



Alterações fisiológicas e atividade de enzimas antioxidantes em sementes de pimentas *Capsicum chinense* Jacq e *Capsicum frutescens* L. durante o processo de maturação

Roberto Fontes Araújo^{1*}, Haynna Fernandes Abud², Laércio Junio da Silva², Eduardo Fontes Araujo², Cleide Maria Ferreira Pinto¹, Fabricio Wellington Souza Silva²

10.1590/0034-737X201865060009

RESUMO

Sementes mantidas dentro de frutos carnosos, após a colheita, podem continuar metabolicamente ativas, sem interromper o processo de maturação, o que pode promover aumento das taxas de germinação e do vigor. Também, durante a maturação e o repouso pós-colheita dos frutos, podem ocorrer alterações nos mecanismos de proteção contra danos oxidativos, incluindo a atividade das enzimas antioxidantes. Objetivou-se, com este trabalho, avaliar a qualidade fisiológica e a atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidativo em sementes de pimentas *Capsicum chinense* Jacq. representada pela pimenta Biquinho e *Capsicum frutescens* L representada pela Malagueta, de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação e submetidos ao repouso pós-colheita. Frutos colhidos aos 40, 55 e 70 dias após antese (DAA) foram armazenados em câmara, a 25 °C, por 0, 6, 12 e 18 dias. As sementes extraídas dos frutos foram avaliadas pelos testes de germinação e de envelhecimento acelerado. Também, foram determinadas as atividades das enzimas superóxido dismutase, catalase e peroxidase. Para ambas as espécies, sementes de frutos colhidos aos 70 DAA, com coloração vermelha, apresentaram taxas de germinação e vigor superiores aos daquelas de colheitas anteriores, aos 40 e 55 DAA. A colheita neste estágio é recomendada para obtenção de sementes de alta qualidade fisiológica. O repouso dos frutos de pimenta Biquinho colhidos aos 55 DAA contribui para aumentar o potencial de germinação das sementes, enquanto, para os de pimenta Malagueta esse procedimento é pouco benéfico. A enzima catalase tem grande potencial para o monitoramento da qualidade fisiológica das sementes de pimentas Malagueta e Biquinho; a baixa atividade dessa enzima em sementes oriundas de frutos em repouso está relacionada com sua maior qualidade fisiológica.

Palavras-chave: pimenta Biquinho, pimenta Malagueta, *C. chinense* Jacq.; *C. frutescens* L.; época de colheita; repouso de frutos; germinação; vigor.

ABSTRACT

Physiological changes and antioxidant enzyme activity in Biquinho and Malagueta pepper seeds during the maturation process

Seeds held inside fleshy fruits after harvest can continue metabolically active, the process of maturation is not interrupted, which can promote the increase on germination and vigour. In addition, during fruit maturation and after-ripening period, changes in the mechanisms of protection against oxidative damage can occur, including the activity of antioxidant enzymes. The aim of this study was to evaluate the physiological quality and enzymatic activity of antioxidant defense system of *Capsicum chinense* Jacq., represented by the Biquinho pepper, and *Capsicum frutescens* L., represented by the Malagueta pepper seeds, collected from fruits at different developmental stages and subjected to

Submetido em 12/04/2018 e aprovado em 31/10/2018.

¹ Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, EPAMIG SUDESTE, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. roberto.araujo@epamig.br; cleide@epamig.br

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitotecnia, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. hfabad@gmail.com; laerciojdsilva@gmail.com; efaraujo@ufv.br; fabricio.welington@ufv.br

*Autor para correspondência: roberto.araujo@epamig.br

post-harvest storage. Fruits harvested at 40, 55, and 70 days after anthesis (DAA) were stored at 25 °C for 0, 6, 12, and 18 days. Seeds were evaluated for germination and accelerated aging tests. In addition, the activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase were determined. For both species, seed from fruits collected at 70 DAA, presenting red colour, had higher germination and vigour compared with the seeds harvested at 40 and 55 DAA. The harvest of fruits at this stage is recommended for obtaining high-quality seeds. The after-ripening of Biquinho pepper seeds harvested at 55 DAA contributes to increase the germination potential of the seed, while for Malagueta seeds, this procedure has little benefit. The catalase enzyme has great potential to monitor the physiological quality of Biquinho and Malagueta pepper seeds; low activity of this enzyme in seeds during the fruits after-ripening is related to better physiological quality.

Keywords: Biquinho pepper; Malagueta pepper; *C. chinense* Jacq.; *C. frutescens* L.; harvest time; fruit after-ripening, germination; vigor.

INTRODUÇÃO

Como a propagação da pimenta é realizada por via seminífera, o controle da qualidade fisiológica e o conhecimento do processo de formação das sementes são essenciais para a obtenção de lotes com taxas de germinação e vigor elevados. Para isso, é necessária a realização da colheita o mais próximo possível da maturidade fisiológica. No entanto, em espécies como a pimenta, em que a floração e frutificação ocorrem de maneira continuada, podem-se encontrar na planta frutos em diversos estádios de maturação. Essa característica dificulta a determinação da época adequada para a colheita única dos frutos, visando à obtenção de lotes de sementes de alta qualidade fisiológica.

Alguns estudos (Vidigal *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2006; Vidigal *et al.*, 2009; Ricci *et al.*, 2013; Lima & Smiderle, 2014; Pereira *et al.*, 2014) com espécies de frutos carnosos, como a pimenta, têm revelado que sementes mantidas no interior dos frutos, por determinado período após a colheita, mantêm-se metabolicamente ativas, podendo haver aumento da sua qualidade fisiológica. O sucesso do repouso pós-colheita dos frutos, antes da extração das sementes, viabilizaria a redução do número de colheitas, pois os frutos poderiam ser colhidos nos diversos estádios de maturação e mantidos em repouso até a extração das sementes, reduzindo-se gastos e evitando-se riscos com condições climáticas e sanitárias desfavoráveis no campo.

Durante o processo de maturação, alterações fisiológicas, bioquímicas, físicas e citológicas ocorrem nas sementes. No início, a atividade metabólica das sementes é intensa, com elevada atividade respiratória e consequente aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008). As EROs são produtos tóxicos, resultantes da redução do oxigênio molecular, como o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\cdot$), cada um com capacidade diferente de causar danos às células (Mittler,

2002). No final da fase de maturação, quando ocorre redução dos teores de água e do metabolismo das sementes (El-Maarouf-Bouteau & Bailly, 2008), apesar de poder haver aumento da produção das EROs, em decorrência do início do processo de dessecação, a atividade de enzimas antioxidantes tende a reduzir-se e outros mecanismos de proteção passam a ser mais importantes, como os antioxidantes não enzimáticos (α -tocoferol e ácido ascórbico) e as proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Leprince *et al.*, 1993; Kalemba & Pukacka, 2007).

Dentre as enzimas removedoras de EROs presentes nas células, destacam-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases (POX) (Mittler, 2002). Essas enzimas atuam em mecanismos de defesa das células contra as espécies reativas de oxigênio, cuja atividade favorece a qualidade fisiológica das sementes (Martins *et al.*, 2012). Além disso, a atuação dessas enzimas nas sementes permanentes no interior de frutos carnosos, colhidos antes da maturidade fisiológica, e em repouso pós-colheita, é importante para a complementação do processo de maturação (Vidigal *et al.*, 2006). Assim, a avaliação da atividade dessas enzimas, durante o desenvolvimento e após a colheita, pode ser útil para o monitoramento da qualidade fisiológica das sementes.

Em vista do que foi exposto, objetivou-se com este trabalho, avaliar a qualidade fisiológica e a atividade de enzimas do sistema de defesa antioxidativo em sementes de pimentas das espécies *Capsicum chinense* Jacq. representada pela pimenta Biquinho e *Capsicum frutescens* L. representada pela pimenta Malagueta, oriundas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação e submetidos ao repouso pós-colheita.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sementes de pimenta Malagueta (*Capsicum frutescens* L.) e de pimenta Biquinho (*Capsicum chinense* Jacq.). As sementes foram produzidas em casa

de vegetação da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), em Viçosa, MG, a partir de sementes fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa com Hortaliças (Embrapa Hortaliças). Realizou-se a semeadura em bandejas de isopor, com 128 células, com substrato comercial utilizado para produção de mudas (Plantmax®), sendo os tratos culturais realizados conforme recomendações técnicas para a cultura (Pinto *et al.*, 2006). Quando as plantas apresentavam de três a cinco pares de folhas, 40 dias após a semeadura, fez-se o transplantio das mudas para vasos de polietileno com cinco litros do substrato (Plantmax®). Para garantir a pureza genética das sementes produzidas, evitando a ocorrência de polinização cruzada, foram colocadas cortinas de isolamento de tecido organza, de coloração branca, ao longo da casa de vegetação, separando as duas espécies.

Durante o florescimento, as flores foram etiquetadas diariamente, a partir da antese, até ser obtido número estimado de frutos que proporcionasse quantidade suficiente de sementes para a condução dos testes propostos.

Para ambas as espécies, foram colhidos frutos aos 40, 55 e 70 dias após a antese (DAA). Os frutos obtidos em cada época de colheita foram submetidos a repouso pós-colheita, a 25°C, por 0, 6, 12 e 18 dias. Em seguida, as sementes foram extraídas manualmente dos frutos e lavadas em água corrente e secadas à sombra, até atingirem teor de água de, aproximadamente, 10% (base úmida).

Após a secagem, as sementes foram armazenadas, por no máximo sete dias, a 10°C, até a realização das análises, no Laboratório de Sementes da EPAMIG SUDESTE e no Laboratório de Pesquisa em Sementes do Departamento de Fitotecnia/UFV, em Viçosa, MG.

No teste de germinação foram utilizadas quatro subamostras de 50 sementes, distribuídas sobre duas folhas de papel toalha, umedecidas com volume de solução de nitrato de potássio (KNO_3) 0,2%, equivalente a 2,5 vezes o peso do papel seco, em caixas de plástico transparente, tipo *gerbox*, com tampa (Brasil, 2009). As caixas foram mantidas em BOD, a 30 °C. As avaliações foram realizadas aos nove (primeira contagem) e 17 dias após a semeadura e, os resultados, expressos em percentagem de plântulas normais.

A velocidade de germinação foi determinada pela contagem diária do número de sementes germinadas até 17 dias após a semeadura, calculando-se o IVG (Índice de Velocidade de Germinação), conforme fórmula proposta por Maguire (1962).

Para a avaliação do envelhecimento acelerado, foram distribuídas, uniformemente, sementes (1 g) sobre bandeja de tela acoplada à caixa de plástico tipo *gerbox*, com 40 mL de água destilada. As caixas foram tampadas e mantidas em incubadora BOD, a 42°C, por 96 horas (Bhering *et al.*, 2006). Decorrido esse período, quatro subamostras de 50

sementes foram submetidas ao teste de germinação, conforme descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em percentagem de plântulas normais no 14º dia após a semeadura.

Para a extração de proteínas e determinação da atividade enzimática foram adotados os procedimentos descritos por Peixoto *et al.* (1999). Imediatamente após serem extraídas dos frutos, as sementes foram congeladas e mantidas a -20 °C, por até 30 dias, até serem efetuadas as análises. Posteriormente, as sementes foram maceradas e quatro amostras de 300 mg foram homogeneizadas em nitrogênio líquido, operação seguida de adição de 2 mL do meio de extração, constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 g, por 15 min, a 4°C.

A determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD, EC 1.15.1.1) foi determinada pela adição de 30 µL do extrato enzimático bruto a 2,97 mL de meio de reação, constituído de tampão fosfato de sódio 50 mM, pH 7,8, contendo metionina 13 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 75µM, EDTA 0,1 mM e riboflavina 2 µM. A reação foi conduzida a 25 °C, em câmara de reação com iluminação de lâmpada fluorescente de 15 W, mantida no interior de caixa coberta com papel alumínio. Após cinco minutos de exposição à luz, a iluminação foi interrompida e a formazana azul, produzida pela fotorredução do NBT, foi medida pela absorvância a 560 nm. O valor da absorvância do meio de reação exatamente igual ao anterior, mas mantido no escuro por igual período, serviu como branco e foi subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotorredução do NBT.

A atividade da enzima catalase (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada pela adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 7,0 e H_2O_2 12,5 mM. O decréscimo da absorvância a 240 nm, à temperatura de 25 °C, foi medido no primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e o resultado foi expresso em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

A atividade da enzima peroxidase (POX, EC 1.11.1.7) ocorreu com adição de 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 25 mM, pH 6,8, guaiacol 20 mM e H_2O_2 20 mM. A produção de purpurogalina foi determinada pelo incremento da absorvância a 420 nm, a 25 °C, durante o primeiro minuto de reação. A atividade enzimática foi calculada, utilizando-se o coeficiente de extinção molar de $2,47 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x4, sendo três épocas de colheita (40, 55 e 70 DAA) e quatro períodos de armazenamento pós-colheita dos frutos (0, 6, 12 e 18 dias), com quatro repetições. Os dados obtidos nos testes de germinação, vigor e atividade enzimática das sementes foram submetidos à análise de variância, após a verificação da normalidade dos erros e da homogeneidade de variâncias, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de regressão, para o fator período de armazenamento pós-colheita dos frutos, em cada época de colheita. A análise estatística foi efetuada com o *software* estatístico R (R Core Team, 2015).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1, observa-se o aspecto visual dos frutos da pimenta Malagueta e da Biquinho, por ocasião das colheitas aos 40, 55 e 70 dias após a antese (DAA). Com a degradação da clorofila e o acúmulo de outros pigmentos, como carotenoides e antocianinas, verificou-se que, aos 40 DAA, os frutos da pimenta Malagueta apresentavam coloração verde amarelada e, os frutos da pimenta Biquinho, cor amarela alaranjada; aos 55 DAA, em ambas as espécies, a coloração dos frutos era laranja avermelhada; aos 70 DAA, o exocarpo dos frutos das pimentas Malagueta e Biquinho apresentavam-se com a coloração completamente vermelha. O ambiente exerce efeito sobre a velocidade do processo de maturação dos frutos e, portanto, não é possível prever a coloração dos frutos com base apenas nos DAA, sendo estes dados apenas indicativos do tempo necessário para se atingir cada estágio.

A germinação mais elevada, para ambas as variedades, foi obtida para sementes de frutos colhidos aos 70 DAA, sem a necessidade de repouso pós-colheita (Figuras 2A e 3A, Tabela 1). Para sementes de pimenta Biquinho, de frutos colhidos aos 70 DAA, a porcentagem de germinação manteve-se praticamente constante, próxima a 90%, ao longo do período de repouso dos frutos (Figura 2A).

Para a pimenta Malagueta, o repouso dos frutos colhidos aos 70 DAA foi prejudicial para a germinação das sementes, reduzindo-a de 90% para 57%, após 18 dias de repouso (Figura 3A). O vigor das sementes de frutos colhidos aos 70 DAA, para ambas as espécies, seguiu a mesma tendência da germinação (Figuras 2 e 3, Tabela 1).

Para a pimenta Biquinho, os resultados obtidos nos testes de primeira contagem de germinação, envelhecimento acelerado e IVG foram praticamente constantes durante o período de armazenamento dos frutos, com valores médios de 59, 65 e 4,20%, respectivamente (Figuras 2B, 2C e 2D, respectivamente).

A pimenta Malagueta, colhida na mesma época, apresentou com o armazenamento dos frutos, queda do vigor das sementes, pois nos testes de primeira contagem de germinação e envelhecimento acelerado, houve redução do vigor de 51 e 71% (antes do armazenamento) para 28 e 57%, respectivamente (Figuras 3B e 3C, respectivamente).

Os resultados de germinação e vigor das sementes de pimentas Biquinho e Malagueta, de frutos colhidos após a maturidade fisiológica (70 DAA), não evidenciam efeito (Figura 2) ou efeito prejudicial (Figura 3) do armazenamento dos frutos na qualidade fisiológica das sementes. A redução da qualidade das sementes, acentuada nas sementes de pimenta Malagueta, deve estar ligado ao processo de deterioração das sementes (McDonald, 1999), com início logo após a maturidade fisiológica. Provavelmente, o ambiente de armazenamento dos frutos, em câmara a 25 °C, favoreceu a manutenção de elevadas taxas respiratórias nas sementes, contribuindo para redução da sua qualidade fisiológica.

A germinação das sementes de pimenta Biquinho, de frutos colhidos aos 55 DAA, aumentou durante o repouso, atingindo valor máximo de 84% aos nove dias (Figura 2A). Para sementes de pimenta Malagueta de frutos colhidos nesse mesmo DAA, a germinação foi pouco favorecida com o repouso dos frutos, alterando-se de 47%, no início do armazenamento, para 55%, aos 12 dias (Figura 3A). Verificou-se, também, efeito do repouso pós-colheita dos frutos colhidos nesse estágio sobre o vigor das sementes.

No caso da pimenta Biquinho, os valores máximos obtidos no teste de primeira contagem de germinação (56%) e envelhecimento acelerado (53%) ocorreram por volta de oito dias de armazenamento (Figuras 2B e 2C, respectivamente). No teste de velocidade de germinação, verificou-se a redução do vigor durante o repouso pós-colheita dos frutos. Para pimenta Malagueta, colhida aos 55 DAA, foi observado aumento dos valores da germinação no teste de envelhecimento acelerado e aumento dos valores do IVG até aproximadamente 12 dias de armazenamento. Assim, para as sementes colhidas aos 55 DAA e submetidas ao repouso pós-colheita dos frutos, foi observado aumento da germinação (Figura 3A) e do vigor (Figura 3B e 3C) dessas sementes.

O repouso pós-colheita dos frutos colhidos antes da maturidade fisiológica das sementes tem sido indicado para algumas espécies que apresentam crescimento indeterminado (Vidigal *et al.*, 2006; Dias *et al.*, 2006; Vidigal *et al.*, 2009), o que possibilita a colheita simultânea de frutos em diferentes estágios de desenvolvimento. Durante esse período, as sementes mantêm-se metabolicamente ativas e o processo de maturação, com acúmulo de massa seca pode ser complementado (Vidigal *et al.*, 2009), havendo incremento da sua germinação e do seu vigor.

Neste trabalho, para as cultivares de ambas as espécies, acredita-se que as sementes colhidas aos 55 DAA ainda não haviam completado o processo de maturação, prosseguido durante o repouso dos frutos, o que ficou evidenciado pelo aumento da germinação e do vigor das sementes (Figuras 2 e 3, Tabela 1). Dados obtidos por Lima & Smiderle (2014) evidenciaram que a colheita de frutos de pimenta Malagueta no estágio verde alaranjado, aos 60 DAA, apresentou sementes com melhor qualidade fisiológica que as obtidas de frutos vermelho intenso e de frutos verdes. Segundo esses autores, a permanência das sementes no interior dos frutos, por dez dias, melhora a qualidade fisiológica das sementes obtidas de frutos colhidos precocemente (intermediários). Assim, há evidências de que o repouso pós-colheita dos frutos de pimenta Malagueta contribui para o aumento da qualidade fisiológica das sementes.

Para sementes de pimenta Biquinho de frutos colhidos aos 40 DAA, apesar de ter havido aumento da germinação durante o repouso dos frutos, o valor máximo atingido foi de 61%, inferior aos valores observados nos demais tratamentos de colheita (Figura 2A). Para pimenta Malagueta, a

colheita aos 40 DAA e o posterior armazenamento dos frutos beneficiaram pouco a taxa de germinação das sementes, atingindo valor máximo de 33%, após 18 dias de armazenamento.

Quanto ao vigor das sementes de frutos colhidos aos 40 DAA, logo após a colheita, para ambas as espécies, os valores foram nulos e após o armazenamento pós-colheita dos frutos o vigor não aumentou consideravelmente (Figuras 2 e 3, Tabela 1). Os valores obtidos no teste de envelhecimento acelerado permaneceram nulos mesmo após o armazenamento dos frutos (Figuras 2C e 3C). Esses dados evidenciam que, para as sementes colhidas muito antes do ponto de maturidade fisiológica, o repouso pós-colheita dos frutos é insuficiente para permitir a conclusão adequada do processo de maturação das sementes, conforme também observado com sementes de pimenta Amarela Comprida (*C. annuum*) (Vidigal *et al.*, 2009). Vidigal *et al.*, (2009) verificaram que a germinação das sementes provenientes de frutos colhidos aos 40 DAA, não armazenados e armazenados por três dias, foi nula, sendo crescente a partir de seis dias de armazenamento pós-colheita dos frutos. No entanto, os valores obtidos foram relativamente

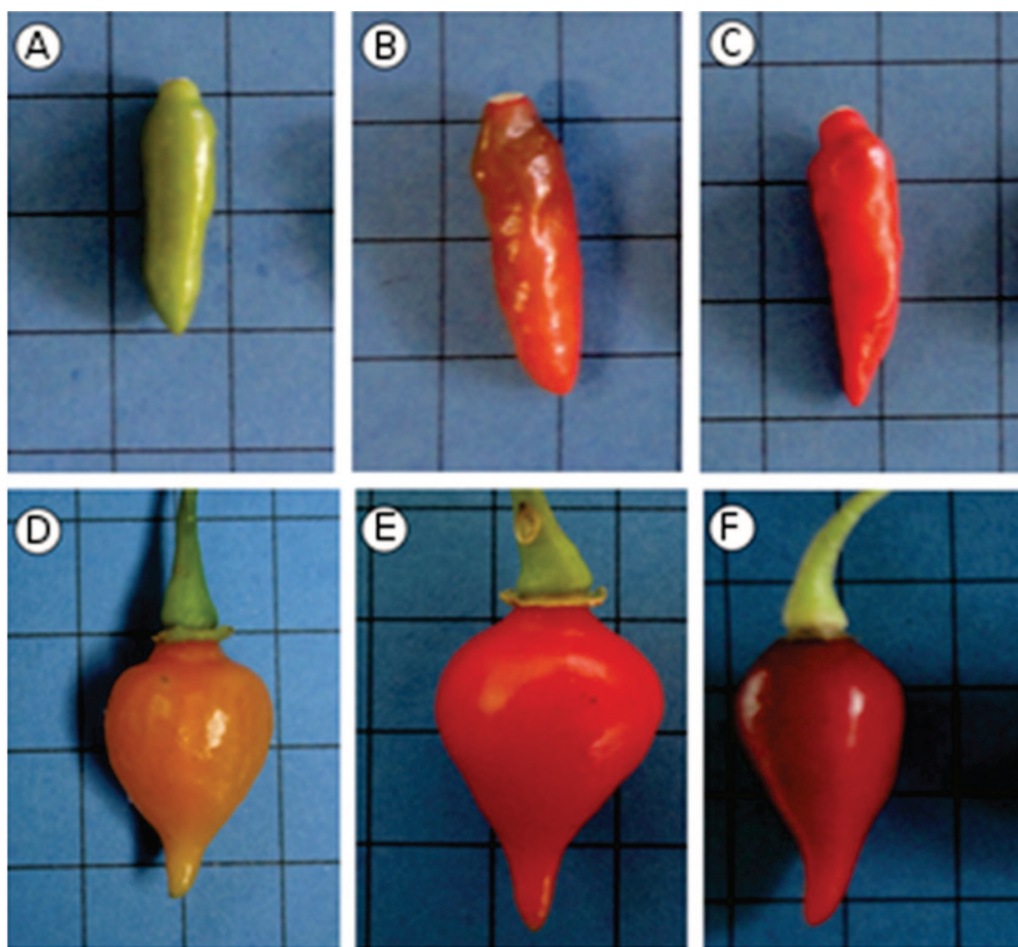


Figura 1: Aspecto visual dos frutos de pimentas Malagueta (A - 40 DAA; B - 55 DAA; C - 70 DAA) e Biquinho (D - 40 DAA; E - 55 DAA; F - 70 DAA), durante o processo de maturação.

baixos, não ultrapassando 40%. A germinação das sementes oriundas de frutos colhidos aos 50 DAA foi crescente, com o armazenamento por até 12 dias, decrescendo a partir daí. Por outro lado, o armazenamento pós-colheita de frutos com 60 e 70 dias de idade não promoveu aumento significativo da germinação das sementes, que se manteve praticamente estável, com valores superiores a 85%, até o final do período (15 dias).

Também, outros autores verificaram que sementes de algumas espécies de frutos carnosos, pertencentes às solanáceas, mesma família das pimentas, mantidas por alguns dias no fruto recém-colhido, dão continuidade ao processo de maturação, atingindo níveis elevados de germinação e vigor. Trabalhando com sementes de tomate oriundas de frutos colhidos aos 40 DAA, Vidigal *et al.* (2006) verificaram que a germinação foi nula, naquelas de frutos sem armazenamento, e atingiu valor de 97%, com o armazenamento por 12 dias. Sanchez *et al.* (1993) observaram que houve aumento da germinação de sementes de pimentão provenientes de frutos colhidos aos 30 DAA e armazenados por 14 dias; entretanto, a germinação máxima das sementes ocorreu quando os frutos foram colhidos

aos 50 DAA e armazenados por sete dias. Em suma, para as duas espécies, sementes de frutos colhidos aos 70 DAA, com coloração vermelha, são de qualidade fisiológica superior à das provenientes de colheitas em épocas anteriores. O repouso pós-colheita dos frutos colhidos aos 70 DAA não afetou a qualidade fisiológica das sementes de pimenta Biquinho, mas foi prejudicial para as da pimenta Malagueta. Para a pimenta Biquinho, o repouso de frutos colhidos aos 55 DAA, com coloração amarela alaranjada, pode promover a qualidade fisiológica das sementes à níveis semelhantes aos das colhidas aos 70 DAA. O mesmo não ocorreu com a pimenta Malagueta, não sendo indicado o repouso pós-colheita de seus frutos.

Portanto, os tratamentos que proporcionaram sementes com percentagem de germinação superior a 70%, mínimo recomendado para a comercialização de sementes básicas do gênero *Capsicum*, de acordo com a portaria 457, de 18 de dezembro de 1986 (Brasil, 1986) e com o projeto de Instrução Normativa de 05 de setembro de 2012 (DOU nº 173), foram: sementes de pimentas Biquinho e Malagueta provenientes de frutos colhidos aos 70 DAA, sem a necessidade de armazenamento pós-colheita (germinação H")

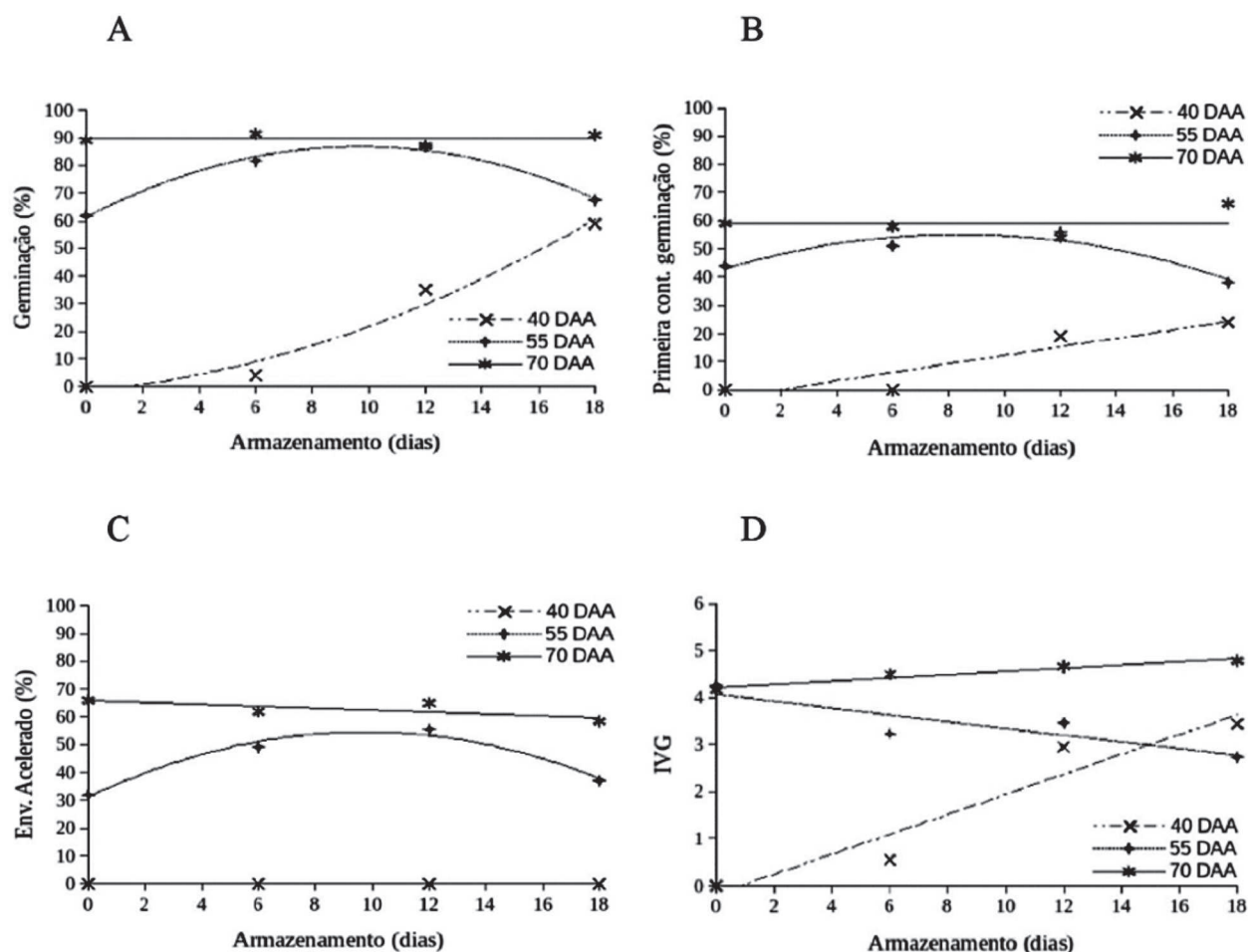


Figura 2: Germinação e vigor de sementes de pimenta Biquinho, extraídas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação, em função do período de armazenamento pós-colheita dos frutos.

90%); sementes de pimenta Biquinho oriundas de frutos colhidos aos 55 DAA, com repouso pós-colheita (germinação máxima = 85%, aos 9,3 dias de repouso).

Sementes de colheita aos 40 DAA, apesar de favorecidas pelo repouso dos frutos, tiveram baixa qualidade fisiológica, para ambas as espécies. Portanto, recomenda-se, para a pimenta Biquinho, a colheita conjunta de frutos de coloração vermelha (70 DAA) e laranja (55 DAA) e o manejo correto do repouso desses frutos por 12 dias. Isso proporciona obtenção de lotes de sementes com qualidade fisiológica elevada e uniforme, com menor número de colheitas, tornando essa etapa menos onerosa. Para a pimenta Malagueta, recomenda-se a colheita seletiva dos frutos de coloração vermelha, aos 70 DAA, seguida da extração imediata das sementes.

De maneira geral, nas duas espécies de pimenta estudadas, as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX) foram inferiores nas sementes extraídas de frutos colhidos aos 70 DAA, se comparadas às atividades daquelas de frutos colhidos aos 55 DAA e, principalmente, aos 40 DAA (Figuras 4 e 5, Tabela 1).

Essas enzimas atuam como mecanismos de defesa vegetal contra formas reativas de oxigênio. A superóxido dismutase é a primeira enzima do grupo a trabalhar; ela anula a ação de superóxidos (O_2^-), catalizando reações de transferência de dois elétrons para produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Em seguida, a catalase impede a formação de outros compostos reativos, convertendo o peróxido de hidrogênio, em água e oxigênio, ou seja, em espécies não reativas (McDonald, 1999). Diante disso, para o mecanismo estar de acordo e em ótima funcionalidade, essas duas enzimas devem apresentar comportamentos semelhantes, já que uma termina o trabalho da outra. Segundo Taiz & Zaiger (2004), apesar de sua grande efetividade na neutralização do oxigênio reativo (O_2^-), a SOD produz peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, apesar de menos reativo, em altas concentrações torna-se tóxico. Assim, sua atividade isoladamente é pouco funcional na proteção da semente, sendo necessária a formação de um sistema removedor de radicais livres, conjuntamente com catalase, peroxidase e carotenoides, entre outros.

Para sementes de pimenta Biquinho, oriundas de frutos colhidos aos 70 DAA, com maiores valores de germi-

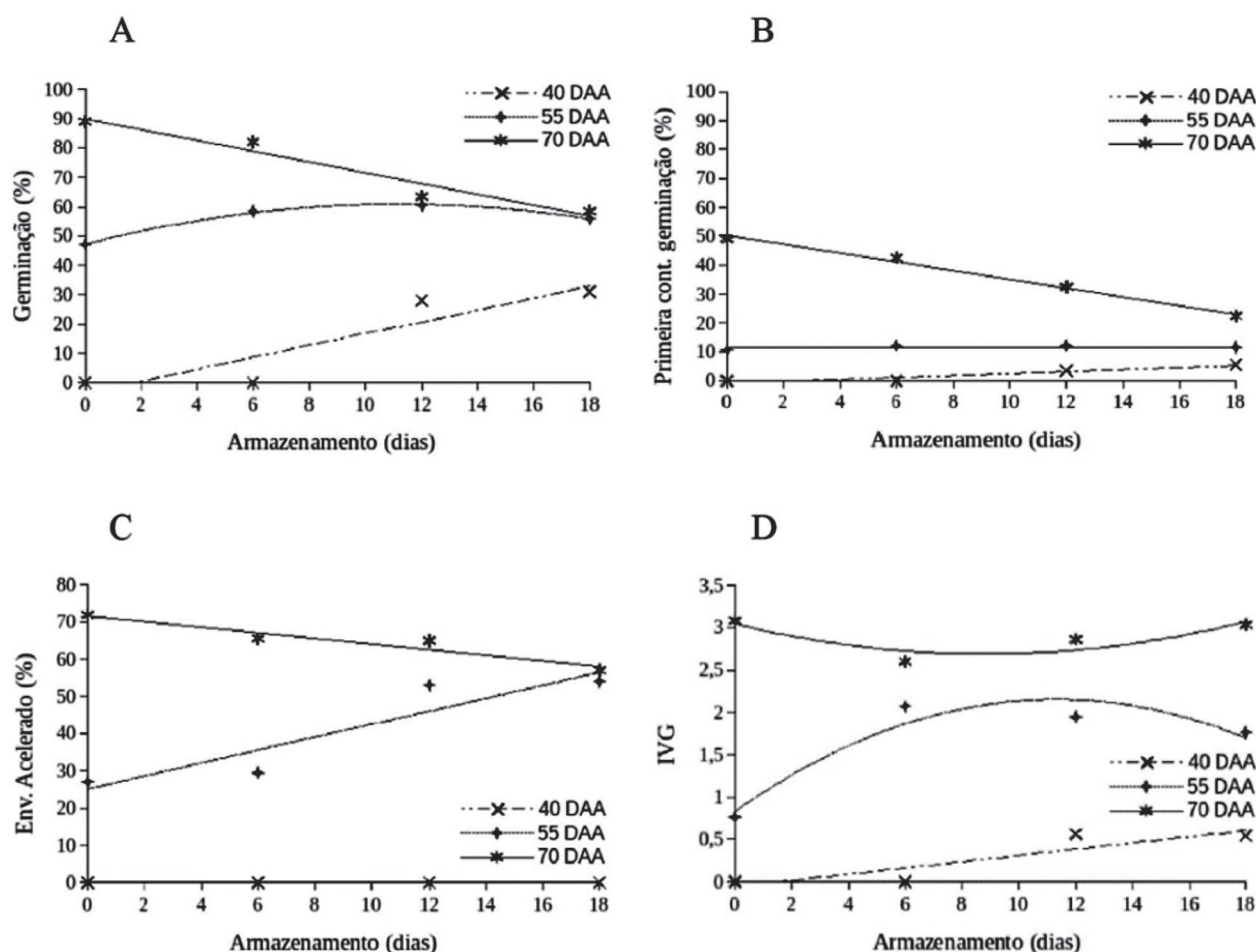


Figura 3: Germinação e vigor de sementes de pimenta 'malagueta', extraídas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação, em função do período de armazenamento pós-colheita dos frutos.

nação e vigor (Figura 2, Tabela 1), houve menor atividade da SOD (Figura 4A). Possivelmente, essas sementes mais vigorosas já haviam atingido a maturidade fisiológica e sofreram menor estresse oxidativo durante o período de armazenamento dos frutos, graças à redução da atividade metabólica e consequentemente, à menor atividade enzimática. Por outro lado, para pimenta Malagueta, os dados de atividade da SOD (Figura 5A) evidenciam aumento do estresse oxidativo das sementes durante o período de repouso dos frutos colhidos aos 70 DAA; diferentemente do ocorrido com pimenta Biquinho. Esses resultados mostram que, em decorrência do processo de deterioração, houve redução da qualidade fisiológica das sementes durante o repouso dos frutos (Figura 3), o que, certamente, demandou maior atividade da enzima antioxidativa (Figura 5A), proporcionada pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (Bailly, 2004). Porém, o aumento da atividade da enzima não foi suficiente para impedir a queda da germinação e do vigor das sementes.

Em sementes de pimenta Biquinho, foi verificada atividade da SOD, durante período de repouso de frutos colhidos aos 55 DAA, maior do que a das sementes das outras

épocas de colheita (Figura 4A). Essa maior atividade da enzima foi acompanhada de aumento, seguido de redução, da germinação das sementes durante o repouso pós-colheita (Figura 2A), ou seja, a alta atividade da enzima está associada à alta atividade metabólica decorrente do processo de maturação, como síntese e acúmulo de reservas nas sementes durante esse período (Vidigal *et al.*, 2011). Esse padrão não foi observado nas sementes de pimenta Malagueta colhidas nessa mesma época (Figura 5A). Em geral, foram observados menores valores de atividade da SOD, porém associados a inexpressivo aumento da germinação durante o período de repouso dos frutos (Figura 3A).

A atividade da superóxido dismutase (SOD) é intensa durante a maturação das sementes (Martins *et al.*, 2012), com aumento da atividade dessa enzima durante o armazenamento pós-colheita dos frutos (Caixeta *et al.*, 2014; Vidigal *et al.*, 2009). Neste trabalho, constatou-se, durante o repouso de frutos colhidos aos 40 DAA, aumento da atividade da SOD para sementes de pimenta Biquinho (Figura 4A) resposta esta contrária para a pimenta Malagueta colhidas aos 40 DAA, que não apresentou incremento da

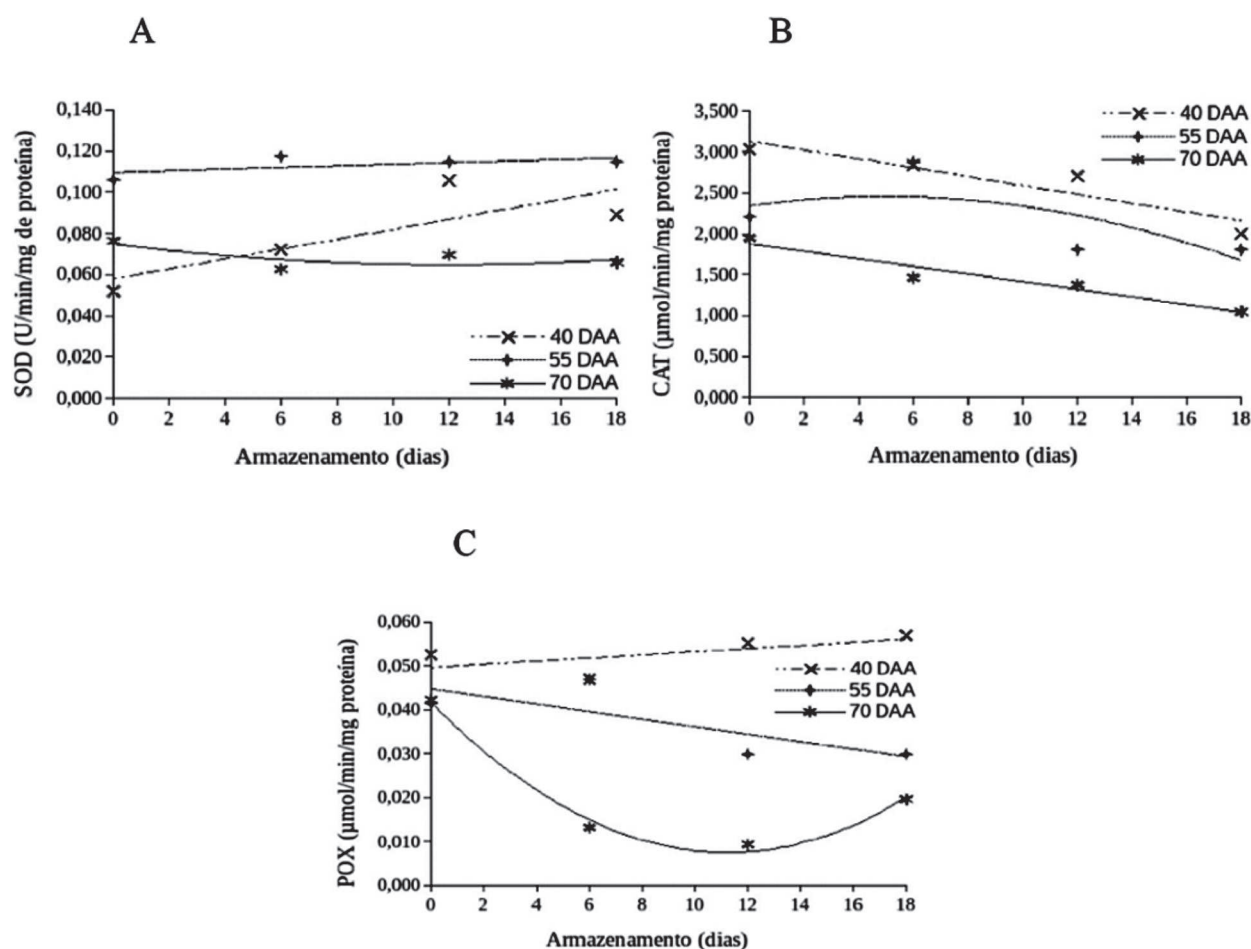


Figura 4: Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX), de sementes de pimenta Biquinho, extraídas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação, em função do período de armazenamento pós-colheita dos frutos.

atividade da SOD durante o repouso dos frutos. Todavia, a atividade da enzima foi maior que a de sementes de outras épocas de colheita (Figura 5A). Esse aumento e maior atividade da enzima estão associados ao incremento da germinação das sementes das duas espécies durante o período de repouso dos frutos (Figuras 2A e 3A). As sementes colhidas nesse período estavam distantes de atingir a maturidade fisiológica, sendo que, as alterações fisiológicas e bioquímicas que culminaram com aumento da germinação das sementes estavam associadas com incremento do estresse oxidativo das células, que ocorre durante seu processo de maturação (Bailly, 2004), como também o consequente aumento da atividade enzimática (Figura 5A). Porém, o tempo de armazenamento dos frutos não foi suficiente para se atingir plenamente o fim do processo de maturação, já que essas sementes apresentaram reduzidos valores de germinação e de vigor (Figuras 2 e 3, Tabela 1). Possivelmente, durante o processo de maturação, essas sementes ainda não haviam atingido nível metabólico mínimo, a partir do qual seria possível completá-lo após desligadas da planta.

Para as duas espécies, foi obtido padrão semelhante para a atividade da CAT (Figuras 4B e 5B), com maiores valores para sementes oriundas de frutos colhidos aos 40 DAA, valores intermediários para as extraídas de frutos colhidos aos 55 DAA e, menores valores para sementes extraídas de frutos colhidos aos 70 DAA. O padrão de atividade dessa enzima foi coerente com os dados obtidos para a germinação e o vigor das sementes (Figuras 2 e 3), ou seja, os maiores valores foram obtidos para as que ainda não haviam atingido a maturidade fisiológica e, portanto, apresentaram menores germinação e vigor, aliados ao aumento da qualidade durante o período de repouso dos frutos. Ainda, a menor atividade da CAT das sementes de colheita aos 70 DAA, após a maturidade fisiológica, está associada ao menor estresse oxidativo dessas sementes, em função da redução do metabolismo, como também foi

observado para SOD (Figuras 4A e 5A). Esses resultados sugerem que, possivelmente, sementes já formadas, imediatamente após atingir sua maturidade fisiológica (máxima germinação e máximo vigor), tendem a apresentar redução da atividade da enzima CAT.

Nakada *et al.* (2011) verificaram que sementes de pepino tiveram a atividade da enzima CAT aumentada até 40 DAA, antes da maturidade fisiológica (45-50 DAA), decrescendo a partir deste estágio. Esses autores justificaram os resultados, com a suposição de que as sementes de pepino (espécie ortodoxa como a pimenta), ao passar pelo processo de secagem, sendo este considerado fator de estresse, e ainda, por causa da baixa expressão das proteínas LEA nesses estágios de desenvolvimento dos frutos (antes de 40 DAA), há ativação da formação de radicais livres, por causa da intolerância à dessecação, ou seja, imaturidade das sementes. As proteínas LEA são formadas no final da embriogênese.

A maior atividade da CAT tem sido relacionada com os mecanismos de defesa antioxidativa contra as espécies reativas de oxigênio, em situações de estresse, quando há maior produção de H_2O_2 , associada à maior atividade da SOD, enquanto a manutenção dos níveis de H_2O_2 das células dá-se pela atividade das enzimas peroxidases (Mittler, 2002). Assim, menores atividades da CAT indicaram menor estresse oxidativo e os resultados para essa enzima foram coerentes com os obtidos nos testes de germinação e vigor, para as duas espécies. Portanto, a CAT pode ser utilizada como indicadora da qualidade fisiológica das sementes de pimentas Biquinho e Malagueta em estudos de maturação, sendo que menores atividades estão relacionadas com maior qualidade fisiológica.

Resultados semelhantes aos obtidos para a CAT foram observados para a POX, em sementes de pimenta Biquinho (Figura 4C), ou seja, maior atividade da enzima foi observada em sementes extraídas de frutos colhidos aos 40 DAA, com ligeiro aumento durante o repouso pós-co-

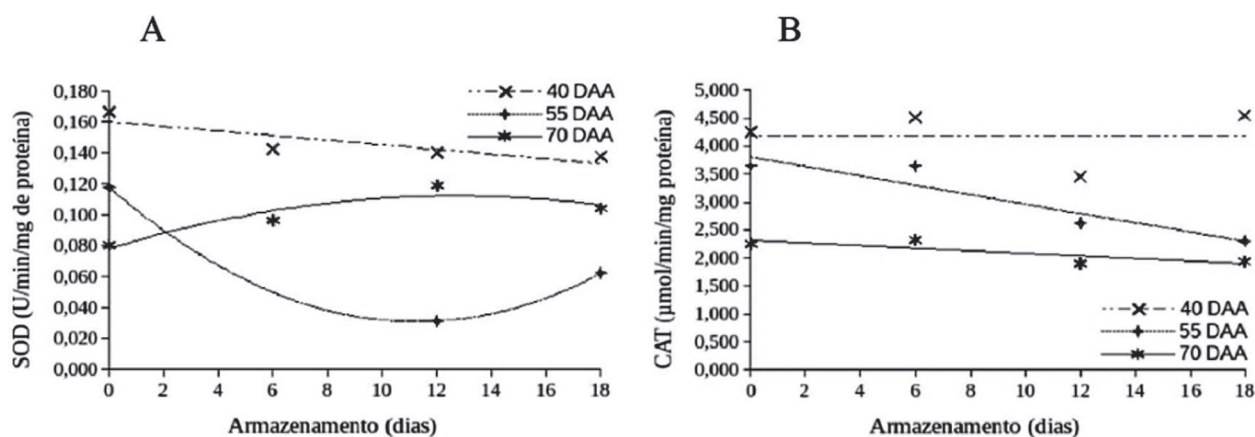


Figura 5: Atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em sementes de pimenta Malagueta, extraídas de frutos colhidos em diferentes estágios de maturação, em função do período de armazenamento pós-colheita frutos.

lheita dos frutos, que foi associado ao aumento da germinação das sementes (Figura 2A). A atividade da enzima foi menor, em sementes colhidas aos 70 DAA, do que a da colhidas aos 55 DAA (Figura 4C). Houve redução da atividade da POX durante o repouso de frutos colhidos na última época (Figura 4C). Para sementes de pimenta Malagueta, não foi detectada atividade dessa enzima, que poderia estar inativa ou com atividade muito reduzida.

A peroxidase desempenha papel crítico no metabolismo das sementes, por utilizar, assim como a catalase, peróxidos como aceptores de hidrogênio, podendo contribuir para o aumento dos mecanismos de defesa e de prevenção de perda da qualidade; de acordo com Bewley & Black (1994), a redução da atividade dessa enzima proporciona maior exposição dos sistemas de membranas aos efeitos do O_2 ; com isso, em decorrência do nível de danos das membranas, o oxigênio atua de forma mais intensa, promovendo oxidação dos compostos.

A associação entre a maturidade de sementes de pimenta e a atividade da POX também foi observada por Caixeta *et al.* (2014). Esses autores, trabalhando com sementes de pimenta Malagueta, extraídas de frutos nos estádios E1 (frutos com primeiros sinais de amarelecimento), E2 (frutos maduros, vermelhos) e E3 (Frutos maduros e

submetidos a sete dias de repouso), verificaram forte atividade da peroxidase em sementes imaturas, no estágio E1; maior lixiviação de exudatos (alto valor da condutividade) nessas sementes imaturas, em função de menor estruturação do sistema de membranas, das organelas e celular. Já, Vidigal *et al.* (2009), em estudo com sementes de pimenta Amarela Comprida (*C. annuum* L.), verificaram que o zimograma da enzima peroxidase não permitiu estabelecer associação entre atividade dessa enzima e estágio de maturação das sementes.

Em geral, nas duas espécies de pimenta estudadas, sementes provenientes de frutos colhidos aos 70 DAA apresentaram, logo após a colheita, e ao longo do período de repouso dos frutos, maior qualidade fisiológica e menor atividade enzimática, principalmente, do que a daquelas extraídas de frutos colhidos aos 40 DAA. Nessa fase de desenvolvimento, a incapacidade de germinar ou a baixa taxa de germinação devem-se à imaturidade do embrião (Abud *et al.*, 2013). Sendo assim, possivelmente, sementes colhidas aos 40 DAA, ainda imaturas, apresentavam metabolismo intenso e, conseqüentemente, elevada formação de EROs. Normalmente, a maior concentração de EROs demanda maior atuação do sistema enzimático antioxidante, o que pode ser comprovado, principalmente,

Tabela 1: Equações de regressão, obtidas para os dados de germinação, vigor e atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX), de sementes de pimentas Biquinho (*C. chinense* Jacq.) e Malagueta (*C. frutescens* L.), extraídas de frutos colhidos em diferentes estádios de maturação, em função do período de armazenamento pós-colheita dos frutos

Variáveis		Pimenta Biquinho		Pimenta Malagueta	
Avaliações de Laboratório	DAA	Equação	R ²	Equação	R ²
Germinação	40	$\hat{y} = 0,1389x^2 + 0,9667x - 1,7$	0,98	$\hat{y} = 2,0166x - 3,4$	0,83
	55	$\hat{y} = -0,2708x^2 + 5,2417x + 61,45$	0,99	$\hat{y} = -0,1111x^2 + 2,4833x + 47,15$	0,99
	70	$\hat{y} = \bar{y} = 89,63$	—	$\hat{y} = -1,8333x + 89,75$	0,95
Prim. cont. germinação	40	$\hat{y} = 1,5167x - 2,9$	0,87	$\hat{y} = 0,3333x - 0,75$	0,90
	55	$\hat{y} = -0,1736x^2 + 2,9083x + 42,95$	0,88	$\hat{y} = \bar{y} = 11,50$	—
	70	$\hat{y} = \bar{y} = 59,25$	--	$\hat{y} = -1,4917x + 50,05$	0,99
Envelhec. acelerado	40	$\hat{y} = \bar{y} = 0$	--	$\hat{y} = \bar{y} = 0$	--
	55	$\hat{y} = -0,2465x^2 + 4,7958x + 31,275$	0,97	$\hat{y} = 1,7417x + 25,2$	0,85
	70	$\hat{y} = -0,325x + 65,8$	0,56	$\hat{y} = -0,7583x + 71,7$	0,91
IVG	40	$\hat{y} = 0,2125x - 0,175$	0,92	$\hat{y} = 0,0363x - 0,052$	0,79
	55	$\hat{y} = -0,0727x + 4,079$	0,78	$\hat{y} = -0,0103x^2 + 0,2338x + 0,8375$	0,91
	70	$\hat{y} = 0,0338x + 4,228$	0,95	$\hat{y} = 0,0045x^2 - 0,0794x + 3,0385$	0,76
SOD	40	$\hat{y} = 0,0024x + 0,0579$	0,66	$\hat{y} = -0,0015x + 0,1601$	0,73
	55	$\hat{y} = 0,0004x + 0,1096$	0,38	$\hat{y} = 0,0007x^2 - 0,0154x + 0,1178$	0,97
	70	$\hat{y} = 7,0779x^2 - 0,0017x + 0,0748$	0,54	$\hat{y} = -0,0002x^2 + 0,0054x + 0,0781$	0,88
CAT	40	$\hat{y} = -0,0538x + 3,1272$	0,86	$\hat{y} = \bar{y} = 4,19$	--
	55	$\hat{y} = -0,0046x^2 + 0,0458x + 2,3432$	0,48	$\hat{y} = -0,00839x + 3,8037$	0,88
	70	$\hat{y} = -0,0465x + 1,8760$	0,93	$\hat{y} = -0,0225x + 2,3025$	0,67
POX	40	$\hat{y} = 0,0004x + 0,0496$	0,40	--	--
	55	$\hat{y} = -0,0009x + 0,0446$	0,61	--	--
	70	$\hat{y} = 0,0003x^2 - 0,0061x + 0,0416$	0,99	--	--

pelas maiores atividades das enzimas catalase e peroxidase nesse estágio (Figuras 4A e 5A). Os menores valores de atividades das enzimas antioxidativas foram verificados em sementes provenientes de colheita aos 70 DAA (Figuras 4 e 5, Tabela 1), no seu ponto de maturidade fisiológica (Abud *et al.*, 2013), comprovados pela germinação e pelo vigor mais elevados (Figuras 2 e 3, Tabela 1). Isso se deve, provavelmente, à redução do metabolismo das sementes (baixa atividade respiratória), com concomitante redução do seu grau de umidade.

Embora exista uma série de pesquisas voltadas para área de enzimologia, o sistema de defesa antioxidante enzimático das plantas ainda não está totalmente elucidado, tratando-se de um campo da ciência intrigante e complexo, que requer dos pesquisadores, de forma contínua, o desenvolvimento de novas linhas de pesquisas na área.

CONCLUSÕES

A colheita dos frutos de pimenta Malagueta e de pimenta Biquinho aos 70 DAA, com coloração vermelha, na maturidade fisiológica, proporcionou sementes com elevada germinação e vigor, dispensando o repouso pós-colheita dos frutos. Nesse estágio de maturação, o repouso dos frutos não foi benéfico para a qualidade fisiológica das sementes de pimenta Biquinho e foi prejudicial para a qualidade das sementes de pimenta Malagueta.

Sementes de pimenta Biquinho, provenientes de frutos colhidos aos 55 DAA, antes da maturidade fisiológica, com pericarpo de coloração alaranjada e submetidas ao repouso pós-colheita, apresentaram incremento da germinação e do vigor, e, portanto, a colheita a partir desse estágio pode ser indicada a fim de otimizar esse processo.

Em geral, a atividade das enzimas envolvidas na proteção das sementes contra radicais livres é maior em sementes de frutos colhidos aos 40 DAA e menor naquelas de frutos colhidos aos 70 DAA.

A catalase tem potencial para o monitoramento da qualidade de sementes de pimentas Malagueta e Biquinho. A baixa atividade dessa enzima, em sementes de frutos colhidos e armazenados, está relacionada com a maior qualidade fisiológica das sementes.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, à CAPES e ao CNPq, pelo apoio financeiro à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- Abud HF, Araújo EF, Araújo RF, Araújo AV & Pinto CMF (2013) Qualidade fisiológica de sementes das pimentas malagueta e biquinho durante a ontogênese. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 04:1546-1553.
- Bailly C (2004) Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14:93-107.
- Rev. Ceres, Viçosa, v. 65, n.6, p. 534-545, nov/dez, 2018
- Bhering MC, Dias DCFS, Vidigal DS & Naveira DSP (2006) Teste de envelhecimento acelerado em sementes de pimenta. *Revista Brasileira de Sementes*, 28:64-71.
- Bewley JD & Black M (1994) *Seed: physiology of development and germination*. 2ª ed. New York, Plenum Press. 445p.
- Brasil (1986) Portaria nº 457, 18 de dezembro de 1986. Estabelece para todo o território nacional, procedimentos e padrões de sementes olerícolas, para distribuição, transporte, e comércio de sementes fiscalizadas, e para importação. DOU, 23/12/1986, Seção 1, p. 19653.
- Brasil (2009). Regras para análise de sementes. Brasília, MAPA/ACS. 395p.
- Caixeta F, Von Pinho EVR, Guimarães RM, Pereira PHAR, Catão HCRM & Clemente ACS (2014) Determinação do ponto de colheita na produção de sementes de pimenta malagueta e alterações bioquímicas durante o armazenamento e a germinação. *Científica*, 42:187-197.
- Dias DCFS, Ribeiro FP, Dias LAS, Silva DJH & Vidigal DS (2006) Tomato seed quality in relation to fruit maturation and post-harvest storage. *Seed Science and Technology*, 34:691-699.
- El-Maarouf-Bouteau H & Bailly C (2008) Oxidative signaling in seed germination and dormancy. *Plant Signal Behavior*, 03:175-182.
- Kalemba EM & Pukacka S (2007) Possible roles of LEA proteins and sHSPs in seed protection: a short review. *Biological Letters*, 44:03-16.
- Leprieux O, Hendry GAF & Mckersie BD (1993) The mechanisms of desiccation tolerance in developing seeds. *Seed Science Research*, 03:231-246.
- Lima JME & Smiderle OJ (2014) Qualidade fisiológica de sementes de pimenta obtidas em frutos de diferentes maturações e armazenadas. *Semina: Ciências Agrárias*, 35:251-258.
- Maguire JD (1962) Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, 02:176-177.
- Martins DC, Vilela FKJ, Guimarães RM, Gomes LAA & Silva PA (2012) Physiological maturity of eggplant seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 34:534-540.
- Mcdonald MB (1999) Seed deterioration, physiology, repair and assessment. *Seed Science Technology*, 27:177-237.
- Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 07:405-410.
- Nakada PG, Oliveira JA, Melo LC, Gomes LAA & Von Pinho EVR (2011) Desempenho fisiológico e bioquímico de sementes de pepino nos diferentes estádios de maturação. *Revista Brasileira de Sementes*, 33:113-122.
- Peixoto PHP, Cambraia J, Sant'ana R, Mosquim PR & Moreira MA (1999) Aluminum effects on lipid peroxidation and on activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 11:137-143.
- Pereira FECB, Torres SB, Silva MIL, Grangeiro LC & Benedito CP (2014) Qualidade fisiológica de sementes de pimenta em função da idade e do tempo de repouso pós-colheita dos frutos. *Revista Ciência Agronômica*, 45:737-744.
- Pinto CMF, Puiatti M, Caliman FRB, Moreira GR, Mattos RN (2006) Clima, época de semeadura, produção de mudas, plantio e espaçamento na cultura da pimenta. *Informe Agropecuário*, 27:40-49.

- R Core Team (2015) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, R Foundation for Statistical Computing. Disponível em: <https://www.R-project.org/>. Acessado em: 21 de novembro de 2015.
- Ricci N, Pacheco AC, Conde AS & Custódio CC (2013) Qualidade de sementes de pimenta jalapenho em função da maturação e tempo de permanência nos frutos. *Agropecuária Tropical*, 43:123-129.
- Sanchez VM, Sundstrom GN, McClure GN & Lang NS (1993) Fruit maturity, storage and postharvest maturation treatments affect bell pepper (*Capsicum annuum* L.) seed quality. *Scientia Horticulturae*, 54:191-201.
- Taiz L & Zeiger E (2004) *Plant physiology*. Califórnia, Artmed. 565p.
- Vidigal DS, Dias DCFS, Dias LAS & Finger FL (2011) Changes in seed quality during fruit maturation of sweet pepper. *Scientia Agricola*, 68:535-539.
- Vidigal DS, Dias DCFS, Naveira DSP, Rocha FB & Bhering MC (2006) Qualidade fisiológica de sementes de tomate em função da idade e do armazenamento pós-colheita dos frutos. *Revista Brasileira de Sementes*, 28:87-93.
- Vidigal DS, Dias DCFS, Von Pinho EVR & Dias LAS (2009) Alterações fisiológicas e enzimáticas durante a maturação de sementes de pimenta (*Capsicum annuum* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, 31:129-136.