

Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob atmosferas modificadas

 [Aline Testoni Cécel](#)¹, e  [Claudio José Barbedo](#)^{1,2}

Como citar: Cécel A.T. & Barbedo C.J. 2021. Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob atmosferas modificadas. Hoehnea 48: e052020. <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-05/2020>

ABSTRACT - (Respiratory rates of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) seeds at modified atmospheres). Successful seed conservation depends on reducing the metabolism of both the seeds and other associated organisms. The metabolic activity can be analyzed by the respiratory rates but it depends on the developing of methodological protocols. In addition, modified atmosphere has shown some control in respiration when O₂ and CO₂ concentrations are changed. This work evaluated the effect of changes in O₂ and CO₂ concentrations on the inhibition of the respiratory metabolism of *Eugenia brasiliensis* Lam seeds. The results showed that in atmospheres with CO₂ concentration between 1.9% and 3.7% it is possible to decrease the metabolism of these seeds. In addition, a model that allows controlling the factors involved in the analysis of respiratory rates in seeds is presented.

Keywords: grumixama, recalcitrant seeds, respiratory metabolism, seed conservation.

RESUMO - (Taxas respiratórias de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) sob atmosferas modificadas). O sucesso da conservação de sementes se resume à redução tanto do seu metabolismo quanto de outros organismos associados a elas. Uma das formas de se avaliar a intensidade metabólica é analisando-se as taxas respiratórias, mas há necessidade de se desenvolver protocolos metodológicos para isso. Além disso, atmosfera modificada tem demonstrado algum controle na respiração quando as concentrações de O₂ e CO₂ são alteradas. Neste trabalho, avaliou-se o efeito da alteração das concentrações de O₂ e CO₂ do ambiente em que sementes foram armazenadas de maneira a inibir o metabolismo respiratório das sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. Os resultados demonstraram que em atmosferas com concentração de CO₂ entre 1,9% e 3,7% é possível diminuir o metabolismo respiratório dessas sementes. Além disso, é apresentado um modelo que permite controlar os fatores envolvidos na análise das taxas respiratórias em sementes.

Palavras-chave: grumixama, conservação de sementes, metabolismo respiratório, sementes recalcitrantes.

Introdução

Sementes sensíveis à dessecação, dispersas com conteúdo elevado de água, assim como as tolerantes à dessecação coletadas ainda imaturas, apresentam menor tempo de vida útil em armazenamento, uma vez que seu metabolismo se encontra acelerado levando ao consumo de reservas e, caso não germinem, desencadeiam processos oxidativos com formação de radicais livres que aceleram sua deterioração (Barbedo *et al.* 2013, 2018).

O sucesso da conservação de sementes se resume à redução tanto do seu metabolismo, atrasando reações químicas prejudiciais à manutenção da viabilidade, quanto de outros organismos associados a elas como insetos e fungos, que acabam contribuindo para sua deterioração. Para evitar esses danos é fundamental que se reduza tanto o teor de água das sementes quanto a temperatura em que serão armazenadas (Walters *et al.* 2001, Pagnotta & Bruni 2006, Alpert 2005, Barbedo *et al.* 2018). Contudo, quando se trabalha com sementes recalcitrantes (de elevados conteúdos

de água, sensíveis a dessecação e a baixas temperaturas), os estudos sobre sua conservação ainda são inconclusivos, principalmente por ainda não terem sido desvendados os fatores que atuam em seu metabolismo durante o armazenamento (Silva *et al.* 2018, Bonjovani & Barbedo 2019). Como não se pode “desligar” esse metabolismo, as melhores condições de armazenamento devem considerar uma atividade fisiológica suficiente para mantê-las vivas e ainda evitar a germinação. Uma das formas de se avaliar a intensidade metabólica é analisando-se as taxas respiratórias, pois todo metabolismo necessita energia. As alterações das concentrações de dióxido de carbono (CO₂) e oxigênio (O₂) no ambiente de armazenamento em que as sementes se encontram podem ser úteis tanto para o diagnóstico das taxas respiratórias (aeróbicas ou anaeróbicas) e de outros processos de oxidação quanto para controle desse metabolismo (Ibrahim *et al.* 1983, Walters *et al.* 2001, Barbedo 2018). Na criopreservação de embriões de sementes recalcitrantes, por exemplo, que necessitam prévia redução no teor de água, uma taxa respiratória que não ultrapasse o valor de 5.000

1. Instituto de Botânica, Núcleo de Pesquisa em Sementes, Avenida Miguel Stéfano, 3687, 04301-902 São Paulo, SP, Brasil

2. Autor para correspondência: cjbarbedo@yahoo.com.br

μmols de O₂ consumido durante o processo de secagem evita os danos comuns à dessecação de sementes recalcitrantes (Walters *et al.* 2001).

Uma atmosfera modificada rica em CO₂ e pobre em O₂ pode reduzir tanto a infestação por insetos e fungos, como também a atividade metabólica de grãos armazenados, com redução de sua taxa respiratória e, conseqüentemente, das perdas por processos oxidativos (Aguiar *et al.* 2004, Villers *et al.* 2006). Entre outros processos possíveis, um dos principais efeitos da baixa concentração de O₂ e elevada concentração de CO₂ é na respiração, em nível do ciclo dos ácidos tricarbóxicos e na cadeia transportadora de elétrons, além de afetar a síntese e a atividade de enzimas. Para a conservação de frutas, por exemplo, a concentração adequada de cada gás varia de acordo com a espécie e o produto armazenado, mas geralmente o O₂ é reduzido de 20,9% (concentração normal da atmosfera) a valores entre 1% e 3% e o CO₂ elevado de 0,03% (normal da atmosfera) a níveis entre 2% e 20% (Brackmann 2007). Em sementes, trabalhos realizados com arroz (*Oryza sativa* L.) e feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), por exemplo, tem demonstrado algum controle na respiração quando as concentrações de O₂ e CO₂ são alteradas (Aguiar *et al.* 2015, Coelho *et al.* 2020). Contudo, na maioria das vezes o objetivo é o controle de insetos e microrganismos (Jayas & Jeyamkondan 2002), e não propriamente as taxas respiratórias das sementes.

Apesar dos diversos estudos quanto ao armazenamento de produtos vegetais sob atmosfera controlada, inclusive sementes, frequentemente os materiais são colocados em atmosfera já modificada. Pouco se conhece quanto às mudanças nas taxas respiratórias das sementes à medida em que a concentração de CO₂ é progressivamente aumentada, e/ou a de O₂ é reduzida, seja pela adição/remoção do gás ou como resultado da própria respiração das sementes. Isso dificulta diretamente dois aspectos importantes na conservação das sementes: a análise das alterações metabólicas durante o armazenamento e o desenvolvimento de tecnologia que permita monitorar as alterações nas taxas metabólicas durante a incubação das sementes sob diferentes condições.

Em relação ao primeiro aspecto, deve-se lembrar que sementes da maioria das espécies agrícolas são tolerantes à dessecação e, por isso, podem ser armazenadas com teor de água bastante reduzido, frequentemente abaixo de 10%. Nessa condição, o metabolismo é quase inexistente, bem como a respiração e, dessa forma, há muito pouca redução na viabilidade das sementes (Alpert 2005, Barbedo *et al.* 2013). Contudo, para as sementes sensíveis à dessecação essa respiração torna-se um dos principais fatores a ser controlado (Ibrahim *et al.* 1983, Walters *et al.* 2001). Em relação ao segundo, quando se pretende analisar as taxas respiratórias das sementes sob diferentes condições, a alteração que a própria respiração das sementes pode promover na atmosfera da incubação pode alterar seu padrão respiratório e, até o momento, pouco se sabe sobre os limites (ou seja, as concentrações de O₂ e CO₂) até os quais esse padrão não é afetado, prejudicando a correta interpretação dos resultados específicos de cada tratamento.

Eugenia brasiliensis Lam., a grumixameira, produz sementes sensíveis à dessecação (recalcitrantes), com capacidade de armazenamento de cerca de 6 meses (Kohama *et al.* 2006, Delgado & Barbedo 2007) e produz frutos de sabor agradável que podem ser consumidos *in natura* ou na forma de conservas e doces, embora ainda não sejam explorados comercialmente. Apresenta-se, portanto, como interessante material vegetal para o estudo das taxas respiratórias durante seu armazenamento, podendo auxiliar na busca por uma possível alternativa para o controle do metabolismo das sementes recalcitrantes pela modificação da atmosfera em que são armazenadas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da alteração das concentrações de O₂ e CO₂ na inibição do metabolismo respiratório das sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam.

Material e métodos

Obtenção do material vegetal - frutos de *Eugenia brasiliensis* Lam. foram coletados de três matrizes do Jardim Botânico de São Paulo (23°38'21,2"S, 46°37'37,1"W, altitude 785 m, clima Cwb) imediatamente após sua queda natural (menos de 24 horas), e levados ao Laboratório de Sementes do Instituto de Botânica para extração, beneficiamento e lavagem das sementes em água corrente. Apenas frutos com características típicas de completo amadurecimento para a espécie foram utilizados. Após a secagem superficial das sementes, estas foram acondicionadas em saco plástico perfurado com agulha e colocadas em geladeira a 8 °C (Kohama *et al.* 2006) até o início dos experimentos, não ultrapassando 15 dias.

Avaliações físicas e fisiológicas - Inicialmente, as sementes foram caracterizadas quanto ao teor de água, conteúdo de massa seca e germinação. O teor de água e o conteúdo de massa seca foram determinados gravimetricamente pelo método de estufa com circulação de ar forçada regulada a 103 ± 1 °C por 17 horas (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2009). Foram utilizadas quatro repetições de 10 sementes cada e os resultados foram expressos em porcentagem (base úmida) para o teor de água e em g . semente⁻¹ para o conteúdo de massa seca.

O teste de germinação foi realizado em caixas plásticas tipo Gerbox® com 200 ml de vermiculita saturada com água (sem posteriores reposições) e utilizadas quatro repetições de 10 sementes cada. O material foi acondicionado em sala de germinação com temperatura constante de 25 °C, umidade relativa do ar de 90% e luz contínua. Os resultados foram expressos em porcentagem de sementes com protrusão de raiz primária de pelo menos 5 mm de comprimento (Delgado & Barbedo 2007).

Para avaliar o consumo de O₂ e a liberação de CO₂ pelas sementes, estas tiveram sua massa fresca e volume medidos e em seguida foram colocadas em respirômetros (frascos de 600 mL com fechamento hermético e tampa perfurada, recoberta por septo, por onde se fez a coleta da amostra de ar - figura 1), iniciando o experimento assim que os frascos foram fechados, assumindo uma composição atmosférica de 20,9%

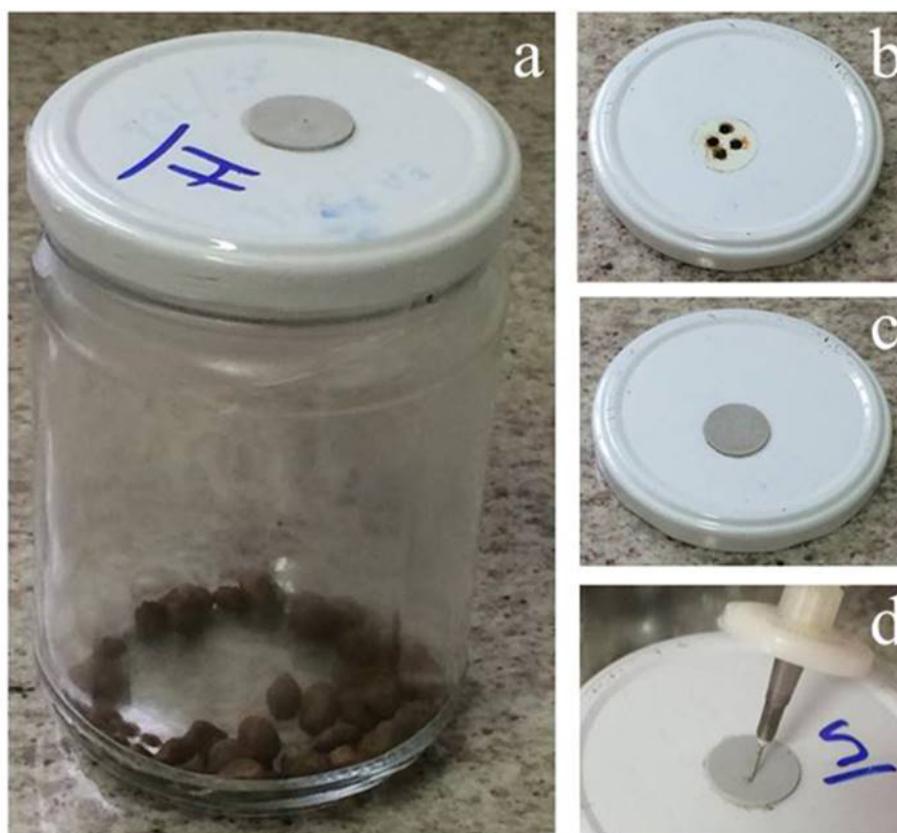


Figura 1. Respirômetro utilizado para análise de consumo de O_2 e liberação de CO_2 por de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. a. Respirômetro - frascos de vidro de 600 mL com fechamento hermético e sementes em seu interior. b. Furos na tampa do frasco para coleta de amostra de ar. c. Septo de borracha para impedir trocas gasosas. d. Coleta da amostra de ar por agulha conectada diretamente ao tubo do aparelho analisador.

Figure 1. Respirometer used for analysis of O_2 consumption and CO_2 release by *Eugenia brasiliensis* Lam. seeds. a. Respirometer - 600 mL glass vials with airtight closure and seeds inside. b. Holes in the bottle cap for collecting air samples. c. Rubber septum to prevent gas Exchange. d. Air sample collection by needle connected directly to the analyzer device tube.

de O_2 e 0,03% de CO_2 (Lamarca & Barbedo 2012, Bonjovani & Barbedo 2019). As amostras de ar foram avaliadas em analisador de gases Modelo 6600 (Illinois Instruments, Inc., Johnsbury, USA) e o consumo de O_2 e a liberação de CO_2 foi calculado pela diferença entre os valores medidos pelo analisador e os valores da atmosfera inicial. Quando necessário, os resultados foram convertidos para $\mu\text{mol} \cdot \text{g}$ massa fresca⁻¹ . hora⁻¹ (adaptando-se metodologia descrita em Lamarca & Barbedo 2012 e Bonjovani & Barbedo 2019). O quociente respiratório (QR) também foi calculado dividindo a quantidade de CO_2 produzido pela de O_2 consumido (Kader & Saltveit 2003).

Incubação das sementes nos respirômetros com atmosfera modificada - para analisar a atividade respiratória das sementes em atmosfera modificada, almejou-se obter concentrações de 0,03% (controle), 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5% e 3,5% de CO_2 , em volume, por injeção direta de CO_2 (obtido por expiração humana natural) nos respirômetros de 600 mL, com imediato fechamento hermético. Após a injeção de CO_2 , e fechamento hermético dos respirômetros, as concentrações de O_2 e CO_2 foram novamente avaliadas, conforme descrito anteriormente, obtendo-se os valores apresentados na tabela 1, que ficaram muito próximos aos almejados e passaram a ser os reais tratamentos. Os respirômetros foram, então, colocados a 25 °C, na ausência de luz.

Tabela 1. Valores de O_2 e CO_2 almejados e registrados no interior dos frascos com sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam.

Table 1. Targeted and recorded O_2 and CO_2 values inside the flasks with *Eugenia brasiliensis* Lam. seeds.

Atmosfera almejada	Concentrações atingidas (%)	
	O_2	CO_2
Normal	20,9	0,03
1,0 % de CO_2	19,5	0,90
1,5 % de CO_2	18,3	1,40
2,0 % de CO_2	17,9	1,90
2,5 % de CO_2	15,9	2,60
3,5 % de CO_2	11,8	3,70

As avaliações das taxas respiratórias das sementes incubadas nas diferentes atmosferas foram realizadas após 17 e 41 horas. Após esse período os frascos foram abertos por alguns minutos para recompor a atmosfera normal de 20,9% de O_2 e 0,03% de CO_2 e novamente fechados, incubados a 25 °C e avaliados após 24 horas para verificar as taxas respiratórias dessas sementes após a incubação em

diferentes concentrações de CO₂. Ao final do experimento, as sementes incubadas nas diferentes concentrações de CO₂ foram avaliadas quanto ao teor de água e germinação, como descrito anteriormente, para verificar sua viabilidade final.

Delineamento experimental e análise dos dados - utilizou-se delineamento inteiramente casualizado, com fator único (concentração de CO₂) e os dados foram submetidos à análise de variância (teste F, a 5%), com médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% (Santana & Ranal 2004).

Resultados e Discussão

As sementes coletadas estavam com 51% de água, 0,142 g semente⁻¹ de massa seca e 100% de germinação, valores comuns para sementes consideradas recalitrantes e relatados por diversos autores para *E. brasiliensis* (Delgado & Barbedo 2007, Amador & Barbedo 2015, Inocente & Barbedo 2019).

Após 17h de incubação em atmosfera normal, as sementes apresentaram elevado consumo de O₂ (6,26% . kg massa seca⁻¹ . hora⁻¹) e liberação de CO₂ (4,68% . kg massa seca⁻¹ . hora⁻¹), evidenciando sua intensa atividade metabólica (figura 2a), correspondendo, respectivamente, a 1,38 e 1,03 μmol . gMF⁻¹ . h⁻¹. Procedendo-se aos devidos ajustes de unidades utilizadas nos diferentes trabalhos, esses valores estão pouco abaixo dos verificados para *Inga vera*, entre 2 a 3 μmol . gMF⁻¹ . h⁻¹ (Bonjovani & Barbedo 2019, Parisi *et al.* 2019), cujos embriões estão entre os com maior grau de recalitrância (Bilia *et al.* 1998), mas bem acima dos apresentados por sementes de *Caesalpinia echinata*, em torno de 0,2 μmol . gMF⁻¹ . h⁻¹ (Lamarca & Barbedo 2012), que são ortodoxas (Barbedo *et al.* 2002). Considerando o conteúdo de água elevado e a temperatura de incubação dessas sementes é esperado que sua atividade respiratória seja elevada, uma vez que diversas reações metabólicas ocorrem nessas condições (Taiz *et al.* 2017, Barbedo *et al.* 2018). Quando sementes ortodoxas tem seu teor de água elevado, as taxas respiratórias também chegam a valores próximos aos obtidos para *E. brasiliensis*, como descrito para *Phaseolus vulgaris* L. (Bonjovani & Barbedo 2019) e *Caesalpinia echinata* (Lamarca & Barbedo 2012, Araujo & Barbedo 2017). Na atmosfera normal, o QR foi de 0,75 (figura 2b), valor que poderia indicar a utilização de ácidos graxos como substrato da respiração, uma vez que a oxidação dessas moléculas produz menos CO₂ por molécula de O₂ (Tcherkez *et al.* 2003, Taiz *et al.* 2017), ou algum outro processo oxidativo diferente da respiração.

Quando se aumentou a concentração de CO₂, houve declínio no consumo de O₂ a partir da atmosfera com 1,9% de CO₂, mas de forma mais expressiva na atmosfera com 3,7% de CO₂, chegando a quase zerar o consumo de O₂ (0,5% . kg massa seca⁻¹ . hora⁻¹, figura 2a, equivalendo a 0,3 μmol . gMF⁻¹ . h⁻¹). González-Meler *et al.* (1996b) verificaram que, ao dobrar o CO₂ atmosférico, a atividade do citocromo *c* oxidase e succinato desidrogenase (complexos proteicos que participam do transporte de elétrons) de mitocôndrias isoladas de cotilédones e raízes de *Glicine max* foi reduzida e, conseqüentemente, também foi reduzido seu metabolismo respiratório. Outros estudos relacionam a redução da

atividade respiratória com a diminuição da concentração externa de O₂ (Stiles 1960, Raymond & Pradet 1980, Saglio *et al.* 1983). Estudando fatias de batata incubadas por duas horas em diferentes concentrações de O₂ (diminuindo de 40% a 1%), Geigenberger *et al.* (2000) verificaram uma contínua redução do estado energético celular com a diminuição da concentração de O₂, especialmente quando o O₂ cai para 12% ou 8%. Além disso, essa redução também resulta na inibição de atividades biosintéticas que economiza ATP e permite a diminuição no consumo de O₂ (Geigenberger 2003).

Após as primeiras 17 horas de incubação, os valores da concentração de CO₂ nos respirômetros havia subido (figura 2a). A partir desse ponto, com mais 24 horas de incubação as sementes tiveram redução ainda maior nas taxas de respiração (figura 3a) e, especialmente para as sementes incubadas inicialmente com 1,9% e 2,6%, houve mudança nos valores de QR, indicando presença de reações oxidativas não respiratórias (figura 3b), como também observado por Lamarca & Barbedo (2012) para sementes de *Caesalpinia echinata*. Surpreendentemente, porém, essas reações não foram deletérias para as sementes, pois ao final da incubação todas estavam vivas e capazes de germinar (tabela 2). Também não foi prejudicial a atmosfera com 2,6% e 3,7%, com QR acima de 1,0 (figura 3b), ou seja, quando o substrato respiratório passou a ser ácidos orgânicos, indicando que algum processo fermentativo ou respiração anaeróbica ocorreu (Taiz *et al.* 2017). Nesse caso, a respiração dessas sementes pode ter sido reduzida a uma concentração crítica, resultando em respiração anaeróbica ao invés de aeróbica (Kays 1991). A redução nas taxas respiratórias com o aumento na concentração de CO₂ e redução de O₂ não se traduziu em perda da viabilidade das sementes, mas sim um provável estado de dormência ou hibernação, pois quando as sementes voltaram à atmosfera normal, voltaram a apresentar os níveis iniciais de respiração (figura 4a, inclusive com valores de QR mais estáveis e próximos de 1,0 (figura 4b).

No presente estudo, as sementes de *E. brasiliensis* incubadas na concentração mais alta de CO₂ (3,7%) e mais baixa de O₂ (12,0%), tiveram seu metabolismo respiratório desacelerado, indicando dois aspectos importantes: o primeiro, a perspectiva de controle do metabolismo de sementes sensíveis à dessecação, durante seu armazenamento, pelo aumento da concentração de CO₂ (e/ou redução da concentração de O₂); o segundo, uma maior garantia metodológica para a análise das taxas respiratórias enquanto a concentração de CO₂ da atmosfera do respirômetro estiver abaixo de 1,9%, e a de O₂ acima de 18%. Neste segundo aspecto, as taxas médias observadas para aumento na concentração de CO₂ (0,0047% . gMF⁻¹ . h⁻¹) e redução de O₂ (0,0063% . gMF⁻¹ . h⁻¹) permitiram obter uma excelente estimativa da faixa de tempo em que as sementes devem permanecer incubadas para, ao mesmo tempo em que se evita valores muito pequenos, que poderiam ser incluídos na faixa de erro de medida dos gases do equipamento, também se evita que a alteração na concentração dos gases do respirômetro cause alguma alteração significativa nas taxas respiratórias das sementes incubadas. De acordo com essas taxas, obtiveram-se duas equações:

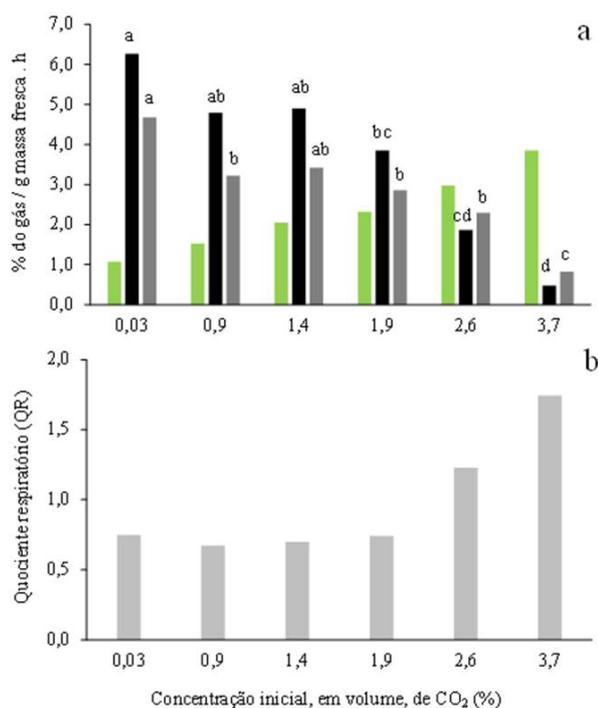


Figura 2. Porcentagem de CO₂ registrada no frasco de 600 mL (a, barras verdes), consumo de O₂ (a, barras pretas) e liberação de CO₂ (a, barras cinzas) registrados nesse mesmo frasco e quociente respiratório (b) das sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. incubadas a 25 °C por 17 horas em atmosferas com diferentes concentrações de CO₂. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Figure 2. Percentage of CO₂ recorded in the 600 mL flask (a, green bars), consumption of O₂ (a, black bars) and CO₂ release (a, gray bars) recorded in that same flask and respiratory quotient (b) of *Eugenia brasiliensis* Lam. seeds incubated at 25 °C for 17 hours in atmospheres with different concentrations of CO₂. Means followed by the same letter do not differ statistically, according to the Tukey test at the 5% level.

Tabela 2. Teor de água (%) e germinação (%) de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. após o período de incubação a 25 °C em diferentes atmosferas.

Table 2. Water content (%) and germination (%) of *Eugenia brasiliensis* Lam. seeds after incubation at 25 °C and different atmospheres.

Atmosfera inicial	Teor de água (%)	Germinação (%)
0,03 % de CO ₂	45,2	100
0,90 % de CO ₂	43,3	99
1,40 % de CO ₂	45,9	99
1,90 % de CO ₂	43,5	95
2,60 % de CO ₂	47,8	99
3,70 % de CO ₂	47,4	99

1. $CO_{2\%V} = 100 \cdot (MF \cdot t \cdot 0,0282) \cdot V_r^{-1}$, onde $CO_{2\%V}$ é a concentração final de CO₂ no respirômetro, em porcentagem do volume, MF é a massa fresca em g, t é o tempo em horas e V_r é o volume do respirômetro em mL

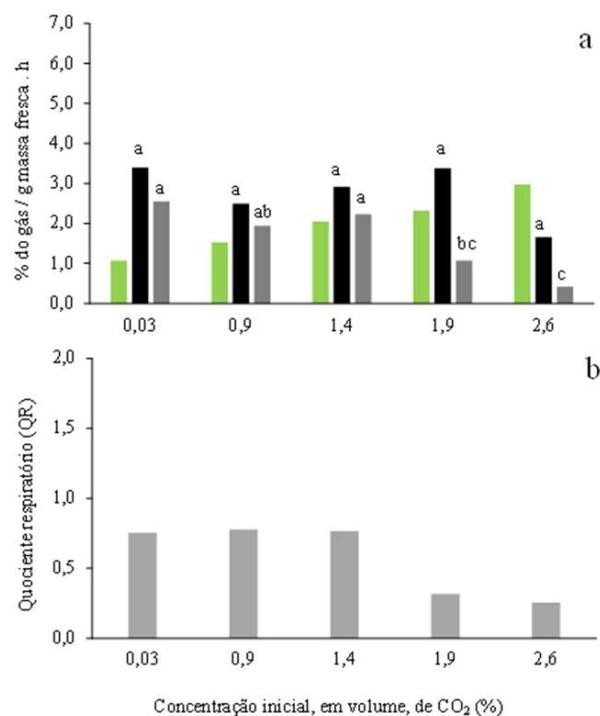


Figura 3. Porcentagem de CO₂ registrada no frasco de 600 mL (a, barras verdes), consumo de O₂ (a, barras pretas) e liberação de CO₂ (a, barras cinzas) registrados nesse mesmo frasco e quociente respiratório (b) das sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. incubadas a 25 °C por 41 horas em atmosferas com diferentes concentrações de CO₂. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Figure 3. Percentage of CO₂ recorded in the 600 mL flask (a, green bars), consumption of O₂ (a, black bars) and CO₂ release (a, gray bars) recorded in that same flask and respiratory quotient (b) of *Eugenia brasiliensis* Lam. seeds incubated at 25 °C for 41 hours in atmospheres with different concentrations of CO₂. Means followed by the same letter do not differ statistically, according to the Tukey test at the 5% level.

2. $O_{2\%V} = 100 \cdot (MF \cdot t \cdot 0,0378) \cdot V_r^{-1}$, onde $O_{2\%V}$ é a concentração final de O₂ no respirômetro, em porcentagem do volume, MF é a massa fresca em g, t é o tempo em horas e V_r é o volume do respirômetro em mL.

De acordo com essas equações, algumas simulações podem ser feitas, como as da tabela 3. Se, por exemplo, se for analisar as taxas respiratórias de sementes de *E. brasiliensis*, colocando-se 10 sementes em um respirômetro com capacidade para 500 a 1.000 mL, a 25 °C, pode-se incubá-las por 72 horas, evitando-se a margem de erro do equipamento mas garantindo que não haverá alteração no padrão respiratório das sementes. Já em um respirômetro de 100 mL deve-se incubar por apenas 24 horas. Aumentando-se o número de sementes para 20, as 72 horas de incubação somente seria possível se se utilizar respirômetro de 1.000 mL. Pela tabela 3 pode-se verificar diferentes situações para escolha do melhor modelo de análise das taxas respiratórias, mas é possível construir mais modelos, inclusive variando-se a temperatura. Com isso pode-se ter maior confiabilidade

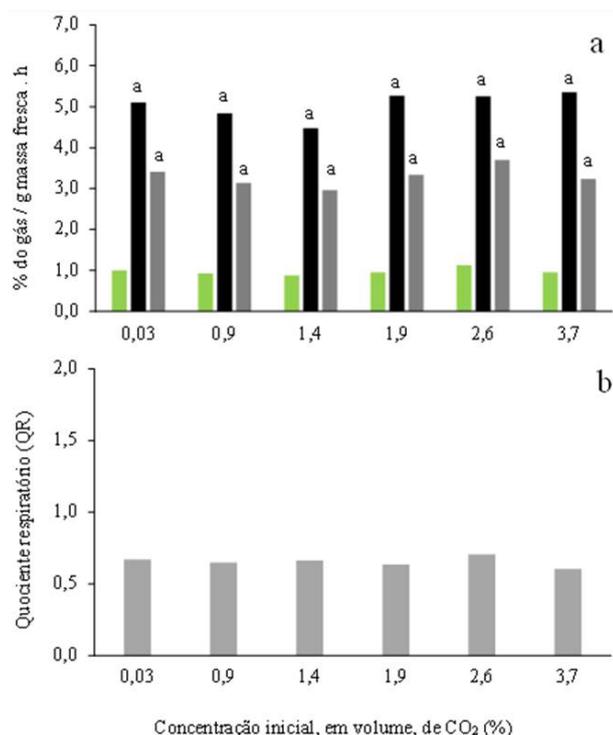


Figura 4. Porcentagem de CO₂ registrada no frasco de 600 mL (a, barras verdes), consumo de O₂ (a, barras pretas) e liberação de CO₂ (a, barras cinzas) registrados nesse mesmo frasco e quociente respiratório (b) das sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. incubadas a 25 °C por 24 horas após reabertura dos frascos para normalizar a atmosfera. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente, de acordo com o teste de Tukey ao nível de 5%.

Figure 4. Percentage of CO₂ recorded in the 600 mL flask (a, green bars), consumption of O₂ (a, black bars) and CO₂ release (a, gray bars) recorded in that same flask and respiratory quotient (b) of *Eugenia brasiliensis* Lam. seeds incubated at 25 °C for 24 hours after flask reopening to normalize its atmosphere. Means followed by the same letter do not differ statistically, according to the Tukey test at the 5% level.

nos resultados e na metodologia adotada para estudos de respiração de sementes.

A atmosfera modificada com altas pressões parciais de CO₂ já é muito utilizada para a conservação de frutos

Tabela 3. Simulações de alteração nas concentrações de O₂ e CO₂ em frascos fechados hermeticamente conforme a massa de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. e o período de incubação a 25 °C.

Table 3. Simulations of changes in the concentrations of O₂ and CO₂ into hermetically sealed flasks according to the mass of *Eugenia brasiliensis* Lam. seeds and the incubation period at 25 °C.

Número de sementes	Massa fresca (g)	Incubação (h)	Concentração O ₂ (%)			Concentração CO ₂ (%)		
			volume do frasco (mL)			volume do frasco (mL)		
			100	500	1.000	100	500	1.000
10	3,0	24	18,2	20,4	20,6	2,0	0,4	0,2
10	3,0	72	12,7	19,3	20,1	6,1	1,2	0,6
20	6,0	12	18,2	20,4	20,6	2,0	0,4	0,2
20	6,0	72	4,6	17,6	19,3	12,2	2,4	1,2
30	9,0	12	16,8	20,1	20,5	3,0	0,6	0,3
50	15,0	12	14,1	19,5	20,2	5,1	1,0	0,5

como maçã, pêssego e caqui, diminuindo taxas respiratórias, retardando processos de maturação e o consumo de reservas durante o armazenamento (Donazzolo & Brackmann 2002, Jayas & Jayamkondan 2002, Nava & Brackmann 2002). No armazenamento de sementes, a adição de CO₂ é usada, principalmente, por possuir um efeito tóxico na maioria dos organismos presentes nas sementes (Cirio & Lima 2003, Zardetto 2005, Aguiar *et al.* 2010), além de ser eficiente na manutenção do vigor e longevidade das sementes durante o armazenamento (Aguiar *et al.* 2012). No presente trabalho se verificou que em atmosferas com concentração de CO₂ entre 1,9% e 3,7% é possível diminuir o metabolismo respiratório das sementes de *Eugenia brasiliensis*. Isso pode trazer importante contribuição para o desenvolvimento de tecnologia que permita armazenar sementes recalcitrantes por longos períodos que, atualmente, é o maior desafio para os profissionais da conservação de sementes em bancos de germoplasma.

Agradecimentos

Ao Instituto de Botânica, pela permissão para as coletas; ao Programa de Pós-graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente do Instituto de Botânica, pela oportunidade do curso de mestrado da primeira autora; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, (CAPES), pela bolsa de mestrado concedida à primeira autora; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro (Processo 2017/50341-0).

Contribuições dos Autores

Aline Testoni Cécel: executou todas as atividades de campo e laboratoriais, realizou as análises estatísticas, discutiu os resultados e redigiu o manuscrito.

Claudio José Barbedo: idealizou o trabalho, elaborou o desenho experimental, realizou as análises estatísticas, discutiu os resultados e redigiu o manuscrito.

Conflitos de interesse

Os autores declaram que não há conflitos de interesse para a publicação deste artigo.

Literatura citada

- Aguiar, R.W.S., Sarmento, R.A., Vieira, S.M. & Didonet, J.** 2004. Controle de pragas em grãos armazenados utilizando atmosfera modificada. *Bioscience Journal* 20: 21-27.
- Aguiar, R.W.S., Faroni, L.D'A., Guedes, R.N.C., Sousa, A.H. & Rosado, A.F.** 2010. Toxicidade da combinação de dióxido de carbono e fosfina sob diferentes temperaturas para *Tribolium castaneum*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, n. 08, pp. 32-129.
- Aguiar, R.W.S., Brito, D.R., Ootani, M.A., Fidelis, R.R. & Peluzio, J. N.** 2012. Efeito do dióxido do carbono, temperatura e armazenamento sobre sementes de soja e micoflora associada. *Revista Ciência Agronômica* 43: 554-560.
- Aguiar, R.W.S., Brito, D.R., Lopes, M.M., Silva, R.R., Fidelis, R.R., Sousa, C.M. & Santos, G.R.** 2015. Effect of carbon dioxide on quality of rice seeds. *Bioscience Journal* 31: 1413-1422.
- Alpert, P.** 2005. The limits and frontiers of desiccation-tolerant life. *Integrative and Comparative Biology* 45: 685-695.
- Amador, T.S. & Barbedo, C.J.** 2015. Germination inhibits the growth of new roots and seedlings in *Eugenia uniflora* and *Eugenia brasiliensis*. *Journal of Seed Science* 37: 241-247.
- Araujo, A.C.F.B. & Barbedo, C.J.** 2017. Changes in desiccation tolerance and respiratory rates of immature *Caesalpinia echinata* Lam. seeds. *Journal of Seed Science* 39: 123-132.
- Barbedo, C.J.** 2018. A new approach towards the so-called recalcitrant seeds. *Journal of Seed Science* 40: 221-236.
- Barbedo, C.J., Centeno, D.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2013. Do recalcitrant seeds really exist? *Hoehnea* 40: 583-593.
- Barbedo, C.J., Silva, J.P.N., Françoso, C.F. & Parisi, J.J.D.** 2018. Armazenamento de sementes. *In: Barbedo, C.J. & Santos-Junior, N.A. (eds.). Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira.* Instituto de Botânica/SMA, São Paulo, pp. 81-108.
- Barbedo, C.J., Bilia, D.A.C. & Figueiredo-Ribeiro, R.C.L.** 2002. Tolerância à dessecação e armazenamento de sementes de *Caesalpinia echinata* Lam. (pau-brasil), espécie da Mata Atlântica. *Revista Brasileira de Botânica* 2: 431-439.
- Bilia, D.A.C., Marcos Filho, J. & Novembre A.D.C.L.** 1998. Conservação da qualidade fisiológica de sementes de *Inga uruguensis* Hook. et Arn. *Revista Brasileira de Sementes* 20: 48-54.
- Bonjovani, M.R. & Barbedo, C.J.** 2019. Respiration and deterioration of *Inga vera* ssp. *affinis* embryos stored at different temperatures. *Journal of Seed Science* 41: 44-53.
- Brackmann, A.** 2007. Uso da atmosfera controlada é recente no Brasil. *Visão Agrícola*: 50-52.
- Cirio, G.M. & Lima, M.L.R.Z.C.** 2003. Métodos de detecção do gênero *Aspergillus* em sementes de milho (*Zea mays* L.) em 270 dias de armazenamento. *Visão Acadêmica* 4: 19-23.
- Coelho, S.R.M., Alves Filho, E.G., Silva, L.M.A., Bischoff, T.Z., Ribeiro, P.R.V., Zocolo, G.J., Canuto, K.M., Bassinello, P.Z. & Brito, E.S.** 2020. NMR and LC-MS assessment of compound variability of common bean (*Phaseolus vulgaris*) stored under controlled atmosphere. *LWT - Food Science and Technology* 117: 108673.
- Delgado, L.F., Barbedo, C.J.** 2007. Tolerância à dessecação de sementes de espécies de *Eugenia*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 42: 265-272.
- Donazzolo, J & Brackmann, A.** 2002. Efeito do CO₂ em atmosfera controlada na qualidade de caqui (*Diospyros kaki*, L.) cv. Fuyu. *Revista Brasileira de Agrociência* 8: 241-245.
- Geigenberger, P.** 2003. Response of plant metabolism to too little oxygen. *Current Opinion in Plant Biology*: 247-256.
- Geigenberger, P., Fernie, A.R., Gibon, Y., Christ, M. & Stitt, M.** 2000. Metabolic activity decreases as an adaptive response to low internal oxygen in growing potato tubers. *Journal of Biological Chemistry* 381: 723-740.
- González-Meler, M.A., Drake, B.G. & Azcón-Bieto J.** 1996a. Rising atmospheric carbon dioxide and plant respiration. *In: A.I. Breymeyer, D.O. Hall, J.M. Melillo & G.I. Agren (eds.). Global change: effects on coniferous forests and grasslands.* John Wiley & Sons, Reino Unido, pp. 161-181.
- González-Meler, M.A., Ribas-Carbo, M., Siedow, J.N. & Drake, B.G.** 1996b. Direct inhibition of plant mitochondrial respiration by elevated CO₂. *Plant Physiology* 112: 1349-1355.
- Ibrahim, A.E., Roberts, E.H. & Murdoch, A.J.** 1983. Viability of lettuce seeds II. Survival and oxygen uptake in osmotically controlled storage. *Journal of Experimental Botany* 34: 631-640.
- Inocente, M.C. & Barbedo, C.J.** 2019. Germination of *Eugenia brasiliensis*, *E. involucrata*, *E. pyriformis*, and *E. uniflora* (Myrtaceae) under water-deficit conditions. *Journal of Seed Science* 41: pp. 76-85.
- Jayas, D.S., Jeyamkondan. S.** 2002. Modified atmosphere storage of grains meats fruits and vegetables. *Biosystems Engineering* 82: 235-251.
- Kader, A.A. & Saltveit, M.E.** 2003. Respiration and gas exchange. *In: J.A. Bartz & J.K. Brecht (eds.). Postharvest physiology and pathology of vegetables.* 2 ed. Marcel Dekker, New York, pp. 7-29.
- Kays, S. J.** 1991. *Postharvest physiology of perishable plant products.* Van Nostrand Reinhold, New York.
- Kohama, S., Maluf, A.M., Bilia, D.A.C. & Barbedo, C.J.** 2006. Secagem e armazenamento de sementes de *Eugenia brasiliensis* Lam. (grumixameira). *Revista Brasileira de Sementes* 28: 72-78.
- Lamarca, E.V. & Barbedo, C.J.** 2012. Short storability of *Caesalpinia echinata* Lam. seeds as a consequence of oxidative processes. *Hoehnea* 39: 577-586.

- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** 2009. Regras para análise de sementes. Secretaria de Defesa Agropecuária, Brasília.
- Nava, G.A. & Brackmann, A.** 2000. Armazenamento de pêssegos (*Prunus persica* (L.) batsch), cv. Chiripá, em atmosfera controlada. *Revista Brasileira de Fruticultura* 24: 328-332.
- Pagnotta, S.E. & Bruni, F.** 2006. The glassy state of water: a 'stop and go' device for biological processes. *In: G.H. Pollack, I.L. Cameron & D.N. Wheatley (eds.). Water and the cell.* Springer, Dordrecht, pp. 93-112
- Parisi, J.J.D., Biagi, J.D., Barbedo, C.J. Medina, P.F., Lamarca, E.V.** 2019. Respiratory rates of *Inga vera* Willd. subsp. *affinis* (DC.) T.D.Penn. seeds. *Floresta e Ambiente* 26: e20171033.
- Raymond, P. & Pradet, A.** 1980. Stabilisation of the adenine nucleotide ratios at various values by an oxygen limitation in germinating lettuce (*Lactuca sativa*) seeds. *Biochemical Journal* 190: 39-44.
- Saglio, P.H., Raymond, P. & Pradet, A.** 1983. Oxygen transport and root respiration of maize (*Zea mays*) seedlings: a quantitative approach using the correlation between ATP:ADP and the respiration rate controlled by oxygen tension. *Plant Physiol* 72: 1035-1039.
- Santana, D.G. & Ranal, M.** 2004. Análise da germinação: um enfoque estatístico. Universidade de Brasília, Brasília.
- Silva, E.A.A., Oliveira, J.M. & Pereira, W.V.S.** 2018. Fisiologia das sementes. *In: C.J. Barbedo & N.A. Santos-Junior (eds.). Sementes do Brasil: produção e tecnologia para espécies da flora brasileira.* Instituto de Botânica/SMA, São Paulo, pp. 15-40.
- Stiles, W.** 1960. The composition of the atmosphere (oxygen content of air, soil, intercellular spaces, diffusion, carbon dioxide and oxygen tension). *In: W. Ruhland (ed.). Encyclopedia of Plant Physiology, Plant Respiration Inclusive Fermentations and Acid Metabolism.* Springer, Heidelberg, pp. 114-148.
- Taiz, L., Zeiger, E., Moller, I. M. & Murphy, A.** 2017. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal.* 6 ed. Artmed, Porto Alegre.
- Tcherkez, G., Nogués, S., Bleton, J., Cornic, G., Badeck, F. & Ghashghaie, J.** 2003. Metabolic origin of carbon isotope composition of leaf dark-respired CO₂ in French bean. *Plant Physiology* 131: 237-244.
- Villers, P., Bruin, T. & Navarro, S.** 2006. Safe storage of grain in the tropics: a comparison of hermetic storage in flexible silos versus rigid metal or concrete silos. *In: A. West & J. Brown (eds.). Feed Technology Update.* Linx Publishing, Honolulu, pp. 17-22.
- Walters, C., Pammenter, N.W., Berjak, P. & Crane, J.** 2001. Desiccation damage, accelerated ageing and respiration in desiccation tolerance and sensitive seeds. *Seed Science Research* 11: 135-148.
- Zardetto, S.** 2005. Effect of modified atmosphere packaging at abuse temperature on the growth of *Penicillium aurantiogriseum* isolated from fresh filled pasta. *Food Microbiology* 22: 367-371.

Recebido: 20.01.2020

Aceito: 13.10.2020

Editor Associado: Nelson Augusto dos Santos Jr.

