

## Variações dos carboidratos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas

Moacir Edson Hellmann<sup>1,2</sup>, Juliana Iura de Oliveira Mello<sup>1,2</sup>, Claudio José Barbedo<sup>1</sup> e Rita de Cássia Leone Figueiredo-Ribeiro<sup>1,3</sup>

Recebido: 02.11.2007; aceito: 30.05.2008

**ABSTRACT** - (Changes in the storage carbohydrates of *Caesalpinia echinata* (brazilwood) seeds stored under different temperatures). Among the major reserve carbohydrates of leguminous seeds are starch, sucrose and galactosyl oligosaccharides, contributing to structural stability of membranes during desiccation besides providing energy for embryo growth. Mature seeds of *Caesalpinia echinata* were harvested before and after shedding and reserve carbohydrates analyzed 15 and 90 days after storage at 25 °C, 7 °C and -18 °C. The main compounds of the embryonic axis were soluble carbohydrates, especially sucrose, while starch represented *ca* 30% of the dry mass of the cotyledons. Recently dispersed seeds, with 12% of water content, had their carbohydrate contents unchanged and the germination capacity maintained when stored at cold temperatures (7 °C and -18 °C). However, mature seeds harvested before shedding, with 22% of water content, had their soluble carbohydrate contents decreased in the axis and starch increased in the cotyledons after 90 days of storage, but the viability was maintained only at 7 °C. Chromatographic analysis showed that the hexose levels decreased during storage, except in the cotyledons of seeds stored at cold temperatures. Results suggest that the metabolism of *C. echinata* seeds was altered during storage but the fluctuations of non-structural carbohydrates during storage are not directly associated to the germination capacity of those seeds.

**Key words:** cold temperature, Leguminosae, reserve compounds, starch, storage, sugars

**RESUMO** - (Variações nos carboidratos de reserva de sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) armazenadas sob diferentes temperaturas). Dentre os carboidratos de reserva de sementes destacam-se o amido, a sacarose e os oligossacarídeos galactosilados, que além da função de reserva, podem atuar na estabilidade das membranas durante a dessecação e a retomada do crescimento embrionário. Sementes maduras de *Caesalpinia echinata* Lam. foram coletadas antes e após a dispersão natural, sendo analisadas imediatamente após a coleta quanto à composição de carboidratos presentes no eixo embrionário e nos cotilédones, e aos 15 e 90 dias após armazenamento a 25 °C, 7 °C e -18 °C. A principal reserva dos eixos embrionários foram os açúcares solúveis, enquanto que o amido foi a dos cotilédones, representando cerca de 30% da massa seca. Sementes recém-dispersas, com 12% de água, armazenadas sob temperaturas baixas (7 °C e -18 °C), mantiveram estável o teor de carboidratos totais nos cotilédones, bem como a capacidade germinativa, mas apresentaram redução no teor de açúcares solúveis. Já as sementes maduras não-dispersas, com 22% de água, mantiveram a capacidade germinativa apenas quando mantidas a 7 °C. Nestas sementes, os açúcares solúveis diminuíram no eixo embrionário e nos cotilédones durante o armazenamento. Análises cromatográficas mostraram que, de modo geral, houve redução nos níveis de hexoses, exceto nos cotilédones de sementes armazenadas sob temperaturas baixas. As variações encontradas nas proporções de sacarose e de hexoses e no teor de amido nos cotilédones e no eixo embrionário das sementes armazenadas sob diferentes temperaturas sugerem que o metabolismo dos carboidratos de reserva é alterado durante o armazenamento. Contudo, as variações encontradas nesses compostos durante o armazenamento não estão diretamente relacionadas com a capacidade germinativa dessas sementes.

**Palavras-chave:** açúcares, amido, armazenamento, compostos de reserva, Leguminosae, temperaturas baixas

### Introdução

Sementes maduras de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) toleram a dessecação e mantêm a viabilidade por até 18 meses quando armazenadas com 0,1 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> MS sob baixas temperaturas (7-8 °C), perdendo a capacidade germinativa em 30 dias, quando armazenadas em temperatura ambiente,

ao redor de 25 °C (Barbedo *et al.* 2002). Essas sementes também toleram o congelamento quando armazenadas com aquele teor de água, produzindo alta porcentagem de plântulas normais após 24 meses de armazenamento (Hellmann *et al.* 2006). Os principais compostos de reserva dessas sementes são proteínas (8%-10%), lipídios (*ca.* 20%) e carboidratos não-estruturais (40%-50%). Dentre estes, a maior fração

1. Instituto de Botânica, Caixa Postal 3005, 01061-970 São Paulo, SP, Brasil  
2. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente  
3. Autor para correspondência: ritarib@usp.br

é composta pelo amido, enquanto que os carboidratos solúveis representam de 10% a 15% da matéria seca, sendo constituídos principalmente por sacarose, glucose e frutose e, em menores proporções, por ciclitóis e oligossacarídeos da série da rafinose (ROs), como rafinose e estaquiase (Borges *et al.* 2006, Garcia *et al.* 2006).

A sacarose é o principal carboidrato solúvel encontrado em sementes maduras de várias espécies (Castilho *et al.* 1990). Esse açúcar, além de atuar como substrato para reações metabólicas que ocorrem sob temperaturas baixas, pode ter um efeito crioprotetor direto sobre as membranas celulares quando em altas concentrações, contribuindo para a tolerância à dessecação e ao congelamento em algumas espécies (Uemura & Steponkus 2003). Proteínas específicas e ROs são sintetizados e acumulados de forma tardia durante o desenvolvimento de sementes e aparentemente também estão envolvidos com a tolerância à dessecação e com a longevidade de sementes ortodoxas (Bernal-Lugo & Leopold 1992, Lin & Huang 1994, Castro *et al.* 2004). No entanto, sementes de pau-brasil, consideradas ortodoxas e tolerantes à dessecação (Barbedo *et al.* 2002), mantiveram alta viabilidade quando armazenadas sob temperaturas baixas (Hellmann *et al.* 2006) sem, contudo, apresentarem teores de ROs compatíveis aos elevados níveis de sacarose encontrados nas sementes como um todo (Garcia *et al.* 2006).

O conhecimento do teor de água é fundamental para o armazenamento seguro de sementes e, no caso daquelas em que o metabolismo de carboidratos pode ser afetado pela temperatura, como ocorre em *Caesalpinia echinata* (Garcia *et al.* 2006), esse aspecto torna-se mais relevante. No presente trabalho foram analisados o teor e a composição dos principais carboidratos de reserva presentes nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes maduras recém-dispersas e não-dispersas de *Caesalpinia echinata*, com vistas a avaliar a possível relação desses compostos com o teor de água e a manutenção da capacidade germinativa dessas sementes após o armazenamento sob diferentes temperaturas.

## Material e métodos

Sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), Caesalpinioideae, foram coletadas em bosque homogêneo implantado na Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, Município de Moji-Guaçu (22°15-16'S, 47°8-12'W; 600 m de altitude), SP, em dezembro de 2004.

Foram realizados dois procedimentos para obtenção das sementes, seguindo as recomendações de Borges *et al.* (2005): 1) coleta de frutos maduros com coloração totalmente castanha e com remoção manual das sementes em laboratório, sendo denominadas sementes maduras não-dispersas (ND); 2) coleta das sementes recém-dispersas, em época sem ocorrência de chuvas nas 24 horas anteriores à colheita, sendo denominadas sementes recém-dispersas (RD). Os conteúdos médios de água das sementes dos dois lotes antes do armazenamento foram de 22,6% e de 12,7%, respectivamente, conforme previamente determinado (Hellmann *et al.* 2006).

As sementes assim obtidas foram inicialmente avaliadas quanto ao teor e composição de carboidratos de reserva, sendo analisados isoladamente os eixos embrionários e os cotilédones (figura 1), separados manualmente a partir de cinco sementes, com três repetições.

Para a extração dos carboidratos solúveis 20 mL ou 1 mL de etanol 80% foram adicionados aos cotilédones e aos eixos embrionários, respectivamente, seguindo-se fervura por 5 min para inativação das enzimas. As amostras foram então homogeneizadas em almofariz e centrifugadas por 10 min a 1.000 g. O precipitado foi re-extraído duas vezes com etanol 80% a 80 °C e os sobrenadantes juntados e concentrados em evaporador rotatório a 40 °C, até cerca de 1 mL, sendo considerados os extratos brutos.

O açúcar total foi quantificado pelo método de fenol-sulfúrico (Dubois *et al.* 1956), usando glucose como padrão. Os resultados foram expressos em mg por g de massa seca (mg g<sup>-1</sup> MS).

Após deionização dos extratos brutos em colunas de troca iônica Dowex - 1 (forma Cl<sup>-</sup>) e Dowex - 50W (forma H<sup>+</sup>), os carboidratos solúveis neutros foram novamente concentrados e analisados por cromatografia líquida de troca aniônica de alta resolução, acoplada a um detector de pulso amperométrico (HPAEC/PAD), usando coluna CarboPac PA-1 (4 x 250 mm) em um sistema Dionex Mod. DX 300 (USA). Para a eluição dos carboidratos, utilizou-se um gradiente de mistura do eluente B (500 mM de acetato de sódio em 150 mM de NaOH) ao eluente A (150 mM de NaOH), com fluxo de 1 mL min<sup>-1</sup>, por meio da seguinte programação: 0-1 min, 25mM; 1-2 min 25-50 mM; 2-14 min, 50-500 mM; 14-22 min, 500 mM; 22-30 min, 25 mM (Itaya *et al.* 1997). Os açúcares presentes nas amostras foram identificados por co-cromatografia com padrões autênticos (Sigma).

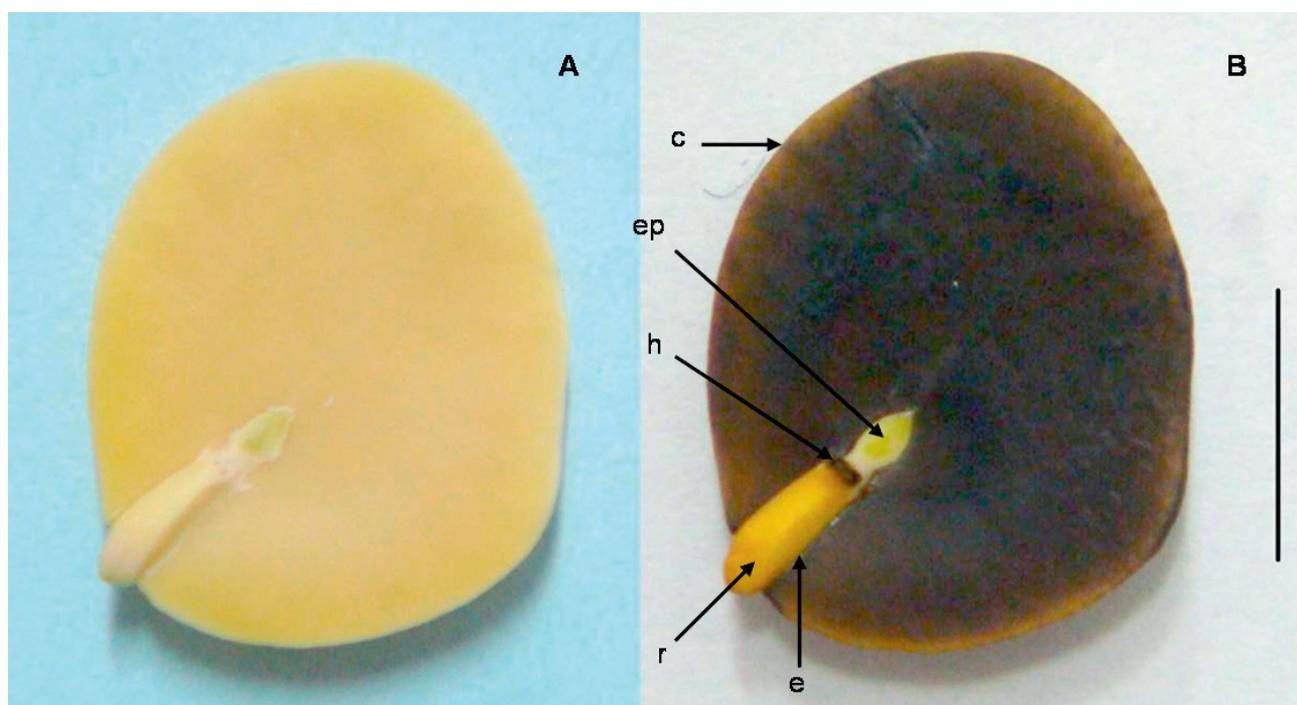


Figura 1. Aspecto geral de semente de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) seccionada longitudinalmente após a remoção do tegumento, antes (A) e após coloração com Reagente de Lugol (B), conforme descrito por Waghorn *et al.* (2003) com destaque para os cotilédones (c), eixo embrionário (e), radícula (r), hipocótilo (h) e epicótilo (ep). Barra de escala = 0,5 cm.

Os resíduos das extrações dos carboidratos solúveis dos cotilédones e dos eixos embrionários foram liofilizados e processados para a quantificação do amido. A extração foi realizada através de fervura dos resíduos com água deionizada por 5 min, seguido por centrifugação a 1.000 g (operação realizada duas vezes), sendo o amido quantificado no sobrenadante com o Reagente de Lugol, conforme metodologia adaptada por Waghorn *et al.* (2003), utilizando amido solúvel (Sigma) como padrão. Os resultados foram expressos em mg por g de massa seca do resíduo ( $\text{mg g}^{-1}$  MS).

As sementes de cada procedimento de colheita foram armazenadas em câmaras com três temperaturas distintas,  $25 \pm 1$  °C (umidade relativa do ar, UR,  $72\% \pm 3\%$ ),  $7 \pm 3$  °C (UR  $45\% \pm 7\%$ ) e  $-18 \pm 5$  °C (UR  $84\% \pm 10\%$ ) e, após 15 e 90 dias de armazenamento, foram novamente avaliadas quanto à composição dos carboidratos de reserva.

O teor de água (%) e o conteúdo de matéria seca das sementes foram determinados pelo método de estufa a  $103 \pm 3$ °C, por 17 horas (ISTA 1985), com 4 repetições de 5 sementes cada.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial

$2 \times 3 \times 2$  (procedimentos de coleta x temperatura de armazenamento x tempo de armazenamento). Os resultados foram submetidos à análise de variância (teste F, a 5% de probabilidade) e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade (Gomes 1982).

## Resultados e Discussão

Os resultados de carboidratos solúveis e de amido obtidos para os eixos embrionários e cotilédones de sementes não-dispersas e recém-dispersas de *C. echinata*, após análise de variância, permitiram verificar que os três fatores estudados (tipo de coleta, temperatura e período de armazenamento) interagiram entre si apenas para os valores de amido no eixo embrionário (tabela 1). Nos cotilédones, os teores de amido apresentaram interação significativa apenas entre os fatores procedimento de coleta e temperatura de armazenamento (tabela 2).

Quanto aos carboidratos solúveis, tanto nos cotilédones quanto no eixo embrionário houve interação significativa somente para os fatores tipo de coleta e tempo de armazenamento (tabela 3).

Tabela 1. Teor de água de sementes (% base úmida) e teor de amido (mg gMS<sup>-1</sup>) nos eixos embrionários de sementes maduras de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) obtidas por dois procedimentos de coleta (não dispersas - ND; recém-dispersas - RD) e armazenadas por 15 e 90 dias a 25 °C, 7 °C e -18 °C. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas para comparação entre períodos de armazenamento, maiúsculas entre temperaturas e itálico entre procedimento de coleta) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tempo de armazenamento	ND			RD		
	25 °C	7 °C	-18 °C	25 °C	7 °C	-18 °C
<i>Teor de água de sementes inteiras</i>						
Inicial (0 dias)	22,9	22,9	22,9	12,8	12,8	12,8
15 dias	10,9	9,3	18,3	10,2	8,7	12,1
90 dias	11,9	8,3	13,5	11,4	7,7	11,3
<i>Teor de amido nos eixos embrionários</i>						
Inicial (0 dias)	0,93 aAa	0,93 aAa	0,93 aAa	1,43 aAa	1,43 aAa	1,43 aAa
15 dias	0,31 abAb	0,83 aAb	0,67 aAa	1,15 abABa	1,59 aAa	0,86 abBa
90 dias	0,18 bBa	1,41 aAa	0,39 aBa	0,71 bAa	0,46 bAb	0,55 bAa
Coefficiente de variação (%)	38,92					

Com base na análise de variância realizada pode-se inferir que a temperatura de armazenamento não afetou o teor de carboidratos solúveis totais no eixo e nos cotilédones durante os 90 dias de armazenamento, mas modificou o teor de amido. Já o procedimento de coleta influenciou todos os resultados, tanto para o teor de amido quanto para o de carboidratos solúveis.

Hellmann *et al.* (2006) mostraram que o potencial germinativo (78%) e a capacidade de desenvolver plântulas (cerca de 70%) de sementes maduras de *C. echinata* não-dispersas e recém-dispersas em época seca foram semelhantes, apesar do conteúdo de água dessas sementes ser diferente (respectivamente 22,6% e 12,7%). Com base nesses resultados, os autores sugeriram que essas sementes apresentavam a mesma qualidade fisiológica em relação à capacidade germinativa e desenvolvimento inicial.

Tabela 2. Teor de amido (mg gMS<sup>-1</sup>) nos cotilédones de sementes maduras de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) obtidas por dois procedimentos de coleta (não dispersas - ND; recém-dispersas - RD) e armazenadas por até 90 dias a 25 °C, 7 °C e -18 °C. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas para comparação entre temperaturas de armazenamento, maiúsculas entre procedimento de coleta) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Temperatura de armazenamento	Procedimentos de coleta	
	ND	RD
25 °C	249,72 aA	256,23 bA
7 °C	256,71 aA	275,58 abA
-18 °C	236,00 aB	286,96 aA
Coefficiente de variação (%)	8,38	

Tabela 3. Carboidratos solúveis (mg gMS<sup>-1</sup>) nos eixos embrionários e cotilédones de sementes maduras de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil) obtidas por dois procedimentos de coleta (não dispersas - ND; recém-dispersas - RD) e armazenadas por 15 e 90 dias sob temperaturas de 25 °C, 7 °C e -18 °C. Valores seguidos pela mesma letra (minúsculas para comparação entre tempos de armazenamento, maiúsculas para procedimentos de coleta) não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tempo de armazenamento	Procedimentos de coleta	
	ND	RD
eixo embrionário		
Inicial (0 dias)	346,06 aA	194,23 aB
15 dias	117,24 bA	119,98 bA
90 dias	122,51 bA	99,36 bA
Coefficiente de variação (%)	15,15	
cotilédones		
Inicial (0 dias)	253,86 aA	215,12 aB
15 dias	132,60 bA	102,57 bB
90 dias	107,14 cA	88,81 cB
Coefficiente de variação (%)	6,66	

Utilizando cotilédones e eixos embrionários isolados de sementes recém-dispersas e não-dispersas de *C. echinata* o presente estudo indicou que o amido é um importante composto de reserva dessas sementes (figura 1). Esse polissacarídeo é encontrado principalmente nos cotilédones (ca. 20%-30% da massa seca, tabela 2), com valores ca. 200 vezes superiores aos encontrados no eixo embrionário (0,1%-0,15% da massa seca, tabela 1). Essas informações confirmam os dados obtidos por Garcia *et al.* (2006) para sementes de *C. echinata* recém-dispersas, englobando eixo embrionário e cotilédones.

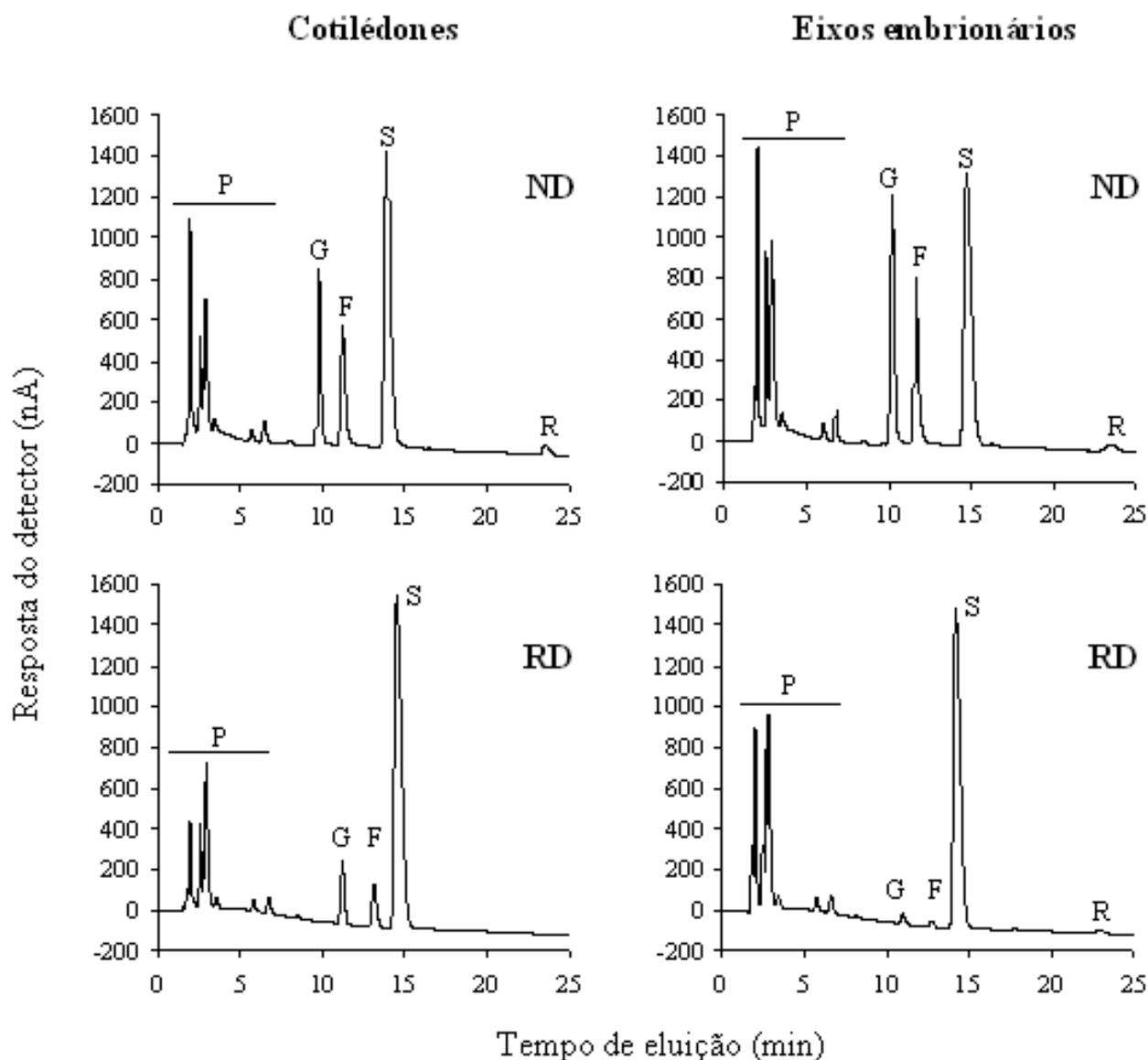


Figura 2. Perfil cromatográfico (HPAEC/DAP) dos carboidratos solúveis de cotilédones e eixos embrionários de sementes maduras não-dispersas (ND) e recém-dispersas (RD) de *Caesalpinia echinata* imediatamente após a coleta. P = polióis, G = glucose, F = frutose, S = sacarose, R = rafinose.

Como se sabe, os carboidratos podem ser acumulados em resposta a estresses ambientais, como o frio e a seca, e atuar como crio- ou osmoprotetores celulares (Leslie *et al.* 1995). Dentre os carboidratos solúveis encontrados nos eixos embrionários e nos cotilédones de sementes maduras de pau-brasil antes e após a dispersão destacaram-se a sacarose, glucose, frutose e polióis (figura 2), além da rafinose e estaquiose em baixas proporções, o que está de acordo com dados já reportados por Garcia *et al.* (2006) para sementes inteiras de *C. echinata*.

A tabela 3 mostra que houve redução significativa nos teores de açúcares solúveis dos cotilédones das sementes provenientes dos dois procedimentos de coleta, analisados durante 90 dias de armazenamento, independentemente da temperatura na qual as sementes foram armazenadas. Simultaneamente, foi observado aumento no teor de amido nos cotilédones, que passou de 218,91 mg g MS<sup>-1</sup>, inicialmente, para 279,98 mg g MS<sup>-1</sup> após 15 dias, não modificando a partir daí até os 90 dias de armazenamento (dados não apresentados).

As mesmas variações foram observadas quanto aos carboidratos solúveis nos eixos embrionários nos primeiros 15 dias de armazenamento (tabela 3). Contudo, os teores de amido nos eixos também diminuíram com o armazenamento (tabela 1), diferentemente do que ocorreu com os cotilédones, conforme descrito acima. Essa variação poderia ser esperada, uma vez que os cotilédones são os tecidos de reserva dessas sementes (Teixeira *et al.* 2004). As tabelas 1, 2 e 3 mostram, ainda, que os conteúdos dos carboidratos de reserva encontrados nas sementes não-dispersas e nas recém-dispersas foram, de maneira geral, semelhantes entre si, tanto nos cotilédones quanto nos eixos embrionários, confirmando a similaridade fisiológica dessas sementes, descrita por Hellmann *et al.* (2006).

De acordo com Carvalho & Nakagawa (2000), o teor de água oscila muito em sementes de diferentes espécies, dependendo da umidade relativa do ar do local de armazenamento, fato também confirmado por Hellmann *et al.* (2006) para as sementes de *C. echinata*, nas quais ocorreu redução no teor de água durante o armazenamento, independentemente da temperatura das câmaras. Dessa forma, as variações observadas nos teores de carboidratos de reserva durante o armazenamento poderiam estar relacionadas com a redução do teor de água dessas sementes. Um aspecto importante a ser ressaltado é a complexa distribuição espacial do conteúdo de água nos diferentes tecidos embrionários, que pode variar entre eixos e cotilédones (Marcos Filho 2005) e, talvez, em diferentes regiões do próprio eixo embrionário. Esta informação deve ser considerada no caso das sementes armazenadas sob temperaturas de congelamento (Hellmann *et al.* 2006). Essas variações poderiam explicar as flutuações dos carboidratos solúveis no eixo nos primeiros 15 dias de armazenamento, diferentemente daquelas observadas nos cotilédones, que ocorreram até 90 dias.

Geralmente, a redução da temperatura tem efeitos opostos sobre a germinação e a longevidade de sementes, diminuindo a primeira e aumentando a segunda. O armazenamento de sementes sob temperaturas imediatamente inferiores à mínima necessária para a germinação (temperatura basal) pode ampliar a longevidade dessas sementes (Pritchard *et al.* 1995). Esta informação poderia explicar o comportamento das sementes de pau-brasil armazenadas a 25 °C, que apresentaram curta viabilidade, independentemente do teor de água inicial; conforme observado por Mello & Barbedo (2007), esta é a temperatura ótima para germinação das

sementes de pau-brasil. Por outro lado, a capacidade germinativa e o vigor das sementes armazenadas a 7 °C foram mantidos (Hellmann *et al.* 2006), também concordando com Pritchard *et al.* (1995) quanto ao armazenamento em temperatura inferior à basal que, para o pau-brasil, é próxima a 10 °C (Mello & Barbedo 2007). O armazenamento a -18 °C foi letal para as sementes não-dispersas, com maior teor de água inicial (22,6%), considerada como água do tipo 3, congelável (Vertucci & Farrant 1995). Esta condição poderia levar à formação de cristais de gelo e perda da viabilidade, apesar dos elevados teores de carboidratos solúveis (especialmente sacarose) presentes nos eixos e cotilédones dessas sementes (tabela 3, figura 3). Por outro lado, sementes dispersas em época seca, com teor de água de 12,6% mantiveram a capacidade germinativa e o desenvolvimento de plântulas até 90 dias de armazenamento a -18 °C (Hellmann *et al.* 2006).

A tolerância ao congelamento das sementes de pau-brasil vem sendo avaliada usando como indicadores a germinação e o vigor das sementes, respectivamente pelo aumento da porcentagem de germinação e do desenvolvimento de plântulas normais das sementes armazenadas a -18 °C (Hellmann *et al.* 2006). Contudo, a tolerância ao congelamento no âmbito celular pode ser avaliada pelas variações no conteúdo de carboidratos. Hisano *et al.* (2004) observaram que o aumento de frutanos em lâminas foliares de gramíneas promovia aumento da tolerância ao congelamento, conforme indicado pela diminuição na liberação de eletrólitos, geralmente causada por danos nas membranas celulares após o congelamento. Como se sabe, o congelamento danifica mecanicamente os tecidos de forma direta e, também, indiretamente pela desidratação causada pela formação de cristais de gelo extracelulares (Hellmann *et al.* 2006 e referências contidas).

O acúmulo de solutos compatíveis, como prolina, sacarose, frutanos e manitol, dentre outros compostos, aumenta a capacidade de retenção de água pelas células, promovendo a tolerância ao congelamento. Acredita-se que esses protetores osmóticos também estejam relacionados com a tolerância ao congelamento pela propriedade que têm de capturar espécies reativas de oxigênio, formadas em sistemas biológicos submetidos a temperaturas muito negativas (Parnanova *et al.* 2004). Bray e colaboradores (*in* Kumar & Bhatla 2006) mostraram que diversos genes induzidos por estresse hídrico também o são por temperaturas baixas. Da mesma

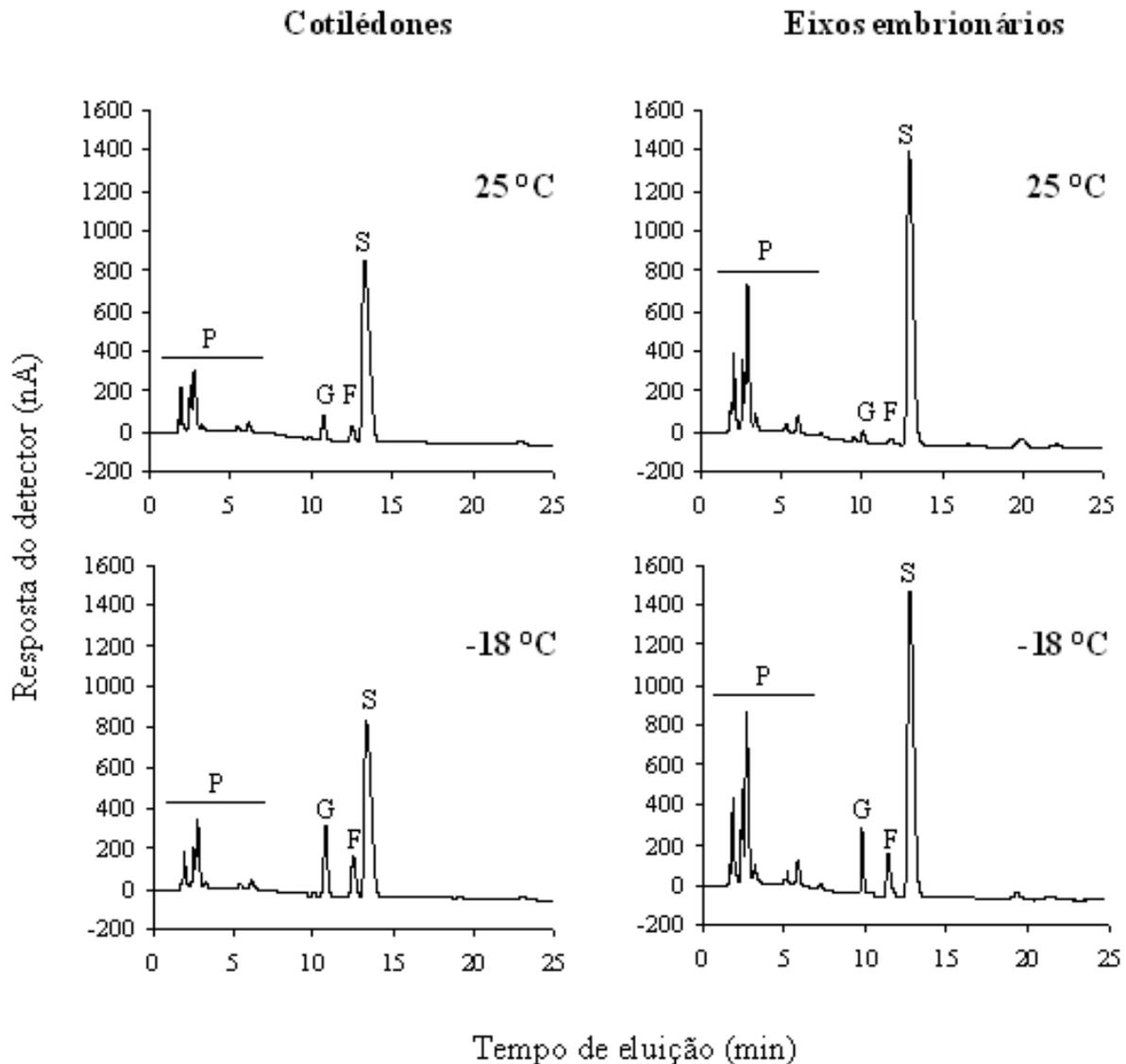


Figura 3. Perfil dos carboidratos solúveis em HPAEC/PAD de cotilédones e eixos embrionários de sementes não-dispersas de *Caesalpinia echinata* após armazenamento por 90 dias sob diferentes condições térmicas. P = polióis, G = glucose, F = frutose, S = sacarose.

forma, o grupo LE 25 de proteínas LEA (“Late Embryogenesis Abundant”) envolvidas na tolerância à desidratação, também poderia conferir tolerância ao congelamento em sementes de tomate.

Aos 90 dias de armazenamento as sementes não-dispersas de *C. echinata* (com 22,6% de água) apresentaram decréscimo nas proporções de todos os carboidratos solúveis dos cotilédones, exceto a sacarose que se manteve relativamente em alta proporção. Os polióis também diminuíram principalmente nos cotilédones e glucose e frutose praticamente desapareceram (figura 3). Nos eixos embrionários ocorreu redução expressiva nas proporções de glucose

e frutose, em todas as temperaturas igualmente, enquanto a sacarose e os polióis mantiveram as proporções iniciais (tabela 4, figuras 2, 3).

Nas sementes recém-dispersas, tanto os cotilédones quanto os eixos embrionários apresentaram altas proporções de polióis e sacarose (figura 2). Glucose e frutose foram encontradas em baixas concentrações nessas sementes, principalmente nos eixos, enquanto a rafinose e a estaquiose não foram sequer detectadas nos extratos purificados e cromatografados por HPAEC/PAD. Contudo, após o armazenamento dessas sementes por 90 dias em todas as temperaturas houve aumento nas proporções dos polióis nos cotilédones

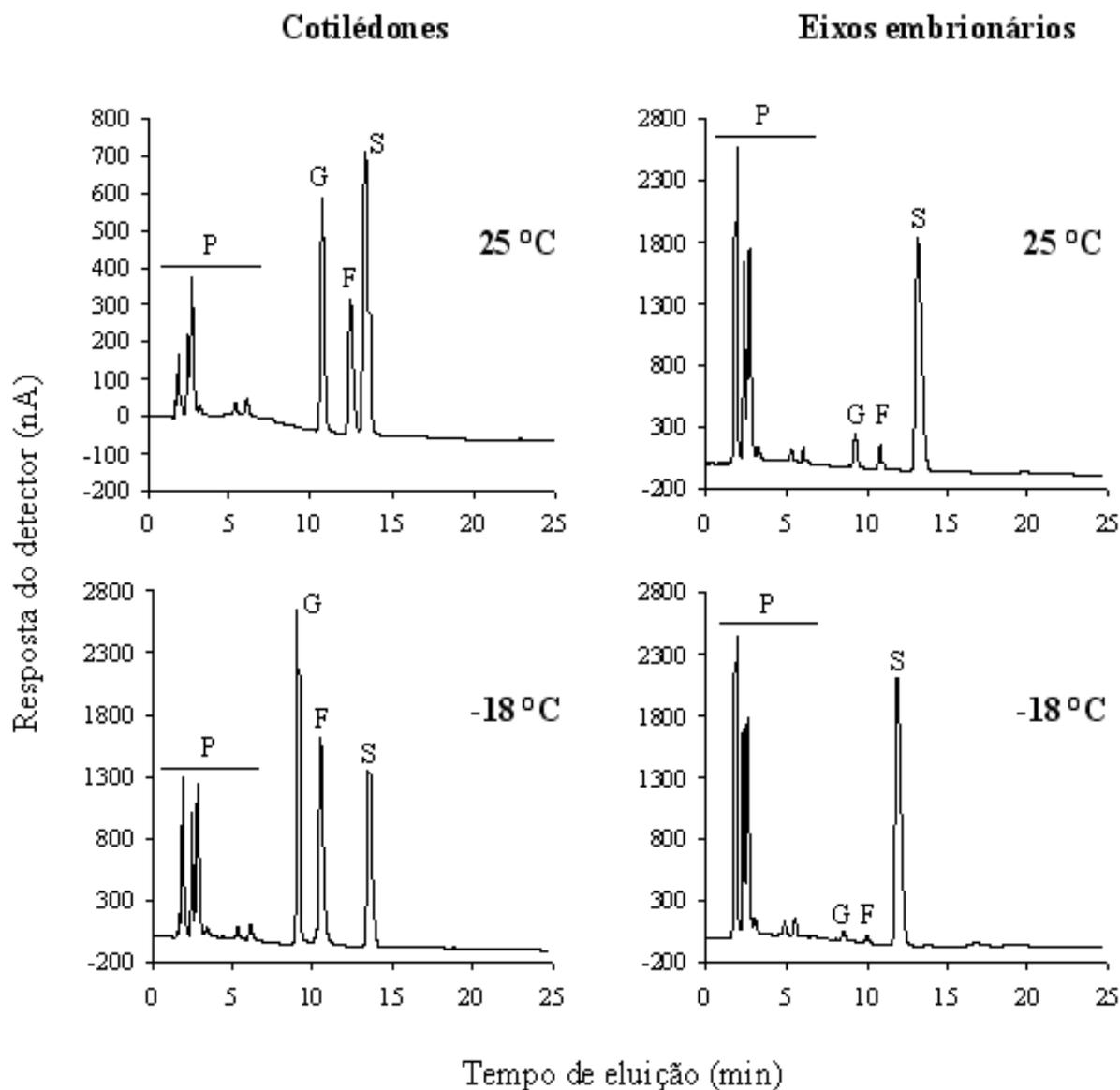


Figura 4. Perfil dos carboidratos solúveis em HPAEC/PAD de cotilédones e eixos embrionários de sementes recém-dispersas de *Caesalpinia echinata* após armazenamento por 90 dias sob diferentes condições térmicas. P = polióis, G = glucose, F = frutose, S = sacarose.

e nos eixos embrionários (figura 4). Adicionalmente, foi observado um aumento expressivo nas proporções de glucose e frutose nos cotilédones das sementes armazenadas a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  (tabela 4), sugerindo que o metabolismo dos principais carboidratos de reserva dessas sementes é afetado pela temperatura.

O mecanismo molecular preciso de conversão do amido a açúcares solúveis e a relação com o desenvolvimento da tolerância ao congelamento por meio dessas alterações metabólicas ainda não estão plenamente esclarecidos. Yano *et al.* (2005) mostraram que em plantas de *Arabidopsis* o gene

*starch excess 1 (sex 1)* tem papel fundamental na degradação do amido, no acúmulo de açúcares e na tolerância ao congelamento dessas plantas, evidenciando a associação desses processos.

Os resultados obtidos no presente trabalho sugerem que as variações observadas nos carboidratos de reserva poderiam ser dependentes também de outros fatores que afetam a integridade dos tecidos embrionários, incluindo o grau de maturidade e a proximidade do estágio fisiológico que caracteriza a germinação das sementes já dispersas. Como se sabe, esses processos são profundamente influenciados pela umidade e pela temperatura.

Tabela 4. Quantificação (% do total de carboidratos) de sacarose, glicose e frutose nos cotilédones e no eixo embrionário de sementes não-dispersas (ND) e recém-dispersas (RD) de *Caesalpinia echinata* antes do armazenamento (T0) e após armazenamento por 90 dias a 25 °C e -18 °C.

Carboidratos (%)	ND			RD		
	T0	25 °C	-18 °C	T0	25 °C	-18 °C
<i>cotilédones</i>						
Sacarose	88,0	96,8	90,1	94,0	94,0	71,1
Glucose	4,8	0,7	4,8	1,7	0,4	14,2
Frutose	2,8	0,4	2,8	1,0	0,2	7,9
<i>eixo embrionário</i>						
Sacarose	95,1	95,4	91,8	94,7	90,1	89,5
Glucose	1,4	0,3	2,1	0,3	1,9	0,3
Frutose	0,8	0,1	1,2	0,2	1,0	0,2

De acordo com Buitink & Leprince (2004), a identificação de cada componente citoplasmático que poderia contribuir para o estado vítreo perfeito nos sistemas biológicos é um dos grandes desafios científicos nessa área do conhecimento. Contudo, somente a formação do estado vítreo não é suficiente para manter a estabilidade celular e conseqüentemente a longevidade de sementes ortodoxas no estado desidratado. Interações macromoleculares e metabólicas entre carboidratos, lipídios e proteínas, que podem ser afetados pela temperatura, estariam entre as possíveis causas da integridade estrutural e fisiológica das sementes de pau-brasil durante o armazenamento. Conforme observado no presente trabalho, as variações no teor de carboidratos solúveis totais das sementes de *C. echinata* não foram influenciadas pela redução da temperatura de armazenamento. Dessa forma, evidencia-se a necessidade de quantificação de outros compostos de reserva, como lipídios e proteínas e de suas possíveis interações com os carboidratos dessas sementes durante o armazenamento em diferentes temperaturas.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processos 2000/06422-4 e 2005/04139-7) pelo apoio financeiro ao projeto; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de mestrado concedida a M. E. Hellmann; ao Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelas bolsas de mestrado concedida a J. I. O. Mello, de produtividade científica concedidas a R.C. L. Figueiredo-Ribeiro e C. J. Barbedo e de apoio técnico concedida a Mary Pereira Monteiro. Agradecemos

também aos funcionários de Reserva Biológica e Estação Experimental de Moji-Guaçu, pelo auxílio nas coletas das sementes.

### Literatura citada

- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil). *Revista Brasileira de Botânica* 25: 431-439.
- Bernal-Lugo, I. & Leopold, A.C.** 1992. Changes in soluble carbohydrates during storage. *Plant Physiology* 98:1207-1210.
- Borges, I.F., Giudice, J.D., Bilia, D.A.C., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2005. Maturation of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered Leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 48: 851-861.
- Borges, I.F., Barbedo, C.J., Richter, A.A. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2006. Variations in sugars and cyclitols during development and maturation of seeds of brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae). *Brazilian Journal of Plant Physiology* 18: 475-482.
- Buitink, J. & Leprince, O.** 2004. Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. *Cryobiology* 48: 215-228.
- Carvalho, N.M. & Nakagawa, J.** 2000. Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4 ed. Jaboticabal, Funep.
- Castilho, E.M., Lumen B.O.D., Reyers, P.S. & Lumen, H.Z.D.** 1990. Raffinose synthase and galactinol synthase in developing seeds and leaves of legumes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38: 351-355.
- Castro, R.D., Bradford, K.J. & Hilhorst, H.M.** 2004. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. *In*: A.G. Ferreira & F. Borghetti (orgs.). *Germinação: do básico ao aplicado*. Porto Alegre, Artmed, pp. 51-67.

- Dubois, N., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. & Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356.
- Garcia, I.S., Souza, A., Barbedo, C.J., Dietrich, S.M.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2006. Changes in soluble carbohydrates during storage of seeds of *Caesalpinia echinata* Lam. (Brazilwood), an endangered leguminous tree from the Brazilian Atlantic Forest. *Brazilian Journal of Biology* 66 (2B): 739-745.
- Gomes, F.P.** 1982. Curso de estatística experimental. 10<sup>a</sup> ed. Nobel, Piracicaba.
- Hellmann, M.E., Mello, J.I.O., Figueiredo-Ribeiro, R.C.L. & Barbedo, C.J.** 2006. Tolerância ao congelamento de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam.) influenciada pelo teor de água inicial. *Revista Brasileira de Botânica* 29: 93-101.
- Hisano, H., Kanazawa, A., Kawakami A., Yoshida M., Shimamoto, Y. & Yamada, T.** 2004. Transgenic perennial ryegrass plants expressing wheat fructosyltransferase genes accumulate increased amounts of fructan and acquire increased tolerance on a cellular level to freezing. *Plant Science* 167: 861-868.
- Ista** (International Seed Testing Association). 1996. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology* 24 (supplement): 1-335.
- Itaya, N.M., Buckeridge, M.S. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 1997. Biosynthesis *in vitro* of high molecular mass fructan by cell-free extracts from tuberous roots of *Viguiera discolor* (Asteraceae). *New Phytologist* 136: 53-60.
- Kumar, A. & Bhatla, S.C.** 2006. Polypeptide markers for low temperature stress during seed germination in sunflower. *Biologia Plantarum* 50: 81-86.
- Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H. & Crowe, L.M.** 1995. Threose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied Environmental Microbiology* 61: 3592-3597.
- Lin, T.P. & Huang, N.H.** 1994. The relationship between carbohydrate composition of some tree seeds and their longevity. *Journal of Experimental Botany* 278: 1289-1294.
- Mello, J.I.O. & Barbedo, C.J.** 2007. Temperatura, luz e substrato para germinação de sementes de pau-brasil (*Caesalpinia echinata* Lam., Leguminosae - Caesalpinioideae). *Revista Árvore* 31: 645-655.
- Parvanova, D., Ivanov, S., Konstantinova, T., Karanov, E., Atanassov, A., Tsvetkov, T., Alexieva & Djilianov, D.** 2004. Transgenic tobacco plants accumulating osmolytes show reduced oxidative damage under freezing stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 57-63.
- Pritchard, H.W., Tompsett, P.B., Manger, K.M. & Smidt, W.J.** 1995. The effect of moisture content on the low temperature responses of *Araucaria hunsteinii* seed and embryos. *Annals of Botany* 76: 79-88.
- Steadman, K.J., Pritchard, H.W. & Dey, P.M.** 1996. Tissue-specific soluble sugars in seeds as indicators of storage category. *Annals of Botany* 77: 667-674.
- Teixeira, S.P., Carmello-Guerreiro, S.M. & Machado, S.R.** 2004. Fruit and seed ontogeny related to the seed behaviour of two tropical species of *Caesalpinia* (Leguminosae). *Botanical Journal of Linnean Society* 146: 57-70.
- Uemura, M. & Steponkus, P.L.** 2003. Modification of the intracellular sugar content alters the incidence of freeze-induced membrane lesions of protoplasts isolated from *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant, Cell and Environment* 26: 1083-1096.
- Vertucci, C.W. & Farrant, J.M.** 1995. Acquisition and loss of desiccation tolerance. *In: J. Kiegel & G. Galili* (eds.). *Seed development and germination*. Marcel Dekker, New York, pp. 237-271.
- Waghorn, J.J., Pozo, T., Acevedo, E.A. & Cardemil, L.A.** 2003. The role of two isoenzymes of alfa-amylase of *Araucaria araucana* (Araucariaceae) on the digestion of starch granules during germination. *Journal of Experimental Botany* 54: 901-91.
- Yano, R., Nakamura, M., Yoneyama, T. & Nishida, I.** 2005. Starch-related  $\alpha$ -glucan/water dikinase is involved in the cold-induced development of freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 138: 837-846.