métodos usados para detecção, tais como a espectrometria de massa (MS), ressonância magnética nuclear (RMN), interferometria de polarização dupla (IPD), espectroscopia de fluorescência, entre outras técnicas analíticas (GIOVANE; BALESTRIERI; NAPOLI, 2008; HAM, 2009; LI et al., 2014; VIANT; SOMMER, 2013). A espectrometria de massas e NMR são métodos poderosos para a identificação de diferentes classes de metabólitos, com alta sensibilidade e abordagens de alto rendimento. Contudo é necessário o uso de métodos de separação antes da detecção, assim várias técnicas cromatográficas são utilizadas, tais como cromatografia gasosa (GC) e cromatografia líquida (LC) (GIOVANE; BALESTRIERI; NAPOLI, 2008; HAM, 2009; LI; YANG; BAI, 2014; VIANT; SOMMER, 2013).

As cromatografias CG e LC acopladas à espectrometria de massa são bastante utilizadas em estudos metabolômicos por apresentar

robustez, alta sensibilidade, seletividade e repetibilidade (GIOVANE; BALESTRIERI; NAPOLI, 2008; GOODACRE et al., 2004; NAVAS-IGLESIAS et al., 2009; VAN DER GREEF et al., 2004). A associação de várias plataformas analíticas é necessária para aumentar a cobertura do metaboloma e frequentemente usada na análise dos subconjuntos de classes químicas para caracterizar, identificar e quantificar muitos compostos em uma mesma amostra biológica (FIEHN, 2008; GIOVANE; BALESTRIERI; NAPOLI, 2008; KADDURAH-DAOUK; KRISHNAN, 2009; KATAJAMAA; ORESIC, 2005).

O uso de GC-MS apresenta grande vantagem e resulta da construção de bibliotecas de espectros, conferindo alta confiabilidade na identificação dos metabólitos, que acorda a informação de tempo de retenção e o padrão de fragmentação obtido, em decorrência da ionização por elétrons. Grande parte dos metabólitos requer derivatização, para que se tornem voláteis a baixas temperaturas para serem analisados por CG. A derivatização é um procedimento que pode introduzir erros por perdas por volatilização durante o processo e limita o número de amostras a serem trabalhadas em conjunto (CANUTO et al., 2018). Outro fator importante é a escolha do gás de arraste ao usar o GC-MS. Isso acontece porque o MS é muito sensível a impurezas. Devido a isso, podem ocorrer danos significativos e elevação dos ruídos, além de reduzir a sensibilidade da técnica (CANUTO et al., 2018, ROLIM et al., 2015; VILLAS-BÔAS; GOMBERT, 2006).

Cada vez mais o uso da cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS) vem sendo aplicada nos estudos envolvendo análises metabolômicas. Esta é uma técnica analítica que apresenta alta robustez, sensibilidade e seletividade, além de ser de fácil operação. A LC-MS é considerada uma técnica abrangente no que se refere à classe de compostos a ser analisada, devido à grande variedade de fases estacionárias disponíveis, além dos diferentes modos de separação, como a eluição em fase reversa (fundamentalmente partição), com ou sem pareamento iônico, interação hidrofílica e troca iônica. Através dos dados de LC-MS, é possível compreender os processos metabólicos que promovem danos em diferentes tecidos nas sementes (CANUTO et al., 2018; ROLIM et al., 2015).

Peroxidação lipídica

Quando os níveis de ERO aumentam e ficam acima do limite considerado adequado, ocorre um aumento da peroxidação lipídica tanto nas membranas das células quanto nas membranas das organelas, que afeta o funcionamento normal da célula. Quando a semente é envelhecida, ocorre maior peroxidação dos lipídeos e, a depender o nível de dano, há uma diminuição na atividade enzimática removedora de peróxidos, contribuindo para a perda da viabilidade (ATAÍDE et al., 2012; JOOSEN et al., 2010; SHARMA et al., 2012). A peroxidação lipídica agrava a oxidação e o estresse através do aumento de radicais derivados dos lipídeos que podem agir danificando proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (CORTE et al., 2010; SHARMA; DUBEY, 2005; SHARMA et al., 2012).

A análise da peroxidação lipídica tem sido utilizada como marcador para lesões em membranas ocasionadas por ERO sob condições estressantes. O aumento da peroxidação lipídica aumenta a produção de malonaldeído (MDA). Este é um dos produtos da peroxidação de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados de fosfolipídios, e é responsável pelos danos de membrana, sendo utilizado como indicativo de estresse oxidativo (ATAÍDE et al., 2012; BAILLY, 2004; LIMA; ABDALLA, 2001). Um dos métodos mais utilizados para a avaliação da peroxidação lipídica através da análise do MDA é o método descrito por Heath e Packer (1968). A quantidade de MDA é calculada usando o coeficiente de extinção molar $155 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e os resultados são expressos em $\mu\text{M MDA g}^{-1}$ de massa seca.

Avaliação de enzimas antioxidantes

A manutenção do sistema enzimático é importante para remover ou reduzir a ação das ERO que causam danos e afetam negativamente o potencial da semente. Há enzimas que agem diretamente na remoção das ERO, no entanto há outras que agem conjuntamente com outras enzimas, a exemplo da glutathione redutase (ROVER JÚNIOR et al., 2001). Há vários métodos para avaliação da atividade das enzimas, sendo a espectrofotometria a técnica mais utilizada para esta análise.

Os métodos são específicos para cada enzima e serão indicados os espectrofotométricos UV/V para análise de algumas dessas enzimas.

Superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A atividade da enzima superóxido dismutase pode ser determinada através da detecção espectrofotométrica do formazan (produto de redução do azul de nitrotetrazólio – NBT) a 560 nm, mediado pelos radicais superóxidos, que são formados quando a riboflavina é submetida à luz (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971; GIANOPOLITIS; RIES, 1977; OMAR et al., 2012; DONAHUE et al., 1997; SILVA et al., 2012). A luz causa uma fotólise na riboflavina, que providencia um elétron para o oxigênio do ambiente (O_2), resultando no íon superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O superóxido atua reduzindo o NBT a formazan (produto de coloração roxa). Na presença de SOD (Figura 36), a reação é inibida e não ocorre produção de formazan, e esta inibição é utilizada para determinar atividade enzimática da SOD (ALFENAS, 2006), considerada como a quantidade de enzima (SOD) necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT. A atividade é calculada pela reação específica e expressa em Unidade SOD. μg^{-1} de Proteína. O cálculo é realizado segundo a fórmula a seguir:

SOD (Unidade / μL) = $[(V/v) - 1] \times F / [PT]$, onde:

V corresponde à taxa de reação na ausência da SOD;

v corresponde à taxa de reação na presença da enzima;

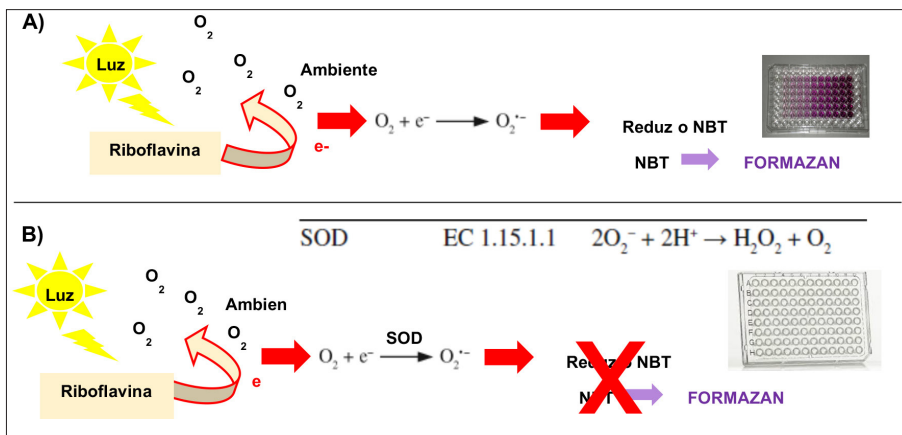
F é o fator de diluição da amostra;

PT corresponde à concentração de proteínas totais do extrato bruto.

Catalase (CAT, EC 1.11.7.6)

A atividade da CAT é determinada pela decomposição enzimática do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo esse decaimento medido através da leitura da absorbância em espectrofotômetro a 240 nm (BERGMEYER, 1970). A atividade da enzima é calculada com base no coeficiente de extinção molar do peróxido de hidrogênio ($0,0436 \text{ M cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade (U) é definida como a quantidade necessária de enzima para converter 1 mmol de substrato em produto por minuto, por μL , nas condições do ensaio. O resultado é expresso em UCAT ($H_2O_2 \text{ min}^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ proteína).

Figura 36 - Esquema da determinação da atividade da SOD.



Nota: A luz causa fotólise na riboflavina, que transfere um elétron para o oxigênio do ambiente (O₂), resultando no íon superóxido (O₂⁻). A. O superóxido atua reduzindo o NBT (cloreto de tetrazólio-nitrozul) a formazan, de coloração roxa; B. na presença de SOD, a reação é inibida e não ocorre produção de formazan. Esta inibição é utilizada para determinar atividade enzimática da SOD.

Ascorbato peroxidase (APX, EC 1.1.11.1)

A atividade da APX normalmente é realizada pelo monitoramento da oxidação do ascorbato (ASA), sendo acompanhada pela leitura da absorbância a 290 nm durante certo período, segundo Nakano e Asada (1981). A taxa de oxidação do ascorbato é determinada pelo decréscimo na absorbância, e a atividade da APX expressa como mmol ASA consumido min⁻¹μg⁻¹proteínas.

Monodehidroascorbato redutase (MDHAR, EC 1.6.5.4)

Esta enzima faz parte do ciclo da ascorbato glutationa. A MDHAR está envolvida na regeneração do ascorbato, através do poder redutor do NADPH + H⁺, com geração de monodehidroascorbato e monitoramento através da redução da absorbância a 340 nm durante certo intervalo de tempo (MIYAKE; ASADA, 1992; MURSHED et al., 2008). A atividade específica deve ser calculada usando o coeficiente de extinção molar de 6.22 mM⁻¹cm⁻¹, e o resultado expresso em MDHAR (μmol min⁻¹μg⁻¹proteína).

Glutationa redutase (GR, EC 1.6.4.2)

O método para determinar a atividade da glutatona redutase pode ser baseado no aumento na absorbância quando ocorre a oxidação do 5,5'ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) ao receber um grupo tiol liberado pela glutatona liberando o ânion colorido denominado ácido tionitrobenzóico (TNB). A formação de TNB é medida espectrofotometricamente em 412 nm. Neste comprimento de onda há absorção máxima do TNB e o resultado da GR é expresso em $\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteína usando o coeficiente de extinção molar ($\epsilon = 13.600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (SMITH, et al., 1998).

Dehidroascorbato redutase (DHAR, EC 1.8.5.1)

A dehidroascorbato redutase faz parte do conjunto de enzimas que compõem o ciclo da glutatona. A DHAR regenera o dehidroascorbato (DHA) a ascorbato e sua atividade é determinada pelo monitoramento da redução do dehidroascorbato dependente de glutatona a 265 nm (MURSHED et al., 2008). A atividade específica é calculada usando o coeficiente de extinção molar de $14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. O cálculo pode ser realizado utilizando o coeficiente de extinção molar da glutatona oxidada ($0,18 \text{ mM}\cdot\text{cm}^{-1}$) e os resultados expressos em DHAR ($\mu\text{mol min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteína).

Glutationa peroxidase (GPX, EC 1.11.1.9)

Faz parte de uma grande família de enzimas com várias isoenzimas que utilizam o GSH para reduzir o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), hidroperóxidos orgânicos e lipídicos (LOOH), e mensurada através da oxidação do NADPH + H^+ a 340 nm (LEE et al., 2003; PAGLIA; VALENTINE, 1967). O resultado é expresso em GPX ($\mu\text{molmin}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteína).

Glutationa S-transferase (GST, EC 2.5.1.18)

O ensaio da glutatona transferase pode ser realizado usando o 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato e mensurando o aumento da absorbância no comprimento de onda de 340 nm, até a formação de glutatona conjugada (DROTAR; PHELPS; FALL, 1985). O resultado é expresso em GST ($\mu\text{molmin}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ proteína).

Referências

- ABDELNUR, P. V. *Imageamento químico por espectrometria de massas utilizando MALDI (MALDI Imaging Mass Spectrometry) aplicado a tecidos vegetais*. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. 6 p, Embrapa Agroenergia. Circular técnica, 006).
- ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Physiological and biochemical deterioration of seeds. *Seed Biology*, [s. l.], v. 2, p. 283-315, 1972.
- ABREU, L. A. S.; CARVALHO, M. L. M.; GOMES PINTO, C. A.; KATAOKA, V. Y.; SILVA, T. T. A. Deterioration of sunflower seeds during storage. *Journal of Seed Science*, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 240-247, 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS; MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO. *Semiárido brasileiro. Educação no Semiárido*, [s. l.], 2014. Disponível em: <https://bit.ly/35yguHJ>. Acesso em: 2 jan. 2020.
- AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Mecanismo e aplicações da reação de Fenton assistida por compostos fenólicos redutores de ferro. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, p. 623-628, 2007.
- AHMAD, P.; SARWAT, M.; SHARMA, S. Reactive oxygen species, antioxidants and signaling in plants. *Journal of Plant Biology*, [s. l.], v. 51, n. 3, p. 167-173, 2008.
- ALBUQUERQUE, K. S.; GUIMARÃES, R. M.; ALMEIDA, I. F.; CLEMENTE, A. C. S. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante a embebição de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth). *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 31, n. 1, p. 12-19, 2009.
- ALENCAR, N. L. M. *Mobilização de reservas endospermicas de pinhão-mansão durante a germinação e desenvolvimento da plântula sob condições de estresse salino*. 2014. 114 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- ALFENAS, A. C. *Eletroforese e marcadores bioquímicos em plantas e microorganismos*. 2. ed. Viçosa: Ed. UFV, 2006.
- ALLAN, G.; WILLIAMS, A.; RABINOWICZ, P. D.; CHAN, A. P.; RAVEL, J.; KEIM, P. Worldwide genotyping of castor bean germplasm, (*Ricinus communis* L. using AFLPs and SSRs. *Genetic Resources and Crop Evolution*, New York, v. 55, p. 365-378, 2008.

ALVES, M. O.; SOBRINHO, J. N.; CARVALHO, M. M. *Possibilidades da mamona como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel no Nordeste Brasileiro*. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2004.

AMARAL, J. G. Ca. *Variabilidade genética para características agronômicas entre progênies autofecundadas de mamona (Ricinus communis L. cv. Al Guarany 2002)*. 2003. 72 f. Tese (Doutorado em Ciências Agronômicas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2003.

ANDRADE, C. A. *O papel do peróxido de hidrogênio na tolerância de soja (Glicine max) ao alagamento*. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Economia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ANDRADE, F. P.; MILANI, M. *Cultivar nordestina e Paraguaçu*. Brasília, DF: Embrapa, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/2UmMv3l>. Acesso em: 2 jan.2019.

ANDRADE JÚNIOR, D. R.; SOUZA, R. B.; SANTOS, S. A.; ANDRADE, D. R. Oxygen free radicals and pulmonary disease. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, Brasília, DF, v. 31, n. 1, p. 60-68, 2005.

ANGELI, J. P. F. *Hidroperóxidos de lipídios como fontes de oxigênio molecular singlete ($O_2[{}^1\Delta_g]$), detecção e danos em biomoléculas*. 2011. 234 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ANSCHAU, V. *Estresse oxidativo e parâmetros hematológicos como biomarcadores da infecção experimental com Trypanosoma evansi em ratos wistar*. 2011. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2011.

AQUINO, C.; BARBOSA, L. M. Classes sucessionais e síndromes de dispersão de espécies arbóreas e arbustivas existentes em vegetação ciliar remanescente (Conchal, SP), como subsídio para avaliar o potencial do fragmento como fonte de propágulos para enriquecimento de áreas revegetadas no Rio Mogi-Guaçu, SP. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 33, n. 2, p. 349-358, 2009.

ARALDI C. G., COELHO, C. M. M. PH do exsudato na avaliação da viabilidade de sementes de Araucaria angustifólia. *Floresta e Ambiente*, Seropédica, v. 22, n. 3, p. 426-433, 2015.

ARAÚJO, R. F.; ABUD, H. F.; SILVA, L. J.; ARAUJO, E. F. PINTO, C. M. F.; SILVA, F. W. S. Physiological changes and antioxidant enzymes activity

in Biquinho and Malagueta pepper seeds during the maturation process. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 65, n. 6, 2018.

ARAÚJO, S. M. S. A Região semiárida do Nordeste do Brasil: questões ambientais e possibilidades de uso sustentável dos recursos. *Rios Eletrônica: Revista Científica da Fasete*, Paulo Afonso, n. 5, p. 89-98, 2011.

ARMENDÁRIZ, J.; LAPUERTA, M.; ZAVALA, F.; GARCÍA-ZAMBRANO, E.; OJEDA, M. C. Evaluation of eleven genotypes of castor oil plant (*Ricinus communis* L.) for the production of biodiesel. *Industrial Crops and Products*, Amsterdam, v. 77, p. 489-490, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSTS. *Seed vigour testing hand book*. East Lansing: AOSA, 1983.

ATAÍDE, G. M.; BORGES, E. E. L.; FLORES, A. V.; CASTRO, R. V. O. Avaliação preliminar da embebição de sementes de jacarandá-da-bahia. *Brazilian Journal of Forestry Research*, London, v. 34, n. 78, p. 133-139, 2014.

AUDI, J.; BELSON, M.; MANISH, P.; SCHIER, J.; OSTERLOH, M. D. Ricin Poisoning. *Clinician's Corner*, [s. l.], v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.

BAFOR, M.; SMITH, M. A.; JONSSON, S. L.; STOBART, K.; STYMNET, S. Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis* L.) endosperm. *Biochemical*, London, v. 280, p. 507-514, 1991.

BAHIA, H. F. *Avaliação e seleção de genótipos de mamoneira (Ricinus communis L.) para fins de melhoramento genético no recôncavo baiano*. 2007. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2007.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, [s. l.], v. 14, p. 93-107, 2004.

BAILLY, C. The signalling role of ROS in the regulation of seed germination and dormancy. *Biochemical Journal*, London, v. 476, p. 3019-3032, 2019.

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences Biologies*, Paris, v. 331, p. 806-814, 2008.

BALDONI, A. B.; CARVALHO, M. H.; SOUSA, N. L.; NÓBREGA, M. B. M.; MILANI, M.; ARAGÃO, F. J. L. Variability of ricin content in mature

Ricinus communis L.: Sementes, envelhecimento e estresse oxidativo

seeds of castor bean. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 46, n. 7, p. 776-779, 2011.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, M. R.; SILVA, M. M. A.; WILLADINO, L.; ULISSES, C.; CAMARA, T. R. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 44, n. 3, p. 453-460, 2014.

BARBOSA, R. D. *Socoró (Mouriri guianensis Aubl.): germinação, desenvolvimento da plântula e classificação das sementes para fins de armazenamento*. 2020. 56 f. Dissertação (Mestrado em Agricultura no Trópico Úmido) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2020.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, Amsterdam, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.

BELTRÃO, N. E. M.; MELO, F. B.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S. *Mamona: árvore do conhecimento e sistemas de produção para o semiárido Brasileiro*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003).Circular Técnico n. 70).

BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. *Biossíntese e degradação de lipídios, carboidratos e proteínas em oleaginosas*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007).Circular Técnico nº 178).

BELTRÃO, N. E. M.; SILVA, L. C.; VASCONCELOS, O. L.; AZEVEDO, D. M. P.; VIEIRA, D. J. Fitologia. In: AZEVÊDO, D. M. P.; LIMA, E. F).ed.). *O agronegócio da mamona no Brasil*. Brasília, DF: Embrapa Algodão, 2001. p. 37-61,.

BENAMAR, A.; TALLON, C.; MACHEREL, D. Membrane integrity and oxidative properties of mitochondria isolated from imbibing pea seeds after priming or accelerated ageing. *Seed Science Research*, Cambridge, v. 13, p. 35-45, 2003.

- BERGMEYER, N. Methoden der enzymatischen analyse. *Akademie-Verlag*, Berlin, v. 1, p. 636-647, 1970.
- BERLETT, B. S.; STADTMAN, E. R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, Rockville, v. 272, n. 33, p. 20313–20316, 1997.
- BEWLEY, J. D. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, Oxford, v. 9, n. 7, p. 1055-1066, 1997.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Seeds: physiology of development and germination*. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994.
- BEYER, R. E. The role of ascorbate in antioxidant protection of biomembranes: interaction with vitamin E and coenzyme Q. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, New York, v. 26, n. 4, p. 349-358, 1994.
- BINOTTI, F. F. S.; HAGA, K. I.; CARDOSO, E. D.; ALVES, C. Z.; SÁ, M. E.; ARE, O. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. *Acta Scientiarum Agronomy*, Maringá, v. 30, n. 2, p. 247-254, 2008.
- BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization*, Atlanta, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.
- BIRTIC', S.; COLVILLE, L.; PRITCHARD, H. W.; PEARCE, S. R.; KRANNER, I. Mathematically combined half-cell reduction potentials of low-molecular-weight thiols as markers of seed ageing. *Free Radical Research*, London, v. 45, n. 9, p. 1093-1102, 2011.
- BORGES, E. E. L.; RENA, A. B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I. B.; PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B).ed.). *Sementes florestais tropicais*. Brasília, ABRATES, p. 83-135. 1993.
- BORGES, S. R. S. *Alterações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas durante a maturação de sementes híbridas de tomate*. 2018. 143 f. Tese (Doutorado em Agronomia e Medicina Veterinária) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2018.
- BRAGA JÚNIOR, J. M. *Maturação, qualidade fisiológica e testes de vigor em sementes de mamona*. 2009. 138 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2009.

Ricinus communis L.: Sementes, envelhecimento e estresse oxidativo

BRASIL. *Glossário ilustrado de morfologia*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.

BROWN, D. J.; CANVIN, D. T.; ZILKEY, B. F. Growth and metabolism of *Ricinus communis* endosperm in tissue culture. *Canadian Journal of Botany*, Ontario, v. 48, p. 2323-2331, 1970.

BRUNETTI, C.; GEORGE, R. M.; TATTINI, M.; FIELD, K.; DAVEY, M. P. Metabolomics in plant environmental physiology. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 64, n. 13, p. 4011-4020, 2013.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. *Biochemistry and molecular biology of plants*. 2. ed. Hoboken: Wiley, 2000. p. 696-705.

BUCKERIDGE, M. D.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ, M. A. S. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F).ed.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 31-50.

BUCKLEY, W. T.; HUANG, J. An ethanol-based seed vigour assay for canola. *Seed Science and Technology*, [s. l.], v. 39, p. 510-526, 2011.

CANGEMI, J. M.; SANTOS, A. M.; CLARO NETO, S. A revolução verde da mamona. *Química Nova*, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 1-6, 2010.

CANUTO, G. A. B; COSTA, J. L.; CRUZA, P. L. R.; SOUZA, A. R. L.; FACCIO, A. T.; KLASSENC, A.; RODRIGUESA, K. T.; TAVARESA, M. F. M. Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Química Nova*, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 75-91, 2018.

CARVALHO, A. C; AGUIAR, E. A.; TEXEIRA, D. L.; DELFINO, J. S.; NASCIMENTO, M. M.; FERREIRA, R. F.; ANDRADE, R. A.; BRITO, R. S. Teste de envelhecimento acelerado para analisar o vigor de sementes de orelhinha de macaco (*Enterolobium schomburgkii* Benth). *Revista Thema*, Pelotas, v. 17, n. 2, p. 346-353, 2019.

CARVALHO, E. R.; OLIVEIRA, J. A, M.; DENILSON, P. D.; SILVA, H. W. L.; CASSIANO G. M. Pre-packing cooling and types of packages in maintaining physiological quality of soybean seeds during storage. *Journal of Seed Science*, Londrina, v. 38, n. 2, p. 129-139, 2016.

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

- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência tecnologia e produção*. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000.
- CASTRO, R. D. *A functional analysis of cell cycle events in developing and germinating tomato seeds*. 1998. 110 f. Tese (Doutorado em Fisiologia Molecular Vegetal) – Wageningen University and Research, Wageningen, 1998.
- CASTRO, R. D.; BRADFOD, K. J.; HILHORST, H. W. M. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F).org.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 51-67.
- CASTRO, R. D.; HILHORST, H. W. M. Embebição e reativação do metabolismo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F).org.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 149-162.
- CAVERZAN, A.; PIASECKI, C.; CHAVARRI, G.; STEWART JÚNIOR, C. N.; VARGAS, L. Defenses against ROS in crops and weeds: the effects of interference and herbicides. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 20, n. 1086, p. 1-20, 2019.
- CECARINI, V.; GEEB, J.; FIORETTI, E.; AMICI, M.; ANGELETTI, M.; ELEUTERI, A. M.; KELLER, J. N. Protein oxidation and cellular homeostasis: emphasis on metabolismo. *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 1773, p. 93-104, 2007.
- CENTENARO, G. S. *Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal*. 2011. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.
- CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.
- CÉSAR, A. S.; BATALHA, M. O. Biodiesel production from castor oil in Brazil: a difficult reality, *Energy Policy*, Amsterdam, v. 38, p. 4031-4039, 2010.
- CHECHETTO, R. G.; SIQUEIRA, R.; GAMERO, C. A. Energy balance for biodiesel production by the castor bean crop (*Ricinus communis* L.), *Revista Ciência Agronômica*, Ceará, v. 41, n. 4, p. 546-553, 2010.

CHEEMA, N. M.; MALIK, M. A.; QADIR, G.; RAFIQUE, M. Z.; NAWAZ, N. Influence of temperature and osmotic stress on germination induction of different Castor Bean cultivars. *Pakistan Journal of Botany*, Karachi, v. 42, n. 6, p. 4035-4041, 2010.

CHHABRA, R.; SINGH, S. T. Seed aging, storage and deterioration: an irresistible physiological phenomenon. *Agricultural Reviews*, New Delhi, v. 40, n. 3, p. 234-239, 2019.

CHOUGUI, N.; TAMENDJARI, A.; HAMIDJ, W.; HALLAL, S.; BARRAS, A.; RICHARD, T.; LARBAT, R. Oil composition and characterisation of phenolic compounds of *Opuntia ficus-indica* seeds. *Food Chemistry*, Amsterdam, v. 139, p. 795-803, 2013.

COIMBRA, R. A.; TOMAZ, C. A.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Teste de germinação com acondicionamento dos rolos de papel em sacos plásticos. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 29, n. 1, p. 92-97, 2007.

CONCEIÇÃO, N. H. *Propriedades biológicas de extratos de Ricinus communis L. e Jatropha curcas L.: cardiotoxicidade e citotoxicidade*. 2017. 118 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

CORBINEAU, F.; GAY-MATHIEU, C.; VINEL, D. Decrease in sunflower (*Helianthus annuus*) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition. *Physiologia Plantarum*, New York, v. 116, p. 489-496, 2002.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; LEITE, H. G.; PEREIRA, B. L. C.; GONÇALVES, J. F. C. Estudo enzimático da deterioração de sementes de *Melanoxylon brauna* submetidas ao envelhecimento natural e acelerado. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 32, n. 1, p. 83-91, 2010.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. A.; VENTRELLA, M. C.; MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Revista Árvore*, Viçosa, v. 30 n. 6, p. 941-949, 2006.

COSTA, M.; HUANG, B. Changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation for Bentgrass species in repose to drought stress. *American Society for Horticultural Science*, Virginia, v. 132, n. 3, p. 319-32, 2007.

- COSTA, M. N.; PEREIRA, W. E.; BRUNO, R. L. A.; FREIRE, E. C.; NÓBREGA, M. B. M.; MILANI, M.; OLIVEIRA, A. P. Divergência genética entre acessos e cultivares de mamoneira por meio de estatística multivariada. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 41, n. 11, p. 1617-1622, 2006.
- DAMRONGVUDHI, O.; THUNYAPUK, R.; PITIPONG, T.; TANAPON, C.; WANCHAI, C. Optimization and sensitivity analysis of fast ethanol assay in maize seeds. *Journal of Seed Science*, Londrina, v. 41, n. 1, p. 97-107, 2019.
- DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactiveoxy genspecies (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, London, v. 2, n. 53, p. 1-13, 2014.
- DAS, P.; NUTAN, K. K.; SINGLA-PAREEK, S. L.; PAREEK, A. Oxidative environment and redox homeostasis in plants: dissecting out significant contribution of major cellular organelles. *Frontiers Environmental Science*, London, v. 2, n. 70, p. 1-11, 2015.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos antioxidants properties of phenolic compounds. *Visão Acadêmica*, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, 2004.
- DELOUCHE, J. C., BASKIN, C. C. Accelerated ageing techniques for predicting the relative storability of seed lots. *Seed Science and Technology*, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 427-452, 1973.
- DIAS, R. A. R.; OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, E. C. Composição química e mobilização de reservas em sementes de *Psidium cattleianum sabine* (Myrtaceae). *Revista Evidência*, Gravataí, v. 18, n. 2, p. 199-211, 2018.
- DOIJODE, S. D. Solute leakage in relation to loss seed viability in chilli cultivars. *Indian Journal of Plant Physiology*, New Delhi, v. 31, n. 3, p. 285-287, 1988.
- DONAHUE, J. L.; OKPODU, C. M.; CRAMER, C. L.; GRABAU, E. A.; ALSCHER, R. G. Responses of antioxidants to paraquat in pea leaves (relationships to resistance). *Plant Physiology*, Oxford, v. 113, n. 1, p. 249-257, 1997.
- DROTAR, A.; PHELPS, P.; FALL, R. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells. *Plant Science*, Amsterdam, v. 42, n. 1, p. 35-40, 1985.

DRUMOND, A. A. L.; SALES, J. F.; ZUCHI, J.; CAMELO, G. N.; SOUZA, M. M. V. Physiological quality of castor seeds (*Ricinus communis* L.) after processing. *Journal of Seed Science*, Londrina, v. 41, n. 2, p. 224-232, 2019.

DRUMOND, A. A. L.; SALES, J. F.; ZUCHI, J.; RESENDE, O.; CAMELO, G. N.; SOUZA, M. M. V. Physiological quality of castor bean seed genotypes stored at two temperatures. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 42, p. 1-10, 2020.

DU, R.; LIU, K.; ZHAO, S.; CHEN, F. Changes in antioxidant activity of peptides identified from brown rice hydrolysates under different conditions and their protective effects against AAPH-induced oxidative stress in human erythrocytes. *ACS Omega*, [s. l.], v. 5, n. 22, p. 12751-12759, 2020.

DUNN, W. B., ELLIS, D. I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Amsterdam, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005.

EASTMOND, P. J.; GRAHAM, I. A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends in Plant Science*, Cambridge, v. 6, n. 2, p. 72-77, 2001.

EBONE, L. A.; CAVERZAN, A.; SILVEIRA, D. C.; SIQUEIRA, L. O.; LÂNGARO, N. C.; CHIOMENTO, J. L. T.; CHAVARRIA, G. Biochemical profile of the soybean seed embryonic axis and its changes during accelerated aging. *Biology*, Basel, v. 9, n. 186, p. 1-17, 2020.

ESHDAT, Y.; HOLLAND, D.; FALTIN, Z.; BEN-HAYYIM, G. Plant glutathione peroxidases. *Physiologia Plantarum*, New York, v. 100, p. 234-240, 1997.

FAGUNDES, D. G. S.; CAGLIARI, A. Sequenciamento de RNA em larga escala como ferramenta para identificação e caracterização de genes em culturas de importância agrônômica. *Revista Eletrônica Científica da UERGS*, Porto Alegre, v. 5, n. 3, p. 271-279, 2019.

FAGUNDES, M.; CAMARGOS, M. G.; COSTA, F. V. A qualidade do solo afeta a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas de *Dimorphandra mollis* Benth). Leguminosae: Mimosoideae). *Acta Botanica Brasílica*, Belo Horizonte, v. 25, n. 4, p. 908-915, 2011.

FÉLIX, R.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; FÉLIX, C. NOVAIS, S. C.; LEMOS, M. F. L. Evaluating the in vitro potential of natural extracts to protect lipids from oxidative damage. *Antioxidants*, [s. l.], v. 9, n. 231, 2020.

- FENOLLOSA, E.; JENÉ, L.; MUNNÉ-BOSCH, S. A rapid and sensitive method to assess seed longevity through accelerated aging in an invasive plant species. *Plant Methods*, [s. l.], v. 16, n. 64, 2020.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, G. B.; BELTRÃO, N. E. M.; SEVERINO, L. S.; GONDIM, T. M. S. V.; PEDROSA, M. B. *A cultura da mamona no cerrado: riscos e oportunidades*. Brasília, DF: Embrapa Algodão, 2006.
- FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, [s. l.], n. 2, p. 32-39, 2007.
- FIEHN, O. Extending the breadth of metabolite profiling by gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, Amsterdam, v. 27, p. 261-269, 2008.
- FIGUEIREDO, S. M. *Qualidade fisiológica de sementes de mamona em função da embalagem, condições e períodos de armazenagem*. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2006.
- FIGUEIREDO NETO, A.; ALMEIDA, F. A.; GOUVEIA, J. P. G.; NÓBREGA, M. B. M.; CARNEIRO, R. M.; PEDROZA, J. P. Divergência genética em acessos de mamona (*Ricinus communis* L.) baseada nas características das sementes. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, Campina Grande, v. 4, n. 2, p. 1-8, 2004.
- FLORES, P.; POGGI, D.; GARIGLIO, N.; CATRARO, M. Accelerated aging test to assess vigor of *Juglans Nigra* Seeds. *International Journal of Fruit Science*, Abingdon, v. 20, n. 2, p. 1-13, 2019.
- FOGAÇA, C. A. Padronização e adequação de metodologias para avaliação da qualidade física e fisiológica de sementes de *Gleditschia amorphoides* Taub. Caesalpinaceae. 95 p. Monografia (Trabalho de Graduação em Agronomia) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2000.
- FOGAÇA, J. J. N. L.; SILVA, R. A.; SANTOS, J. L.; NUNES, R. T. C.; FERREIRA, L. L.; OTONIEL, M. M. Qualidade fisiológica de sementes de mamona crioula var. Carrapatinho em função da posição do ráculo. *Revista de Ciências Agrárias*, Belém, v. 40, n. 1, p. 87-93, 2017.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. *Germany: Castor oil seed, production quantity (tons)*. Rome, 2020. Disponível em: <https://bit.ly/3gHbFBe>. Acesso em: 8 jan. 2020.
- FRANÇA NETO, J. B.; HENNING, A. A. *Qualidades fisiológica e sanitária de sementes de soja*. Londrina: Embrapa, 1984.
- FRANÇA NETO, J. B.; KRYZANOWSKI, F. C.; SILVA, W. R. *Tecnologia da produção de sementes de soja de alta qualidade*. Brasília, DF: Embrapa, 2005). Circular Técnica n° 40).
- FRASER, P. D.; BRAMLEY, P. M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, Amsterdam, n. 43, p. 228-265, 2004.
- FU, Y. B.; AHMED, Z.; DIEDERICHSEN, A. Towards a better monitoring of seed ageing under ex situ seed conservation. *Conservation Physiology*, Oxford, v. 3, p. 1-16, 2015.
- GALLÉ, A.; CZÉKUS, Z.; BELA, K.; HORVÁTH, E.; ÖRDÖG, A.; CSISZÁR, J.; POÓR, P. P. Plant glutathione transferases and light. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, n. 1944, San Diego, p 1-12, 2019.
- GARCÍA, A. Á; CARRIL, E. P.-U. Metabolismo secundário de plantas. *Reduca (Biología)*, [s. l.], v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009. Série Fisiologia Vegetal.
- GARCIA, F. *Formação de oxigênio singlete $O_2(^1\Delta_g)$ por fagócitos*. 2005, 101 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- GARLET, J., SOUZA, G. F.; DELAZERI, P. Teste de tetrazólio em sementes de *Cassia leptophylla*. *Enciclopédia Biosfera*, Goiânia, v. 11, n. 21, p. 1800-1808, 2015.
- GARZA-CALIGARIS, L. E.; AVENDAÑO-VÁZQUEZ, A. O.; ALVARADO-LÓPEZ, S.; ZÚÑIGA-SÁNCHEZ, A.; OROZCO-SEGOVIA, A.; PÉREZ-RUIZ, R. V.; GAMBOA-DEBUEN, A. At3g08030 transcript: a molecular marker of seed ageing. *Annals of Botany*, Oxford, v. 110, p. 1253-1260, 2012.
- GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Concentração da solução de tetrazólio e período de coloração do teste para sementes de mamoneira. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 31, n. 3, p. 38-47, 2009.
- GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.)

- pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 32, n. 1, p. 186-196, 2010.
- GASPAR-OLIVEIRA, C. M.; MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J. Pré-condicionamento das sementes de mamoneira para o teste de tetrazólio. *Acta Scientiarum. Agronomy*, Maringá, v. 33, n. 2, p. 303-311, 2011.
- GIANOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, Oxford, v. 59, p. 309-314, 1977.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, Amsterdam, v. 48, p. 909-930, 2010.
- GIOVANE, A.; BALESTRIERI, A.; NAPOLI, C. New insights into cardiovascular and lipid metabolomics. *Journal of Cellular Biochemistry*, New York, v. 105, n. 3, p. 648-654, 2008.
- GONÇALVES, K. C. B. *Estudo de bioinformática aplicado à análise de expressão gênica utilizando dados oriundos de sequenciamento por tecnologia de “next-generation” em animais controle e em modelos de epilepsia do lobo temporal mesial*. 2015. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2015.
- GOODACRE, R.; VAIDYANATHAN, S.; DUNN, W. B.; HARRIGAN, G. G.; KELL, D. B. Metabolomics by numbers: acquiring and understanding global metabolite data. *Trends Biotechnology*, Cambridge, v. 22, p. 245-252, 2004.
- GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. *Annual Review of Plant Biology*, Palo Alto, v. 59, p. 115-142, 2008.
- GUPTA, A.; PUNIA, R. C.; DHAIYA, O. S. Seed ageing and deterioration during storage of pearl millet hybrid along with their parental line. *Research in Environment and Life Sciences*, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 554-556, 2017.
- GUPTA, S.; SAHA, S.; ROY, P.; BASU, P.; GANGULI, S. Structural and Functional analysis of glutathione peroxidase from *Ricinus communis* L.: a computational approach. *International Journal of Bioinformatics Research*, Chhattisgarh, v. 2, n. 1, p. 20-30, 2010.
- HAJRAH, N. H; ABDUL, W. M; AL-GARNI, S. M.; SHEIKH, A.; AHMED, M. M. M.; HALL, N.; SAINI, K. S.; SABIR, J. S. M.; BORA, R. S. Gene expression profiling to elucidate the pharmacological and toxicological effects of *Ricinus communis* L. leaf extract in mammalian cells. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, Abingdon, v. 33, n. 1, p. 397-407, 2019.

HALL, R. D. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. *New Phytologist*, New York, v. 169, p. 453-468, 2006.

HAM, X. Lipidomics: developments and applications. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, v. 877, n. 26, p. 2663, 2009.

HAMPTON, J. G.; TEKRONY, D. M. Controlled deterioration test. In: HAMPTON, J. G., TEKRONY, D. M. *Handbook of vigour test methods*. Zurich: International Seed, Testing Association, 1995. p. 70-78.

HAO, P.; SUN, B.; CHU, X.; SUN, Y.; XING, X.; LIU, S.; TANG, E.; XU, X. Effect of castor oil based urethane oligomer on properties of UV-curable pressure sensitive adhesive for peelable wafer dicing tape. *Journal of Adhesion Science and Technology*, Abingdon, v. 34, n. 23, p. 1-12, 2020.

HASANUZZAMAN, M.; BHUYAN, M. H. M. B.; ZULFIGAR, F.; RAZA, A.; MOHSIN, S. M.; AL MAHMUD, J.; FUJITA, M.; FOTOPOULOS, V. Reactive oxygen species and antioxidant defense in plants under abiotic stress: revisiting the crucial role of a universal defense regulator. *Antioxidants*, Basel, v. 9, n. 8, p. 1-52, 2020.

HASANUZZAMAN, M. HOSSAIN, M. A. SILVA, J. A. T. S. FUJITA, M. Plant Response and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor. In: VENKATESWARLU, B; SHANKER, A. K.; SHAKER, C.; MAHESWARI, M. *Crop stress and its management: perspectives and strategies*. New York: Springer, 2012. p. 261-301.

HENNING, C. P. Compuestos secundarios nitrogenados: alcaloides. In: RINGUELET, J.; VINÁ, S. *Productos naturales vegetales*. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2013. p. 18-61.

HENNING, F. A.; MERTZ, L. M.; JACOB JUNIOR, E. A.; MACHADO, R. D.; FISS, G.; ZIMMER, P. D. Composição química e mobilização de reservas em sementes de soja de alto e baixo vigor. *Bragantia*, Campinas, v. 69, n. 3, p. 727-734, 2010.

HO, T.-T.; MURTHY, H. N.; PARK, S.-Y. Methyl jasmonate induced oxidative stress and accumulation of secondary metabolites in plant cell and organ cultures. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 21, n. 716, p. 1-18, 2020.

HOWARTH, C. J. Genetic improvements of tolerance to high temperature. In: ASHRAF, M., HARRIS, P. J. C).ed.). *Abiotic stresses: plant resistance*

- through breeding and molecular approaches. New York: Howarth Press, 2005.
- HOWARTH, C. J. Melhorias genéticas de tolerância a alta temperatura. In: ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. (ed.). *Abiotic stresses: plant resistance through breeding and molecular approaches*. London: Routledge, 2005.
- HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5-diglucosides. *American Journal of Enology and Viticulture*, [s. l.], v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.
- HU, X.; HAO, C.; CHENG, Z-M.; ZHONG, Y. Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the grapevine superoxide dismutase (SOD) family. *International Journal of Genomics*, [s. l.], p. 1-13, 2019.
- HUANG, M.; WANG, Q. G.; ZHU, Q. B.; QIN, J. W.; HUANG, G. Review of seed quality and safety tests using optical sensing technologies. *Seed Science & Technology*, Cambridge, v. 43, p. 337-366, 2015.
- HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P. Glutaciona e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.
- HUTH, C. *Lignina no tegumento de semente de soja: deterioração por umidade e dano mecânico e tamanho de amostra para o teste de tetrazólio*. 2015. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2015.
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, Abindgdon, v. 54, p. 287-293, 2018.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. Germination. In: ISTA. *International rules for seed testing*. Bassersdorf: ISTA, 2004. p. 5.1-5.5; 5A.1-5A.50.
- JASPERS, P.; KANGASJÄRVI, J. Reactive oxygen species in abiotic stress signaling. *Physiologia Plantarum*, New York, v. 138, p. 405-413, 2010.
- JESUS, T. S. R. *Marcadores fisiológicos e bioquímicos da qualidade de sementes de Ricinus communis L. submetidas a diferentes condições de armazenamento*. 2016. 143 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2016.

- JEVAS, O. The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. *International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences*, Chhattisgarh, v. 3, n. 6, p. 01-08, 2016.
- JIANHUA, Z.; MCDONALD, M. B. The saturated salt accelerated aging for smallseeded crops. *Seed Science and Technology*, Bassersdorf, v. 25, n. 1, p. 123-131, 1997.
- JOLIVET, P.; ROUX, E.; D'ANDREA, S.; DAVANTURE, M.; NEGRONI, L., ZIVY, M.; CHARDOT, T. Protein composition of oil bodies in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry*, Amsterdam, v. 42, p. 501-509, 2004.
- JOOSEN, R. V. L.; KODDE, J.; WILLEMS, L. A. J.; LIGTERINK, W.; VAN DER PLAS, L. H. W.; HILHORST, H. W.M. GERMINATOR: A Software package for high-throughput scoring and curve fitting of *Arabidopsis sp.* seed germination. *The Plant Journal*, New York, v. 62, p. 148-159, 2010.
- KADDURAH-DAOUK, R., KRISHNAN, R. R. K. Metabolomics: a global biochemical approach to the study of central nervous system diseases. *Neuropsychopharmacology*, London, v. 34, n. 1, p. 173-186, 2009.
- KARYOTOU, K; DONALDSON, R. P. Ascorbate peroxidase, a scavenger of hydrogen peroxide in glyoxysomal membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, Amsterdam, v. 434, p. 248-257, 2004.
- KATAJAMAA, M.; ORESIC, M. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BMC Bioinformatics*, London, v. 6, 179-190, 2005.
- KENNEDY, R. A.; RUMPHO, M. E.; FOX, T. C. Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiology*, Oxford, v. 100, p. 1-6, 1992.
- KIM, S.-H.; KIM, S.-H.; LEE, J.-H.; LEE, B.-H.; YOON, H. J.; SHIN, D. H.; PARK, S. S.; JANG, S. B.; PARK, J.-S.; JEE, Y.-K. Superoxide dismutase gene (SOD1, SOD2, and SOD3) polymorphisms and antituberculosis drug-induced hepatitis. *Allergy Asthma Immunology Research*, Seoul, v. 7, n. 1, p. 88-91, 2015.
- KRANNER, I.; BIRTIĆ, S; ANDERSON, K. M.; PRITCHARD, H. W. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radical Biology & Medicine*, Amsterdam, v. 40, p. 2155-2165, 2006.

KRZYZANOWSKI, F. C.; WEST, S. H.; FRANÇA NETO, J. B. O teste de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. *Informativo Abrates*, Londrina, v. 11, n. 2, p. 185, 2001.

KURAMA, E. E.; FENILLE, R. C.; ROSA JR, V. E.; ROSA, D. D.; ULIAN, E. C. Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane. *Molecular Plant Pathology*, New York, v. 3, n. 4, p. 251-259, 2002.

KUREK, K.; PLITTA-MICHALAK, B.; RATAJCZAK, E. Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process. *Plants*, Basel, v. 8, n. 174, 2019.

LAGO, A. A.; ZINK, E.; RAZERA, L. F.; BANZATTO, N. V.; SAVY FILHO, A. Dormência em sementes de três cultivares de mamona. *Bragantia*, Campinas, v. 38, p. 41-44, 1979.

LASO, E.; OGONOWSKI, J. Lipase: characterization, applications and methods of immobilization. *Chemik*, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 97-102, 2010.

LEE, S. E.; SHIN, H.-T.; HWANG, H. J.; KIM, J. H. Antioxidant activity of extracts from *Alpinia katsumadai* seed. *Phytotherapy Research*, Chichester, v. 17, p. 1041-1047, 2003.

LEHNINGER, A. L., COX, M. M., NELSON, D. L. *Lehninger: princípios de bioquímica*. 5. ed. [S. l.: s. n.], 2011.

LEHNINGER, A. L., COX, M. M., NELSON, D. L. *Lehninger: princípios de bioquímica*. 6. ed. [S. l.: s. n.], 2014.

LI, M.; YANG, L.; BAI, Y.; LIU, H. Analytical methods in lipidomics and their applications. *Analytical Chemistry*, Washington, DC, v. 86, n. 1, p. 161-175, 2014.

LI, Y.; LIU, Y.; ZHANG, J. Advances in the research on the AsA-GSH cycle in horticultural crops. *Frontiers of Agriculture in China*, New York, v. 4, n. 1, p. 84-90, 2010.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LOGAN, B. A.; KORNYEYEV, D.; HARDISON, J.; HOLADA, A. S. The role of antioxidant enzymes in photoprotection. *Photosynthesis Research*, New York, v. 88, p. 119-132, 2008.

LOPES, F. F. M.; BELTRÃO, N. E. M.; LOPES NETO, J. P.; PEDRO, J. P. Crescimento inicial de genótipos de mamoneira com sementes submetidas ao envelhecimento acelerado. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*, Campina Grande, v. 12, n. 2, p. 69-79, 2008.

LUZ, D. A. *Estudo da degradação da vitamina E (α -tocoferol) durante as etapas do refino do óleo de babaçu (*Orbignya phalerata*, Mart.): validação de um método*. 2011. 94 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

LUZ, R. P. *Caracterização morfofisiológica molecular e agrônômica de cultivares de mamona*. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitotecnia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2012.

MA, W.-G.; ZHANG, Z.-H.; ZHENG, Y.-Y.; PAN, W.; QIU, T.; GUAN, Y.-J.; HU, J. Determination of tobacco (*Nicotiana tabacum*) seed vigour using controlled deterioration followed by a conductivity test. *Seed Science and Technology*, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 1-10, 2020.

MA, Y.; HUANG, D.; CHEN, C.; ZHU, S.; GAO, J. Regulation of ascorbate-glutathione cycle in peaches via nitric oxide treatment during cold storage. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 247, p. 400-406, 2019.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 12, n. 3, p. 205-212, 1999.

MAGALHÃES, S. R.; BORGES, E. E. L.; BERGER, A. P. A. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (vell.) s. f. blake durante a germinação. *Ciência Florestal*, Santa Maria, v. 20, n. 4, p. 589-595, 2010.

MAGEDANS, Y. V. S. *Metabolismo do alcaloide antioxidante braquicerina de *Psychotria brachyceras* Müll. Arg. sob estresse de calor*. 2017. 67 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2017.

MAHJABIN, B. S.; ABIDI, A. B. Physiological and biochemical changes during seed deterioration: a review. *International Journal of Recent Scientific Research*, Chhattisgarh, v. 6, p. 3416-3422, 2015.

MARCOS FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Piracicapba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, 2005. v. 1.

- MARCOS FILHO, J. Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola*, São Paulo, v. 72, n. 4, p. 363-374, 2015.
- MARCOS FILHO, J.; NOVEMBRE, A. D. C.; CHAMMA, M. C. P. Tamanho da semente e o teste de envelhecimento acelerado para soja. *Scientia Agricola*, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 473-482, 2000.
- MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, New York, v. 67, n. 4, p. 569-579, 2010.
- MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C. Morfologia de frutos, sementes e plântulas e germinação de sementes de *Erythrina variegata* L. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 29, n. 3, p. 8-17, 2007.
- MATTHEWS, S. Physiology of seed ageing. *Agricultural Botany*, Thousand Oaks, v. 14, n. 2, 1985.
- MCDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Science and Technology*, [s. l.], v. 27, p. 177-237, 1999.
- MEDEIROS, A. D.; PINHEIRO, D. T.; XAVIER, W. A.; SILVA, L. J.; DIAS, D. C. F. S. Quality classification of *Jatropha curcas* seeds using radiographic images and machine learning. *Industrial Crops & Products*, Amsterdam, v. 146, p. 1-7, 2020.
- MELLO, J. I. O. *Compostos de reserva de sementes e suas relações com diferentes níveis de sensibilidade à dessecação e ao congelamento*. 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Botânica, Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.
- MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, n. 36, p. 1-11, 2002.
- MELO, R. B. *Caracterização das reservas das sementes e avaliação da germinação e formação de plântulas de nove espécies arbóreas de florestas alagáveis da Amazônia*. 2013. 82 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2013.
- MELO, W. C.; SILVA, D. B.; PEREIRA JUNIOR N. Produção de etanol a partir de torta de mamona (*Ricinus communis* L.) e avaliação da letalidade da torta hidrolisada para camundongos. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 1104-1106, 2008.

MENDES, R. C.; DIAS, D. C. F. S.; PEREIRA, M. D.; BERGER, P. G. Tratamentos pré-germinativos em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 31, n. 1, p. 187-194, 2009.

MENDES, R. C.; DIAS, D. C. F. S.; PEREIRA, M. D.; DIAS, L. A. S. Testes de vigor para avaliação do potencial fisiológico de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.). *Ciencia e Agrotecnologia*, Lavras, v. 34, n. 1, p. 114-120, 2010.

MENGARDA, L. H. G. *at al* Alternating temperature and accelerated aging in mobilization of reserves during germination of *Carica papaya* L. seeds. *Journal of Seed Science*, Londrina, v. 37, n. 1, p. 16-25, 2015.

MESSETTI, M. A.; SANTOS, A. M.; ANGELIS, D. F.; CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Estudo do derivado do óleo de *Ricinus communis* L.) mamona) como agente biocida e redutor da viscosidade produzida por *Leuconostoc mesenteroides* em indústrias sucroalcooleiras. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 77, n. 2, p. 301-308, 2010.

MILLER, A.-F. Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights. *HHS Public Access*, [s. l.], v. 586, n. 5, p. 585-595, 2012.

MIRA, S.; PIRREDDA, M.; MARTÍN-SÁNCHEZ, M.; MARCHESSI, J. E.; MARTÍN, C. DNA methylation and integrity in aged seeds and regenerated plants. *Seed Science Research*, Cambridge, p. 1-9, 2020.

MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Advances in Medical Sciences*, Amsterdam, v. 63, p. 68-78, 2018.

MISHRA, B.; CHANDC, S.; SANGWANA, N. S. ROS management is mediated by ascorbate-glutathione- α -tocopherol triad in co-ordination with secondary metabolic pathway under cadmium stress in *Withania somnifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*, Amsterdam, v. 139, p. 620-629, 2019.

MISHRA, V. K.; PATEL, R. H. Synthesis and characterization of flame retardant polyurethane: effect of castor oil polyurethane on its properties. *Polymer Degradation and Stability*, Amsterdam, v. 175, p. 1-36, 2020.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S; GOLLERY, M.; BREUSEGEM, F. V. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, [s. l.], v. 9, n. 10, 2004.

MIYAKE, C.; ASADA, K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product

monodehydroascorbate radicals in thylakoids. *Plant & Cell Physiology*, Oxford, v. 33, n. 5, p. 541-553, 1992.

MORAES, J. V. *Morfologia e germinação de sementes de Poecilanthe parviflora bentham (fabaceae – faboideae)*. 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Universidade Estadual Paulista, São Paulo,, 2007.

MORAES, P. F.; LAAT, D. M.; SANTOS, M. E. A. H. P.; COLOMBO, C. A.; KIIHL, T. Expressão gênica diferencial em genótipos de mamona (*Ricinus communis* L.) submetidos a déficit hídrico induzido por PEG. *Melhoramento Genético Vegetal*, [s. l.], v. 74, n. 1, p. 25-32, 2015.

MOURA, M. S. B.; GALVINCIO, J. D.; BRITO, L. T. L.; SOUZA, L. S. B.; SÁ, I. I. S.; SILVA, T. G. F. *Clima e água de chuva no semi-árido*. Brasília, DF: Embrapa, 2005. Disponível em: <https://bit.ly/2UpGHGt>. Acesso em: 2 jan. 2020.

MURSHED, S. M. S.; LEONG, K. C.; YANG, C. Investigations of thermal conductivity and viscosity of nanofluids. *International Journal of Thermal Sciences*, Amsterdam, v. 47, n. 5, p. 560-568, 2008.

MUTLU, H.; MEIER, M. A. R. Castor oil as a renewable resource for the chemical industry. *European Journal of Lipid Science and Technology*, New York, n. 112, p. 10-30, 2010.

MYLONA, P. V.; POLIDOROS, A. N. ROS regulation of antioxidant genes. In: GUPTA, S. D. *Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants*. Enfield: Science Publishers, 2011. p. 101-128.

NAGEL, M.; KRANNER, I.; NEUMANN, K.; ROLLETSCHKE, H.; SEAL, C.; COLVILLE, L.; FERNÁNDEZ-MARÍN, B.; BÖRNER, A. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. *Plant, Cell & Environment*, Hoboken, v. 38, n. 6, p. 1011-1022, 2014.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, Oxford, v. 22, p. 867-880, 1981.

NAVAS-IGLESIAS, N., CARRASCO-PANCORBO, A., CUADROS-RODRÍGUEZ, L. From lipids analysis towards lipidomics, a new challenge for the analytical chemistry of the 21st century. Part II: analytical lipidomics. *Trends in Analytical Chemistry*, Amsterdam, v. 28, p. 393-403, 2009.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NERY, F. C.; ALVARENGA, A. A.; JUSTO, C. F., CASTRO, E. M.; STEIN, V. C. Caracterização morfológica e química de sementes de *calophyllum brasiliense* cambess. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 144-146, 2007.

NGUEDAP, R. D. T.; TCHUIFON, D. R. T.; CONDE, M. A.; MENGOUNOU, G. M.; NDOM, J. C.; AZEBAZE, A. G. B. Comparative study of extraction methods on the composition and physicochemical properties of vegetable oil from the seeds of *Ricinus communis*. *Chemical Science International Journal*, [s. l.], v. 29, n. 6, p. 29-37, 2020.

NIKI, E.; ABE, K, Vitamin E: structure, properties and functions. In: NIKI, E. *Vitamin E: chemistry and nutritional benefits*. London: Royal Society of Chemistry, 2019. p. 1-11.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *The Royal Society of Chemistry*, London, v. 5, p. 27986-28006, 2015.

NOBRE, D. A. C.; SILVA NETA, I, C.; DAVID, A. M. S. S.; GONÇALVES, N. P. AMARO, H. T. R. Desempenho físico e fisiológico de sementes de mamona produzidas no norte de Minas Gerais. *Revista Agrarian*, Dourados, v. 7, n. 24, p. 218-225, 2014.

NOLETO, L. G.; PEREIRA, M. F. R.; AMARAL, L. I. V. Alterações estruturais e fisiológicas em sementes de *Copaifera langsdorffii* desf. – Leguminosae-Caesalpinioideae submetidas ao tratamento com hipoclorito de sódio. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 32, n. 1, p. 45-52, 2010.

OGUNNIYI, D. S. Castor oil: a vital industrial rawmaterial. *Bioresource Technology Amsterdam*, v. 97, p. 1086-1091, 2006.

OLIVEIRA, A. K. M.; SCHLEDER, E. D.; FAVERO, S. Caracterização morfológica, viabilidade e vigor de sementes de *Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. *Revista Árvore*, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2006.

OLIVEIRA, G. P. *Maturação e qualidade fisiológica de sementes de feijão – caupi (Vigna unguiculata (L.) Walp.)*. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2012.

OLIVEIRA, L. R. *Avaliação dos compostos fenólicos e das propriedades antioxidantes da polpa do pequi (Caryocar spp) processado in natura*. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, S. C. G. *Aminoácidos não-proteinogênicos como antioxidantes*. 2016. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química Medicinal) – Universidade do Minho, Braga, 2016.

OMAR, S. A.; ELSHEERY, N. I.; KALAJI, H. M.; XU, ZENG-FU; SONG-QUAN, S. CARPERNTIER, R. LEE, C. H.; ALLAKHVERDIEVS, S, I. Dehydroascorbate reductase and glutathione reductase play an important role in scavenging hydrogen peroxide during natural and artificial dehydration of *Jatropha curcas* seeds. *Journal Plant Biology*, Hoboken, v. 55, p. 469-480, 2012.

ORNELLASA, F. L. S.; SOUSA, A. O. S.; PIROVANIA, C. P.; ARAÚJO, M. N. A.; COSTA, D. S.; DANTAS, B. F.; BARBOSA, R. M. Gene expression, biochemical and physiological activities in evaluating melon seed vigor through ethanol release. *Scientia Horticulturae*, Amsterdam, v. 261, p. 1-9, 2019.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PARK, A. K.; KIM, I.-S.; DO, H.; KIM, H.; CHOL, W.; JO, S.-W.; SHIN, S. C.; LEE, J. H.; YOON, H.-S.; KIM, H.-W. Characterization and structural determination of cold-adapted monodehydroascorbate reductase, MDHAR, from the Antarctic hairgrass *Deschampsia antarctica*. *Crystals*, [s. l.], v. 9, n. 537, 2019.

PASTOR, N.; WEINSTEIN, H.; JAMISON, E.; BRENOWITZ, M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequencespecific binding. *Journal of Molecular Biology*, Amsterdam, v. 304, n. 1, p. 55-68, 2000.

PATEL, V. R.; DUMANCAS, G. G.; VISWANATH, L. C. K.; MAPLES, R.; SUBONG, B. J. J. Castor oil: properties, uses, and optimization of processing parameters in commercial production. *Lipid Insights*, [s. l.], v. 9, p. 1-12, 2016.

PERTEL, J. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o envelhecimento natural e artificial de sementes de café (*Coffea arabica* L.). 2004. 117 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.

PHANEENDRANATH, B. R. Influence of amount of water in the paper towel on standard germination tests. *Journal of Seed Technology*, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 82-87, 1980.

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

PINHO, S. Z.; CARVALHO, L. R.; DELACHIAVE, M. E. A. Limit between stages I and II of a seed imbibition curve. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 61, n. 1, p. 17-20, 2004.

PIOTROWICZ, I. B. B. *Avaliação das propriedades antioxidante e anti-hipertensiva de peptídeos derivados do concentrado proteico de farelo de arroz (Oryza sativa L.)*. 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande, 2016.

POLITO, L.; BORTOLOTTI, M.; BATTELI, M. G.; CALAFATO, G.; BOLOGNESI, A. Ricin: an ancient story for a timeless plant toxin. *Toxins*, Basel, v. 11, n. 324, 2019.

QUEIROGA, V. P.; BELTRÃO, N. E. M. *Produção e armazenamento de sementes de mamona (Ricinus communis L.)*. Brasília, DF: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2004). Circular Técnico nº 206).

QUEIROGA, V. P.; SANTOS, R. F. Diagnóstico da produção de mamona (*Ricinus communis*, L.) em uma amostra de produtores do nordeste brasileiro. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibras*, Campina Grande, v. 12, n. 1, p. 9-23, 2008.

QUEIROGA, V. P.; SANTOS, R. F.; QUEIROGA, D. A. N. Levantamento da produção de mamona (*Ricinus communis* L.) em uma amostra de produtores em cinco municípios do Estado da Bahia. *Agro@ambiente*, Boa Vista, v. 5, n. 2, p. 148-157, 2011.

RAHMAN, A.; CHO, B. K. Assessment of seed quality using non-destructive measurement techniques: a review. *Seed Science Research*, Cambridge, v. 26, p. 285-305, 2016.

RAHOUI, S.; CHAOUI, A.; BEM, C.; RICKAUER, M.; GENTZBITTEL, L.; FERJANI, E. E. Effect of cadmium pollution on mobilization of

- embryo reserves in seedlings of six contrasted *Medicago truncatula* lines. *Phytochemistry*, Amsterdam, v. 111, p. 98-106, 2015.
- RAJJOU, L.; LOVIGNY, Y.; GROOT, S. P. C.; BELGHAZI, M.; JOB, C.; JOB, D. Proteome-wide characterization of seed aging in arabidopsis: a comparison between artificial and natural aging protocols. *Plant Physiology*, Oxford, v. 148, p. 620-641, 2008.
- RAMAIAH, K. P.; MISHRA, K.; ATKAR, A.; SRIDHAR, S. Pervaporation separation of chlorinated environmental pollutants from aqueous solutions by castor oil based composite interpenetrating network membranes. *Chemical Engineering Journal*, Amsterdam, v. 387, p. 1-42, 2020.
- RATAJCZAK, E.; MAŁECKA, A.; BAGNIEWSKA-ZADWORNA, A.; KALEMBA, E.M. The production, localization and spreading of reactive oxygen species contributes to the low vitality of long-term stored common beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Journal of Plant Physiology*, Amsterdam, v. 174, p. 147-156, 2015.
- RATAJCZAK, E.; MAŁECKA, A.; CIERESZKO, I.; STASZAK, A. M. Mitochondria are important determinants of the aging of seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, [s. l.], v. 20, p. 1-12, 2019.
- RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, DF, v. 28, n. 2, p. 123-130, 2003.
- RIBEIRO, P. R.; ZANOTTI, R. F.; DEFLERS, C.; FERNANDEZ, L, G.; CASTRO, R. D.; LIGTERINK, L.; HILHORST, H. W. M. Effect of temperature on biomass allocation in seedlings of two contrasting genotypes of the oilseed crop *Ricinus communis*. *Journal of Plant Physiology*, Amsterdam, v. 185, p. 31-39, 2015.
- RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, N. M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005.
- RIBEIRO FILHO, J. *Cultura da mamoneira*. Viçosa: UFV, 1966.
- RIOS, I. C.; CORDEIRO, J. P.; ARRUDA, T. B. M. G.; RODRIGUES, E. A.; UCHOA, A. F. J.; LUNAC, M. T.; CALVALCANTE, C. L.; RICARDO, N. M. P. S. Chemical modification of castor oil fatty acids (*Ricinus communis*) for

biolubricant applications: an alternative for Brazil's green market. *Industrial Crops & Products*, Amsterdam, v. 145, p. 1-8, 2019.

RODRIGUES, H. C. A.; CARVALHO, S. P.; CARVALHO, A. A.; CARVALHO FILHO, J. L. S.; CUSTÓDIO, T. N. Avaliação da diversidade genética entre acessos de mamoneira (*Ricinus communis* L.) por meio de caracteres morfoagronômicos. *Revista Ceres*, Viçosa, v. 57, n. 6, p. 773-777, 2010.

ROHMAN, M. M.; ISLAM, M. M.; MONSUR, M. B.; AMIRUZZAMAN, M.; FUJITA, M.; HASANUZZAMAN, M. Trehalose protects maize plants from salt stress and phosphorus deficiency. *Plants*, [s. l.], v. 8, n. 568, p. 1-19, 2019.

ROLIM, A. E. H.; HENRIQUE-ARAÚJO, R.; FERRAZ, E. G.; DULTRA, F. K. A. A.; FERNANDEZ, L. G. Lipidomics in the study of lipid metabolism: current perspectives in the omic sciences. *Gene*, Amsterdam, v. 554, n. 2, p. 131139, 2015.

ROSSETTO, C. A. V.; MARCOS FILHO, J. Comparação entre os métodos de envelhecimento acelerado e de deterioração controlada para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 52, n. 1, p. 121-131, 1995.

ROTTA, R. B. *Estudo da enzima glutationa em carne de frango*. 2007. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) –Universidade Regional Integrada do Alto do Uruguai e das Missões, Erechim, 2007.

ROVER JÚNIOR, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

SACHAN, N.; ROGERS, D. T.; YUN, K.-Y.; LITTLETON, J. M.; FALCONE, D. L. Reactive oxygen species regulate alkaloid metabolism in undifferentiated *N. tabacum* cells. *Plant Cell Reports*, New York, n. 29, v 437, p. 437-448, 2010.

SALIMON, J.; NOOR, N. A. M.; NAZRIZAWATI, A. T.; MOHD FIRDAUS, M. Y.; NORAISHAH, A. Fatty acid composition and physicochemical properties of malaysian castor bean *Ricinus communis* L. seed oil. *Sains Malaysiana*, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 761-764, 2010.

- SANO, N.; RAJJAOU, L.; NORTH, H.; DEBEAUJON, M.-P. A.; SEO, M. Staying alive: molecular aspects of seed longevity. *Plant & Cell Physiology*, Oxford, v. 57, n. 4, p. 660-674, 2016.
- SANTOS, C. M. R.; MENEZES, N. L.; VILLELA, F. A. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.
- SANTOS, J. F.; ALVARENGA, R. O.; TIMÓTEO, T. S.; CONFORTO, E. C.; MARCOS FILHO, J.; VIEIRA, R. D. Avaliação do potencial fisiológico de lotes de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 33, n. 4, p. 743-751, 2011.
- SANTOS, J. L. *Fisiologia da maturação de frutos e superação de dormência em sementes de maracujá-do-mato (Passiflora cincinnata Mast.)*. 2018. 80 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista, 2018.
- SANTOS, M. H.; BATISTA, B. L.; DUARTE, S. M. S.; ABREU, C. M. P.; GOUVÊA, C. M. C. P. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 604-610, 2007.
- SANTOS, S. R. G. *Efeito da temperatura na germinação de sementes de Sebastiania commersoniana (Baill.) Smith & Downs (Branquilho)*. 1999. 76 f. Dissertação (Mestrado em Produção e Tecnologia de Sementes) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1999.
- SANTOSO, B. B.; PARWATA, I. A.; JAYA, I. K. D. Seed viability and oil content of castor bean (*Ricinus communis* L.) as affected by packaging materials during storage. *International Journal of Applied Science and Technology*, [s. l.], v. 5, n. 2; p. 56-61, 2015.
- SASAKI, M. Lipídios, carboidratos e proteínas de sementes de leguminosas do cerrado. 2008. 83 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.
- SATHISH, S.; AHAMED, R.; SENTHIL, N.; ARULKUMAR, N.; PARK, H. S.; KALAISELVI, S.; UMARANI, R.; RAVEENDRAN, M.; BHASKARAN, M.; KIM, G. S. Proteomic analysis of ageing in black gram (*Vigna mungo* L.) seeds and its relation to seed viability. *Plant Omics*, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 201-211, 2015.

SCHAUER, N.; FERNIE, A. Plant metabolomics: towards biological function and mechanism. *Trends in Plant Science*, Maryland Heights, v. 11, n. 10, p. 508-516, 2006.

SCHNEIDER, R. C. S.; ALVES, D. M.; LARA, L. R. S.; PONS, E. L.; CARAMÃO, E. B.; MARTINELLI, M. Componentes minoritários do óleo de mamona (*Ricinus communis* L.). *Tecno-Lógica*, Santa Cruz do Sul, v. 11, n. 1, p. 41-46, 2007.

SCHULZ, D. G.; ORO, P.; VOLKWEIS, C.; MALAVASI, M. M.; MALAVASI, U. C. Maturidade fisiológica e morfometria de sementes de *Inga laurina* (Sw.) Willd. *Floresta e Ambiente*, Soropédica, v. 21, n. 1, p. 45-51, 2014.

SEVERINO, L. S.; FERREIRA, G. B.; MORAES, C. R. A.; GONDIM, T. M. S.; CARDOSO, G. D.; VIRIATO, J. R.; BELTRÃO, N. E. M. Produtividade e crescimento da mamoneira em resposta à adubação orgânica e mineral. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, DF, v. 41, n. 5, p. 879-882, 2006.

SEWELAM, N; KAZAN, K; SCHENK, P. M. Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Frontiers in Plant Science*, San Diego, v. 7, n. 187, p. 1-21, 2016.

SHABAN, B. Aging in orthodox seeds is a problem. *International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research*, Nakhil St, v. 1, n. 11, p. 1296-1301, 2013.

SHACTER, E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metabolism Reviews*, [s. l.], v. 32, p. 307-326, 2000.

SHARMA, P.; DUBEY, R. S. Lead toxicity in plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Campoo dos Goytacazes, v. 17, n. 1, p. 35-52, 2005.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, [s. l.], v. 2012, p. 1-26, 2012.

SILVA, A. A.; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 4, p. 994-1002, 2010.

SILVA, J. N.; SILVA, M. A. D.; RODRIGUES, M. H. B. S.; ALVES, R. M. Testes de envelhecimento acelerado e condutividade elétrica para sementes de espécies florestais nativas: uma breve revisão. *Meio Ambiente (Brasil)*, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 24-30, 2019.

- SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.
- SILVA, P. P., SEKITA, M. C., DIAS, D. C. F.; NASCIMENTO, W. M. Biochemical and physiological analysis in carrot seeds from different orders of umbels. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 47, p. 407-413, 2016.
- SILVA, S. A.; CERQUEIRA, L. S.; VILARINHOS, A. D.; AMORIM, E. P.; MOREIRA, R. F. C.; COSTA, M. A. P. C. Variabilidade genética em cultivares de mamona por meio de marcadores RAPD. *Magistra*, Recôncavo da Bahia, v. 24, n. 4, p. 341-347, 2012.
- SILVEIRA, C. M. *Teste de deterioração controlada em sementes de amendoim*. 2006. 62 f. Dissertação (Mestrado em Produção de Tecnologia de Semente) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2006.
- SINGH, A. S.; KUMARI, S.; MODI, A. R.; GAJERA, B. B.; NARAYANAN, S.; KUMAR, N. Role of conventional and biochnological approaches in genetic improvement of castor (*Ricinus communis* L.). *Industrial Crops and Products*, Amsterdam, v. 74, p. 55-62, 2015.
- SINGH, J.; PAROHA, S.; MISHRA, R. P. Factors affecting oilseed quality during storage with special reference to soybean (*Glycine max*) and Niger (*Guizotia abyssinica*) seeds. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, Tamilnadu, v. 6, n. 10, p. 2215-2226, 2017.
- SINGH, V. G.; JITHENDRA, K. D.; CHAUHAN, S. S.; SINHA, A.; SIGH, S.; SHARMA, S. *Ricinus Communis* (palm of Christ) healing touch of God. *International Journal of Advance Research and Development*, [s. l.], v. 3, p. 181-183, 2018.
- SMERILLI, A.; BALZANO, S.; MASELLI, M.; BLASIO, M.; OREFICE, I.; GALASSO, C.; SANSONE, C.; BRUNET, C. Antioxidant and photoprotection networking in the coastal diatom *Skeletonema marinoi*. *Antioxidants*, Basel, v. 8, n. 6, p. 154, 2019.
- SMERTENKO, A.; DRABER, P.; VIKLICKY, V.; OPATRNY, Z. Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant, Cell and Environment*, Hoboken, v. 20, n. 12, p. 1534-1542, 1997.

SOARES, A. M. S.; MACHADO, O. L. T. Defesa de plantas: sinalização química e espécies reativas de oxigênio. *Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas*, São Luís, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2007.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Revista Nutrição*, Campinas, v.15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SOETISNA, U. *at al* Germination test recommendations for estimating the viability of moist or dry seeds of lemon (*Citrus limon*) and lime (*C. aurantifolia*). *Seed Science & Technology*, Zurich, v. 13, p. 87-110, 1985.

SOUZA, A. S.; TAVORA, F. J. A. F.; PITOMBEIRA, J. B.; BEZERRA, F. M. Épocas de plantio e manejo da irrigação para a mamoneira. II – Crescimento de produtividade. *Revista Ciência Agronômica*, Fortaleza, v. 38, p. 422-429, 2007.

SOUZA, M. T.; SOUZA, M. T.; PANOBIANCO, M. Morphological characterization of fruit, seed and seedling, and seed germination test of *Campomanesia guazumifolia*. *Journal of Seed Science*, Londrina, v. 40, n. 1, p. 75-81, 2018.

SOUZA, N. C.; MOTA, S. B.; BEZERRA, F. M. L; AQUINO, B. F; SANTOS, A. B. Produtividade da mamona irrigada com esgoto doméstico tratado. *Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, v. 14, p. 478-484, 2010.

SOUZA, V. H. A.; SANTOS, L.T.; CAMPOS, A. F; CAROLINO, J. Análise do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB): resultados e críticas. *Revista de Administração Geral*, Macapá, v. 1, n. 1, p. 23-41, 2015.

SPINOLA, M. C. M.; CÍCERO, S. M.; MELO, M. Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo ao envelhecimento acelerado. *Scientia Agrícola*, São Paulo, v. 57, n. 2, p. 263-270, 2000.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, Amsterdam, v. 24, p. 345-351, 2003.

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

SUJATHA, M.; REDDY, T. P; MAHASI, M. J. Role of biotechnological interventions in the improvement of castor (*Ricinus communis* L.) and *Jatropha curcas* L. *Biotechnology Advances*, Amsterdam, v. 26, p. 424-435, 2008.

- TAIZ L; ZEIGER E. *Fisiologia vegetal*. 3. ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2004.
- TELES, C. A. S. *Aspectos fisiológicos e eventos do ciclo celular em sementes de Ricinus communis L. sob restrição hídrica*. 2013. 97 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2013.
- TESNIER, K.; STROOKMAN-DONKERS, H. M.; VAN PIJLEN, J. G.; VAN DER GEEST, A. H. M.; BINO, R. J.; GROOT, S. P. C. A controlled deterioration test for *Arabidopsis thaliana* reveals genetic variation in seed quality. *Seed Science & Technology*, [s. l.], v. 30, p. 149-165, 2002.
- TIWARI, Y. K.; YADAV, S. K. Effect of high-temperature stress on ascorbate-glutathione cycle in maize. *Agricultural Research*, New York, v. 9, p. 1-9, 2019.
- TOZZI, H. H. *Caracterização da mobilização das reservas das sementes do maracujá-amarelo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa O. Deg) durante a germinação*. 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.
- TRAPNELL, C.; PACHTER, L.; SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, Oxford, v. 25, n. 9, p. 1105–1111, 2009.
- TRZECIAK, M. B. *Formação de semente de soja: aspectos físicos, fisiológicos e bioquímicos*. 2012. 131 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz Queiroz”, Piracicaba, 2012.
- UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de Compostos de aroma. *Química Nova*, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 616-622, 2007.
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, A.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Amsterdam, n. 39, p. 44-84, 2007.
- VAN DER GREEF, J., STROOBANT, P., VAN DER HEIJDEN, R. The role of analytical sciences in medical systems biology. *Current Opinion in Chemical Biology*, London, v. 8, n. 5, p. 559-565, 2004.
- VASCONCELLOS, A. *Qualidade fisiológica de sementes de mamona e gergelim provenientes do consórcio*. 2012. 18 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Agroecologia e Agropecuária) – Universidade Estadual da Paraíba, Lagoa Seca, 2012.

VASCONCELOS, P. C T. *Abordagem multi-ômica para identificação de marcadores de estresses abióticos em sementes e plântulas de Ricinus communis L.: fenotipagem integrada, perfil metabolômico e expressão de genes.* 2017. 230 f. Tese (Doutorado em Bioquímica e Biologia Molecular) Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2017.

VASCONCELOS, P. C T. *Desenvolvimento e germinação de sementes de mamona cv. Mpa 11: morfofisiologia e ciclo celular.* 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2015.

VIANT, M. R.; SOMMER, U. Mass spectrometry based environmental metabolomics: a primer and review. *Metabolomics*, New York, v. 9, n. S1, 144-158, 2012.

VILLAS-BÔAS, S.G., HØJER-PEDERSEN, J., AKESSON, M., SMEDSGAARD, J., NIELSEN, J. Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast*, Chichester, v. 22, n. 14, p. 1155-1169, 2005.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, Amsterdam, v. 61, p. 199-223, 2007.

WALTERS, C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Science Renault*, Cambridge, v. 8, p. 223-244, 1998.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews. Genetics*, London, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WOLFE-SIMON, F.; GRZEBYK, D.; SCHOFIELD, O. The role and evolution of superoxide dismutases in algae. *Phycological Society of America, Moss Landing*, v. 41, p. 453-465, 2005.

YAO, Z.; LIU, L.; GAO, F.; RAMPITSCH, C.; REINECKE, D. M.; OZGA, J. A.; AYELE, B. T. Developmental and seed aging mediated regulation of antioxidative genes and differential expression of proteins during pre- and post-germinative phases in pea. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Campos dos Goytacazes, v. 169, p. 1477-1488, 2012.

YEBOAH, A.; YING, S.; LU, J.; XIE, Y.; AMOANIMAA-DEDE, H.; BOATENG, K. G. A.; CHEN, M.; YIN, X. Castor oil (*Ricinus communis*): a review on the chemical composition and physicochemical properties. *Food Science and Technology*, Campinas, p. 1-15, 2020.

ZUCARELI, C. *Teste de deterioração controlada para avaliação do vigor de sementes de milho (Zea mays L.)*. 2002. 111 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2002.

ZUCARELI, C.; CAVARIANI, C.; AUGUSTO, C.; SBRUSSI, G.; NAKAGAWA, J. Teste de deterioração controlada na avaliação do vigor de sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 33, n. 4, p. 732-742, 2011.

ZUCHI, J.; BEVILAQUA, G. A. P.; ZANUNCIO, J. C.; PESKE, S. T.; SILVA, S. D. A.; SEDIYAMA, C. S.; Characteristics of castor bean cultivars according to the environmental crop and sowing season in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 501-506, 2010.

ZUCHI, J.; PANOZZO, L. E.; HEBERLE, E.; ARAÚJO, E.F. Curva de embebição e condutividade elétrica de sementes de mamona classificadas por tamanho. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 34, n. 3, p. 504-509, 2012.

Sobre os autores

Thamires Soares Ricardo Jesus

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/ICS/UFBA), Salvador (BA).

E-mail: thamires.s.r.jesus@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/3458550915427125>

Patrícia Campos Santos

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/ICS/UFBA), Salvador (BA).

E-mail: patricia.campos@ufba.br, psopmacs@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/4192658430990088>

Thales Guimarães Bezerra

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/ICS/UFBA), Salvador (BA).

E-mail: thalesguimaraes@live.com, <http://lattes.cnpq.br/2359072070702372>

Cristiane Dantas de Brito

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/ICS/UFBA), Salvador (BA).

E-mail: crisrichta@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/4167308031183290>

Paulo Roberto Ribeiro de Jesus

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Metabolomic Research Group, Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/ICS/UFBA), Salvador (BA).

E-mail: pauloribeiro@ufba.br, <http://lattes.cnpq.br/2372350954162223>

Renato Delmondez de Castro

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/ICS/UFBA), Salvador (BA).

E-mail: renatodel@gmail.com, <http://lattes.cnpq.br/0945648805844128>

Henk Hilhorst

Wageningen University, Department of Plant and Physiology, Wageningen, Netherlands. E-mail: henk.hilhorst@wur.nl

Wilco Ligterink

Wageningen Seed Lab, Laboratory of Plant Physiology, Wageningen University, Wageningen, the Netherlands. E-mail: wilco.ligterink@keygene.com

Luzimar Gonzaga Fernandez

Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Bioquímica e Biofísica, Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB/ICS/UFBA), Salvador (BA).

E-mail: luzimargonzaga@gmail.com, luzimar@ufba.br, <http://lattes.cnpq.br/5869970809916591>

Formato: 17 x 24 cm
Fontes: Futura Md BT, IowanOldSt BT
Extensão digital: PDF



Luzimar G. Fernandez é bióloga e química, doutora em Bioquímica na área de Biologia Molecular Estrutural, professora titular do Departamento de Bioquímica e Biofísica do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, atuando na orientação e no desenvolvimento de pesquisas em bioquímica e ciências ômicas, com espécies vegetais e suas aplicações, desde 2000.



Thamires Soares é bacharel em Biotecnologia, mestre e doutoranda em Bioquímica e Biologia Molecular pela UFBA.



Patrícia Campos é bióloga, especialista MBA em Auditoria e Gestão Ambiental e doutoranda em Biotecnologia de Recursos Naturais na UFBA.

Trata-se de uma compilação de publicações científicas com várias ilustrações, que deixam esta obra bem didática ao discutir de forma clara, mas com detalhamento e rigor científico, sobre os mecanismos biológicos, fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos na germinação, armazenamento, envelhecimento e estresse oxidativo em *R. communis*. O público-alvo são estudantes, professores e pesquisadores que trabalham com a planta e outras oleaginosas, e/ou tenham interesse nos temas abordados. O principal diferencial desta obra para as demais existentes é a abordagem multidisciplinar sobre os avanços científicos sobre sementes, metabolismo e estresse oxidativo em *R. communis*, apresentados pela primeira vez na forma de livro, mas que podem ser aplicados a outras plantas multiusos e adaptados ao semiárido.

ISBN 978-65-5630-234-8



9 786556 302348

