



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS DE PATOS – PB

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA ENVOLVIDOS COM A PROTEÇÃO
OXIDATIVA DURANTE O ENVELHECIMENTO DE SEMENTES DE CAUPI
CULTIVAR PÉROLA**

GISELA FORMIGA QUEIROZ NÓBREGA

PATOS-PB,

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CAMPUS DE PATOS – PB

GISELA FORMIGA QUEIROZ NÓBREGA

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA ENVOLVIDOS COM A PROTEÇÃO
OXIDATIVA DURANTE O ENVELHECIMENTO DE SEMENTES DE CAUPI
CULTIVAR PÉROLA**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Unidade Acadêmica
de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Campina
Grande, como requisito para o
título de graduada em Licenciatura
em Ciências Biológicas.

ORIENTADOR: PROF. DR. CARLOS EDUARDO ALVES SOARES

PATOS-PB,

2012



Biblioteca Setorial do CDSA. Agosto de 2022.

Sumé - PB

FICHA CATALOGADA NA BIBLIOTECA SETORIAL DO CSTR /
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CAMPUS DE PATOS

N754c

2012 Nóbrega, Gisela Formiga Queiroz

Caracterização fisiológica envolvida com a proteção oxidativa durante o envelhecimento de sementes de caupi cultivar pérola. / Gisela Formiga Queiroz Nóbrega - Patos - PB: UFCG /UACB, 2012.

61p.: il. Color.

Inclui Bibliografia.

Orientador (a): Carlos Eduardo Alves Soares

(Graduação em Ciências Biológicas) Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Universidade Federal de Campina Grande.

1- Sementes. 2 - Bioquímica. 3 - Fisiologia vegetal. 4 - Feijão Caupi. 5 - Proteção enzimática. 6 - Armazenamento. 7 - Título.


CDU: 631:577. 1

GISELA FORMIGA QUEIROZ NÓBREGA

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA ENVOLVIDA COM A PROTEÇÃO
OXIDATIVA DURANTE O ENVELHECIMENTO DE SEMENTES DE FEIJÃO
CAUPI CULTIVAR PÉROLA**

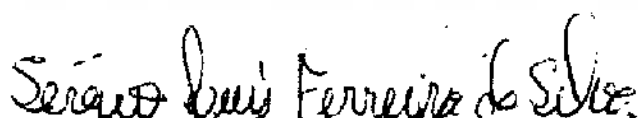
Aprovado em: 26 de outubro de 2012

BANCA EXAMINADORA



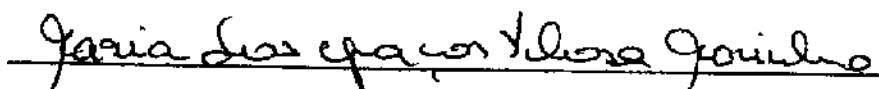
Prof. Dr. Carlos Eduardo Alves Soares - Orientador

Universidade Federal de Campina Grande



Prof. Dr. Sérgio Luiz Ferreira da Silva

Universidade Federal do Ceará



Prof.ª Dr.ª Maria das Graças Veloso Marinho

Universidade Federal de Campina Grande

A minha mãe e minha avó por todo amor e dedicação que tiveram a mim desde sempre. Ao meu pai por ser o meu exemplo de vida e de perseverança. Aos professores Carlos Eduardo, Joaquim Albenísio e Sérgio Luiz pela confiança e apoio. Aos meus amigos do Labplant que tanto me ajudaram na realização desse trabalho e a todos os amigos que sempre estiveram presentes e fizeram dessa jornada uma alegria incalculável.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela presença constante em minha vida, guiando-me e fazendo-me sempre forte e perseverante.

Ao professor Dr. Carlos Eduardo Alves Soares, por ser meu orientador e incentivador, agradece-lo também pela confiança e oportunidades oferecidas, pelo estímulo ao crescimento acadêmico. Agradece-lo pela experiência única de estagio que me concedeu.

Ao professor Dr. Joaquim Albenísio por ter me acolhido em seu laboratório, pela atenção e confiança. Por ter me proporcionado experiências únicas que me fizeram valorizar ainda mais meus estudos e despertar novos interesses.

Ao Dr. Sérgio Luiz por ter acreditado em mim, por ter me feito perseverar em momentos difíceis, por estar sempre disponível. Serei sempre grata pela acolhida.

Aos amigos que fiz durante o estagio no Labplant, Lara Mesquita, Ana Karla Moreira, Milton Lima, Marcio Martins, Josemir Moura, João Victor e Cristina que me ajudaram bastante a realizar a parte experimental do meu trabalho, não apenas com o conhecimento, mas com a amizade, a alegria de trabalhar junto, a paciência, a compreensão, a disponibilidade. Serei sempre grata a todos, vocês terão sempre um lugar no meu coração!

A minha mãe Maria Betânia e a minha avó Terezinha Maciel pelo carinho, pelos cuidados, pelo apoio em todas as minhas decisões. Pelo amor!

Ao meu pai Marcos Antônio por sempre me incentivar, sempre me cobrar, sempre desejar que eu seja uma pessoa melhor. Por torcer pelo meu sucesso e por ter acreditado em mim mesmo nos meus momentos de fraqueza. Por ser meu exemplo de personalidade.

A Renata Parente e Ana Maria Parente pelo apoio, acolhida e confiança. Pelo carinho, pela amizade, pela sinceridade. Por serem pessoas que Deus colocou na minha vida e estiveram sempre presente para somar, nunca para subtrair.

Aos meus afilhados Gabriel Parente e Hian Osmar por serem luz na minha vida, por me trazer tanta alegria!!!

A minha amiga Eliana por dividir comigo as aflições do dia-a-dia, por estar presente em momento de intensa alegria, por ser sempre presente!

Ao meu namorado Igor Alves que desde que estamos juntos sempre participou da minha vida, sempre se preocupando comigo, fazendo de tudo pra me ver bem. Agradeço por me fazer feliz!

“A seleção natural é o maior guindaste de todos os tempos. Ela elevou a vida da simplicidade primeva a altitudes estonteantes de complexidade, beleza e aparente desígnio que hoje nos deslumbram”.

(Richard Dawkins)

SUMARIO

Capítulo 1

Introdução	1
Caracterização da semente	3
Envelhecimento	4
Teoria do envelhecimento por radicais livres	5
Envelhecimento de sementes	6
Armazenamento de sementes	8
Princípios gerais do armazenamento de sementes	9
Fatores que influenciam a longevidade das sementes armazenadas	11
Avaliação de vigor de sementes	12
Espécies reativas do oxigênio	13
Estresse oxidativo	14
Produção de EROS em sementes	15
Estresse sofrido por sementes	16
Proteção endógena em sementes	16
Antioxidantes	18
Catalase	18
SOD	19
Referencias bibliográficas	21
Capítulo 2.	29
Resumo	30
Abstract	31
Introdução	32
Materiais e métodos	34

Material vegetal	34
Atividades realizadas com sementes quiescentes	34
Determinação de teor de água em sementes de feijão caupi cv. Perola	35
Curva de embebição	35
Atividades realizadas com sementes tratadas com antioxidantes	36
Curva de sódio e potássio	36
Determinação de aminoácidos solúveis totais	37
Determinação de carboidratos solúveis totais	37
Teste de peroxidação lipídica	38
Determinação de proteínas solúveis	38
Preparação do material para liofilização e extração	38
Determinação de aminoácidos solúveis totais	39
Determinação de carboidratos solúveis totais	39
Teste de peroxidação lipídica	40
Proteínas solúveis pelo método Bradford;	40
Determinação de Peróxido de hidrogênio	41
Atividade da Catalase	41
Atividade da Superoxido desmutase	42
Teste de envelhecimento artificial acelerado	43
Resultados e Discussões	43
Conclusão	52
Referencias bibliográficas	55

LISTA DE FIGURAS

(Figura 1) Curva de embebição realizado com sementes quiescentes de feijão caupi cv. Pérola.	44
(Figura 2) Sementes de feijão caupi cv. Pérola antes (T = 0) e depois (T = 5 h) do tempo de embebição.	44
(Figura 3) Curva de embebição em sementes quiescente.	45
(Figura 4) Curva de vazamento de eletrólitos em sementes quiescentes (T=5h)	45
(Figura 5) Gráfico do vazamento de eletrólitos realizado na presença de água deionizada, ASC, BHA e Manitol.	46
(Figura 6) Curva de sódio apresentada no vazado do teste de condutividade realizado com água deionizada, ASC, BHA e Manitol.	47
(Figura 7) Curva de potássio apresentada no vazado do teste de condutividade realizado com água deionizada, ASC, BHA e Manitol.	47
(Figura 8) Quantificação de proteínas solúveis realizada com o líquido do vazamento de eletrólitos.	48
(Figura 9) Quantificação de carboidratos solúveis realizada com o líquido do vazamento de eletrólitos.	48
(Figura 10) Atividade da SOD representação das diferenças de atuação na presença dos 4 tratamentos.	49
(Figura 11) Atividade da CAT representação das diferenças de atuação na presença dos 4 tratamentos.	50
(Figura 12) Quantificação de peróxido em massa seca de semente	50
(Figura 13) Câmara de envelhecimento artificial acelerado ELO'S , 220V em uso, durante o tratamento de envelhecimento de sementes de feijão caupi.	52
(Figura 14) Sementes após o tratamento de envelhecimento artificial.	52
(Figura 15) Comparativo das medições de vazamento de eletrólitos realizado em sementes antes e depois do teste de envelhecimento artificial com sementes tratadas com água deionizada, ascorbado, BHA e manitol.	53

RESUMO

De acordo com estudos anteriores feitos por Aragão (2007), as enzimas catalase e ascorbato peroxidase estão intimamente relacionadas com o equilíbrio endógeno da produção de espécies reativas do oxigênio (EROS) em sementes de feijão-de-corda, as EROS que são produtos resultantes do metabolismo celular, quando produzidas em excesso e acumuladas no interior da célula são consideradas como a principal causa do envelhecimento do organismo. Esse trabalho foi desenvolvido no intuito de verificar a atuação da proteção oxidativa por meio de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos durante o processo de envelhecimento de sementes de feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Foram analisados os seguintes parâmetros para as sementes quiescentes, tratadas com antioxidante e inibidor osmótico: quantificação de matéria orgânica e inorgânica, peroxidação do tecido e atividade enzimática. Já as sementes envelhecidas artificialmente foram avaliadas pelos seguintes testes de vigor: vazamento de eletrólitos e teste de germinação. As variáveis analisadas foram selecionadas para tentar explicar que prováveis mecanismos bioquímicos estão envolvidos na perda do vigor de sementes durante longos períodos de armazenamento.

Palavras chave: Proteção enzimática, viabilidade, armazenamento, feijão caupi.

INTRODUÇÃO

O armazenamento de sementes por período prolongado induz a sua deterioração, o desgaste sofrido pela mesma varia entre as espécies de plantas e da forma as quais foram armazenadas. Sementes ortodoxas a exemplo do feijão caupi são tolerantes a dessecação e devem ser armazenadas no estado seco (Kranner, 2006). As sementes apresentam-se como um bom modelo de estudo para testes de envelhecimento por possibilitar estimativas a cerca da perda de vigor em um pequeno intervalo de tempo, contribuindo para o esclarecimento a respeito das intrínsecas relações entre deterioração da semente e a produção de espécies reativas do oxigênio. (Aragão, 2007)

Alto teor de umidade e temperatura elevada aceleram o processo de envelhecimento e em consequência levam a semente a perda do vigor e possivelmente a morte celular programada. Esta teoria basea-se principalmente na "teoria dos radicais livres" proposta por Harman, afirmando que o acúmulo de danos causados por radicais livres é o mecanismo responsável pelo envelhecimento de todos os seres vivos.(Kibinza, 2011) .

O uso de teste de vigor para a avaliação de qualidade da semente é considerado de extrema importância principalmente para as empresas produtoras de sementes pela necessidade de reduzir a comercialização de sementes de baixa qualidade ou de pouca produtividade para a agricultura. Com a capacidade de identificar o nível de deterioração da semente, os teste de vigor a exemplo do teste de envelhecimento artificial tem sido usado para o controle de qualidade principalmente de sementes ortodoxas que mantem um maior padrão de qualidade quando são armazenadas em ambiente de baixa temperatura e pouca umidade como é o caso do feijão caupi.

No Nordeste brasileiro, o cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma atividade de grande importância para o desenvolvimento agrícola da região, o que é verificado tanto na parte econômica quanto nutricional. Por isso, a leguminosa é considerada um componente básico da alimentação das populações mais pobres, exercendo função social no suprimento das necessidades energéticas dessas populações (TEÓFILO et al., 2008).

Devido a necessidade de comercialização de sementes de qualidade pelas empresas produtoras de semente tem-se estimulado cada vez mais o desenvolvimento e aprimoramento de novos testes de vigor que possam avaliar as condições fisiológicas das sementes. Além do teste de envelhecimento artificial e do teste de germinação, a condutividade elétrica é considerada um ótimo teste de vigor para avaliar alterações nos processos bioquímicos, como a mensuração da integridade das membranas celulares (Ferguson, 1995).

A utilização de sementes como modelo pra estudo do envelhecimento especialmente por possibilitar a avaliação da perda da viabilidade em pouco tempo, pode ser uma excelente ferramenta no estudo do esclarecimento das intrínsecas relações entre deterioração e espécies reativas do oxigênio (Aragão, 2007)

Um grande número de contribuições atualizadas nesse campo tem demonstrado a relação das espécies reativas do oxigênio (EROS) com principal responsável perda do vigor e viabilidade durante o armazenamento prolongado de sementes ortodoxas. Interessantemente, a peroxidação lipídica induzida por esses componentes tem sido vastamente citada como sendo a maior cauda do envelhecimento de sementes (Prientley, 1986; McDonald, 1999). Segundo Bowler et al. 1992 e McDonald, 1999, mecanismos enzimáticos antioxidativos (catalase, ascorbato peroxidase, e superóxido desmutase), estão envolvidos com a viabilidade de sementes.

Além disso, protetores antioxidativos não-enzimáticos como o ácido ascórbico tem sido usado em pré-tratamento para proteção e revigoração de sementes, aumentando sua capacidade de germinação quando submetido ao envelhecimento natural e acelerado (Chhrtri et al., 1993, Powell et al.,2000)

Mediante todas as observações feitas pelos trabalhos citados anteriormente, ver-se a necessidade de encontrar alternativas eficientes contra o envelhecimento dos organismos que possa contribuir para a proteção endógena existente. Dessa forma o presente trabalho busca avaliar a atuação de antioxidantes não enzimático que desempenham proteção em sementes de caupi contra o envelhecimento e conseqüentemente a perda de vigor.

CARACTERIZAÇÃO DA SEMENTE

O feijão-caupi é uma dicotiledônea que pertence a família Fabace, subfamília Faboideae, gênero *Vigna*, espécie *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (ALMEIDA et al.,2005a). Possui porte herbáceo, podendo ser trepadora ou não. Sua denominação pode variar de acordo com a região: feijão-de-corda, feijão pardo, feijão de vara, feijão de vaca, caupi, feijão baiano e feijão-fradinho (ALMEIDA et al.,2005a).

Apresenta facilidade de adaptação as mais variadas condições ambientais, o que permite sua exploração sob uma diversidade de sistemas de cultivo, especialmente na região Nordeste do Brasil, onde o plantio é feito com maior frequência (SOUZA, 2005).

Apesar de constituir uma cultura com ampla adaptação a vários ambientes, não suporta excesso nem escassez de água, pois a alta precipitação causa o apodrecimento das sementes em processo de germinação e facilita o aparecimento de doenças durante o desenvolvimento vegetativo das plantas. Com relação aos períodos de seca, pode

prejudicar a fase de florescimento e preenchimento dos grãos, o déficit hídrico provoca redução significativa no número de vagens por planta, comprimento das vagens, número de grãos por vagens, e diante disso, uma conseqüente redução na produtividade dos grãos, já que a planta nessas condições produz vagens com amadurecimento precoce (LINHARES, 2007).

Em relação ao aspecto nutricional, o feijão-caupi é uma excelente fonte de proteínas (23-25% em média), apresentando todos os aminoácidos essenciais, carboidratos (62% em média), vitaminas e minerais, além de possuir grande quantidade de fibras dietéticas, baixa quantidade de gordura (teor de óleo de 2% em média) e não contém colesterol (FUSCALDI e PRADO, 2005).

No Brasil, especificamente na região Nordeste, o cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma atividade de grande importância para o desenvolvimento agrícola da região, o que é verificado tanto na parte econômica quanto nutricional. Por isso, a leguminosa é considerada um componente básico da alimentação da população (TEÓFILO et al., 2008).

ENVELHECIMENTO

Segundo August Weismann(1882) a Teoria do Desgaste é uma das primeiras a explicar o processo de envelhecimento, o desgaste dos tecidos decorrente das inúmeras mortes celulares acaba por não conseguir mais a regeneração. De acordo com alguns estudos o desgastes acontece a nível molecular. Moléculas importantes como o DNA ficariam sujeitas a danos ao longo do tempo como também organelas a exemplo das mitocôndrias.

Outra teoria que tenta explicar as causas do envelhecimento é a Teoria do acúmulo de resíduos que sugere que o acúmulo de resíduos e toxinas no interior das células, sendo estes produtos do próprio metabolismo, prejudicam a função celular normal levando a morte celular (Cruz & Schwanke 2001).

A Teoria dos radicais livres é uma das que apresentam-se em maior destaque devido as evidencias de sua atuação no processo de envelhecimento. Tendo como base a utilização de oxigênio pelos animais aeróbicos em sua produção de energia. Atividade realizada pela mitocôndria recebe o nome de respiração celular. Em media 2% do oxigênio captado pela célula não é utilizado no processo de respiração, participando assim da formação de moléculas denominadas Espécies Reativas do Oxigênio (EROS), tais moléculas são altamente reativas ligando-se as membranas celulares e no DNA causando danos terríveis(Cruz & Schwanke 2001).

A principal característica do envelhecimento ocorrido nos organismos vivos é a perda progressiva da capacidade de respostas em adaptação ao estresse oferecidos pelo meio ao passar do tempo. Os gerontologistas apresentam uma concepção para esse intrincado fenômeno, definindo-o como um processo adaptativo, sendo causado por inúmeros fatores modulados pela interação dos genes e das ações ambientais sobre os mesmos(Yu & Chung, 2006).

TEORIA DO ENVELHECIMENTO POR RADICAIS LIVRES

Segundo Denham Harman(1956) os radicais livres produzidos durante a respiração aeróbia causam prejuízo denominados de danos oxidativos que se acumulam, resultando no envelhecimento e morte celular, conseqüentemente levando a morte do organismo. Com o avanço dos estudos e as descobertas em relação as proteções antioxidantes por

meio da própria célula, a teoria do envelhecimento por radicais livres ganhou credibilidade diante de varias outras teorias que tentam explicar esse fenômeno.

A teoria dos radicais livres aponta a mitocôndria como a principal fonte geradora de oxidantes endógenos. Em relação a esse fato, estudos gerontológicos observaram que espécies com alto metabolismo apresentam um curto potencial de tempo de vida. ("Maximum Life Span Potencial" – MLSP).

De acordo com a teoria do envelhecimento o estresse oxidativo produzidas pela respiração contribuem para o envelhecimento de todos os organismos vivos, o envelhecimento efetivamente leva ao acúmulo de espécies reativas do oxigênio no citoplasma de células, produzido pelas mitocôndrias durante a respiração ativa. Para compreender como essas substâncias atuam é necessario conhecer o metabolismo do organismo e identificar os danos causados pelo acumulo de tais. Faz-se nesseçario também conhecer a atividade de proteção endogena desenvolvida pela célula durante seu envolvimento no reparo dos danos causados pelas EROS (Kibinza, et al., 2011).

ENVELHECIMENTO DE SEMENTES

O processo de envelhecimento acarreta à deterioração da semente, que em sua grande maioria expressa-se com a perda da viabilidade da mesma para o plantio. Sementes ortodoxas armazenadas por longos periodos apresentam alto nivel de deterioração, em última instância, à perda de sua capacidade germinativa. A taxa de degates da semente apresenta variações entre espécies de plantas e lotes de sementes.

Segundo a "teoria dos radicais livres" proposta por Harman, o envelhecimento ocorre devido a acumulação de danos causados por radicais livres, sendo assim o mecanismo responsavel por causar morte celular e consequentemente do organismo.

Numerosos estudos relatam a importância dos radicais livres no envelhecimento de plantas e animais e a importância que as espécies reativas de oxigênio (EROS) tem no envelhecimento de sementes. Entre estas EROS, H₂O₂ desenvolve uma atividade preocupante por causar a desintegração das membranas celulares porém, comparado a alguns outros é facilmente convertido em pela ação de enzimas(Kibinza, 2011).

O alto teor de umidade e temperatura elevada são fatores que contribuem para a aceleração deste processo. A presença de água induz o processo germinativo da semente, iniciando assim a utilização de oxigênio em seu metabolismo. Segundo Borghetti & Ferreira (2004) a temperatura é o fator que intensifica a velocidade de absorção de água afetando assim a velocidade de germinação, as reações bioquímicas e todo o processo germinativo.

A deterioração da semente pode gerar danos equivalentes a:

- Mudanças na atividade respiratória das sementes;
- Lesão da integridade do sistema de membranas;
- Peroxidação de lipídios;
- Lixiviação de solutos;
- Modificações em atividades enzimáticas e síntese de proteínas;
- Redução do crescimento e vigor das plântulas;
- Aumento do número de plântulas anormais;
- Aumento da suscetibilidade a ataques de microrganismos patogênicos;
- Completa perda da capacidade germinativa;
- Morte das sementes.

ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

O conhecimento das condições ideais para a germinação da semente de uma determinada espécie é de fundamental importância, principalmente, pelas respostas diferenciadas que ela pode apresentar em função de diversos fatores, como viabilidade, dormência, condições de ambiente, envolvendo água, luz, temperatura, oxigênio e ausência de agentes patogênicos, associados ao tipo de substrato para sua germinação (Carvalho e Nakagawa, 2000).

De acordo com Marcos Filho (2005), para a melhor conservação das sementes ortodoxas, como as de mamona, o ambiente com umidade relativa e temperatura mais baixa tem se mostrado adequado, já que essas condições permitem manutenção de baixo nível de atividade de reações químicas e preservação do poder germinativo e do vigor das sementes (S. FANAN et al. 2009)

Durante o armazenamento, a presença de água superior a 13% interfere diretamente na longevidade da semente, provocando danos por mudança no metabolismo celular, induzindo o aumento da atividade enzimática e respiratória das sementes, facilitando o aparecimento de fungos favorecidos pela alta temperatura (Vieira & Yokoyama, 2000). O aumento do teor de água em sementes compromete suas condições fisiológicas, já que induz a atividade metabólica do embrião (Macedo et al., 1999).

Dentre os fatores do ambiente que afetam o processo germinativo das sementes, a temperatura exerce acentuada influência. As sementes de diferentes espécies apresentam faixas distintas de temperatura para a germinação. As altas temperaturas apresentam-se como um fator que contribui para deterioração da semente, juntamente com a alta umidade por causar a desorganização das membranas celulares, reduzindo o

vigor da semente, o que pode ser verificado pelo aumento da quantidade de lixiviados durante o processo de embebição das sementes (Marcos Filho et al.,1990;Lin, Salinas et al., 1998).

Em pequenas propriedades produtoras de sementes, o armazenamento das mesmas é feito em garrafas de vidro, em recipientes com camadas de areia fina, latas de flandres e tambores de zinco. Nas médias e grandes propriedades, o armazenamento é feito principalmente em tambores de zinco e silos metálicos(Santos et al., 2003). As técnicas atuais disponíveis para melhorar a conservação, baseiam-se em controlar as condições do ambiente com o uso de refrigerados e atmosferas modificadas com a presença de gases, atuando na redução do metabólico e na respiração dos grãos (Brasil , 1992).

PRINCÍPIOS GERAIS DO ARMAZENAMENTO DE SEMENTES

Estudos sobre sementes relatam que a longevidade das sementes está relacionada a uma variedade fatores, entre os quais estão:

- O desgaste do DNA embrionário – ocasionando aberrações cromossômicas que impedem a germinação (Kramer e Kozlowski, 1972; Fontes et al., 2001),
- A presença de alta umidade – a baixa umidade mantem a semente em baixo metabolismo evitando a produção de agentes deterioradores (Kramer e Kozlowski,1972);
- Alta temperatura – quanto menos a temperatura, menor a atividade fisiológica das sementes e dos agentes deterioradores (Kramer e Kozlowski, 1972);
- Baixa quantidade de reserva de nutrinetes– sementes com pouca reserva de nutriente apresentam menor período de viabilidade (Kageyama & Marquez, 1981);

· Presença de luminosidade –favorece a oxidação facilitando sua deterioração (Kramer e Kozlowski, 1972; Cabral et al., 2003);

· Tempo de armazenamento – os componentes químicos são instáveis, sofrendo transformações com o passar do tempo causando a deterioração da semente (Cabral et al., 2003).

Como decorrência do período de estocagem, pode ocorrer:

Decaimento da velocidade de desenvolvimento das plântulas,

Aumento de transporte de substâncias através da membrana citoplasmática;

Perda da atividade realizada por algumas enzimas,

Maior susceptibilidade a estresses,

Aumento da atividade respiratória;

Perda de reservas alimentícias (UFSM, 2004).

Após a colheita as sementes precisam ser armazenadas em condições adequadas, a fim de minimizar o processo de deterioração. Apesar de não poder ser impedido, o desgaste sofrido pela semente pode ser controlado. As boas condições de armazenamento não iram melhora a qualidade das sementes, apenas mantê-la ou reduzir impacto sofrido pelas mesmas (EMBRAPA-CPAF Rondônia, 2001).

O armazenamento tem por objetivo conservar as sementes, preservando suas qualidades físicas, fisiológicas e sanitárias, para posterior semeadura e obtenção de plantas saudáveis após a germinação (UFSM, 2004). Toda e qualquer semente armazenada sofre deterioração que pode ser mais rápida ou mais lenta, dependendo das características ambientais e das características das próprias sementes. Geralmente a redução da luminosidade, da temperatura e da umidade de ambos, sementes e ambiente,

faz com que seu metabolismo seja reduzido e que os microorganismos que as deterioram fiquem fora de ação, aumentando sua longevidade. (Vieira et al., 2004).

Para a estocagem de sementes ortodoxas as técnicas de armazenamento que apresentam melhores resultados são baseadas na utilização de câmara fria, a câmara seca e a câmara fria seca(Vieira et al., 2002). Tais sementes apresentam tolerância a dessecação, sua longevidade aumenta com a diminuição do teor de umidade e da temperatura de modo controlado (Hong e Ellis, 2003).

Entre os fatores que causam a perda da viabilidade das sementes citados anteriormente, a umidade e a temperatura apresentam-se em posição de destaque, entre essas a umidade ainda é tido como mais importante que a temperatura. Sementes ortodoxas devem ser estocadas com menos de 10% de teor de umidade para que seja mantendo ou aumentando a longevidade.

FATORES QUE INFLUENCIAM A LONGEVIDADE DAS SEMENTES ARMAZENADAS

Os fatores citados abaixo são fundamentais para o mantimento da qualidade da semente desde a colheita até o momento do plantio.

1. Qualidade inicial das sementes;
2. Teor de umidade da semente
3. Temperatura de armazenamento;
4. Umidade relativa de armazenamento
5. Tempo gasto entre colheita e o armazenamento;
6. Tratamentos de higienização;
7. Forma e tipo de embalagem;

AVALIAÇÃO DE VIGOR DE SEMENTES

A utilização de testes de vigor tem se tornado ferramentas cada dia mais presentes na rotina das indústrias produtoras de sementes, visando aumentar a qualidade do seu produto, na busca pela comercialização de sementes de alta qualidade e potencial fisiológico. Os objetivos dos testes de vigor são: avaliar ou identificar características que possam diferenciar a qualidade dos lotes com germinação semelhante, complementar as informações fornecidas pelo teste de germinação; distinguir lotes de altos dos de baixo nível de vigor, resistência ao transporte e capacidade de armazenamento. Por isso a importância da utilização de testes que procuram aferir a qualidade das sementes e o seu estado atual, observando parâmetros associados ao vigor (Binotte et al, 2008).

Para identificar modificações nos processos bioquímicos, como o nível de integridade das membranas celulares o teste de condutividade elétrica é considerada uma ótima avaliação de vigor (Ferguson, 1995). O teste de condutividade elétrica é um método preciso que identifica e avalia as condições fisiológicas da semente. O valor mensurado no teste de condutividade elétrica da solução de embebição da semente é o resultado da quantidade de lixiviados liberado pelas células durante o teste, a qual está diretamente relacionada com a integridade das membranas celulares.

Quanto mais alto o valor da condutividade elétrica, menor será a qualidade e o vigor das sementes, pois a maior quantidade de lixiviados representa a perda de constituintes celulares, revelando a menor capacidade de reparação aos danos causados à semente (Salvador,2002).

O potencial de armazenamento de sementes pode ser avaliado também com o uso do teste de envelhecimento acelerado. Este teste se baseia no fato de que a

degradação das sementes é aumentada quando as mesmas são expostas a condições adversas de temperatura e umidade, que são os fatores ambientais mais relacionados à deterioração das sementes (Binotte et al, 2008).

ESPÉCIES REATIVAS DO OXIGÊNIO (EROS)

A atividade respiratória é o processo pelo qual as células obtêm energia, devido a respiração ocorre um encadeamento de reações capazes de gerar eletronegatividade, onde o oxigênio é o acceptor final de elétrons. Essa sequência de reações oxidativas resulta na formação de compostos como o ânion superóxido, o radical hidroperoxila, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila que, de forma conjunta, são denominados espécies reativas de oxigênio (EROS), (Barreiros, et al, 2006).

O termo radical livre é utilizado quando um átomo ou uma molécula apresentam elétrons não pareados, sendo dessa forma uma espécie instável, com a capacidade de reagir rapidamente com outras substâncias (Catania, et al. 2009).

Hoje sabes que os radicais livres atuam no envelhecimento das inúmeras espécies de plantas e animais e a importância que as espécies reativas de oxigênio (EROS) tem no processo de desgaste celular que acarretam o envelhecimento de sementes. Entre outras, a peroxidação lipídica cauda por esses elementos tem sido amplamente citada como principal causa do envelhecimento de sementes (Prientley, 1986; McDonald, 1999).

O acúmulo de EROS inicia reações com ácidos graxos poliinsaturados, causando a destruição das membranas celulares por meio da peroxidação lipídica (Senaratna et al, 1988; Pukacka,1991). Entre as EROS, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é considerado o grande responsável pelo desgaste celular, pois apresenta-se estável em

pH biológico, atravessa com facilidade as membranas e acarreta danos graves a célula, podendo gerar estresse oxidativo que é conceituado como o desequilíbrio entre produção de ROS e de defesa antioxidante endógena (Kibinza, et al., 2011).

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma molécula sinalizadora que desempenha um papel importante, relacionada com o desenvolvimento da planta e respostas ambientais. Alterações na disponibilidade de H_2O_2 são resultantes das variações de metabolismo (Mhandi, et al 2010).

Durante todo o desenvolvimento da semente ocorre a produção de espécies reativas do oxigênio, no período de embriogênese até a germinação, incluindo o período de armazenamento. As EROS exercem um duplo papel nos processos fisiológicos das sementes, atuando como sinalizadores celulares e como toxina que acumulam-se no interior das células quando expostas a condições de estresse. Desde que a produção de ROS seja esteja em equilíbrio com a sua eliminação, essas apresentam-se benéficas para germinação, desenvolvendo sua atividade de sinalização, finalizando o período de dormência da semente.

Porém, o acúmulo de EROS em condições não controladas geram danos oxidativos que conseqüentemente levam a morte celular (Bailly, et al, 2008).

ESTRESSE OXIDATIVO

A cada dia cresce o interesse no estudo de antioxidantes devido a descoberta da atuação dos radicais livres sobre os organismos vivos. A oxidação é fator básico da vida em organismos aeróbico, dessa forma a produção de radicais livres é um acontecimento natural, causado por alguma disfunção biológica. No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular,

sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Porém o excesso dessas substâncias proporcionam efeitos prejudiciais, entre os quais estão a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (Barreiros, et al. 2006).

PRODUÇÃO DE EROS EM SEMENTES

Trabalhos relatam a importância de conhecer o envolvimento das espécies reativas do oxigênio nas atividades fisiológicas de sementes, essa análise possibilita a observação de variações do conteúdo de EROS durante todas as etapas de vida principalmente quando relacionado ao teor de peróxido de hidrogênio. O conteúdo de H_2O_2 é bastante elevado principalmente durante o início do desenvolvimento, possivelmente deve estar associado a presença de umidade elevada que possibilita altas taxas de atividades metabólicas.

Por outro lado a capacidade germinativa da semente está relacionada com o alto teor de H_2O_2 acumulado, sendo possível identificar o alto nível dessa molécula em sementes embebidas, momento em que o equilíbrio entre a produção e a eliminação é perdido e a produção torna-se acumulativa levando a semente a germinação.

O acúmulo de peróxido de hidrogênio também ocorre com frequência durante o período de armazenamento, principalmente quando extenso, esse acúmulo gera o desgaste das membranas, como consequência o envelhecimento das sementes, levando a perda da viabilidade. Sendo assim o peróxido de hidrogênio pode ser vista como uma molécula benéfica quando associada a quebra da dormência em algumas sementes ou prejudicial quando associada ao envelhecimento das mesmas (Bailly et al, 2008).

ESTRESSE SOFRIDO POR SEMENTES

A maioria dos estresse geram impactos sobre as sementes, na grande maioria das vezes tais fatores afetam a reprodução das plantas e conseqüentemente a produtividade das mesmas, interferindo negativamente na agricultura e biodiversidade (Karnner, et al. 2010).

Proteção, reparação, aclimatação e adaptação são tidos como fatores de construção de “resposta” ou “resistência” aos estresses impactantes sobre as sementes, estes são a base para longevidade das mesmas. Quando a semente não consegue desenvolver uma resposta a tal estresse, dependendo do tempo em que ela foi exposta, é inevitável o auto índice de morte celular e conseqüentemente a morte das sementes, resultado da exaustão correspondente ao desgaste causado pela exposição ao estresse (Karnner, et al. 2010).

A própria atividade metabólica da semente gera efeito estressante sobre as sementes, o processo de respiração produz estresse oxidativo, pela acumulação de EROS no interior das células, contribuem para o envelhecimento de todos os organismos vivos. Por tanto é indispensável compreender a atuação das enzimas que participam do metabolismo de sementes em respostas ao estresse. Essas enzimas agem durante o processo de envelhecimento e estão diretamente envolvidas no reparo durante o condicionamento em sementes (Kibinza, et al., 2011).

PROTEÇÃO ENDÓGENA EM SEMENTES

As próprias células apresentam um sistema de defesa contra a atuação dos radicais livres. Essa proteção é desempenhada pela atividade de um conjunto de

enzimas denominadas “enzimas anti-oxidantes” que são sintetizadas pela própria célula, a partir de genes presentes no DNA do organismo. A atividades dessas enzimas impedem ou tentam impedir a ação dos radicais livres.

Contribuindo com a ação dessas enzimas, os organismo recebem ajuda de substâncias encontradas em alimentos de origem vegetal, como frutas e legumes que recebem o no compostos anti-oxidantes, entre estes destacam-se as vitaminas C e E.

A idéia de que os radicais livres conduziram ao processo do envelhecimento, baseia-se em evidências que mostram que os radicais livres produzem: pigmentos celulares, ligações cruzadas e danos no DNA com o passar da idade(Cruz & Schwanke, 2001).

Essa atividade de prevenção de danos oxidativos, realizada pela própria células pela produção de enzimas catalisadoras e juntamente com o auxilio dos mecanismos não enzimáticos proporcional a desintoxicação celular. Entre as enzimas que participam desse mecanismo de proteção temos a catalase que atua decompondo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultando na produção de oxigênio e a água.

Para compreender a proteção endógena contra os danos oxidativo é necessário investigar a importância e a regulação dessas enzimas desintoxicadoras como é o caso da catalase. Recentes estudos realizados com aminotriazol um inibidor de CAT apontam que a mesma desempenha um papel-chave no sistemas de reparação durante o envelhecimento, que está associado ao acúmulo de H_2O_2 , mostrado em quantificação bioquímica (Kibinza, et al., 2011).

As colaboração destas enzimas e atuação de antioxidantes de baixo peso molecular entre os quais encontramos o ácido ascórbico, podem contribuir para o aumento a resistência ao processo de oxidação, minimizando os danos celulares ocasionados pelo estresse decorrente do acúmulos de EROS (Pukacka, 2006).

A atividade protetora proporcionada pela presença das enzimas e dos antioxidantes de baixo peso molecular, são respostas que garante uma maior resistência ao organismo, aumentando a longividade e contribuindo para eliminação de EROS que causam o envelhecimento, em semente ajudam a manter a sua viabilidade (Karnner, et al. 2010)

ANTIOXIDANTES

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. De acordo com Halliwell³ "Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a oxidação do mesmo". Os antioxidantes produzidos pelo corpo agem enzimaticamente, a exemplo da GPx, CAT e SOD2(Barreiros, et al. 2006)

CATALASE

Entre as enzimas antioxidantes conhecida atualmente a catalase foi a primeira a ser descoberto e caracterizada. Observações feitas por Loew (1900) lhe permitiu afirmar que "parece não existir nenhuma planta e nenhum animal que não possua aquela enzima "(Kirkman e Gaetani, 2007). Mesmo organismos que não utilizam oxigênio no seu processo de obtenção de energia possuem catalase. Esta tem como reação a dismutação de duas moléculas de H₂O₂ em água e O₂(Zamocky et al., 2008).

Para a compreensão do mecanismo de proteção endógena contra os danos oxidativo é preciso conhecer a importância e a regulação desempenhada por essas

essas enzimas desintoxicadoras como é o caso da catalase. Estudo utilizando aminotriazol uma substância inibidora da CAT, mostra que essa enzima desempenha um papel crucial no sistema de reparo durante o envelhecimento, que está associado ao acúmulo de H_2O_2 , mostrado em quantificação bioquímica (Kibinza, et al., 2011).

SUPEROXIDO DESMUTASE

Em 1969 a teoria do envelhecimento por radicais livres ganhou credibilidade com a descoberta da enzima superóxido dismutase (SOD). O uso da SOD como uma ferramenta para localizar sítios subcelulares da geração de $O_2\cdot^-$, levou ao fortalecimento da teoria do radical livre, isto é, que a principal fonte de oxidantes endógenos são os cloroplastos e peroxissomos. Em relação a esse fato, gerontologistas têm observado ao longo do tempo que espécies com alto metabolismo têm um curto potencial de tempo de vida. (“Maximum Life Span Potencial” – MLSP).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, E.R., et al. Qualidade dos grãos de soja armazenados em diferentes condições. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.** vol.13 no.5. 2009.

ALMEIDA, C. A.F. et al. Efeitos de extratos alcoólicos de plantas sobre o caruncho do feijão *Vigna (Callosobruchus maculatus)*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental.** Campina Grande, v.9, n.4, out-dez, 2005a.

ARAGÃO, T.C.F.R. Danos oxidativos e envelhecimento de sementes de feijão Caupi. **Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.** Universidade Federal do Ceará, Tese de Doutorado. 2007.

ARRUDA, S.C. et al. Banco de sementes de plantas espontâneas na cultura do feijão-caupi no sistema de capoeira triturada. **Cadernos de Agroecologia** – ISSN 2236-7934 – Vol 6, No. 2, 2011.

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 Biologies**, 2008.

BARREIROS et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006

BARREIROS, A. L. B. S. ; DAVID, J. M. ; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006.

BORGHETTI, F.; FERREIRA, A.G. Germinação: do básico ao aplicado. **Artmad**, 2004.

BULTEAU, A. L. et al. Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. **Experimental gerontology**. v. 41, p. 653-657, 2006.

CABRAL, E. L.; BARBOSA, D. C. A.; SIMABUKURO, E. A., Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (Manso) Benth. & Hook. f. ex. S. Moore. **Acta botanica**, v.17(4), p. 609-617. 2003.

CATANIA, A. S. ; BARROS, C. R. ; FERREIRA, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, vol.53 no. 5, 2009

CATUNDA, P.H.A. et al. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 25, nº 1, p.65-71, 2003.

CHHETRI, D. R.; RAI, A. S.; BHATTACHARJEE, A. Chemical manipulation of seed longevity of four crop species in a unfavourable storage environment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 14, n. 2, p. 269-300, 1993.

CHRISTINA 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.

CRUZ, I. B. M.; SCHWANKE, C.H.A. ; Reflexões sobre biogerontologia como uma ciência generalista, integrativa e interativa. **Estud. interdiscip. Envelhec.**, v.3, p.7-36, 2001.

DELOUCHE, J., Germinação, deterioração e vigor da semente. *Seed News*, n. 6, p. 24-31, 2002. Disponível: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/feijao/feijao-caupi>. Acesso em: 20 agosto.2012.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, et al., DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 5003–5011, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMPRAPA – Meio-Norte.Cultivo de feijão-caupi. Sistema de produção 2. Versão eletrônica, 2003.

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, nº 1, p. 150-159, 2009

FONTES, B. P. D.; DAVIDE, L. C. ; DAVIDE, A. C., Fisiologia e citogenética desementes envelhecidas de Araucaria angustifolia. **Ciências agrotecnicas**, Lavras, v.25, n.2,p.346-355, mar./abr., 2001.

FUSCALDI, C. K; PRADO, R. G. Análise Econômica da Cultura do Feijão. **Revista de Política Agrícola**. Ano XVI, n. 1, 2005.

GOEL, A.; AJAY GOEL,K.; SHEORAN,I. Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. **J. Plant Physiol.** v.160, p. 1093–1100, 2003.

HOLDSWORTH, et al. Post-genomics dissection of seed dormancy and germination. **Plant Science** .v.13, 2008.

KIBINZA,S., et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v.181, p.309–315, 2011.

KISSMANN, C. et al. Germinação e armazenamento de sementes de *Albizia hasslerii* (Chod.) Burkart. **Rev. bras. Sementes**, vol.31 no.2, 2009.

KRANNER, I., et al. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? **Free radical biology & medicine**, v.,p., 2006.

KRANNER, I., et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science, **New Phytologist**, 2010.

LIMA, J.P.M.S., Sincronia entre catalase e peroxidase do ascorbato na proteção contra danos oxidativos em folhas de feijão caupi expostas aos estresses hídrico e salinico. **Universidade Federal do Ceará**. Tese de Doutorado. 2007.

LIN, S. S. Alterações na lixiviação eletrolítica, germinação e vigor de sementes de feijão envelhecidas sob alta umidade relativa do ar e alta temperatura. *Revista brasileira de fisiologia vegetal*, v. 2, n. 2, p.1-6,1990.

LINHARES, F. C. L. Comportamento de três cultivares de caupi, submetidos à omissão de nutrientes, cultivados em amostras de gleissolo de várzea do rio Pará. Dissertação (Mestrado) **Universidade Federal Rural da Amazônia**, Belém PA, 2007

MACEDO, E. C.; GROTH, D.; SOAVE, J. Influencia da embalagem do armazenamento na qualidade fisiológica de sementes de arroz. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 21, n. 1, p. 65-67, 1999.

MARCOS FILHO, J.; SILVA, W. R.; NOVENBRE, A. D. C. Estudo comparativo de métodos para a avaliação de qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. *Pesquisa agropecuária*, 1990.

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

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

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 58, p. 459-481, 2007

ORACZ, K., et al. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. **Plant J.** 2007

PUKACKA, S. Changes in membrane lipid components and antioxidant levels during natural aging of seeds of *Acer platanoides*. **Physiology Plant**, v. 82, p. 306-310, 1991.

PUKACKA, S. RATAJCZAK, E. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. **Journal of Plant Physiology**, v.162,p. 873—885, 2005

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.

SANTOS, C.M. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Rev. Bras. Sem.**, Pelotas, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

SENARATNA, T.; GUSSE, J.F.; MC KERSIE, B.D. Age-induced changes in cellular membranes of imbibed soybean axes. **Physiology Plant**, v. 73, p.85-91, 1988.

SILVA, C.D., Condutividade elétrica e composição mineral da solução de embebição de sementes de feijão armazenadas em duas temperaturas. Universidade Estadual Paulista. **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, 2009.

SILVA, W.J. M.; FERRARI, C. K. B.; Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista . Brasileira. Geriatria. Gerontologia**. v.14(3), p.441-451, 2011.

SILVEIRA, T.L.D. Regras de armazenamento de sementes. Núcleo sementes. Departamento de Fitotecnologia. Centro de Ciências Rurais. **Universidade Federal de Santa Maria**, 1999.

TEÓFILO, M. E. et al. Potencial fisiológico de sementes de feijão caupi produzidas em duas regiões do Estado do Ceará. **Revista Ciência Agronômica**. Fortaleza- CE, v. 39, n.3, p. 443-448, jul-set, 2008.

TOMMASI, F. et al. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in gongko biloba. **Seeds Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p. 359-368, 2006.

VIEIRA, A. H. et al. Técnicas de produção de sementes florestais. Porto Velho: Embrapa,CT 205, p.1-4, 2001.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. Teste de vigor em sementes. FUNEP, v.,p. 164, 1994. UFSM. Armazenamento de sementes. 2004. Disponível em: <http://www.ufsm.br/sementes/> . Acesso em: 7/ago/2012.

WANG, L. et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics**. 2012.

YE. N., et al., Ascorbic acid and reactive oxygen species are involved in the inhibition of seed germination by abscisic acid in rice seeds. **Journal of Experimental Botany**, p.1-14, 2011.

**CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA ENVOLVIDOS COM A PROTEÇÃO
OXIDATIVA DURANTE O ENVELHECIMENTO DE SEMENTES DE CAUPI
CULTIVAR PÉROLA**

GISELA FORMIGA QUEIROZ NÓBREGA¹, CARLOS EDUARDO ALVES
SOARES¹, JOAQUIM ALBENÍSIO GOMES DA SILVEIRA², SERGIO LUIZ
FERREIRA DA SILVA².

1 Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), Unidade Acadêmica de Ciências
Biológicas, Curso de Ciências Biológicas (Licenciatura), Rodovia Patos/Teixeira,
Bairro Jatobá, CEP. 58704-330, Patos, Paraíba, Brasil (gisela_fqn@hotmail.com).

2 Universidade Federal do Ceará, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular,
Laboratório de Metabolismo do Estresse de Plantas, Av. Humberto Monte s/n,
UFC/Departamento de Bioquímica, Bloco 907, sala 1080, Bairro Pici, CEP 60455-970,
Fortaleza – Ceará.

RESUMO

A qualidade das sementes comercializadas é um dos fatores de maior importância para alcançar altas produtividades. A presente pesquisa visou avaliar os parâmetros fisiológicos envolvidos com a proteção oxidativa durante o envelhecimento de sementes de caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. Os parâmetros analisados foram: quantificação de matéria orgânica e inorgânica, peroxidação do tecido e atividade enzimática (CAT, SOD e APX). Após o envelhecimento artificial, as sementes foram avaliadas pelos seguintes testes de vigor: vazamento de eletrólitos e teste de germinação. As variáveis analisadas foram selecionadas para explicar que prováveis mecanismos bioquímicos estão envolvidos na perda do vigor de sementes durante longos períodos de armazenamento. Verificamos a atuação de enzimas na manutenção do equilíbrio endógeno e avaliamos o potencial antioxidante do ascorbato (ASC) e do Butil-hidroxi-anisol (BHA). Estudos anteriores relataram que as enzimas catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD) estão intimamente relacionadas com o equilíbrio endógeno da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) em sementes de caupi. As ROS que são produtos resultantes do metabolismo celular, quando produzidas em excesso e acumuladas no interior da célula, são consideradas a principal causa do envelhecimento do organismo.

Palavra chave: Armazenamento, estresse, germinação, vigor.

PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION MECHANISMS INVOLVED IN THE PROTECTION DURING OXIDATIVE DAMAGE OF COWPEA SEEDS.

ABSTRACT

The quality of commercial seed is one of the most important factors to achieve high yields. This study was conducted in order to examine the role of oxidative protection through enzymatic and non-enzymatic mechanisms during seed storage of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]. It was noticed that enzymes act on the equilibrium maintenance and we evaluated the potential antioxidant endogenous of ascorbate (ASC) and Butylated hydroxy-anisole (BHA). Previous studies reported that the enzymes catalase (CAT), ascorbate peroxidase (APX) and superoxide dismutase (SOD) are closely related to the balance of the endogenous production of reactive oxygen species (ROS) in cowpea seeds. ROS are products of the cell metabolism. When they have been overproduced and accumulated inside the cell they are considered the primary cause of aging of the organism. The parameters analyzed were: quantification of organic and inorganic matter, tissue peroxidation and enzymatic activity (CAT, SOD and APX). After artificial aging test, the seeds were evaluated by the following test force: electrolyte leakage and germination test. These variables were selected to explain the probable biochemical mechanisms involved in the loss of seed vigor during storage long periods.

Keyword: *Vigna unguiculata* L, seed storage, seed aging, oxidative stress.

1. INTRODUÇÃO

O feijão-caupi também conhecido como feijão-de-corda ou feijão-macassar (*Vigna unguiculata* L., Walp) é cultivado nas regiões Nordeste e Norte do Brasil destinadamente para a produção de grãos, já que o mesmo representa um dos principais componentes da alimentação humana nessas regiões (Embrapa,2003). Devido a grande demanda de grãos para o consumo e conseqüentemente para o cultivo, o feijão-caupi apresenta-se em posição de destaque socioeconômica.

Essa importância econômica que exerce o feijão caupi, sobretudo por representar a principal fonte de proteína vegetal presente na alimentação da população das regiões Norte e Nordeste despertou o interesse dos produtores sobre o conhecimento de suas variações e hoje já se encontra disponível inúmeras informações tecnológicas sobre o feijão-caupi. Programas de melhoramento genético desenvolveram várias cultivares comerciais, expandindo o mercado e aperfeiçoando as formas de uso do produto (Embrapa,2003).

Devido a grande relevância do cultivo dessas sementes se faz necessário o desenvolvimento de estudos não apenas para a ampliação de melhores técnicas de plantio, mas também para condicionar formas de armazenamentos que possam garantir a qualidade do produto, bem como conhecer mecanismos endógenos que possam contribuir com um maior prazo para comercialização de sementes (Embrapa,2003)

O acondicionamento de sementes por um determinado período de tempo pode induzir a sua deterioração de acordo com as condições oferecidas pelo armazenamento, o desgaste sofrido pela mesma varia entre as espécies de plantas e da forma **as quais** foram armazenadas. As sementes do tipo ortodoxas como é o caso do feijão-caupi são

melhores conservadas quando armazenadas em ambientes secos e de baixa temperatura (Kranner, 2006).

Hoje já se sabe que as espécies reativas do oxigênio são a principal causa do envelhecimento dos organismos anaeróbicos que as produzem naturalmente devido suas necessidades metabólicas. Espécies reativas de oxigênio (EROS) como o radical superóxido ($\cdot O_2^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil ($\cdot OH$) são constantemente geradas nos organismos vivos durante os processos fisiológicos e especialmente sob condições patológicas (HUANG et al., 2007). Porém produção excessiva das ROS pode desencadear prejuízos ao organismo, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (Barreiros, et al. 2006).

Para evitar os danos causados pelo acúmulo de ROS as células dispõe de alguns catalisadores enzimáticos e mecanismos não enzimáticos que possibilitam a desintoxicação (Huang et al., 2007). Entre as várias enzimas que desempenham essa função é possível citar a Catalase (CAT), a Superóxido Dismutase (SOD), a Peroxidase do ascorbato (APX), entre outras. A catalase, por exemplo, atua decompondo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em oxigênio e água. Para compreender a proteção endógena contra os danos oxidativo é necessário investigar a importância e a regulação dessas enzimas desintoxicadoras como é o caso da catalase (Kibinza, et al., 2011).

No trabalho de Oliveira, et al (2008) foram observadas as atividades enzimáticas em tempos variados de armazenamento de sementes. Foi observado que a elevada atividade da SOD aos 30 dias de armazenamento pode estar relacionada ao estresse do processamento e ao tempo que a polpa demorou em congelar, já a constância na atividade da SOD observada após os 60 dias pode ser explicada pela baixa temperatura de armazenamento permitindo um retardo do metabolismo oxidativo procedente do

estádio de maturação dos frutos de acerola, visto que no congelamento as reações metabólicas são reduzidas, porém não totalmente inibidas (Oliveira, et al., 2008)

Mediante as observações feitas nos diversos trabalhos anteriormente citados, esse trabalho foi desenvolvido no intuito de avaliar os danos causados pelas formas inadequadas de acondicionamento de sementes, identificar a quantidade e que tipo de matéria foi perdida pela semente de caupi durante o período de exposição a água e a atividade das enzimas e de mecanismos não enzimático que possam estar relacionados com a proteção ao estresse oxidativo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

As sementes de *Vigna unguiculata* utilizadas na realização do trabalho foram cedidas pelo Banco de Sementes e Germoplasma de Manejo da Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias pela pessoa da Profa. Dra. Elizita Maria Teófilo. Foram utilizadas sementes da safra 2011 armazenadas adequadamente em câmara de resfriamento (4 °C).

2.2 Atividades realizadas com sementes quiescentes

Para avaliação das sementes estudadas foram realizados testes com sementes quiescentes de controle de qualidade onde foram observados a integridade física e o aspecto morfológico das sementes. Foram ainda realizados testes de medição de condutividade elétrica e de germinação.

Para o teste de condutividade elétrica foram utilizadas 3 repetições contendo dez (10) sementes por recipiente imersas em 50 mL de água destilada deionizada. As medições foram realizadas a cada 5 minutos durante a primeira meia hora, e em seguida passaram a ser mensuradas a cada 15 minutos até o tempo de duas horas. As medições seguintes tiveram intervalos variados até a finalização do teste que teve como duração total 24h. Para realização dessa atividade foi usado o equipamento DM31 Digimed.

Para o teste de germinação foram utilizadas 60 sementes distribuídas em 3 repetições cada uma com 20 unidades, o plantio foi realizado em papel germitest . O papel foi umedecido com água destilada numa quantidade equivalente a 2,0 vezes o peso do papel, usando um borrifador de forma a uniformizar o teste. Os rolos foram envolvidos em sacos plásticos e foram colocados em germinador. O experimento foi conduzido em câmara de germinação com condições ambientais controladas (25° e 12 horas de exposição a luz por dia) e foi observada durante oito dias onde foi possível constatar a viabilidade das sementes.

2.2.1 Determinação de teor de água em sementes de feijão caupi cv. Perola

Para determinação do teor de água das sementes foram utilizadas 3 repetições cada um com 10 sementes por saco de papel. As sementes permaneceram durante 72h em estufa programada a $70^{\circ} C \pm 2$, sendo pesado a cada 24h de exposição ao tratamento.

2.2.2 Curva de embebição

Para curva de embebição foram utilizadas 3 repetições cada uma com 40 sementes por recipiente imersas em 55 mL de água destilada deionizada. A pesagem foi realizada a

cada 15 minutos durante as primeiras duas horas do teste e em seguida as medições passaram a ser feitas a cada 30 minutos até o tempo final de 5h com o auxílio de balança de precisão. Durante todo o experimento, sobretudo nos intervalos, o material permaneceu em agitação.

2.3 Atividades realizadas com sementes tratadas com antioxidantes

Após as determinações com sementes quiescentes foram realizados os tratamentos antioxidativos. As sementes tratadas foram analisadas para a identificação dos processos bioquímicos envolvidos na deterioração das sementes. Como processo inicial dos testes foi mensurado o vazamento de eletrólitos em sementes controle (embebida em água destilada deionizada), sementes tratadas com antioxidantes (Ascorbado e BHA) e sementes tratadas com inibidor de potencial osmótico (Manitol) em tempos variados de exposição aos tratamentos (30, 60, 90, 120 e 180 minutos) O líquido utilizado nos testes de condutividade foi avaliado para identificação e quantificação das substâncias lixiviadas pelo vazamento de eletrólitos nos diferentes tratamentos durante os tempos citados acima. As análises realizadas no líquido foram.

2.3.1 Curva de sódio e potássio

Para essa análise não foi feito nenhum tipo de extração ou procedimento que utilizasse alguma substância. O líquido foi usado exatamente como foi colhido após as leituras do vazamento de eletrólitos.

2.3.2 Determinação de aminoácidos solúveis totais

As determinações de aminoácidos solúveis totais (N- α -amino livres) foram feitas de acordo Yemm e Cocking, (1955). Em tubos de ensaio foram adicionados 0,5 mL do extrato (diluído 10 vezes), 0,25 mL de tampão citrato 0,2 M em pH 5,0 e 0,6 mL de reagente revelador (ninhidrina 5% e KCN 0,2 mM). Os tubos foram fechados, agitados e colocados em banho-maria a 100 °C por 15 minutos, após esse período, foram transferidos para banho de gelo para interromper a reação. Depois foram adicionados 0,65 mL de etanol 60 % para deixar a cor violeta estável por 1 hora. Foram feitas as leituras espectrofotométricas a 570 nm. Para o branco o volume de extrato foi substituído por tampão citrato.

2.3.3 Determinação de carboidratos solúveis totais

Os açúcares solúveis foram medidos de acordo com Dubois et al., (1956). Em tubos de 20 mL foram colocados 0,5 mL do extrato, 0,5 mL de fenol 5 %, seguido de agitação, e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. O H₂SO₄ foi adicionado rapidamente e diretamente contra a superfície da solução. Os tubos foram agitados em vórtex e ficaram em repouso até atingirem a temperatura ambiente, em seguida foram feitas as leituras em espectrofotômetro a 490 nm. Para o branco o volume de extrato foi substituído por água deionizada.

Para quantificar a concentração de carboidratos solúveis as leituras do espectro foram postas na equação da reta obtida por uma curva-padrão de glicose em μ M. Os resultados foram expressos em mmol carboidrato kg⁻¹ MS.

2.3.4 Teste de peroxidação lipídica

Em tubos de ensaio foram adicionado 0,5 mL do extrato diluído e 2 mL de solução TCA 20% mais TBA 0,5%. Em seguida os tubos foram mantidos em banho-maria por 1 hora a 95°C, assim que foram retirados do banho-maria foram resfriados no gelo para interromper a reação. Em seguida foram centrifugados a temperatura ambiente por 10min a 4.000g. Usando uma cubeta de quartzo e o espectro de luz não visível as amostras foram lidas a 532 nm e 660 nm. Essa determinação foi realizada segundo (HEATH,R.L.;PACKER,L. 1968)

2.3.5 Determinação de proteínas solúveis

A determinação de proteínas solúveis foi feita de acordo com o método de Bradford, (1976). Para mensurar as proteínas solúveis, foram adicionados em tubos de ensaio, 0,1 mL do extrato e 1 mL do reagente de Bradford (Comassie Brilliant Blue G-250 90 %, etanol 95 % e ácido fosfórico 85%). Os tubos foram agitados e ficaram em repouso por 15 minutos, depois foram feita as leituras em espectrofotômetro a 595 nm. Para a leitura de todos essas determinações citadas acima foi usado o espectrofotômetro Genesys 5. Em seguida, os experimentos foram realizados com a massa seca das sementes utilizadas nos testes de condutividade citados anteriormente.

4. Preparação do material para liofilização e extração

Após os tratamentos realizados durante o teste de condutividade as sementes utilizadas foram imediatamente congeladas com nitrogênio líquido e mantidas em

freezer a -80°C . Devido a grande absorção de água pela semente durante os tratamentos, para obtermos a massa seca das sementes foi necessário a liofilização do material. As sementes foram maceradas utilizando almofariz sempre resfriado com nitrogênio líquido, a pasta produzida foi guardada em tubo tipo eppendorf e novamente conservado em freezer a -80°C até o momento da liofilização. As amostras permaneceram no liofilizador durante 24h. tempo necessário para remoção de toda a água presente, obtendo assim a “farinha” de massa seca de sementes. Para esse processo utilizado o Liofilizador L101 Liotop.

Utilizando a massa seca das sementes foram realizadas as seguintes determinações:

4.1 Determinação de aminoácidos solúveis totais

As determinações de aminoácidos solúveis totais (N- α -amino livres) foram feitas de acordo com Yemm e Cocking, 1955. Mesma metodologia citada do tópico 3.3.2.

4.1.2 Determinação de carboidratos solúveis totais

A quantidade de massa seca de semente para produção do extrato segue a mesma concentração do item anterior, com diferenciação apenas no fator diluição que necessitou ser diluído apenas 10 vezes. Os carboidratos solúveis foram mensurados de acordo com Dubois et al., 1956. metodologia citada no tópico 3.3.3.

4.2.3 Teste de peroxidação lipídica

Para determinação de TBARS foram utilizadas 30mg de massa seca, maceradas com TCA 5%. Em seguida foi recolhido em eppendorff para centrifugar a 12.000g por 20 min a 4°C. Após a centrifugação foi recolhido o sobrenadante que necessitou ser diluído 50 vezes (1/50) para iniciar o processo de determinação. Essa determinação foi realizada segundo HEATH, R.L.; PACKER, L. 1968. metodologia citada no tópico 3.3.4.

4.2.4 Proteínas solúveis pelo método Bradford;

Para preparação do extrato foi usado 30mg de massa seca de semente e 1mL tampão fosfato de potássio pH 7,0 a 0,1M. Após a extração o material foi recolhido em eppendorf e centrifugado a 12.000g por 15 min a 4° C. Na determinação de proteínas por ligação ao corante foi usado o método de Bradford, foram colocados em tubos de ensaio 0,1mL do extrato diluído 50 vezes (1/50), 2,5mL do reagente de Bradford (composição citada no tópico 3.3.5) e em seguida agitados utilizando um vórtex.

Após 15 minutos, foi feita a leitura com a utilização de um espectrofotômetro à 595 nm, em cubeta de plástico. Para zerar o aparelho o branco utilizado foi composto de água e reagente de Bradford. Os cálculos da concentração de proteínas solúveis, foram feitos de acordo com a equação obtida para a curva padrão.

4.2.5 Determinação de Peróxido de hidrogênio

Para a extração foi usado 30mg de massa seca de semente e 1 mL de TCA 5% que foram macerados com a utilização de almofariz, em seguida foram recolhidas, colocadas em tubo tipo eppendorff e centrifugadas a 12.000 G, por 15 min. a 4°C. Após retiradas da centrífuga recolhe-se o sobrenadante para iniciar a marcha analítica.

Em novos tubos (tipo eppendorff) foram colocados 0,5mL do extrato sem diluição, 0,1mL de solução de $TiCl_4$ 20% em HCl 11M e agitados em vórtex. Após agitação foi adicionado 150 μ l de NH_4OHPA e novamente agitado em vórtex, em seguida centrifugado a 10.000g por 5min a 4°C. retirando da centrifugação descarta-se o sobrenadante deixando apenas o precipitado para conclusão da determinação. Lava-se o precipitado por 2 vezes com TCA 1% , centrifugando a 10.00g por 5min a 4°C e descarta o sobrenadante. Em seguida adiciona aos recipientes 400 μ l de H_2SO_4 1 μ M mais 180 μ l de TCA 5%, ressuspende o precipitado com auxílio de um palito e do agitado. Centrifuga mais uma vez a 10.000g por 5min a 4°C. Concluindo, faz-se a leitura em espectrofotômetro a 415nm.

4.2.6Atividade da Catalase

Para preparação do extrato utilizado nessa atividade foi usado 30 mg de massa seca de semente e 1 mL de tampão de extração. Para preparação das amostras foram colocados em tubos 50 μ L de extrato e 2,95 mL do tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0) contendo H_2O_2 20 mM, para o branco substitui o extrato por 50 μ L de tampão de extração.

Antes de iniciar a leitura zera-se o espectro com o tampão de fosfato de potássio 50mM (pH 7,0), logo após inicia-se a leitura acompanhando o decaimento a 240 nm por 300 segundos, com leituras a cada 60 segundo.

4.2.7 Atividade da Superóxido desmutase

Para preparação do extrato utilizado nessa atividade foram usados 30mg de massa seca de semente e 1 mL de tampão de extração. Nesse ensaio há necessidade de 3 brancos diferentes, o branco total onde é colocado no tubo de ensaio apenas 2mL do tampão de reação, o branco do claro onde é colocado todas as soluções usadas na reação e essa amostra acompanha todo o procedimento das amostras contendo o extrato e o branco do escuro que também é preparado como o branco do claro porém permanece todo o tempo da reação sem ser exposto a luz.

Para a preparação das amostras contendo o extrato são colocados nos tubos de ensaio 1660µL tampão de ensaio, 200µL de NBT 750µM, 100µl do extrato e 40µL de Riboflavina 1mM. Com exceção do branco escuro todos os demais tubos são expostos durante 5min a iluminação com lâmpadas fluorescentes de 30watts. Após esse processo os tubos são escurecidos para iniciar a leitura.

Ajusta-se o espectrofotômetro para 560 nm e em seguida zera o aparelho com o branco total. Inicia-se a leitura pelo branco claro, em seguida branco escuro e depois ler as amostras. Essa determinação foi realizada segundo a metodologia de GIANNOPOLITIS, O; REIS, SK. (1977). Para a leitura de todos essas determinações citadas acima foi usado o Espectrofotômetro Genesys 5.

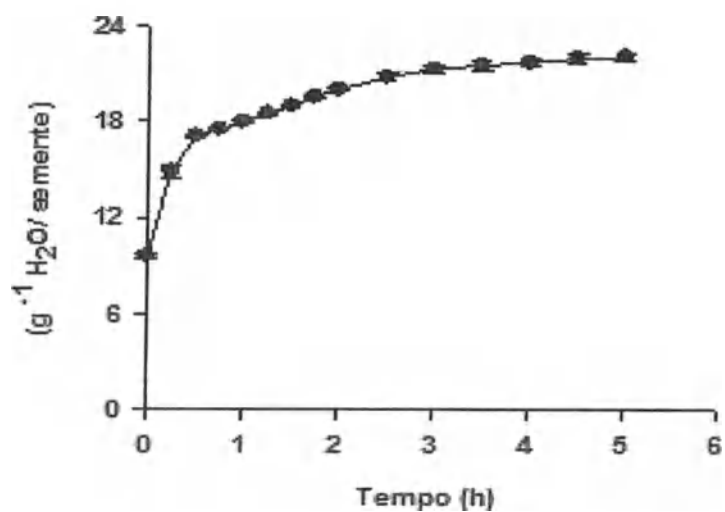
4.2.8 Teste de envelhecimento artificial acelerado

Após todas essas análises, as quais quantificaram as perdas e o danos sofridos pelas sementes durante o processo de embebição dos antioxidantes, sementes quiescentes foram novamente embebidas em água deionizada (controle), ASC, BHA e Manitol por 15 minutos para serem submetidas ao tratamento de envelhecimento artificial acelerado.

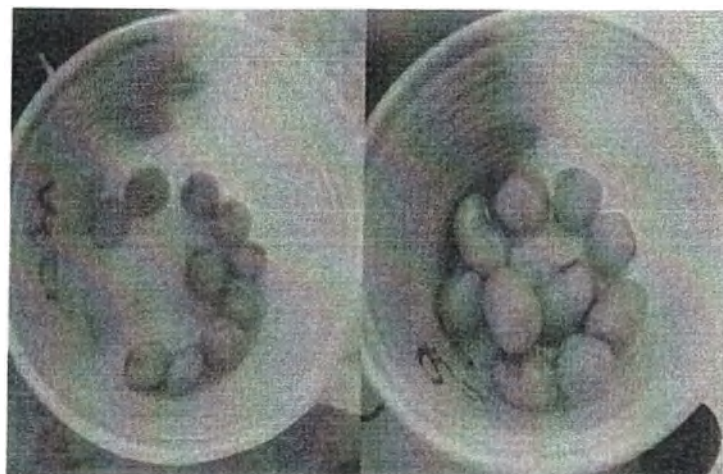
Para este tratamento foi usada a câmara de envelhecimento artificial acelerado ELO'S , 220V. As sementes foram distribuídas em caixas *gerbox* de forma aleatória. Para auxiliar o controle da umidade e temperatura foram usados um termômetro convencional e um termigrometer (Figura 8).

5. Resultados e Discussões

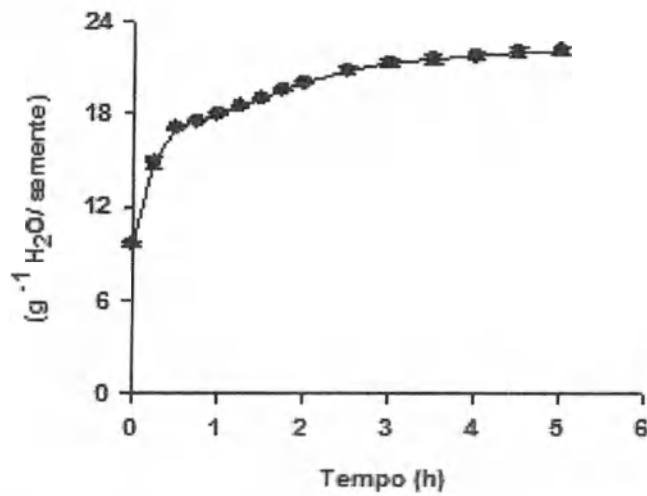
Os testes iniciais de germinação mostraram a viabilidade das sementes utilizadas neste trabalho. A curva de embebição realizada com sementes quiescentes apresentou alta permeabilidade (Figura 1, 2 e 3). Isso indica uma elevada passagem de água através das membranas celulares do feijão caupi cultivar Perola, caracterizando alta taxa de perda de matéria o que pode ser verificado durante a medição da condutividade elétrica (Figura 4)



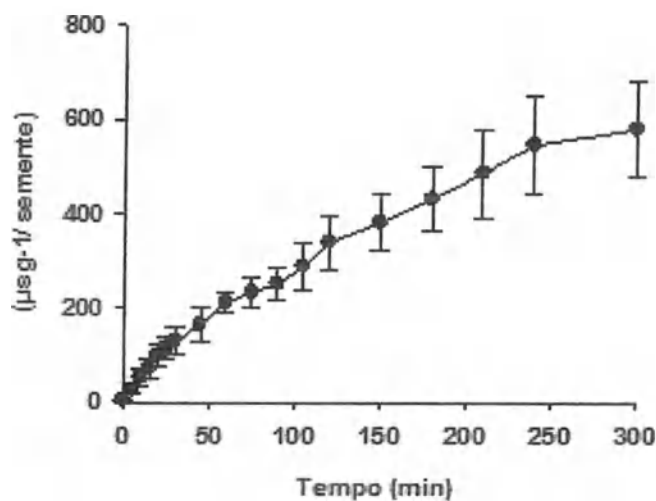
(Figura 1) Curva de embebição realizado com sementes quiescentes de feijão caupi cv. Pérola.



(Figura 2) Sementes de feijão caupi cv. Pérola antes (T = 0) e depois (T = 5 h) do tempo de embebição.



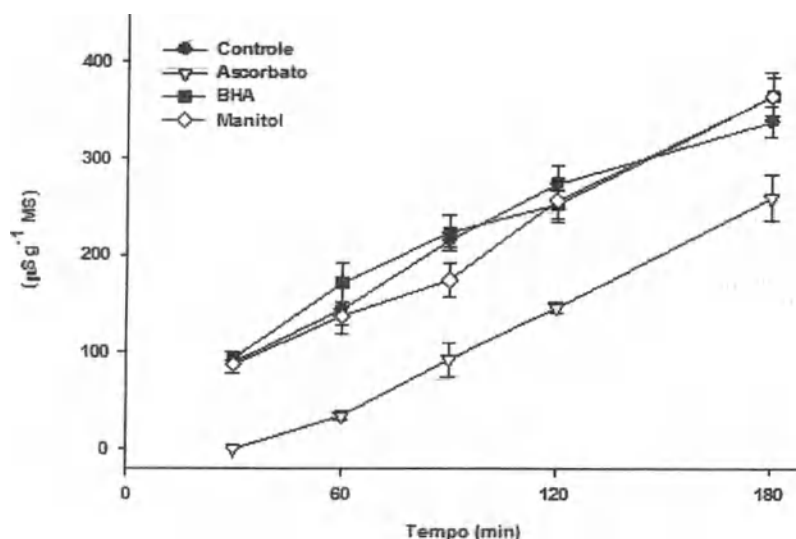
(Figura 3) Curva de embebição em sementes quiescente.



(Figura 4) Curva de vazamento de eletrólitos em sementes quiescentes (T=5h)

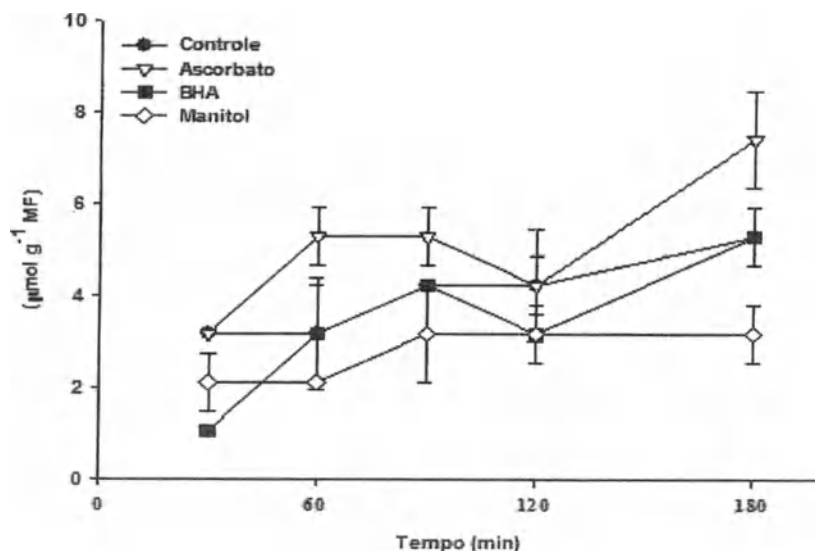
Comparando as altas taxas de vazamentos de eletrólitos apresentadas nos testes controles como resultado obtido na presença do ascorbato foi possível constatar a redução do lixiviamento de eletrólitos na presença do ascorbato. Por outro lado, no teste realizado com BHA, não foi verificada diminuição do vazamento de eletrólitos em

relação ao grupo controle. Após a observação desses resultados foi realizado o mesmo teste na presença do Manitol (inibidor osmótico) e os resultados mostraram atividade antioxidante na presença de ascorbato (Figura 5).

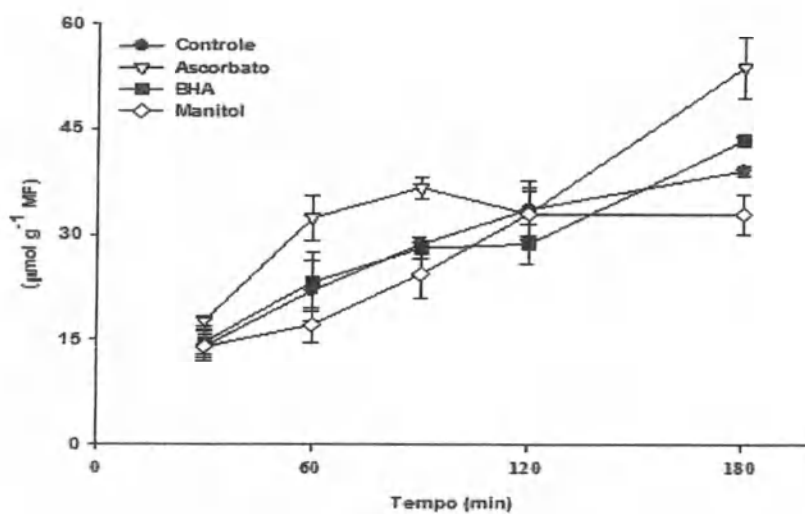


(Figura 5) Gráfico do vazamento de eletrólitos realizado na presença de água deionizada, ASC, BHA e Manitol.

Porém os resultados obtidos das quantificações realizadas no líquido do vazado e na massa seca das sementes tratadas mostraram uma diferença significativa de vazado das sementes tratadas com ascorbato em relação aos demais tratamentos. O gráfico representando a curva de vazamento de sódio e potássio (Figura 6 e 7) mostra uma grande diferença na quantidade de eletrólitos perdidos pelas células tratadas com ascorbato. Os demais tratamento apresentaram um resultado semelhante entre se na curva de sódio e potássio.

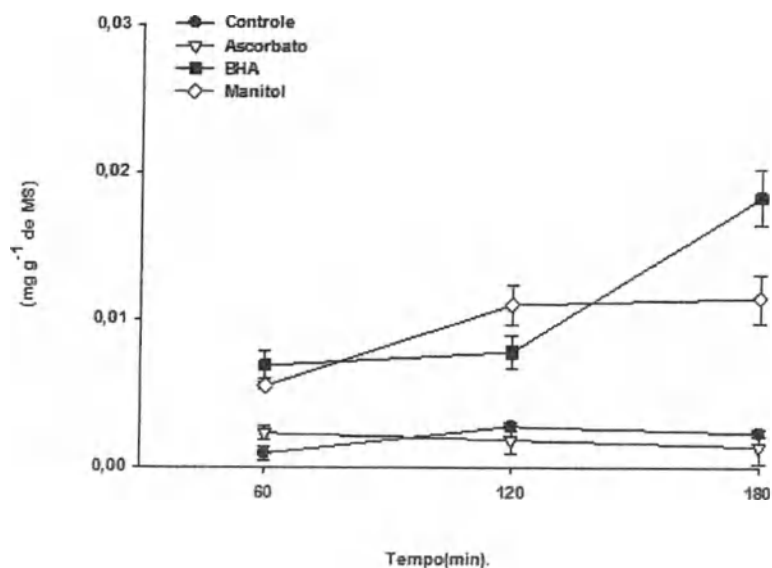


(Figura 6) Curva de sódio apresentada no vazado do teste de condutividade realizado com água deionizada, ASC, BHA e Manitol.

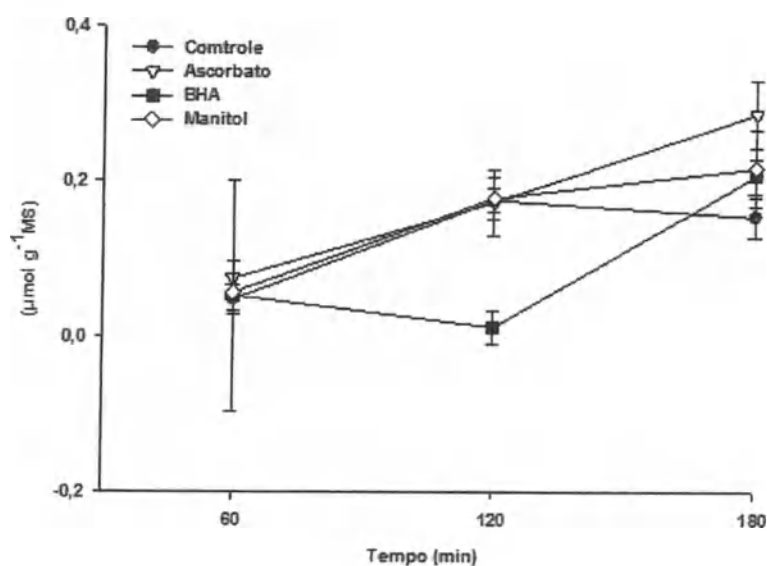


(Figura 7) Curva de potássio apresentada no vazado do teste de condutividade realizado com água deionizada, ASC, BHA e Manitol.

Alguns dos gráficos das demais quantificações também apresentam alta taxa de vazamento de eletrólitos das sementes tratadas com ascorbato em relação ao controle (Figura 8 e 9)



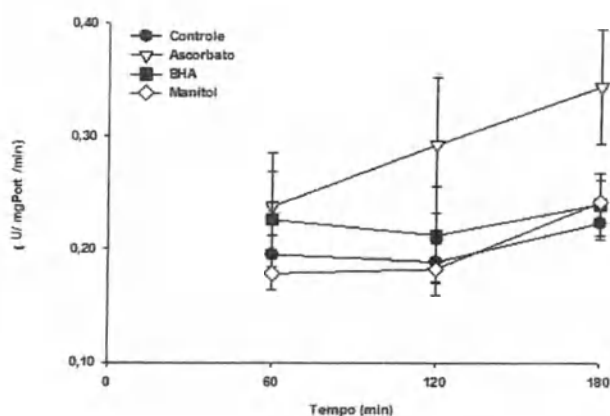
(Figura 8) Quantificação de proteínas solúveis realizada com o líquido do vazamento de eletrólitos.



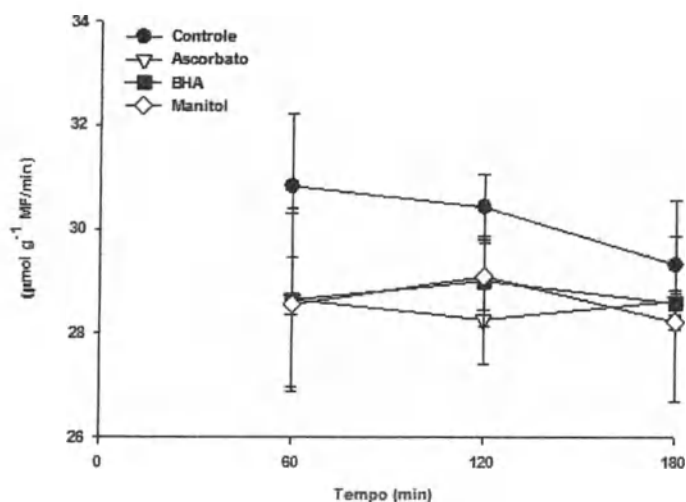
(Figura 9) Quantificação de carboidratos solúveis realizada com o líquido do vazamento de eletrólitos.

Em análise aos gráficos que representam a atividade das enzimas, observa-se uma alta taxa de atuação da SOD na massa seca da sementes tratada com o ascorbato

(Figura 10), porém a mesma observação não pode ser feita em relação a catalase (Figura 11). Em Barreiros, et al (2006) a proteção enzimática baseia-se quase que exclusivamente na decomposição de ânion superóxido ou dismutação de peróxido de hidrogênio, evitando a peroxidação lipídica que resulta no desgaste das membranas celulares e conseqüentemente a morte das mesmas. A alta atividade da enzima garante a proteção endógena a célula e resulta na diminuição da perda de eletrólitos.

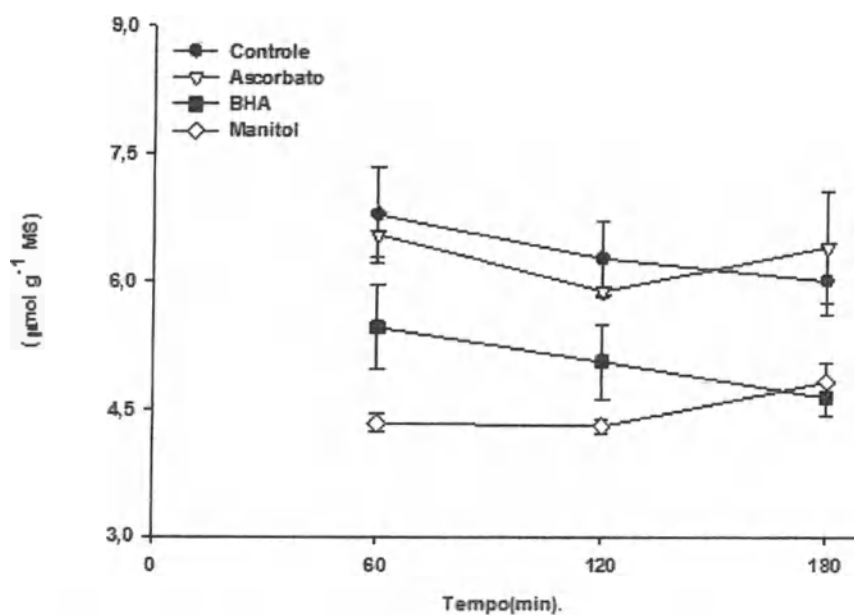


(Figura 10) Atividade da SOD representação das diferenças de atuação na presença dos 4 tratamentos.



(Figura 11) Atividade da CAT representação das diferenças de atuação na presença dos 4 tratamentos.

A quantificação de peróxido em massa seca de semente também mostra uma alta quantidade de peróxido nas sementes tratadas com ascorbato (Figura12).

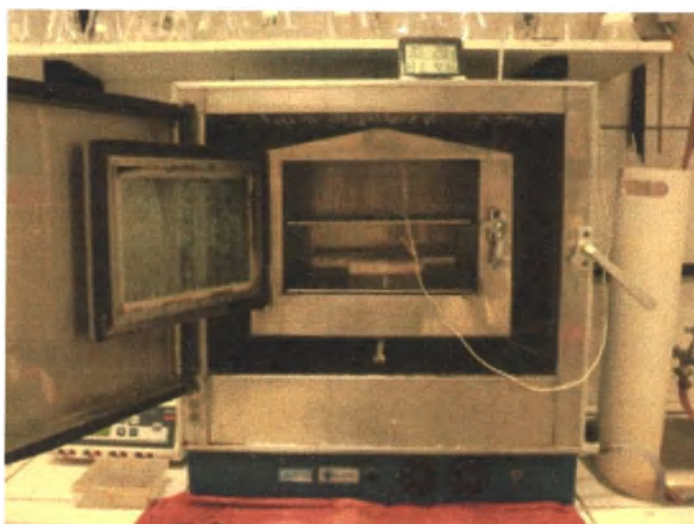


(Figura12) Quantificação de peróxido em massa seca de semente

Após todas as quantificações de matéria orgânica e inorgânica realizadas com o líquido do lixiviado do vazamento de eletrólitos e da massa seca das sementes, novas sementes fora expostas aos mesmos tratamentos por 15 min. de embebição e em seguida fora usadas no teste de envelhecimento artificial.

Ao final do teste realizado em câmara de envelhecimento artificial onde as sementes foram expostas a temperatura de $45^{\circ} \pm 2$ e umidade relativa de 99% durante 48 horas (Figura 13) foi possível constatar a alta sensibilidade das sementes de caupi cv. Pérola ao processo de envelhecimento. Em Binotti, et al (2008), a diminuição expressiva da germinação indica que a exposição ao tratamento de envelhecimento artificial acelerado não é suportado pela semente, ao final do teste a mesmas já não apresenta mais capacidade de reparo aos danos causados pela exposição à alta temperatura e umidade relativa, pois a perda da capacidade de germinação é resultado final do processo de deterioração.

Mostrando também que mesmo as sementes antes tratadas com antioxidantes não enzimáticos não conseguiram suportar as condições impostas pelo teste de envelhecimento acelerado (Figura 14). De acordo com Catunda (2003), as mudanças de temperatura e umidade relativa do ar provocam constantes alterações fisiológicas em sementes armazenadas em condições inadequadas, causando a morte celular.



(Figura 13) Câmara de envelhecimento artificial acelerado ELO'S , 220V em uso, durante o tratamento de envelhecimento de sementes de feijão caupi.

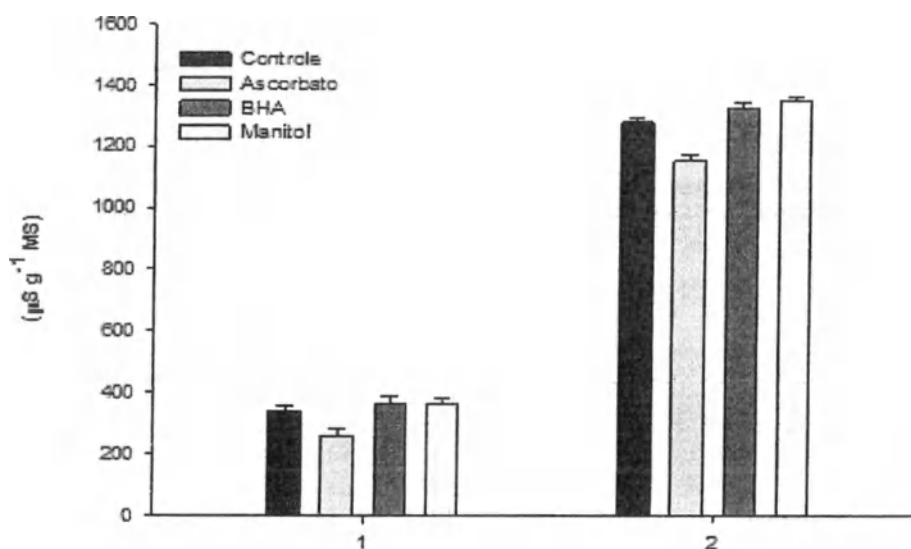


(Figura 14) Sementes após o tratamento de envelhecimento artificial.

6. Conclusão

Mediantes as observações feitas anteriormente à alternativa encontrada para explicar a proteção antioxidativa exercida pelo ascorbato em relação aos demais

tratamentos, é que o mesmo induza ou auxilia na atividade da enzima superóxido desmutase contribuindo para a efetivação da proteção endógena realizada pelo antioxidante enzimático. O gráfico onde está representado o dano de membrana das sementes envelhecidas artificialmente também mostra uma diminuição do desgaste sofrido pelas sementes tratadas com ascorbato em relação aos demais tratamentos (Figura 14).



(Figura 14) Comparativo das medições de vazamento de eletrólitos realizado em sementes antes e depois do teste de envelhecimento artificial com sementes tratadas com água deionizada, ascorbato, BHA e manitol.

Mesmo com os resultados das quantificações apresentando um aumento do lixiviamento de matéria nas sementes tratadas com ascorbato, os resultados das medições de vazamento de eletrólitos (dano de membrana) do mesmo expressam uma diferença em relação aos dos tratamentos controle, BHA e manitol. Em Binotti, et al.

(2008) foi possível observar que aminoácidos, açúcares e íons de potássio são as substâncias encontradas em maior quantidade no líquido do lixiviados dos testes de condutividade (Binotti, et al,2008).

Neste trabalho não foi possível diagnosticar a relação entre a quantificação de matéria lixiviada com a proteção exercido pelo antioxidante não enzimático, o ascorbato, pois os resultados obtido até o presente momento não apresentam relações significativas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, S.C. et al. Banco de sementes de plantas espontâneas na cultura do feijão-caupi no sistema de capoeira triturada. **Cadernos de Agroecologia** – ISSN 2236-7934 – Vol 6, No. 2, 2011.

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 Biologies**, 2008.

BARREIROS et al. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 1, 113-123, 2006

BINOTTI, F. F. S. et al. Efeito do período de envelhecimento acelerado no teste de condutividade elétrica e na qualidade fisiológica de sementes de feijão. **Acta Sci. Agron.** v. 30, n. 2, p. 247-254, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. 1976.

BULTEAU, A. L. et al. Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. **Experimental gerontology**. v. 41, p. 653-657, 2006.

CATANIA, A. S. ; Barros, C. R. ; Ferreira, S. R. G. Vitaminas e minerais com propriedades antioxidantes e risco cardiometabólico: controvérsias e perspectivas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, vol.53 no. 5, 2009

CATUNDA, P.H.A.et al. Influência do teor de água, da embalagem e das condições de armazenamento na qualidade de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 25, nº 1, p.65-71, 2003.

CHRISTINA 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.

DELOUCHE, J., Germinação, deterioração e vigor da semente. Seed News, n. 6, p. 24-31, 2002.Disponível: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/feijao/feijao-caupi>. Acesso em: 20 agosto.2012.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p.350-356, 1956.

EL-MAAROUF-BOUTEAU, et al., DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 14, p. 5003–5011, 2011.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMPRAPA – Meio-Norte.Cultivo de feijão-caupi. Sistema de produção 2. **Versão eletrônica**, 2003.

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, nº 1, p. 150-159, 2009

KIBINZA,S., et al. Catalase is a key enzyme in seed recovery from ageing during priming. **Plant Science**, v.181, p.309–315, 2011.

KISSMANN, C. et al. Germinação e armazenamento de sementes de *Albizia hasslerii* (Chod.) Burkart. **Rev. bras. Sementes**, vol.31 no.2, 2009.

KRANNER, I., et al. Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? **Free radical biology & medicine**, v.,p., 2006.

KRANNER, I., et al. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science, **New Phytologist**, 2010.

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

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annu. Rev. Plant Biol.** v. 58, p. 459-481, 2007

ORACZ, K., et al. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. **Plant J**, 2007

PUKACKA, S. RATAJCZAK, E. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. **Journal of Plant Physiology**, v.162,p. 873—885, 2005

SANTOS, C.M. et al. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de feijão envelhecidas artificialmente. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 26, n. 1, p. 110-119, 2004.

SENARATNA, T.; GUSSE, J.F.; MC KERSIE, B.D. Age-induced changes in cellular membranes of imbibed soybean axes. *Physiology Plant*, v. 73, p.85-91, 1988.

SILVA, C.D., Condutividade elétrica e composição mineral da solução de embebição de sementes de feijão armazenadas em duas temperaturas. **Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**, 2009.

SILVA, W.J. M.; FERRARI, C. K. B.; Metabolismo mitocondrial, radicais livres e envelhecimento. **Revista Brasileira. Geriatria. Gerontologia**. v.14(3), p.441-451, 2011.

SILVEIRA, T.L.D. Regras de armazenamento de sementes. Núcleo sementes. Departamento de Fitotecnia. Centro de Ciências Rurais. **Universidade Federal de Santa Maria**, 1999.

TOMMASI, F. et al. Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in ginkgo biloba. **Seeds Plant Physiology and Biochemistry**, v.44, p. 359-368, 2006.

VIÉGAS, R. A. et al. Effect of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola**, v. 5, n. 2, p. 216-222, 2001.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. Teste de vigor em sementes. FUNEP, v.,p. 164, 1994. UFSM. Armazenamento de sementes. 2004. Disponível em: <http://www.ufsm.br/sementes/> . Acesso em: 7/ago/2012.

WANG, L. et al. Comparative proteomics analysis reveals the mechanism of pre-harvest seed deterioration of soybean under high temperature and humidity stress. **Journal of Proteomics**. 2012.

YEMM, E. W.; COCKING, E.F. The determination of amino acids with ninhydrin. **Analyst**. v. 80, p. 209-210, 1955.

VIÉGAS, R. A. et al. Effect of NaCl-salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola**, v. 5, n. 2, p. 216-222, 2001.