



**HEBE MARIANE FREIRE FERREIRA**

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E  
BIOQUÍMICO DE SEMENTES DE GIRASSOL  
SUBMETIDAS AO ARMAZENAMENTO  
CONVENCIONAL E CÂMARA FRIA**

**LAVRAS - MG**

**2016**

**HEBE MARIANE FREIRE FERREIRA**

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE SEMENTES  
DE GIRASSOL SUBMETIDAS AO ARMAZENAMENTO  
CONVENCIONAL E CÂMARA FRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Édila Vilela de Resende Von Pinho

Coorientadora

Dra. Heloisa Oliveira dos Santos

**LAVRAS - MG**

**2016**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Ferreira, Hebe Mariane Freire.

Comportamento fisiológico e bioquímico de sementes de girassol submetidas ao armazenamento convencional e câmara fria / Hebe Mariane Freire Ferreira. – Lavras: UFLA, 2016.

61 p.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Édila Vilela de Resende Von Pinho.

Bibliografia.

1. Híbridos. 2. Ambientes. 3. Armazenamento. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**HEBE MARIANE FREIRE FERREIRA**

**COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE SEMENTES  
DE GIRASSOL SUBMETIDAS AO ARMAZENAMENTO  
CONVENCIONAL E CÂMARA FRIA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 18 de dezembro de 2015.

Dr. Antonio Rodrigues Vieira

EPAMIG

Dra. Heloisa Oliveira dos Santos

UFLA

Dra. Édila Vilela Resende Von Pinho

Orientadora

**LAVRAS - MG**

**2016**

Dedico ao meu pai, que apesar não ter dado tempo de ver esta minha conquista, tenho certeza que de onde estiver está orgulhoso. Porque ele também tinha este sonho, mas não o conquistou. Faça isso por você!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Lavras (UFLA), pela oportunidade. Ao ofertar a vaga no Programa de Biotecnologia Vegetal pude realizar este sonho de me tornar Mestre em Biotecnologia Vegetal.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Édila Vilela Resende Von Pinho e coorientadora Heloisa Oliveira dos Santos, pela liberdade e confiança referente ao presente trabalho, além da indiscutível amizade e compreensão em momentos difíceis.

Agradeço ao Programa de Biotecnologia Vegetal o qual participei, por viabilizar o meu curso de mestrado. Agradeço também a empresa de Fomento CAPES que financiou meu trabalho durante todo o período de mestrado.

Agradeço ao Grupo de estudos do Laboratório G-Óleo e as demais empresas de fomento colaboradoras, FAPEMIG, CNPQ e FINEP que colaboram com material e equipamentos para realização de parte do trabalho em seus respectivos laboratórios.

Agradeço a todos os amigos e funcionários do Laboratório de Sementes da UFLA, pelo enorme aprendizado, apoio e carinho. Durante estes dois anos de convivência percebi que o aprendizado é uma construção diária cujo ingrediente principal é o afeto. A esta rede de apoio que me acolheu, os meus mais sinceros agradecimentos.

Agradeço de forma especial à Verônica, à Aline, ao Rucyan, à Raquel e todos aqueles que colaboraram e estiveram ao meu lado em momentos cruciais da elaboração dos resultados desta dissertação.

Agradeço aos meus colegas de mestrado da UFLA, em especial a Mirelly Alves que me ajudou a sustentar toda a caminhada e me deu forças para não desistir. Sinto que nós percorremos este caminho juntas, nos complementando e nos fortalecendo. Obrigada pela rica troca e cumplicidade.

Sinto-me privilegiada por fazer parte dessa construção, que desafia os meus limites rasos e me renova. Obrigada pela alegria que me proporcionaram.

Possuir amigos e tutores que pensam de formas tão distintas, enriqueceu significativamente a minha formação. Agradeço a enorme diversidade que me rodeia que, apesar de me desorientar às vezes, me ajuda a captar diferentes olhares sobre a mesma realidade.

Agradeço a minha pequena grande família por tudo. Deixei vocês por último, porque sempre deixo o melhor para o final, e vocês são o melhor da minha vida.

Agradeço ao meu marido Thiago, e que durante todo o Mestrado foi meu namorado, tornou-se meu noivo e por fim meu marido. Você foi simplesmente essencial.

Agradeço em especial minha mãe, minha avó e meu irmão Glauber, vocês são minha fortaleza, meus pilares, minha fonte de carinho.

Obrigada por vocês quatro aguentarem meu mau humor matinal, minhas reclamações (a respeito da dissertação) e a bagunça dos meus livros e resumos que se espalharam pela casa toda.

Não encontro palavras suficientes para agradecer, simplesmente fico completamente envolvida por um enorme sentimento: gratidão. Muito obrigada!

## RESUMO

A cultura do girassol é estratégica, principalmente como cultivo de rotação em épocas de safrinha e para o desenvolvimento da indústria de óleo. A cultura tem expressão em algumas regiões do país, principalmente na região Centro-Oeste, sendo que o uso de sementes de alta qualidade é fundamental para a garantia de altas produtividades. Principalmente devido às características bioquímicas das sementes há a necessidade de armazenar as sementes sob condições favoráveis para a manutenção da qualidade das mesmas até a semeadura. Neste estudo foram avaliadas sementes de girassol de dois híbridos comerciais, Helio 250 e Helio 251, que foram submetidas ao armazenamento em dois ambientes. As sementes foram armazenadas por período de 8 meses em armazém convencional e câmara fria. A qualidade das sementes foi avaliada aos 0, 2, 4, 6 e 8 meses de armazenamento, por meio dos testes de germinação, índice de velocidade de germinação, envelhecimento acelerado, teste de emergência (I.V.E.), índice de emergência e teor de água. Também foram avaliadas a expressão de proteínas por eletroforese e a composição química das sementes em cada período de armazenamento. O armazenamento em câmara fria é mais eficiente para a conservação da qualidade de sementes de girassol. Alterações da qualidade de sementes de girassol podem ser detectadas pelas análises enzimáticas, a exceção da glutatona peroxidase. Alto teor de ácidos graxos oleicos não influencia na qualidade de sementes de girassol. A proporção de ácidos graxos é alterada após o armazenamento.

Palavras-chave: Híbridos. Ambientes e armazenamento. Girassol.

## ABSTRACT

The sunflower cultivation is strategic mainly as crop rotation on off-season periods and for the development of industrial oil. The culture is important in some regions, especially in the Midwest, and the use of high quality seeds is essential for ensuring high productivity. Mainly due to biochemical features, there is the need to store the seeds under favorable conditions in order to maintain their quality until sowing. This study included sunflower seeds of two commercial hybrids, Helio 250 and Helio 251, which were subjected to storage in both environments. Seeds were stored for a period of eight months in the conventional storage and freezer. Seed quality was evaluated at 0, 2, 4, 6 and 8 months of storage, through germination, speed of germination index, accelerated aging, emergency test (IVE), emergence index and water content. It was assessed the expression of proteins by electrophoresis and chemical composition of the seeds in each storage period. The freezer storage is more efficient for the conservation of sunflower seed quality. Changes in sunflower seed quality can be detected by enzyme analysis, except for the glutathione peroxidase. High content of oleic fatty acid does not influence the quality of sunflower seeds. The proportion of fatty acids is changed after storage.

Keywords: Hybrids. Storage environments. Sunflower.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>A cultura do Girassol</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Mercado e armazenamento de sementes</b> .....	16
<b>2.3</b>	<b>Deterioração de sementes e expressão de proteínas</b> .....	19
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	56
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

Entre as oleaginosas, a cultura do girassol tem se tornado uma opção interessante para o agronegócio brasileiro, seja devido aos seus produtos ou coprodutos. Esta cultura tem sido cultivada em rotação na época de safrinha, como cultura sucessora ao milho e soja em várias regiões do Brasil, principalmente na região Centro-Oeste.

Na indústria de alimentos, o girassol é fonte de proteína, podendo ser utilizado na alimentação animal de forma direta, como silagem, ou na composição de rações.

O cultivo de girassol, também, tem aumentado nos últimos anos para atender à demanda de óleo para uso doméstico e mais recentemente como alternativa de biodiesel. Mais da metade da produção de grãos destina-se à produção de óleo. Cultivares que apresentam grãos com altos teores de óleo têm sido desenvolvidos para atender à indústria de óleo.

Sementes de girassol possuem, em média 47,3% de lipídios, 24% de proteínas, 19,9% de carboidratos e 4% de cinzas, considerando o teor de água médio de 5%. Sabe-se que as sementes oleaginosas são mais susceptíveis à deterioração, principalmente durante o armazenamento, em função das oxidações que ocorrem em ácidos graxos insaturados. Em sementes de girassol, considerando o teor total de lipídeos, 23,1% são de ácidos graxos monoinsaturados como o ácido palmitoleico, ácido oleico e ácido gadoleico, 65,3% são ácidos graxos poli-insaturados como o ácido linoleico e ácido linolênico.

Com a expansão da área com a cultura de girassol no país observa-se também o desenvolvimento do mercado de sementes. Neste contexto, o controle de qualidade de sementes de girassol é de fundamental importância para a garantia do potencial de produtividade das cultivares desenvolvidas.

O monitoramento da qualidade de sementes de girassol durante o armazenamento é importante para garantir a comercialização de sementes de alta qualidade. O potencial de armazenamento é influenciado pelo genótipo e condições de armazenamento, sendo que, a composição química das sementes influencia sobremaneira no potencial de armazenamento dessas. Diversas empresas têm investido em sistemas de armazenamento com controle da temperatura e umidade relativa do ar para reduzir a deterioração das sementes e consequentemente garantir uma população adequada de plantas no campo.

Desta forma, o objetivo neste trabalho foi estudar a qualidade fisiológica das sementes de girassol sob diferentes condições de armazenamento durante o período de 8 meses. Objetivou-se ainda determinar por meio da técnica de eletroforese a expressão das enzimas álcool desidrogenase, catalase, superóxido dismutase, esterase, malato desidrogenase, piruvato descarboxilase, isocitrato liase, glutamato redutase e glutamato peroxidase, bem como a composição química dessas sementes durante o armazenamento.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 A cultura do Girassol**

A cultura de girassol tem sido considerada de grande importância seja devido aos seus produtos ou coprodutos. Esta cultura vem sendo utilizada em algumas regiões do país em sistema de sucessão de culturas logo após as espécies de verão, tais como a soja e o milho (PAES, 2005).

O girassol pertence à família Asteraceae, que se caracteriza por ser uma dicotiledônea de ciclo anual e possui inflorescência em seu ápice, conhecida como capítulo, cuja forma pode variar de côncavo a convexo e diâmetro de 10 a 40 cm (NOBRE, 2012).

O período de florescimento oscila entre 10 e 15 dias e seu ciclo vegetativo varia entre 90 a 130 dias, dependendo do genótipo. As flores das plantas de girassol têm sua classificação determinada pela esterilidade, podendo ser do tipo liguladas ou tubulares. O primeiro tipo possui característica estéril, cor amarela e as flores situam-se na parte externa do capítulo; o segundo tipo possui característica fértil, ocupam todo o centro do capítulo e é limitada pelas flores liguladas. Sua polinização é do tipo cruzada alógama realizada por insetos, geralmente abelhas (CASTRO; FARIAS, 2005). Os frutos são originários de flores férteis, tubulosas e fecundadas, denominados aquênios. Também se caracterizam por serem secos, indeiscentes e compostos pelo pericarpo e endocarpo do fruto (TOMAZELA et al., 2008).

O teor de óleo das sementes varia de 10 a 60%, de acordo com a composição química. As sementes “oleosas” possuem o pericarpo fortemente aderido, representando cerca de 20 a 30% do peso das sementes, com 40 a 60% de lipídios, são menores e economicamente mais importante por ser fonte de óleo, proteína e ter como coproduto o farelo de girassol. As sementes “não

oleosas” são maiores, de coloração preta ou cinza, com presença de listras e pericarpo espesso que representa 40 a 45% do peso, com 25 a 30% de lipídios, e correspondem a cerca de 5% dos genótipos de girassol (BRIGANTE, 2013).

É uma espécie com ampla capacidade de adaptação às condições edafoclimáticas. Por ser uma planta que possui características de resistência tanto ao frio quanto ao calor, ultimamente, sua cultura vem se apresentando como uma opção de rotação e sucessão de culturas nas regiões produtoras de grãos. Em função de suas características favoráveis e adaptáveis ao clima tropical do Brasil, a cultura do girassol tem se expandido para outras regiões. Esta cultura possui maior tolerância à seca, quando comparada ao milho e/ou o sorgo, baixa incidência de pragas e doenças, além de contribuir com a rotação e sucessão às culturas subsequentes (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2014).

É considerada uma planta sul-americana originária do Peru, porém, alguns autores atribuem a sua origem como norte-americana, por existirem pesquisas arqueológicas que revelam o uso do girassol por índios norte-americanos em uma região compreendida entre o Norte do México e o estado de Nebraska, nos Estados Unidos. Na Rússia os primeiros cultivos foram feitos no início do século XIX e no Brasil, as primeiras referências sobre o cultivo foram registradas no início do século XX. Na Europa, há registros de plantio no século XVI e no início do século XVII se expandiu por todo esse continente até chegar à Rússia, onde a cultura foi inicialmente utilizada como ornamental. Em seguida foi utilizada para a produção de óleo, em escala comercial e com rápida expansão, tornando-se um dos países de maior produção de girassol (DALL’AGNOL; VIEIRA; LEITE, 2005).

O mercado mundial de grãos de girassol é dominado pela Ucrânia, Rússia e Argentina. De acordo com o levantamento da CONAB, o maior produtor de grãos de girassol é a Ucrânia, com uma produção para a safra

2014/15 da ordem de 10 milhões de toneladas, seguida da Rússia com 9,5 milhões de toneladas. Foi previsto que para a safra de 2014/2015 a produção mundial de grãos de girassol, foi na ordem de 40,2 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2014).

Embora em menor escala quando comparados à Argentina e aos demais países pioneiros, o Brasil, o Uruguai, o Chile, o Paraguai e a Bolívia são outros países sul-americanos que utilizam o girassol como mais uma opção de cultivo e alternativa para rotação com outras culturas.

O crescimento da produção de girassol nos últimos anos tem como justificativa o seu cultivo não competir com o mercado das outras culturas. A partir do ano de 2000, no Brasil, houve um importante impulso da cultura de girassol, sendo que a produção de grãos para silagem foi consolidada no início deste período. Em 2005, foi lançado oficialmente pelo Governo Federal o PNPB – Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, criado pela lei 11.097/2005, possuindo como uma das diretrizes a produção de biodiesel a partir de diferentes fontes oleaginosas. Esta ação fortaleceu as potencialidades regionais para a produção de matéria-prima, como por exemplo, o girassol. A partir de então com os incentivos para a produção nacional de Biodiesel houve estímulos para a produção de girassol em pequenas, médias e grandes propriedades agrícolas em diferentes regiões do Brasil. Entre 2008 e 2009 os primeiros híbridos de girassol “alto oleico (AO)” foram lançados e novas oportunidades de negócios entre a classe produtora de grãos e a agroindústria de alimentos foram realizadas por meio de contratos específicos de produção de grãos com alto teor de óleo. A partir de 2009, até os dias atuais, foi observado crescimento na atividade de produção de girassol alto oleico (PERSON, 2012).

Os grãos de girassol são utilizados para obter coprodutos como por exemplo o farelo, que contém em sua composição cerca de 50% de proteínas após extração do óleo com solvente orgânico (PESTANA et al., 2012).

Além da obtenção de produtos proteicos, o cultivo aumentou significativamente nos últimos anos visando atender à demanda do mercado de óleo para uso doméstico e mais recentemente, como alternativa de biodiesel. Mais da metade da produção de grãos de girassol é destinada para a obtenção de óleo. O óleo de girassol contribui com cerca de 8% da produção de óleo vegetal do total produzido em nível mundial, perdendo somente para o óleo derivado da soja e canola. Na indústria de alimentos, é fonte de proteínas, podendo ser utilizado na alimentação animal de forma direta, como silagem, ou na composição de rações. As indústrias brasileiras que produzem derivados do girassol são formadas por um pequeno número de médias e grandes indústrias localizadas, sobretudo, nos estados de Goiás, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. São indústrias que processam o girassol visando, basicamente, atender às demandas alimentares ou mesmo domésticas da população brasileira, principalmente o óleo. Além dessas empresas, existem no Brasil, diversas pequenas indústrias, que estão processando o óleo do girassol para utilização do mesmo como biocombustível (PESTANA et al., 2012).

Na indústria farmacêutica o óleo de girassol é muito utilizado na produção de cosméticos. As indústrias de cosméticos produzem o óleo de girassol com a proposta de utilizá-lo como emoliente, reepitelizante e estimulante na cicatrização, tendo como referência a permeabilidade da água, indicadora das trocas que ocorrem nas integridades das membranas das células da pele. É um tipo de óleo rico em vitaminas A, C, D e E. Uma das doenças tratadas e prevenidas com o uso de óleo de girassol é a úlcera de decúbito, ou popularmente conhecida como escara, uma doença que ocorre em grande escala em pacientes acamados. Com o tratamento desta doença foi comprovado, por meio de pesquisas, que o óleo de girassol por conter, principalmente, ácido oleico e ácido linoleico, diminui significativamente a permeabilidade da pele à água e na pele danificada o óleo é eficaz também, porque reduz o fluxo da água

para a pele intacta. Em recém-nascidos pode também ser utilizado para se evitar possíveis infecções da pele. O óleo de girassol é comercializado pela indústria farmacêutica na forma líquida, como por exemplo para base de massagem e cicatrização, como um componente de emulsões, sabão e entre outras utilidades. Para tratamento, em geral, recomenda-se formulações destinadas ao tratamento de pele seca, desgastada e envelhecimento de peles danificadas (GHONAIM et al., 2014).

## **2.2 Mercado e armazenamento de sementes**

Com a expansão da área plantada com girassol há demanda crescente por sementes com alta qualidade e que possuam características de interesse do produtor de grãos e da indústria. No entanto, grande parte das sementes comercializadas no Brasil, vem sendo objeto da importação de países vizinhos como a Argentina. De acordo com a Associação Brasileira de Sementes e Mudas - ABRASEM (2014), a taxa de utilização de sementes de girassol no país está em torno de 60%, o que caracteriza ainda a necessidade de investimento pelos produtores de grãos na utilização deste importante insumo. Ainda há poucas empresas no Brasil produzindo sementes com o objetivo de atender este mercado. Mesmo em pequeno número, estas empresas têm investido em tecnologias de produção de sementes e isto tem sido comprovado pelo lançamento de novos híbridos no mercado, com características agrônômicas para atender aos produtores desta cultura.

Para atender à indústria têm sido desenvolvidos cultivares que possuem grãos com alto teor de óleo. Sementes de girassol possuem, em média, 47,3% de lipídios, 24% de proteínas, 19,9% de carboidratos, 4% de cinzas como matéria seca, considerando teor de água de 4,7% (O'BRIEN, 2009). A composição

química das sementes é influenciada pelas condições edafoclimáticas em que a planta se desenvolveu e pelo genótipo (SILVA et al., 2011).

Os carboidratos correspondem a cerca de 20% da composição em sementes de girassol, sendo seus representantes, fibras (carboidratos estruturais) e carboidratos de reserva. Como exemplo de carboidratos o amido se destaca, por ser um material de reserva na produção de lipídeos como triglicerídeos (PESTANA et al., 2012).

As sementes de girassol são ricas em ácido linoleico, o mais conhecido tipo de ácido graxo, substância que não é produzida pelo organismo humano, mas é essencial à vida. Os lipídios presentes são essencialmente constituídos por triacilglicerídeos (98 a 99%) e uma pequena fração de fosfolipídios, tocoferóis, esteróis e ceras; ácidos graxos insaturados (88,4%), reduzido teor de ácido linolênico (0,1-0,4%) e alto teor de ácido linoleico (ômega 6: 64,6 – 71,5%). Os ácidos graxos que compõem o óleo de girassol convencional são: mirístico (0,1%), palmítico (5,8 - 6,6%), palmitoleico (0,1%), esteárico (3,8 - 5,2%), oleico (16,0 - 23,8%), linoleico (64,6 - 71,5%), linolênico (0,1 - 0,4%), araquídico (0,2 - 0,4%), gadoleico (0,1 - 0,3%), behêmico (0,6 - 0,8), lignocérico (0,1%), ácidos graxos saturados (11,6%), ácidos graxos monoinsaturados (23,1%) e ácidos graxos poli-insaturados (65,3%); e óleo alto oleico apresentam 3% de palmítico, 5% esteárico, 9% linoleico e 83% de oleico (ALVES, 2010).

A composição química das sementes influencia no potencial de armazenamento das sementes, característica associada ao genótipo e às condições edafoclimáticas durante a produção. Além disso, o potencial de armazenamento das sementes é influenciado pelas condições ambientais a exemplos da umidade relativa e temperatura.

As sementes de girassol, quando submetidas ao armazenamento, podem sofrer alterações na sua composição química, principalmente em decorrência das insaturações do óleo, principalmente dos ácidos graxos poli-insaturados que

posteriormente poderão se tornar ácidos graxos saturados. Essa transformação se dá devido à oxidação de lipídios promovida pelo processo de deterioração das sementes. A composição dos ácidos graxos é alterada por ação de enzimas lipolíticas que aceleram o processo de deterioração (BRIGANTE, 2013).

As alterações bioquímicas em sementes são responsáveis pela redução da qualidade fisiológica das mesmas. Como já abordado estas alterações variam com o genótipo e condições de armazenamento. Em regiões tropicais, como o Brasil, o armazenamento torna-se mais crítico em função das altas temperaturas e umidade relativa em várias regiões do país.

Entre os objetivos do armazenamento está a função de prolongar ao máximo a qualidade do produto pós-colheita. Reduzir ao máximo as condições que possam provocar alterações bioquímicas e perda de qualidade fisiológica, colabora na redução de aparecimento de fungos devido às condições não favoráveis do crescimento dos mesmos. Quando o armazenamento é bem monitorado observa-se uma melhor resistência das sementes à deterioração, porcentagem de germinação é mais homogênea e diminuição da incidência de plântulas anormais (DELOUCHE; BASKIN, 1973).

Ressalta-se que entre os lotes de sementes da mesma espécie e mesmo cultivar pode ocorrer variabilidade, mesmo que armazenadas em condições de armazenamento similares, porque cada semente possui uma característica específica e isso vai depender do histórico do lote. A qualidade fisiológica inicial é determinante do potencial de armazenamento de diferentes lotes de uma mesma espécie, já que os lotes de sementes com mesma capacidade de germinação durante o armazenamento podem sofrer alterações resultando diferentes capacidades germinativas (OLIVEIRA; RANAL, 2010).

Em sementes oleagionosas, o teor de lipídios é a principal característica que afeta o armazenamento quando este é realizado em condições inadequadas. A peroxidação de lipídeos é uma das causas mais frequentes de deterioração e

perda da viabilidade das sementes. Muitas vezes isto ocorre pela atividade do oxigênio em ácidos graxos poli-insaturados presentes nas membranas das sementes, o que afeta a qualidade dos coprodutos (ABREU et al., 2013).

Os lipídios são moléculas consideradas importantes para a sobrevivência da semente. Sua composição é baseada na associação de ácidos graxos e álcool (glicerol), que tem início entre 20 e 70 dias após a fertilização, sendo influenciado pela temperatura. Os lipídios são considerados fontes de energia mais eficientes que os carboidratos durante o processo de germinação. Além disso, podem ter função estrutural e função reserva.

Entre os lipídios encontrados em sementes oleaginosas estão os ácidos graxos saturados e insaturados. Os ácidos graxos saturados são moléculas mais simples e mais fáceis de serem quebradas pelo organismo, sendo assim o tipo mais comum encontrado é o ácido palmítico. Os ácidos graxos insaturados possuem a molécula mais complexa e são mais difíceis de serem quebrados. É mais comum de ser encontrado em sementes oleaginosas, principalmente nas formas monoinsaturado e poli-insaturado, tendo como representantes o ácido oleico e ácido linoleico (MARCOS FILHO, 2015).

De modo geral, os lipídios podem representar de 2% até mais de 50% da massa seca de sementes. Os lipídios na sua forma de fosfolipídios constituem a membrana das células, e é ela que sofre com a deterioração, devido à hidrólise de lipídios de reserva para ação enzimática, à peroxidação e à autoxidação.

### **2.3 Deterioração de sementes e expressão de proteínas**

Durante o processo de deterioração das sementes pode ocorrer desnaturação de biomoléculas e acúmulo de toxinas, intimamente ligados à queda da integridade das membranas celulares. Destaca-se que o início da deterioração das sementes está relacionado à atividade das enzimas associadas à

biossíntese de novos tecidos. Sendo assim, o monitoramento das alterações bioquímicas advindas da deterioração é correlacionado às variações dos perfis de enzimas específicas do processo respiratório, peroxidação de lipídios e remoção de radicais livres (TIMÓTEO, 2011).

As enzimas, como substâncias orgânicas de natureza proteica, são importantes na deterioração das sementes e suas atividades são um dos indicadores da perda de qualidade da semente. Estão relacionadas ao processo de respiração, peroxidação lipídica e remoção de radicais livres (BRANDÃO JÚNIOR, 1996).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão relacionadas com o desenvolvimento e a existência do organismo vivo. Elas são responsáveis pelo dano oxidativo em biomoléculas, como o ácido desoxirribonucleico (DNA), carboidratos, lipídios e proteínas. As plantas possuem autodefesa contra estas EROs, porém em condições de estresse pode haver um aumento na sua formação que está associado à queda da defesa vegetal. Isso faz com que cause uma resposta a este dano, acelerando os processos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O acúmulo de radicais livres se dá pela falta de efetividade dos sistemas removedores presentes em organismos desidratados (ALSCHER; ERTURK; HEALTH, 2002).

A superóxido dismutase (SOD) constitui a primeira linha de defesa contra EROs, ou seja, é uma enzima que atua contra formas reativas de oxigênio, além de anular a ação dos superóxidos ( $O_2^-$ ), catalisando reações de transferência de dois elétrons para produzir peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (MC DONALD, 1999). Sua principal função é transformar o superóxido em peróxido de hidrogênio, que possui compostos muito menos reativos. O acúmulo de peróxido, quando presente em excesso, pode ter efeito tóxico à semente (BRIGANTE, 2013). No entanto, a atividade isolada de SOD é pouco funcional

na proteção da semente, sendo necessária a formação de um sistema removedor de radicais livres conjuntamente, como por exemplo, a catalase.

A catalase (CAT) é uma enzima comumente encontrada nos organismos, presente nos peroxissomas. São catalisadoras do peróxido de hidrogênio produzido em condições de estresse, convertendo-o em água e molécula de oxigênio livre, sem que ao final sejam produzidos radicais livres (MALLICK; MOHN, 2000). É uma enzima tetramérica que forma heterotetrâmeros entre as variações de CAT-1 e CAT-2, além de ser utilizada como sistema modelo para estudo da regulação gênica durante o desenvolvimento. A redução na atividade desta enzima pode propiciar o acúmulo de  $H_2O_2$  em sementes (McMILLIN, 1983).

A atividade das enzimas é também monitorada pela respiração das células, principalmente quando atuam no metabolismo de reserva. As enzimas álcool desidrogenase (ADH) e malato desidrogenase (MDH) têm sua atividade ligada ao processo de respiração (TIMÓTEO, 2011).

A enzima MDH é uma enzima que participa das rotas aeróbicas da respiração. É responsável pela biossíntese da rota de malato oxaloacetato pela interconversão do malato para oxaloacetato, durante o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Ciclo de Krebs) em plantas. Parte do processo é caracterizado pela fixação do  $CO_2$  nas plantas e movimentação do malato pela membrana mitocondrial. Assim, MDH possui importantes funções biossintéticas como síntese de aminoácidos, gluconeogênese, manutenção dos potenciais redox e intercâmbio de metabólitos entre o citoplasma e as organelas. É esperado que sua atividade seja intensa nos primeiros estádios do processo de germinação em que a síntese de novos tecidos da semente requer mais energia para o crescimento (MALONE et al., 2007).

Na respiração anaeróbica são produzidos compostos voláteis, como por exemplo, o acetaldeído um composto que provoca danos, independentemente da

umidade relativa do ar ou da temperatura de armazenamento. Já o etanol causa deterioração somente em condições de umidade relativa do ar alta. A enzima álcool desidrogenase (ADH) é pertencente à rota anaeróbica da respiração, sendo de vital função durante o ciclo da glicose em condições anaeróbicas. O NAD<sup>+</sup> é reciclado a partir de então, o piruvato por ação da piruvato descarboxilase é convertido em acetaldeído, que conseqüentemente será reduzido a etanol. A acumulação de etanol envolve a oxidação de NADH e produz pequenas quantidades de ATP, molécula fundamental para a sobrevivência de várias espécies sob condições de anóxia. É também uma opção para detecção de eventos deletérios em sementes (SALGADO, 2001).

A glutathione peroxidase (GPX) é uma enzima de tipo peroxidase não heme, do grupo das tiol peroxidases, que são responsáveis por catalisar a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em ação conjunta a glutathione reductase, formando assim a glutathione oxidada (GSSG) e água ou álcoois, o que atua sua toxicidade (ROUHIER; JACQUOUT, 2005). A GPX é uma molécula que nas plantas possui selenocisteína no seu sítio ativo, ao contrário do que ocorre nos homólogos animais que possuem a cisteína. É um tetrâmero de glutamato contendo um selênio por subunidade. Sua atividade, mesmo presente em mitocôndrias, é maior no citoplasma das células. Não são dependentes da glutathione (GSH), mas sim da tioredoxina como doador de elétrons. Sua presença em plantas já foi relatada por diversos autores, porém seu papel individual em espécie de planta ainda não foi caracterizado (FONINI, 2010).

A glutathione (GSH) é um componente tiol de maior abundância em plantas, pois possui inúmeras atividades contra o estresse oxidativo, incluindo a poluição do ar, calor, frio e seca. É um antioxidante e possui participação na síntese de fitoquelatinas (PCs). Sua presença é a primeira defesa da tolerância contra a exposição ao cádmio, um metal pesado. Em estudos realizados com

girassol, a planta foi submetida ao tratamento de cádmio para avaliar sua tolerância ao metal pesado, observou-se que o nível de GSH diminuiu e que houve uma indução de PCs, 3 dias após o início do tratamento (GALLEGO; BENAVIDES; TOMARO, 1996).

Ao promover a remoção do peróxido de hidrogênio no cloroplasto, a GSH deve estar em sua forma reduzida. Essa oxi-redução da glutathiona GSSG a GSH é catalisada pela glutathiona redutase (GR), na presença de NADPH. Desta forma, para manter a razão dos níveis de GSH e GSSG nos cloroplastos, a GR tem papel importante na proteção dos mesmos. Essa enzima é composta por um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons, responsável pela catalização da redução dependente de NADPH da GSSG para glutathiona reduzida. Sua atividade tem sido avaliada em trabalhos a respeito de diferentes fatores de estresses (CARDOSO, 2000).

Sob o efeito de estresse hídrico em arroz, Boo e Jung (1999), concluíram que houve uma diminuição de várias enzimas enquanto a atividade de GR aumentou, sugerindo que este aumento seria uma resposta de defesa da planta ao estresse hídrico. Shalata e Tal (1998) observaram em sementes de tomate o efeito do estresse salino, onde foi identificado aumento na atividade de GR, segundo estes autores o efeito é provocado pela alta concentração de GSH.

A isocitrato liase é uma enzima de regulação do ciclo do glioxilato. Em sementes de soja as enzimas isocitrato liase e malato-sintase estão envolvidas no metabolismo de lipídios armazenados. Durante a germinação, a atividade desta enzima é mais expressiva, podendo então ser mais passível de identificação. Nesta etapa obtém-se valores máximos, na proporção de lipídios degradados e na síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994). Após o início da germinação, esta enzima é processada novamente e neste ciclo os lipídios insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis (sacarose), que

podem se deslocar para os meristemas radiculares e apicais (MARTINS et al., 2000).

A esterase é uma isoenzima que possui o seu sistema constituído por um complexo e heterogêneo grupo de enzimas reativas que possuem substratos específicos. Suas formas são variáveis, e em plantas, por exemplo, são encontradas geralmente forma monomérica ou dimérica, com alto nível de variabilidade. Devido a esta característica, a esterase é um dos sistemas isoenzimáticos mais polimórficos em plantas. Atua em reações de hidrólise de ésteres e, portanto, atua diretamente no metabolismo de lipídios (MERTZ et al., 2009).

As reações metabólicas da respiração são divididas em três estágios, sendo estes a glicólise, o Ciclo do Ácido Carboxílico (ou Ciclo de Krebs) e a Cadeia de transporte de elétrons. No ciclo do ácido tricarboxílico, que ocorre na membrana mitocondrial, o piruvato é oxidado em  $\text{CO}_2$  e a capacidade de realizar redução é ativada. O ciclo corresponde à etapa final da oxidação de energia metabólica, além disso o ciclo origina unidades monoméricas para biossíntese de carboidratos, lipídios e aminoácidos não essenciais. São oito reações sucessivas que o compõe, em que substratos orgânicos são oxidados para formar  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  e coenzimas reduzidas NADH e  $\text{FADH}_2$  (CAMPBELL, 2000).

O piruvato é um produto da via glicolítica que é convertido a Acetil CoA, um substrato para o ciclo de Krebs. É encontrado na matriz mitocondrial e sob condições aeróbicas é convertido em  $\text{CO}_2$  e em um fragmento de dois carbonos, a Acetil CoA em reação de descarboxilação oxidativa. Esta reação é catalisada pelo complexo de enzimas piruvato desidrogenase, sendo estas enzimas de três tipos distintos: Enzima piruvato desidrogenase (E1), a Diidrolipoil diidrolipoamida acetiltransferase (E2), diidrolipoamida desidrogenase (E3), que ainda possuem suas atividades associadas a outras cinco diferentes coenzimas: pirofosfato de tiamina (TPP) para descarboxilação

oxidativa do piruvato; o grupo prostético lipoamida (ácido lipoico) que regenera o TPP e oxida o grupo hidroetil em acetil; E2 transfere o grupo acetil para a coenzima A; regeneração do complexo piruvato desidrogenase, E2 é reduzida pela flavina adenina dinucleotídeo (FAD) na presença de E3 com regeneração de lipoato; FADH<sub>2</sub> é reoxidada transferindo elétrons para NAD<sup>+</sup> formando NADH. Por fim, soma-se um total de 2 piruvatos formados pela glicólise e são sintetizadas 5 moléculas de ATP para cada molécula de glicose (MOTTA, 2009).

Os níveis de lisina nas sementes de girassol são baixos, porém o teor de proteínas totais supera esta perda e o girassol apresenta uma relação inversa entre os conteúdos de óleo e de proteína desde que a proporção de casca permaneça constante. As proteínas que correspondem a cerca de 24% do obtido em sementes são constituídas por albuminas (17-23%), globulinas (55-60%), glutelinas (11-17%) e prolaminas (1-4%), de acordo com Mandarino (1992). As proteínas, enzimas e isoenzimas têm sido também utilizadas como marcadores do potencial fisiológico das sementes. E por meio deste fato tem sido possível elucidar a causa da deterioração das sementes.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório Central de Sementes do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Minas Gerais. Foram utilizadas sementes de dois híbridos de girassol (Helio 250; Helio 251), produzidas sob as mesmas condições edafoclimáticas pela empresa Heliagro Agricultura e Pecuária LTDA., Araguari/MG. São sementes oleaginosas que se diferem de acordo com o percentual de lipídeo que possuem e são consideradas como híbridos simples. De acordo com o fornecedor, o híbrido Helio 250 possui maior percentual de lipídeo, que varia de 44-48%. Já o híbrido Helio 251 possui percentual que varia de 40-44%.

As sementes foram produzidas na safra 2013, na região de Tupaciguara/MG, altitude média de 760m. A semeadura ocorreu em maio e a colheita em outubro de 2013.

Para cada híbrido foi avaliada a qualidade inicial das sementes por meio dos testes de: germinação, envelhecimento acelerado, índice de emergência e teor de água. Na sequência as sementes das duas cultivares foram acondicionadas em embalagens multifoliadas, e armazenadas por um período de 8 meses em armazém convencional (25 °C e 60% U.R.) e em câmara fria e seca ( $\pm 10$  °C e 55 UR). Os ambientes de armazenamento foram controlados por um termohigrógrafo.

Aos 2, 4, 6 e 8 meses, além da avaliação da qualidade fisiológica das sementes, foi realizada a análise proteômica e a determinação da composição química destas sementes, como descritas a seguir:

*Grau de umidade de sementes:* foi determinado pelo método de estufa a 105 °C por 24 horas de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009). Foram utilizadas duas repetições para cada tratamento. Após este período as sementes foram levadas a dessecadores até o resfriamento das

amostras e em seguida foi efetuado o peso seco e os resultados expressos em porcentagem.

*Teste de germinação:* para a determinação da germinação foram utilizadas 8 subamostras contendo 25 sementes distribuídas uniformemente, totalizando 200 sementes por tratamento. A semeadura foi realizada em substrato rolo de papel para germinação, umedecidos com 2,5 vezes o peso do substrato papel em água destilada, e foram mantidos em germinador à 25 °C , por um período de 10 dias. As contagens foram realizadas aos 4 e 10 dias após semeadura (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem de plântulas normais. A primeira contagem de germinação foi conduzida juntamente ao teste de germinação, avaliando-se o número de plântulas normais aos quatro dias após a semeadura.

*Envelhecimento acelerado:* para realização do teste foi utilizada a metodologia proposta pela Association of Official Seed Analysis – AOSA (1983), na qual duzentas sementes por repetição foram dispostas sobre tela de alumínio em gerbox adaptado, contendo 40mL de água destilada e mantidas em BOD a 42 °C por 72 horas. Após este período, as sementes foram submetidas ao teste de germinação conforme prescrito pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009) e os resultados expressos em porcentagem referindo-se à contagem de plântulas normais emergidas aos 4 dias de semeadura.

*Emergência de plântulas em condições controladas e Índice de Velocidade de Emergência – IVE:* para a determinação da emergência em condições controladas e IVE, a semeadura foi realizada em substrato terra : areia na proporção de 2:1, umedecido até 60% da capacidade de campo, em caixas plásticas dispostas em câmara de crescimento a 25 °C com fotoperíodo de 12 horas. Foram utilizadas 4 repetições de 50 sementes, totalizando 200 sementes por tratamento. Os resultados da emergência foram expressos em porcentagem de plântulas normais emergidas e computados aos 4 (emergência inicial) e 10

dias de semeadura. O cálculo do IVE foi realizado utilizando a fórmula proposta por Maguire (1962), computando-se diariamente o número de plântulas emergidas.

*Expressão de proteínas:* após cada período (0, 2, 4, 6 e 8 meses de armazenamento) foram amostradas cerca de 100g de sementes de cada tratamento. Em seguida foram removidos, manualmente, os pericarpos das sementes, os quais foram macerados, também manualmente, na presença de antioxidante PVP (polivinilpirrolidona) e de nitrogênio líquido em almofariz e armazenadas à temperatura de -86 °C.

Para as análises foram pesadas, em microtubos, subamostras com 100mg do material macerado. Antes de serem colocadas em solução tampão e extrair as enzimas, as amostras foram devidamente lavadas com éter, para extração do óleo. Para cada 100mg de amostra nos microtubos foi acrescido 300µL de éter e centrifugadas a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante obtido foi descartado e logo se adicionou 300µL do tampão de extração, contendo 0,6g de Fosfato de sódio dibásico a 0,034M; 7g de sacarose 2M; 2,56g PVP; 0,05g de DTT 0,003M; 0,1g de ácido L-ascórbico 0,0025M; 1g de PEG 6000 (Tris HCl 0,2M; pH 8,0) e 0,2% de β-mercaptoetanol, sem necessidade de ajuste de pH, na proporção de 300µL por 100 mg das sementes. As amostras foram homogeneizadas e mantidas por 12 horas a 4 °C, seguido de centrifugação a 14000 rpm por 30 minutos a 4 °C.

As corridas eletroforéticas foram realizadas em sistemas géis de poliacrilamida a 7,5% (gel separador) e 4,5% (gel concentrador). O sistema tampão gel/eletrodo utilizado foi o Tris-glicina pH 8,9. Para proceder a corrida eletroforética foram aplicados 50µL do sobrenadante de amostra de cada tratamento nas canaletas e a corrida efetuada a 4 °C, 120V por no mínimo 6 horas (ALFENAS et al., 2006). Terminada a corrida, os géis foram revelados para os sistemas ADH – Álcool Desidrogenase, CAT – Catalase, SOD –

Superóxido Dismutase, EST – Esterase, MDH – Malato Desidrogenase, Piruvato Descarboxilase, Glutamato redutase, Glutamato peroxidase e isocitrato liase, e proteínas resistentes ao calor conforme Alfenas et al. (1998).

*Teor de óleo:* a análise da composição química das sementes de girassol foi realizada no Laboratório de Plantas oleaginosas, óleos, gorduras e biodiesel (G-ÓLEO) e Laboratório de Fitoquímica e Química medicinal – UNIFAL/MG.

Para cada tratamento foram utilizadas 5 repetições de 5g de macerado. Estas foram moídas em moinho de facas do tipo WILLYE STAR FT 50.

A extração do óleo foi realizada pelo método de Soxhlet, utilizando-se como solvente o hexano e calculando-se, em seguida, os resultados em porcentagem de base seca. O método de Soxhlet baseia-se na determinação do teor de extrato de lipídios quando a amostra é submetida a refluxos sucessivos com solvente hexano.

As amostras foram colocadas no Soxhlet acrescidas de 200mL de hexano no balão volumétrico, logo após o sistema foi preparado quando se acoplou a parte superior do Soxhlet ao condensador e a inferior ao balão volumétrico. Este sistema foi então colocado sob a placa de aquecimento (45 °C) que deu início ao refluxo e circulação da água para obtenção do óleo. A extração ocorreu em ciclos contínuos por 6 horas. Após as 6 horas de ciclo e lavagem contínua das amostras, a mistura óleo solvente foi levada para um roto evaporador onde o hexano foi recuperado. Este processo durou cerca de 2 horas e a amostra obtida foi levada à estufa 35 °C por 24 horas para completa evaporação do solvente. O teor de óleo foi calculado considerando a porcentagem obtida em massa seca. O óleo obtido foi recolhido, armazenado a -86 °C e protegido de luz e calor, para posterior filtragem. O material foi filtrado em papel filtro apropriado para Cromatografia Gasosa e secado com gás nitrogênio.

*Esterificação:* ao extrato de lipídeos foi adicionado 2 mL de NaOH 0,5M e metanol, a solução foi colocada em banho fervente por 5 minutos e depois resfriada com água gelada. À solução foi adicionado 2,5 mL de reagente esterificante (10g de cloreto de amônio, 15 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 300 ml de metanol) e levado novamente em banho fervente por 5 minutos e depois resfriado com água gelada. Em seguida foi adicionado 2 mL de solução de NaCl saturada e agitado no vórtex por 10 segundos. Foi adicionado 2,5 mL de hexano e logo após foi agitado por 10 segundos em vórtex e em seguida passou por centrifugação de 3000 rpm, por 10 minutos. A separação de fases ocorreu, e a mistura de hexano e lipídeos foi transferida para frasco âmbar e secada com ar de nitrogênio e armazenada em temperatura -80 °C, até o momento da análise. Antes da análise o substrato foi ressuspendido com 0,6 ml de hexano.

*Caracterização dos ésteres de ácidos graxos:* a composição dos ácidos graxos foi determinada por cromatografia em fase gasosa, sendo utilizado o cromatógrafo GC-2010 (Shimadzu), equipado com detector de massas e coluna capilar de sílica fundida com 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, contendo polietilenoglicol como fase estacionária líquida. O padrão utilizado será uma mistura de 37 ésteres metílicos (Supelco<sup>TM</sup> 37 Component FAME Mix), de C:4 a C22:6, com pureza de 99,9%. Foram utilizados os seguintes parâmetros operacionais: modo de injeção “*split*”, com razão de divisão de 1:20; volume injetado de 1 µL; temperatura do detector de 240 °C; temperatura do injetor de 220 °C; programa de temperatura: início a 60 °C com rampa linear de 5 °C/minuto até atingir 240 °C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos, mantendo a rampa de aquecimento a 10 °C/minuto até atingir 270 °C, permanecendo nesta temperatura. Para a realização da cromatografia em fase gasosa, foi necessário redissolver as amostras em 0,6 mL de hexano.

A identificação dos picos foi realizada por método comparativo com os tempos de retenção do padrão de ésteres de ácidos graxos e os resultados foram feitos por integração das áreas dos picos e expressos em porcentagem de área.

*Procedimentos estatísticos:* o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, e os dados foram interpretados estatisticamente por meio de análise de variância em esquema fatorial (2 x 2 x 5) correspondente 2 tipos de híbridos, 2 condições de armazenamento (10 °C e 25 °C) e 5 épocas de armazenamento. Para os dados quantitativos aplicou-se análise de regressão e as comparações de médias realizadas pelo teste de Scott-Knott, em nível de 5% de significância, por meio do software estatístico SISVAR®.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes aos valores médios das temperaturas máximas (Tx), mínimas (Tn), e médias (Tm) e da umidade relativa (UR) nos meses correspondentes ao período de armazenamento das sementes de mamona estão registrados na Tabela 1.

Tabela 1 Valores médios das temperaturas máximas (Tx), mínimas (Tn), e médias (Tm) e da umidade relativa (UR) dos meses correspondentes ao período de armazenamento das sementes de mamona

Meses	Tx (°C)	Tn (°C)	Tm (°C)	UR (%)
Setembro/2008	28,0	13,2	19,4	62
Outubro/2008	28,9	17,2	22,0	70
Novembro/2008	27,9	17,0	21,2	64
Dezembro/2008	27,0	17,6	21,3	80
Janeiro/2009	28,7	18,2	22,2	80
Fevereiro/2009	31,6	19,2	24,2	77
Março/2009	29,6	18,1	22,7	78
Abril/2009	27,5	15,8	20,4	75
Mai/2009	26,2	13,7	18,7	72
Junho/2009	23,9	17,0	16,2	75
Julho/2009	26,2	13,4	18,6	70
Agosto/2009	26,0	13,0	18,5	66
Setembro/2009	28,7	16,4	21,6	69

Fonte: Setor de Agrometeorologia do Departamento de Engenharia – UFLA

Dentre os vários fatores que afetam a conservação de sementes tem-se a umidade relativa do ar e a temperatura. As variações na umidade relativa do ar observadas durante os 12 meses de armazenamento, mesmo sendo sutis em números, quando interagindo com as alterações na temperatura, influenciaram

diretamente na manutenção da qualidade das sementes mantidas em armazém convencional.

Isso é comprovado pela redução no teor de água das sementes, independente da cultivar, aos oito meses de armazenamento, nas sementes mantidas em armazém convencional.

As médias dos dados obtidos na determinação do grau de umidade das sementes armazenadas estão representadas na Tabela 1.

No início do armazenamento a diferença entre os valores do grau de umidade das sementes das cultivares Helio 250 e Helio 251 foi de 0,43%.

Durante o armazenamento houve variações dos valores de grau de umidade das sementes armazenadas nos dois ambientes. Segundo Brigante (2013), o equilíbrio higroscópico de sementes de girassol de cultivares com diferentes teores de óleo, a temperatura de 25 °C é variável em função da umidade do ambiente e do tipo de embalagem.

Tabela 1 Médias em porcentagem (%) do grau de umidade de sementes de girassol, híbridos Helio 250; Helio 251, em função da época de armazenamento (0,2,4,6,8) e condições de armazenamento (AC – armazém convencional; CF – câmara fria). UFLA, Lavras/MG. 2014-2015

HÍBRIDO	PERÍODOS	UMIDADE (%)	
		AC	CF
HELIO 250	0	6,40	
	2	5,57	6,11
	4	6,18	6,45
	6	6,88	5,95
	8	6,48	5,78
HELIO 251	0	6,83	
	2	6,97	6,97
	4	7,04	7,15
	6	7,52	6,60
	8	7,49	6,51

As variações do grau de umidade das sementes nos períodos de armazenamento foram em média de  $\pm 0,5\%$ . Em sementes da cultivar Helio 250 armazenadas em armazém convencional, a variação máxima do grau de umidade durante os períodos de armazenamento foi de 1,31%. Já em câmara fria a variação máxima foi menor, 0,67%.

Quanto às sementes de girassol da cultivar Helio 251 a variação máxima do grau de umidade durante o armazenamento em armazém convencional foi de 0,69% e no armazenamento em câmara fria foi de 0,64%.

Ao final dos oito meses de armazenamento não foram observadas variações significativas no valor do grau de umidade, porém pôde ser constatado que no armazenamento em câmara fria a variação do grau de umidade é menor, em função da estabilidade das condições de umidade relativa e temperatura do ar.

*Qualidade Fisiológica*

Os resultados correspondentes às médias (%) de germinação, primeira contagem de germinação e vigor (emergência, emergência inicial e envelhecimento acelerado) das sementes de girassol Helio 250 e Helio 251 estão representados na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados médios (%) primeira contagem de germinação, de germinação, de emergência e envelhecimento acelerado de sementes de girassol armazenadas em câmara fria e armazém convencional

Híbridos	Condição de Armazenamento	
	Ambiente Convencional	Câmara Fria
1ª contagem – Germinação		
H250	71Bb	82Ba
H251	80Ab	87Aa
CV (%)	3,11	
Germinação		
H250	96Ab	98Aa
H251	94Bb	96Ba
CV (%)	2,30	
Emergência inicial		
H250	58Ab	70Aa
H251	57Ab	66Ba
CV (%)	8,20	
Emergência		
H250	96Aa	96Aa
H251	92Ba	93Ba
CV (%)	3,24	
Envelhecimento acelerado		
H250	38Aa	38Ba
H251	39Ab	49Aa
CV (%)	7,19	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Nos resultados observados nos testes de germinação, primeira contagem de germinação e emergência inicial para ambos os híbridos e no teste de envelhecimento acelerado para Helio 251 foram observados os maiores valores para as sementes armazenadas em câmara fria.

Abreu et al. (2013) ao analisarem sementes dos mesmos híbridos, Helio 250 e 251, também observaram menores valores de germinação em sementes armazenadas no armazém convencional, quando comparadas às observadas em câmara fria. Sob baixas temperaturas e umidade relativa as sementes ortodoxas possuem maior potencial de armazenabilidade, uma vez que a deterioração das sementes é menor, em função da manutenção do baixo metabolismo destas nesse ambiente.

Nos resultados observados em Helio 250 no teste de emergência e no teste de envelhecimento acelerado não houve diferença estatística entre os valores de vigor das sementes armazenadas em câmara fria e armazém convencional. No teste de envelhecimento acelerado os valores foram muito baixos, 38%, e no de emergência altos, 96%.

Ressalta-se também que o período de 72 horas adotado no teste de envelhecimento acelerado parece ter sido drástico para as sementes das duas cultivares. Nesta condição sementes da cultivar Helio 251 foram mais vigorosas, quando armazenadas em câmara fria, 49%. Este valor foi superior ao observado no ambiente convencional para o mesmo híbrido e também em relação ao observado em sementes do híbrido Helio 250, também em câmara fria (Tabela 2). Nos resultados do teste de primeira contagem de germinação, menores valores foram observados em sementes da cultivar Helio 250, independentemente do ambiente de armazenamento.

Já nos testes de germinação, emergência inicial e emergência, maiores valores foram observados em sementes da cultivar Helio 250, independentemente do ambiente de armazenamento. Nestes, houve exceção no

teste de emergência, quando as sementes foram armazenadas em ambiente convencional, e não houve diferença estatística entre os valores observados para as duas cultivares.

Não tem sido incomum verificar comportamento distinto em relação à qualidade fisiológica de sementes de diferentes genótipos quando submetidos aos testes cujos princípios são diferentes.

Nesta pesquisa ao considerar os resultados em todos os testes realizados observa-se melhor qualidade das sementes do híbrido Helio 250, o que corrobora com os resultados observados por Grisi e Santos (2007). No entanto quando as sementes foram submetidas a uma condição mais estressante, no teste de envelhecimento acelerado, maior vigor foi observado em sementes do híbrido Helio 251.

#### *Teor de lipídeos*

Independentemente do ambiente de armazenamento, maiores valores de lipídios foram observados em sementes da cultivar Helio 250 (Tabela 3). Para as sementes desta cultivar não houve diferença entre os valores de lipídios observados na câmara fria e no ambiente convencional. Já em sementes da cultivar Helio 251, no ambiente convencional, foi verificado maior valor de lipídios.

Tabela 3 Teor lipídico de sementes de girassol em diferentes ambientes de armazenamento

Híbridos	Condição de Armazenamento	
	Ambiente Convencional	Câmara Fria
	Teor de lipídeos (%)	
H250	41,11aA	42,03aA
H251	37,79aB	36,54bB
CV (%)	1,39	

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Houve variação dos teores de lipídios médios das sementes de girassol da cultivar Helio 250 e 251 durante o armazenamento. Comparando as sementes a cultivar Helio 250 teve um rendimento de teor de óleo maior que Helio 251 para os dois ambientes de armazenamento. Estes resultados corroboram ao descritos pela empresa de sementes nos quais as sementes do híbrido Helio 250 possuem maior teor de óleo, cerca de 44 a 48% enquanto as sementes do híbrido Helio 251 possuem 40 a 44% de teor de óleo.

Santos (2010) não observou em sementes de mamona, das cultivares IAC-80 e Guarani variações nos teores de óleo em diferentes épocas de armazenamento, em função do tipo de armazenamento.

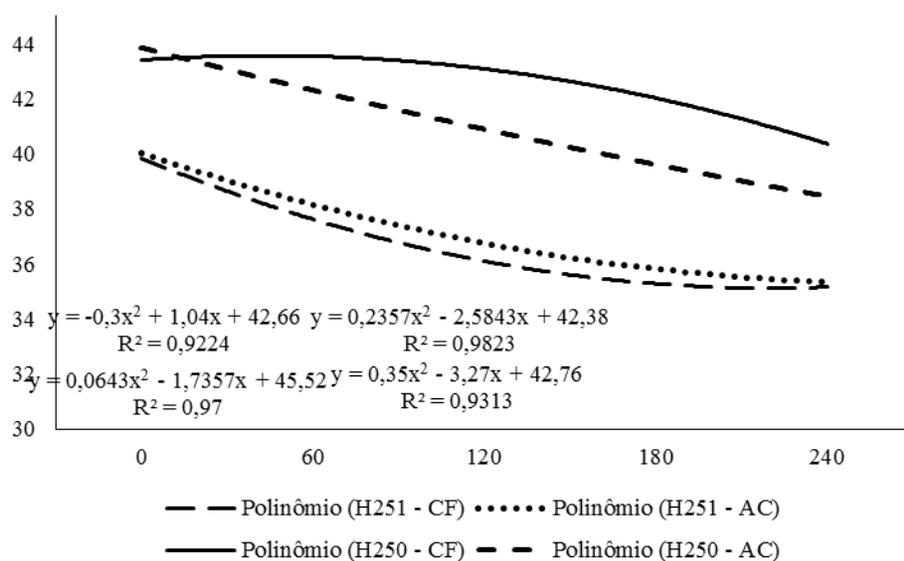


Figura 1 Teor de lipídios (%), para os híbridos H250 e H251, em função das épocas de armazenamento (0, 60, 120, 180 e 240 dias) e condições de armazenamento (AC – armazém convencional e CF – câmara fria)

De um modo geral, para os dois tipos de ambientes e para os dois híbridos, o teor de lipídios diminuiu durante os 8 meses de armazenamento.

Sementes do híbrido Helio 251, armazenado em câmara fria, foram identificadas com menor teor de lipídios inicialmente, seguido, do mesmo híbrido, cujas sementes estavam armazenadas em armazém convencional.

As sementes do híbrido Helio 250 inicialmente tinham cerca de 43% de teor de lipídios. Ao final dos 8 meses de armazenamento verificou-se que o teor de lipídios foi reduzido em sementes deste híbrido, quando armazenados em câmara fria a redução foi menor. Já em sementes do híbrido Helio 250 armazenadas em armazém convencional foi observado o maior teor de lipídios, mas com decréscimos significativos ao longo do armazenamento.

Resultados semelhantes foram encontrados por Brigante (2013), em sementes das cultivares Aguará-4 e Olisun-3 durante o armazenamento de 9 meses ocorreu redução nos teores de lipídios em ambas as cultivares. Para a cultivar Aguará-4 as diferentes condições de armazenamento influenciaram no conteúdo de lipídios e em temperaturas mais baixas, por exemplo 10 °C, o conteúdo final de lipídios foi mais elevado.

#### *Quantificação de ácidos graxos*

As Tabelas 4 e 5 se referem aos dados dos ácidos graxos (saturados, monoinsaturados e poli-insaturados) em sementes híbridas de girassol Helio 250 e Helio 251 armazenadas em ambiente convencional e em câmara fria, em cinco períodos diferentes de armazenamento.

Em relação aos ácidos graxos saturados, em sementes do híbrido Helio 250 até 120 dias de armazenamento não foi observada diferença estatística nos valores observados em ambiente convencional e câmara fria. Aos 180 e 240 dias de armazenamento maiores valores de ácidos graxos insaturados foram observados em sementes armazenadas em ambiente convencional (Tabela 4).

Já para o híbrido Helio 251 não houve diferença entre os valores de ácidos graxos saturados em sementes armazenadas em câmara fria e ambiente convencional, independentemente do período de armazenamento das sementes.

Brigante (2013) identificou em seu estudo que a cultivar Aguará-4, ao longo de um armazenamento de 9 meses, passou a sofrer efeitos da temperatura e embalagem a partir do terceiro mês sobre o teor de ácidos graxos saturados. No final do armazenamento aquelas sementes que estavam acondicionadas em embalagem a vácuo, não sofreram alteração em relação aos ácidos graxos saturados em diferentes temperaturas de armazenamento, porém quando acondicionadas em embalagens de papel os menores valores foram obtidos na condição de armazenamento a 10 °C.

Independentemente dos períodos de armazenamento maiores valores de ácidos graxos saturados foram verificados em sementes da cultivar Helio 250, assim como observado para os valores de lipídios.

Em sementes do híbrido Helio 250, armazenadas aos 120,180 e 240 dias foram observados menores valores de ácidos graxos monoinsaturados em sementes armazenadas em câmara fria.

Para os demais períodos de armazenamento não houve diferença nos resultados de ácidos graxos monoinsaturados em sementes armazenadas em câmara fria e ambiente convencional.

Já para o híbrido Helio 251 não foram observadas diferenças significativas nos teores de ácidos graxos monoinsaturados, em sementes armazenadas em câmara fria e ambiente convencional, independentemente dos períodos de armazenamento.

As alterações na composição química das células das sementes podem ser identificadas e estar relacionadas à redução da qualidade das mesmas. As sementes de girassol são altamente oleicas e propícias de sofrerem deterioração devido a sua composição química. O processo de deterioração pode alterar o teor

lipídico das sementes durante o armazenamento e a redução do teor pode resultar no declínio do vigor das sementes, devido às alterações estruturais nos fosfolipídios da membrana e ácidos graxos poli-insaturados (BRIGANTE, 2013).

A composição de ácidos graxos é determinante da suscetibilidade do óleo presente nas sementes. As classes de ácidos graxos presentes nas sementes são os ácidos graxos saturados e ácidos graxos insaturados, que estão incluídos os monoinsaturados e poli-insaturados. A fração composta por ácidos graxos insaturados e as condições de armazenamento (temperatura e embalagem), determinam o aumento da deterioração durante o armazenamento. Eles também constituem a maior parte dos lipídios presentes em sementes, destaca-se a presença do ácido linoleico, que quando em altas quantidades garante a qualidade do óleo que for destinado à indústria alimentícia.

Silva et al. (2011) realizaram uma pesquisa com sementes de 7 cultivares de girassol e observaram que os valores de ácidos graxos saturados esteve próximo da referência comercial, mas ao contrário desta situação, os ácidos graxos insaturados se apresentaram abaixo desta faixa, concluindo que as sementes não eram tão vigorosas quanto se esperava.

Em relação ao teor de ácidos graxos poli-insaturados (Tabela 6), para a cultivar Helio 250, foram observados menores valores quando as sementes foram armazenadas em câmara fria, aos 120 e 240 dias. Nos demais períodos não houve diferença significativa dos valores de ácidos graxos poli-insaturados em sementes armazenadas em ambiente convencional e armazenadas em câmara fria. Em sementes da cultivar Helio 251, apenas aos 180 dias, foi observada diferença significativa quanto ao teor de ácidos graxos insaturados sob diferentes condições de armazenamento, sendo o maior valor observado em câmara fria.

Aos 120 e 240 dias de armazenamento foram observados os maiores valores de ácidos graxos poli-insaturados em sementes do híbrido Helio 251 em

câmara fria e para o híbrido Helio 250 aos 240 dias de armazenamento em ambiente convencional.

Aos 240 dias de armazenamento foram verificados maiores valores de ácido oleico em sementes do híbrido Helio 250 em ambiente convencional e em câmara fria. Aos 180 dias de armazenamento foi observado maior valor de ácido oleico em sementes do híbrido Helio 250 armazenadas em câmara fria. Para os demais tratamentos não houve diferença estatística significativa.

Maiores valores de ácido linoleico foram observados em sementes do híbrido Helio 250 aos 60 dias de armazenamento em ambiente convencional e em sementes do híbrido Helio 250 aos 240 dias de armazenamento em câmara fria. Aos 120 dias de armazenamento maior valor de ácido linoleico foi observado em sementes do híbrido Helio 251 armazenadas em câmara fria. Em sementes do híbrido Helio 250 maiores valores do ácido oleico foram observadas em sementes armazenadas em câmara fria aos 60, 180 e 240 dias de armazenamento. Nos demais tratamentos não houve diferença significativa para os valores de ácido linoleico.

Em relação aos resultados observados para ácido linolênico, maiores valores foram observados em sementes do híbrido Helio 250, armazenadas aos 60 dias em ambiente convencional e aos 120 dias e 180 dias em câmara fria. Já em sementes do híbrido Helio 251 maiores valores foram verificados aos 60 e 240 dias em ambiente convencional e aos 180 dias em câmara fria.

Ressalta-se que a diferença nos valores de ácido linoleico, ácido linolênico e ácido oleico, observadas em sementes dos dois híbridos estudados, nos dois ambientes de armazenamento foi pequena. No entanto, as diferenças significativas observadas podem ser atribuídas aos baixos valores de coeficiente de variação. Nas sementes de girassol avaliadas os maiores valores de ácidos graxos foram observados para ácido linoleico, ácido oleico e ácido linolênico, respectivamente.

Tabela 4 Porcentagem média de ácidos graxos saturados para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

	Época (Dias)									
	0		60		120		180		240	
	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF
H250	10,6aA	10,3aA	10,3aA	10,5Aa	10,1aA	10,3aA	11,4aA	10,2bA	11,7aA	10,6bA
H251	9,6aB	9,7aB	9,8aB	9,9aB	9,7aB	9,5aB	10,1aB	9,7bB	10,3aB	9,8bB
CV	3,21									

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Tabela 5 Porcentagem média de ácidos graxos monoinsaturados para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

	Época (Dias)									
	0		60		120		180		240	
	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF
H250	26,4aA	26,2aB	26,3aA	26,0aA	26,2aA	25,8bB	26,0bA	25,7aB	25,4aA	24,7bB
H251	26,8aA	26,9aA	26,3aA	26,1aA	26,2aA	26,0aA	26,1aA	26,0aA	25,9aA	25,7aA
CV (%)	1,04									

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Tabela 6 Porcentagem média de ácidos graxos poli-insaturados para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

	Época (Dias)									
	0		60		120		180		240	
	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF
H250	59,8aA	60,3aA	60,4aA	60,5aA	61,4aA	60,5bB	61,8aA	61,2aA	63,2aA	61,9bB
H251	60,1aA	60,5aA	60,9aA	60,9aA	61,2aA	61,0aA	61,9bA	62,4aA	62,6aB	62,9aA
CV (%)	1,39									

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Tabela 7 Porcentagem média de ácido oleico para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

	Época (Dias)									
	0		60		120		180		240	
	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF
H250	25,9aA	26,1aA	26,0aA	26,2aA	26,7aA	26,7aA	26,9aA	26,9aA	27,4aA	27,5aA
H251	26,0aA	26,3aA	26,1aA	26,5aA	26,4aA	26,6aA	26,5aA	26,8aA	26,1aB	26,9aB
CV (%)	1,92									

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Tabela 8 Porcentagem média de ácido linoleico para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

	Época (Dias)									
	0		60		120		180		240	
	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF
H250	60,3aA	61,2aA	60,5bB	61,3aA	61,7aA	62,1aA	61,8bA	62,5aA	62,5bA	63,4aA
H251	60,1aA	61,5aA	61,2aA	61,7aA	61,9bA	62,7aA	61,9aA	62,6aA	62,7aA	62,9aB
CV (%)	2,03									

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Tabela 9 Porcentagem média de ácido linolênico para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

	Época (Dias)									
	0		60		120		180		240	
	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF	AC	CF
H250	0,18aA	0,15aA	0,19aA	0,12bA	0,05bB	0,14aA	0,05bB	0,17aA	0,06aA	0,04aA
H251	0,19aA	0,18aA	0,23aA	0,15bA	0,19aA	0,17aA	0,11bA	0,19aA	0,09aA	0,02bA
CV (%)	1,07									

\*Médias seguidas pela mesma letra maiúscula na coluna e minúscula na linha não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

A proporção de ácidos graxos presentes em sementes de girassol é uma característica de relevância em estudos com esta espécie. Entre as classes que se subdividem, são estudadas, principalmente, os ácidos oleico, linoleico e linolênico, responsáveis pela estabilidade oxidativa.

A presença de ácido oleico em híbridos de girassol corresponde à fração de ácidos graxos monoinsaturados presentes na semente. Para os dois híbridos em estudo e os dois tipos de ambientes, foi observado que houve um aumento mínimo na porcentagem média de ácido oleico desde o início até os 8 meses do final do armazenamento. Brigante (2013) obteve resultados semelhantes com a cultivar Aguará-4, em que observou uma faixa de 26 a 27% de ácido oleico em embalagens diferentes e ambientes diferentes aos 3 meses de armazenamento e como passar do período de armazenamento houve um aumento deste composto.

O ácido linoleico corresponde à fração de ácidos poli-insaturados presente nas sementes. Nas sementes estudadas, o ácido linoleico foi encontrado em maior quantidade que os demais ácidos graxos e sua quantidade permanece basicamente a mesma do início do armazenamento ao fim, mantendo a estabilidade das sementes Helio 250 e Helio 251.

Encontrado em pequena quantidade, o ácido linolênico é um tipo de ácido graxo insaturado mais conhecido como ômega-3. Observou-se um comportamento diferente comparado aos outros ácidos graxos. Com o passar dos dias de armazenamento, a porcentagem média de ácido linolênico caiu, isto pode ter ocorrido devido à tendência deste composto sofrer oxidação. Brigante (2013) também identificou o mesmo comportamento nas cultivares estudadas em condições e embalagens diferentes, chegando ao final do período de armazenamento, em algumas cultivares não observando mais a presença deste composto.

### *Análise das atividades enzimáticas*

Na Figura 1 está representado o zimograma referente à expressão da enzima esterase. Maior expressão desta enzima foi observada em sementes da cultivar Helio 251, independentemente dos ambientes de armazenamento e dos períodos de armazenamento. Em sementes da cultivar Helio 250 houve maior expressão desta enzima em sementes armazenadas em câmara fria quando comparadas à expressão naquelas armazenadas em ambiente convencional. Nestas sementes a expressão também foi maior em sementes recém-armazenadas (período 0) e aos 240 dias de armazenamento, independentemente dos ambientes nos quais as sementes foram armazenadas, já em sementes do híbrido 251 houve mais estabilidade dos padrões de expressão desta enzima, principalmente quando armazenadas em ambiente convencional. Quando as sementes deste híbrido foram armazenadas em câmara fria houve redução da expressão da enzima esterase aos 180 e 240 dias de armazenamento.

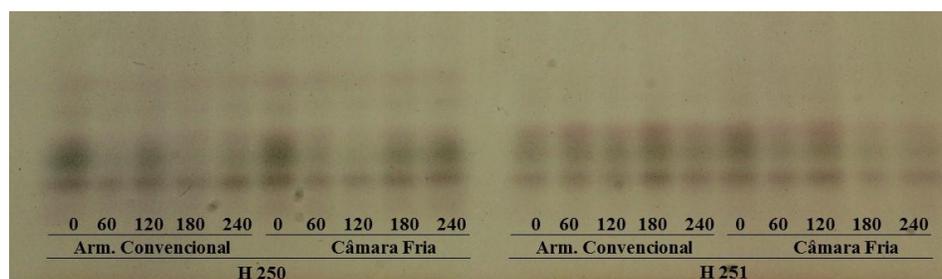


Figura 1 Zimograma referente à expressão da enzima esterase para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

A enzima esterase é representativa nas membranas celulares, hidrolisando os ésteres de membranas, atuando assim, diretamente no metabolismo de lipídios. Sua presença quando identificada demonstra a existência de peroxidação de lipídios, visto que realiza a hidrólise de ésteres.

Além da degradação, sua expressão está diretamente ligada ao metabolismo de lipídios da membrana (MERTZ et al., 2009).

Em sementes do híbrido Helio 250 armazenadas em câmara fria, foi observada maior expressão da enzima esterase quando comparada a observada em sementes armazenadas em ambiente convencional. Ao comparar esta expressão com os teores de ácidos graxos saturados, ácidos graxos monoinsaturados e ácidos graxos poli-insaturados também foi verificado aumento destes em sementes armazenadas em câmara fria, principalmente após 120 dias de armazenamento.

A expressão da enzima isocitrato liase está representada pelo zimograma da Figura 2. De uma maneira geral, maior expressão desta enzima foi observada em sementes do híbrido Helio 251 quando comparada a observada em sementes de Helio 250, como observada na expressão da enzima esterase. Em sementes do híbrido Helio 250 a maior expressão desta enzima foi observada em sementes recém-armazenadas (período0) e aos 240 dias de armazenamento tanto no ambiente convencional quanto em câmara fria. Já as sementes do híbrido Helio 251 não foram observadas muita variação na expressão desta enzima quando as sementes foram armazenadas em câmara fria. Variações da expressão foram observadas principalmente em sementes armazenadas em ambiente convencional, com maior expressão aos 60 e 180 dias de armazenamento.

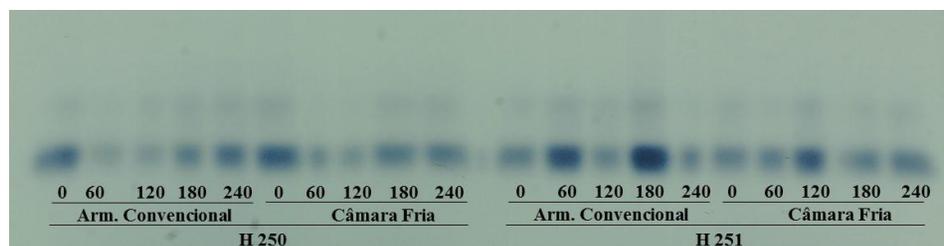


Figura 2 Zimograma referente à expressão da enzima isocitrato liase para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

A atividade da enzima isocitrato liase está relacionada à regulação do ciclo do glioxilato e esta enzima está envolvida no metabolismo de lipídios armazenados nas sementes oleaginosas. Esta enzima pode ser relacionada à germinação das sementes, obtendo-se valores máximos de expressão da mesma quando ocorre o máximo da proporção de lipídios degradados para a síntese de sacarose (BEWLEY; BLACK, 1994). Esta enzima é sintetizada “de novo” após o início do ciclo germinativo, já que no início do ciclo os lipídios insolúveis das sementes se transformam em açúcares solúveis (sacarose) (MARTINS et al., 2000).

Na Figura 3 encontra-se o zimograma para a enzima malato desidrogenase (MDH). De uma maneira geral, maior expressão da enzima MDH foi observada em sementes da cultivar Helio 250, quando comparada à observada em sementes da cultivar Helio 251. Nesta última menor expressão foi observada em sementes armazenadas na câmara fria.

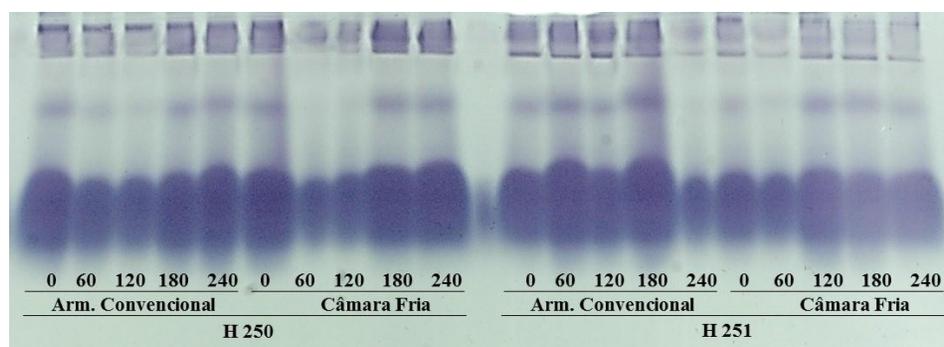


Figura 3 Zimograma referente à expressão da enzima malato desidrogenase para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

A enzima malato desidrogenase (MDH) faz parte da rota respiratória e tem importante função de catálise da reação de malato a oxalato, na última reação do ciclo de Krebs. Em sementes da cultivar Helio 251 e armazenadas em câmara fria houve menor expressão da enzima MDH. Nestes ambientes de armazenamento também foram observadas os maiores valores de germinação e vigor em sementes de ambos os híbridos.

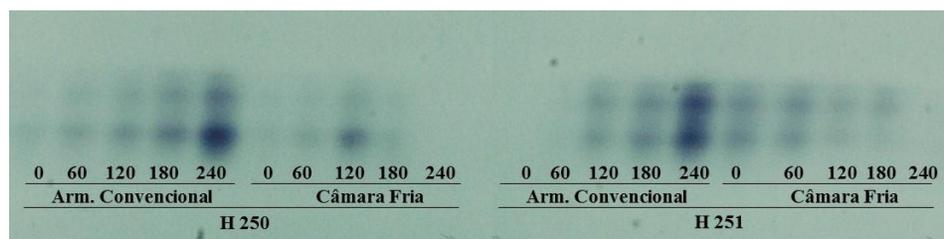


Figura 4 Zimograma referente à expressão da enzima álcool desidrogenase para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

Pela Figura 4 observa-se maior expressão da enzima álcool desidrogenase (ADH) em sementes armazenadas em ambiente convencional,

principalmente após 120 dias de armazenamento, para ambas as cultivares. A expressão da ADH foi baixa em sementes armazenadas em câmara fria tornando-se praticamente nula após 180 dias de armazenamento.

A enzima ADH faz parte da rota anaeróbica da respiração celular. Nesta rota há produção de acetaldeído e etanol, os quais são tóxicos às sementes. Esta, neste contexto, deve-se ressaltar os maiores valores de germinação e vigor das sementes de ambas as cultivares quando armazenadas em câmara fria. Já em sementes armazenadas em ambiente convencional, sob temperaturas e umidade relativa mais altas, foram observados os menores valores de germinação e vigor, e nestas sementes também foi verificada a maior expressão da enzima álcool desidrogenase.

Em sementes das cultivares Helio 251 e Helio 251, armazenadas em câmara fria, maior expressão da superóxido dismutase (SOD) (Figura 5) e catalase (Figura 6) foram observadas no início do armazenamento (período 0) e aos 240 dias de armazenamento. Já no armazenamento convencional não houve alterações significativas nos padrões destas enzimas quando as sementes do híbrido Helio 250 foram armazenadas e diferentes períodos de armazenamento. Já para o híbrido Helio 251 em sementes armazenadas em ambiente convencional houve variações na expressão destas enzimas ao longo do armazenamento.

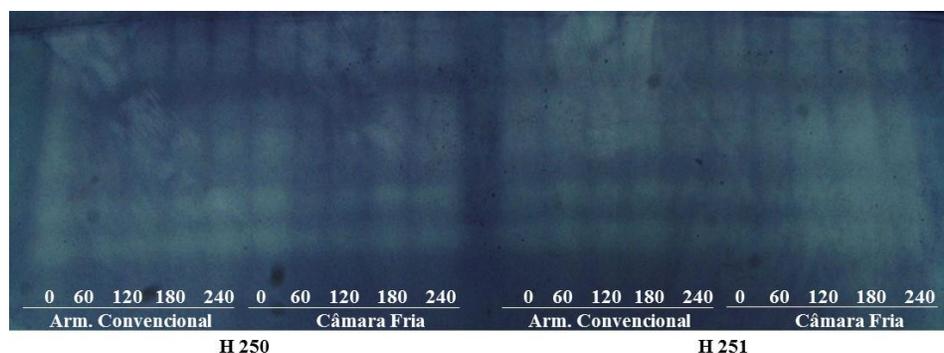


Figura 5 Zimograma referente à expressão da enzima superóxido dismutase para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

A enzima superóxido dismutase (SOD) é uma enzima removedora de radicais livres que está relacionada à perda de viabilidade das sementes. Sua atividade está relacionada à atividade antioxidante para neutralizar o oxigênio e outros radicais livres formados sob condições de estresse.

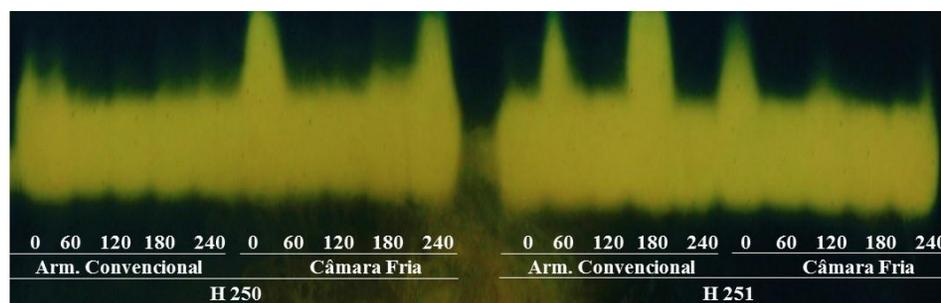


Figura 6 Zimograma referente à expressão da enzima catalase para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

A enzima catalase está envolvida na remoção de peróxidos de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) das células, e sua maior atividade pode estar associada à diminuição ou aumento de mecanismos de prevenção de danos oxidativos (BAILLY et al., 1996).

Na Figura 7 está representado o zimograma observado para a enzima Glutathiona redutase. Em sementes da cultivar Helio 250, maior expressão desta enzima foi observadas em sementes recém-armazenadas (período 0) e aos 240 dias de armazenamento. Já em sementes armazenadas na câmara fria não houve variações significativas na expressão desta enzima ao longo do armazenamento.

Em sementes do híbrido Helio 250 e armazenadas em ambiente convencional houve redução da expressão da enzima glutathiona redutase aos 240 meses de armazenamento. Já em câmara fria, maior expressão desta enzima foi observada em sementes recém-armazenadas (período 0) e aos 240 dias de armazenamento.

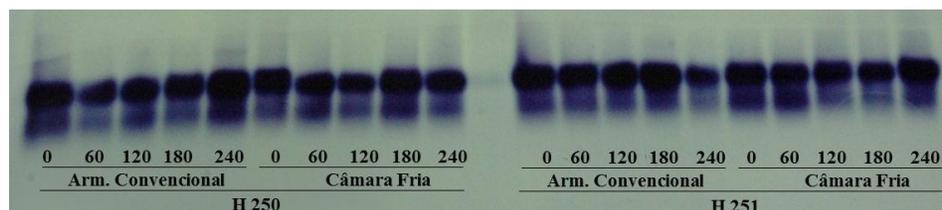


Figura 7 Zimograma referente à expressão da enzima glutathiona redutase para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

Entre os compostos de baixa massa molecular que possuem como função a proteção antioxidante das células vegetais, destaca-se a glutathiona (GSH), um tripeptídeo de glutamato, cisteína e glicina. Entre suas principais funções, atuar na homeostase redox da maioria das células aeróbicas é primordial e assim é considerada como a molécula central do metabolismo celular, sinalizadora redox e reguladora da expressão dos genes de defesa ao estresse (NOCTOR, 2012).

Como é um metabólito multifuncional, atua também no desenvolvimento e crescimento das plantas, na modulação da atividade

enzimática, no controle do desenvolvimento da raiz e no processo de modificação dos hormônios e outros compostos endógenos. Ainda assim, protege as proteínas da desnaturação causada pela oxidação de grupos tióis durante o estresse (HERMES, 2014).

Na presente pesquisa não foi observada diferença nos padrões enzimáticos da enzima glutathiona peroxidase em ambos os materiais estudados, nas diferentes condições de armazenamento e períodos de armazenamento.

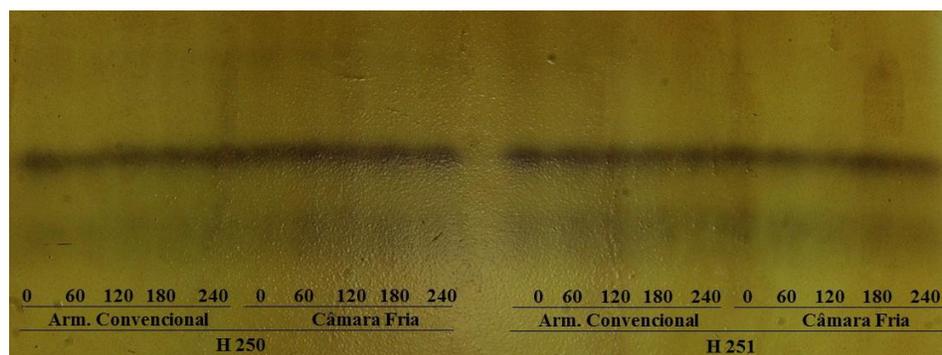


Figura 8 Zimograma referente à expressão da enzima glutathiona peroxidase para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

A glutathiona redutase é uma enzima precursora da oxi-redução de GSSH (glutathiona oxidada) a GSH (glutathiona), na presença de NADPH. Já a glutathiona peroxidase é uma enzima tipo peroxidase responsável por catalisar, juntamente à glutathiona redutase, a redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos para obtenção da glutathiona oxidada, água e álcoois. Há um trabalho conjunto das duas enzimas para bloquear a atividade antioxidante de EROS nas células das sementes, evitando assim a deterioração da mesma. Concomitantemente estas enzimas trabalham auxiliando na manutenção da integridade das células que poderiam ser danificadas por EROS (FONINI, 2011).

Os padrões isoenzimáticos da piruvato descarboxilase estão representados na Figura 9. Em sementes do híbrido Helio 250 armazenadas em ambiente convencional foi observada maior expressão desta enzima aos 240 dias de armazenamento. Em sementes armazenadas em câmara fria não houve variações significativas na expressão desta enzima nos diferentes períodos de armazenamento.

Em sementes da cultivar Helio 251, armazenadas em câmara fria e armazém convencional, houve redução da expressão da enzima piruvato descarboxilase ao longo do período de armazenamento. Houve maior expressão no início do armazenamento (período 0) e menor expressão em sementes armazenadas por 240 dias.

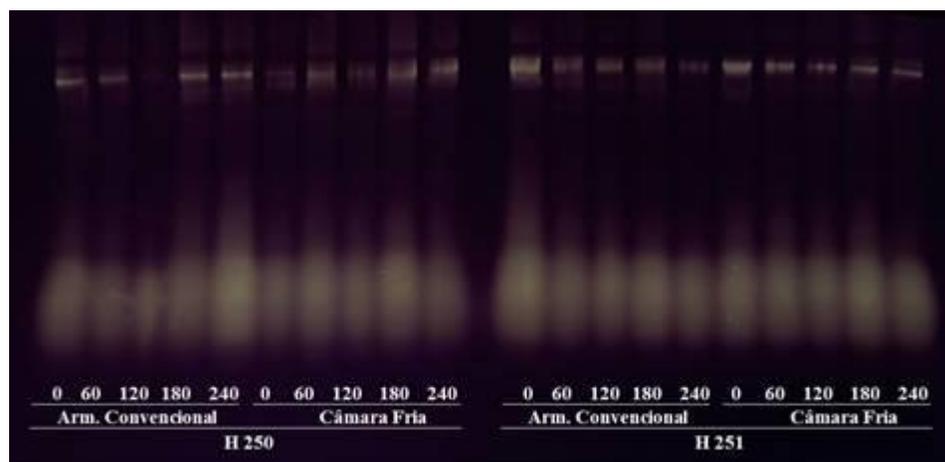


Figura 9 Zimograma referente à expressão da enzima piruvato descarboxilase para os híbridos Helio 250 e Helio 251 em função da condição de armazenamento (AC – armazém convencional, CF – câmara fria) e épocas de armazenamento

A enzima piruvato descarboxilase participa do metabolismo anaeróbico na fase da glicólise, quando atua convertendo o acetaldeído que então é reduzido a etanol pela ADH. Esta enzima atua quebrando o piruvato presente no citosol das células produzindo o acetaldeído.

## **5 CONCLUSÕES**

O armazenamento em câmara fria é mais eficiente para a conservação da qualidade de sementes de girassol.

Alterações da qualidade de sementes de girassol podem ser detectadas pelas análises enzimáticas, à exceção da glutathione peroxidase.

Alto teor de ácidos graxos oleicos não influencia na qualidade de sementes de girassol.

A proporção de ácidos graxos é alterada após o armazenamento.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A. S. et al. Deterioration of sunflower seeds during storage. **Journal of Seed Science**, Londrina, v. 35, n. 2, p. 240-247, 2013.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG: UFV, 1998. 574 p.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa, MG: UFV, 2006. 574 p.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEALTH, L. S. Role of superoxidase dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of experimental Botany**, Laucaster, v. 53, n. 372, p. 1331-1341, 2002.
- ALVES, F. V. **Composição química e qualidade fisiológica de sementes de girassol de plantas submetidas à competição intraespecífica**. 2010. 44 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SEMENTES E MUDAS. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/>>. Acesso em: 22 nov. 2014
- ASSOCIATION OF OFFICIAL SEED ANALYSIS. **Seed vigour testing handbook**. Ithaca, 1983. 88 p. (Handbook on seedtesting. Contribution, 32).
- BAILLY, C. et al. Changes in malondialdehyde content and in superoxide dismutase, catalase and glutathione reductase activities in sunflower seeds as related to deterioration during accelerated aging. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, p. 104-110, 1996.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445 p.
- BOO, Y. C.; JUNG, J. Water déficit-induced oxidative stress and antioxidative defenses in rices plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 155, n. 2, p. 255-261, 1999.

BRANDÃO JUNIOR, D. S. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas na avaliação da qualidade de sementes de milho**. 1996. 110 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1996.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 398 p.

BRIGANTE, G. P. **Deterioração de sementes de girassol durante o armazenamento**. 2013. 206 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

CARDOSO, P. F. **Resposta de linhagens de arroz à exposição ao cádmio**. 2000. 55 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2000.

CASTRO, C.; FARIAS, J. R. B. Ecofisiologia do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 163-218.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_03\\_11\\_10\\_09\\_36\\_girassolfevereiro2014.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_03_11_10_09_36_girassolfevereiro2014.pdf)>. Acesso em: 25 abr. 2014.

DALL´AGNOL; VIEIRA, O. V.; LEITE, R. M. V. B. C. Origem e histórico do girassol. In: LEITE, R. M. V. B. C.; BRIGHENTI, A. M.; CASTRO, C. **Girassol no Brasil**. Londrina: Embrapa Soja, 2005. p. 1-12.

DELOUCHE, J. C.; BASKIN, C. C. Accelerated aging technique for predicting the relative storability of seeds lots. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 2, p. 427-452, 1973.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA SOJA. **Girassol**. Disponível em: <[http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op\\_page=54&cod\\_pai=38](http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?op_page=54&cod_pai=38)>. Acesso em: 4 abr. 2014.

FONINI, L. S. **Análise da expressão dos genes de Glutathione peroxidase em arroz (*Oriza sativa* L.)**. 2011. 51 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

GALLEGO, S. M.; BENAVIDES, M. P.; TOMARO, M. L. Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. **Plant Science**, Limerick, v. 121, n. 2, p. 151-159, 1996.

GHONAIM, H. M. et al. Effect of natural sunflower oil and its components on the skin permeability to water and some drugs. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Indore, v. 6, p. 630-636, 2014. Suppl. 2.

GRISI, P. U.; SANTOS, C. M. Influência do armazenamento, na germinação das sementes de girassol. **Horizonte Científico**, Uberlândia, v. 1, n. 7, p. 14-17, 2007.

HERMES, V. S. **Regulação transcricional da síntese de glutatona em folhas de milho e de flavonoides em frutos de pimenta**. 2014. 149 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

MAGUIRE, J. D. Speeds of germination aid selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar./Apr. 1962.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response to algae cells. **Journal of Seed Technology**, Lincoln, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

MALONE, G. et al. Expressão diferencial de isoenzimas durante o processo de germinação de sementes de arroz em grandes profundidades de semeadura. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, abr. 2007.

MANDARINO, J. M. G. **Características bioquímicas e nutricionais do óleo e do farelo de girassol**. Londrina: EMBRAPA - CNPSo, 1992. 25 p. (Documentos, 52).

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Londrina: ABRATES, 2015. 659 p.

MARTINS, C. A. O. et al. Atividade da isocitrato-liase durante a germinação de sementes de soja. Dissertação: Mestrado em Agronomia, área de concentração de Fitotecnia. Universidade Federal de Viçosa (UFV). Viçosa, 2000. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, MG, v. 22, n. 1, p. 42-46, 2000.

- McDONALD, M. B. Seed deterioration: physiology, repair and assessment. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 22, n. 3, p. 531-539, 1999.
- McMILLIN, D. E. Plant isoenzymes: a historical perspective. TANKSTEY, S. D. **Isoenzymes in plant genetics e breeding**. Amsterdam: Elsevier, 1983. p. 3-13.
- MERTZ, L. M. et al. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Viçosa, MG, v. 31, n. 2, p. 254-262, 2009.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica clínica: princípios e interpretações**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2009. 400 p.
- NOBRE, D. A. C. **Desempenho agrônômico e qualidade das sementes de diferentes genótipos de girassol, no norte de Minas Gerais**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.
- NOCTOR, G. et al. Glutathione in plants: na integrated overwie. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 35, p. 454-484, 2012.
- O'BRIEN, R. D. **Fat and oils: formulating and processing of applications**. 3th ed. Boca Raton: CRC, 2009. 744 p.
- OLIVEIRA, R. B.; RANAL, M. A. **Qualidade fisiológica de cipselas de girassol das cultivares helio 360 e helio 250**. 2010. 77 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.
- PAES, J. M. V. Utilização do girassol em sistemas de cultivo. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 34-41, 2005.
- PERSON, L. C. **A cultura do girassol como estratégia de competitividade para o agronegócio regional e nacional: importância para a agroenergia e a alimentação**. 2012. 127 f. Dissertação (Mestrado em Agroenergia) - Escola de Economia de São Paulo da Fundação Getúlio Vargas, São Paulo, 2012.
- PESTANA, J. et al. **A cultura do girassol**. Piracicaba: Esalq, 2012.

ROUHIER, N.; JACQUOUT, J. P. The plant multigenic Family of thiol peroxidases. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 38, n. 11, p. 1413-1421, 2005.

SALGADO, K. C. C. **Certificação da pureza genética em sementes híbridas de milho por meio de marcadores morfológicos e moleculares**. 2001. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2001.

SANTOS, H. O. et al. **Conservação de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2010. 85 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

SHALATA, A.; TAL, M. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in the leaf of the cultivated tomato and its wild salt – tolerant relative *Lycopersicon penneli*. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 169-174, 1998.

SILVA, M. R. et al. Teor e composição do óleo de cultivares de girassol cultivados no semiárido do oeste baiano. In: XIX REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE GIRASSOL, 19., e SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE A CULTURA DO GIRASSOL, 7., 2011, Aracaju. **Resumos ...** Londrina: Embrapa Soja, 2011. p. 399.

TIMÓTEO, T. S. **Condições de armazenamento e conservação do potencial fisiológico de sementes em diferentes genótipos de milho**. 2011. 89 f. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias) - Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 2011.

TOMAZELA, A. L. et al. Girassol. In: CASTRO, P. R. C. et al. **Manual de fisiologia vegetal: fisiologia dos cultivos**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2008. p. 92-112.