

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**

**Heteromorfismo de sementes de *Cedrela fissilis* Vell.: Aspectos físicos,  
anatômicos, bioquímicos e fisiológicos**

Karoline Geralda Mendes  
*Magister Scientiae*

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**KAROLINE GERALDA MENDES**

**Heteromorfismo de sementes de *Cedrela fissilis* Vell.: Aspectos físicos, anatômicos, bioquímicos e fisiológicos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jean Marcel Sousa Lira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS  
2025**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade  
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

M538h  
2025  
Mendes, Karoline Geralda, 1996-  
Heteromorfismo de sementes de *Cedrela fissilis* Vell.:  
aspectos físicos, anatômicos, bioquímicos e fisiológicos /  
Karoline Geralda Mendes. – Viçosa, MG, 2025.  
1 dissertação eletrônica (94 f.): il. (algumas color.).

Inclui apêndices.

Orientador: Jean Marcel Sousa Lira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Engenharia Florestal, 2025.

Referências bibliográficas: f. 75-94.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2025.727>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Tecnologia de sementes. 2. Plantas florestais.  
3. Sementes - Fisiologia. I. Lira, Jean Marcel Sousa, 1983-.  
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia  
Florestal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal.  
III. Título.

GFDC adapt. CDD 22. ed. 634.923231

Bibliotecário(a) responsável: Bruna Silva CRB-6/2552

**KAROLINE GERALDA MENDES**

**Heteromorfismo de sementes de *Cedrela fissilis* Vell.: Aspectos físicos, anatômicos, bioquímicos e fisiológicos**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 5 de agosto de 2025.

Assentimento:

---

Karoline Geralda Mendes  
Autora

---

Jean Marcel Sousa Lira  
Orientador

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 31/10/2025 às 21:13:38 e pelo orientador em 04/11/2025 às 18:07:01. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **L99C.NPPK.J7RR** e clique no botão 'Validar documento'.

Aos meus pais.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Engenharia Florestal, pela minha formação e oportunidade de cursar o mestrado.

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aos professores Jean Marcel Sousa Lira e Lausanne Soraya de Almeida, pela oportunidade, orientação, suporte, confiança e amizade.

Ao professor Edgard Augusto de Toledo Picoli pelo apoio, inspiração e colaboração nas análises anatômicas e histoquímicas.

Aos integrantes do Laboratório de Fisiologia Vegetal e Fisiologia Pós-Colheita, em especial a Marlene de Souza Bretas, André Luiz dos Santos Timóteo, Paulo Victor dos Santos Ramos, Gabriella Bigonha Lucarelli e ao técnico José Maurício Machado Pires pelos ensinamentos, pela ajuda na condução do trabalho, pela disponibilidade, apoio e gentileza.

Ao José Mauro Ferreira, técnico do Laboratório de Sementes Florestais do Departamento de Engenharia Florestal (DEF-UFV), pelos ensinamentos, apoio, inspiração e pela ajuda na condução do trabalho.

Ao Laboratório de Agroenergia do Departamento de Agronomia (DAA – UFV), pela colaboração na obtenção dos espectros NIR, e ao professor Laércio Júnior da Silva, pelo apoio e colaboração nas análises dos espectros.

Ao professor Sebastião Martins Filho e ao pós-doutorando Marciel Lelis Duarte pela colaboração nas análises estatísticas.

Agradeço aos meus pais, Nilsa e Maurício, e à minha família por todo o amor e apoio incondicional. Ao meu namorado e maior incentivador, Wenderson, agradeço pelo companheirismo e apoio em todos os momentos, além de tantas conversas inspiradoras.

A todos que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho.

Muito obrigada!

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)*

## RESUMO

MENDES, Karoline Geralda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2025. **Heteromorfismo de sementes de *Cedrela fissilis* Vell.: Aspectos físicos, anatômicos, bioquímicos e fisiológicos.** Orientador: Jean Marcel Sousa Lira.

*Cedrela fissilis* Vell., conhecida como cedro-rosa, é uma espécie arbórea nativa do Brasil, de grande relevância ecológica e econômica, que apresenta heteromorfismo de sementes associado à coloração do tegumento. Essa coloração, que varia do bege ao marrom-avermelhado, pode refletir diferentes estágios de maturação e impactar diretamente a qualidade fisiológica das sementes. Este trabalho teve como objetivo investigar a relação entre a cor do tegumento e a qualidade fisiológica de sementes claras e escuras de *C. fissilis*, por meio da análise de atributos físicos, anatômicos, bioquímicos e fisiológicos. As sementes foram avaliadas quanto à biometria, teor de umidade, peso de mil sementes, germinação, vigor, curva de embebição, condutividade elétrica, estrutura interna (microscopia de luz e teste de raios X), composição de reservas (carboidratos, lipídios e proteínas), teor de compostos fenólicos, atividade de enzimas antioxidantes e perfil espectral por espectroscopia no infravermelho próximo (NIR). A germinação foi avaliada por meio da análise de sobrevivência, juntamente com os testes de Log-rank e Wilcoxon. Foi criado um modelo para ajustar a curva de embebição e estimar parâmetros relacionados às diferentes fases da germinação e calcular a velocidade de embebição. Os espectros NIR, obtidos de sementes individuais, foram pré-processados e utilizados para modelagem com base no método da Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Os demais dados foram analisados por meio do teste t de Student a 5% de probabilidade. Sementes escuras apresentaram maior peso de mil sementes, teor de proteína total, maior atividade das enzimas catalase e peroxidase, além de maior germinação e vigor. Sementes claras apresentaram conteúdo mais elevado de açúcares redutores, sugerindo menor grau de maturidade ou início de deterioração. Não houve diferenças entre sementes claras e escuras quanto à anatomia. A espectroscopia NIR mostrou alta precisão na distinção entre sementes claras e escuras, especialmente na região espectral próxima de 1938 nm. A cor das sementes de *C. fissilis* constitui um biomarcador da sua qualidade fisiológica, podendo ser utilizada como um critério prático na seleção de sementes com maior qualidade.

Palavras-chave: cedro-rosa; germinação e vigor; qualidade fisiológica; cor

do tegumento

## ABSTRACT

MENDES, Karoline Geralda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August, 2025. **Heteromorphism of *Cedrela fissilis* Vell. seeds: Physical, anatomical, biochemical and physiological aspects.** Adviser: Jean Marcel Sousa Lira.

*Cedrela fissilis* Vell., commonly known as cedro-rosa, is a tree species native to Brazil with high ecological and economic relevance. It exhibits seed heteromorphism associated with seed coat coloration. This coloration, ranging from beige to reddish-brown, may reflect different maturation stages and directly influence seed physiological quality. The present study aimed to investigate the relationship between seed coat color and the physiological quality of light- and dark-colored *C. fissilis* seeds through the analysis of physical, anatomical, bio-chemical, and physiological traits. Seeds were evaluated for biometric parameters, moisture content, thousand-seed weight, germination, vigor, imbibition curve, electrical conductivity, internal structure (via light microscopy and X-ray imaging), reserve composition (carbohydrates, lipids, and proteins), phenolic compound content, antioxidant enzyme activity, and spectral profile using near-infrared (NIR) spectroscopy. Germination was analyzed using survival analysis combined with Log-rank and Wilcoxon tests. A model was developed to fit the imbibition curve, estimate parameters related to the different germination phases, and calculate the imbibition rate. NIR spectra obtained from individual seeds were preprocessed and modeled using Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA). Other data were analyzed using the Student's t-test at a 5% probability level. Dark-colored seeds exhibited higher thousand-seed weight, total protein content, greater catalase and peroxidase activity, and superior germination and vigor. Light-colored seeds showed higher levels of reducing sugars, suggesting a lower degree of maturity or the onset of deterioration. No anatomical differences were observed between light and dark seeds. NIR spectroscopy demonstrated high accuracy in distinguishing between seed color groups, particularly in the spectral region near 1938 nm. The seed color of *C. fissilis* represents a biomarker of physiological quality and may serve as a practical criterion for selecting seeds with higher vigor and viability.

Keywords: cedro-rosa; germination and vigor; physiological quality; seed coat color

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. CONTEXTO TEÓRICO .....	13
2.1 <i>Cedrela fissilis</i> Vellozo.....	13
2.2 Heteromorfismo de sementes devido a cor do tegumento .....	16
2.3 Qualidade fisiológica de sementes.....	18
2.4 Estrutura de sementes .....	23
2.5 Composição química de sementes .....	26
2.6 Sistema antioxidante enzimático .....	28
2.7 Técnicas para análises bioquímicas de sementes.....	29
2.7.1 Histoquímica.....	29
2.7.2 Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis) .....	30
2.7.3 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) .....	34
2.7.4 Nitrogênio total pelo método de Kjeldahl.....	37
2.7.5 Extração de lipídios por Soxhlet.....	38
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Material vegetal .....	39
3.2 Qualidade física das sementes .....	40
3.2.1 Biometria .....	40
3.2.2 Peso de mil sementes .....	40
3.2.3 Grau de umidade.....	40
3.2.4 Teste de raios X .....	40
3.3 Anatomia das sementes.....	41
3.4 Análise bioquímica das sementes .....	42
3.4.2 Lipídios.....	42
3.4.1 Carboidratos.....	42
3.4.3 Proteínas totais.....	43
3.4.3 Compostos fenólicos totais (CFT).....	43
3.4.4 Atividade de enzimas do sistema antioxidativo.....	44
3.4.5 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) .....	45
3.5 Qualidade fisiológica das sementes .....	46
3.5.1 Teste de germinação .....	46
3.5.2 Curva de embebição.....	46
3.5.3 Teste de condutividade elétrica.....	49

3.6 Análise estatística .....	49
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 Qualidade física das sementes .....	51
4.2 Anatomia das sementes.....	53
4.3 Bioquímica das sementes.....	56
4.4.1 Espectroscopia NIR .....	61
4.4 Qualidade fisiológica das sementes .....	63
4.5 Análise de componentes principais (ACP) .....	68
4.6 Considerações finais .....	69
5. CONCLUSÕES .....	70
APÊNDICE A – Análise de correlação multivariada.....	72
APÊNDICE B – Artigo produzido a partir desse trabalho .....	74
REFERÊNCIAS .....	75

## 1. INTRODUÇÃO

Diante do cenário de mudanças climáticas, da necessidade de conservar as florestas e do fortalecimento da política ambiental, a demanda por sementes de espécies nativas, que constituem insumo básico dos programas de recuperação e conservação de ecossistemas, se intensificou (Carvalho et al., 2006; Ribeiro-Oliveira; Ranal, 2014). O sucesso desses programas, seja por meio do plantio de mudas ou via semeadura direta, depende diretamente da obtenção de sementes de alta qualidade. Apesar disso, a tecnologia aplicada na reprodução de espécies florestais nativas ainda é limitada, e os lotes de sementes frequentemente apresentam germinação reduzida e desuniforme. Nesse contexto, identificar métodos que facilitem a seleção e obtenção de sementes de alta qualidade torna-se essencial, e o estudo de características morfológicas relacionadas ao comportamento ecológico das espécies nativas pode contribuir para uma compreensão mais ampla da funcionalidade dessas estruturas e para o aprimoramento de estratégias eficazes para a seleção de sementes (Cosmo et al., 2017).

*Cedrela fissilis* Vell., popularmente conhecida como cedro-rosa, é uma árvore nativa do Brasil de grande importância madeireira e recomendada para restauração de áreas degradadas (Durigan; Nogueira, 1990; Carvalho, 2003; 2005). Pertencente à família Meliaceae, essa espécie caducifólia pode atingir até 40 metros de altura e apresentar um tronco com diâmetro de até 300 cm na fase adulta. Trata-se de uma planta alógama, hermafrodita ou monóica, com flores unissexuais por aborto (Carvalho, 2003). Assim como a maioria das espécies florestais nativas, sua principal forma de multiplicação ocorre por via sexuada, tornando as sementes um recurso essencial para a conservação da espécie. Suas sementes são aladas em uma das extremidades e apresentam tegumento com coloração que varia de bege a castanho-avermelhado, caracterizando um tipo de heteromorfismo de sementes. Tal fenômeno, em que uma única planta produz sementes que diferem em cor, forma, massa ou tamanho, já foi relatado em mais de 200 espécies de angiospermas e pode influenciar o desenvolvimento das plantas em diferentes estágios de crescimento (Mandák, 1997; Imbert, 2002; Matilla et al., 2005).

O heteromorfismo de sementes resulta da interação entre fatores evolutivos, ecológicos e fisiológicos, sendo considerado uma estratégia adaptativa que contribui para a sobrevivência e o sucesso reprodutivo da espécie. Em ambientes sujeitos a forte variação temporal, a produção de sementes com características distintas pode aumentar a probabilidade de sucesso reprodutivo, ao garantir que ao menos parte da progênie encontre condições

favoráveis para germinar e se desenvolver. Entretanto, a heteromorfia não resulta apenas de pressões seletivas, mas também de restrições evolutivas, fisiológicas e de desenvolvimento que ocorrem na própria planta. Fatores como a posição das sementes na planta, o acesso diferencial a nutrientes e luz, e o tempo de desenvolvimento podem influenciar a expressão de características distintas entre sementes de um mesmo indivíduo (Venable, 1985). Por exemplo, sementes formadas em diferentes regiões da planta podem apresentar variações em tamanho, dormência ou capacidade de dispersão, refletindo limitações estruturais e fisiológicas que favorecem a formação de sementes que diferem entre si quando a morfologia ou comportamento ecológico. Assim, a heteromorfia de sementes surge como um fenômeno natural resultante da interação entre aclimatações ambientais e limitações impostas pela biologia da planta, podendo também estar relacionada ao estágio de maturação das sementes, fator que influencia diretamente seu potencial fisiológico (Marcos-Filho, 2005).

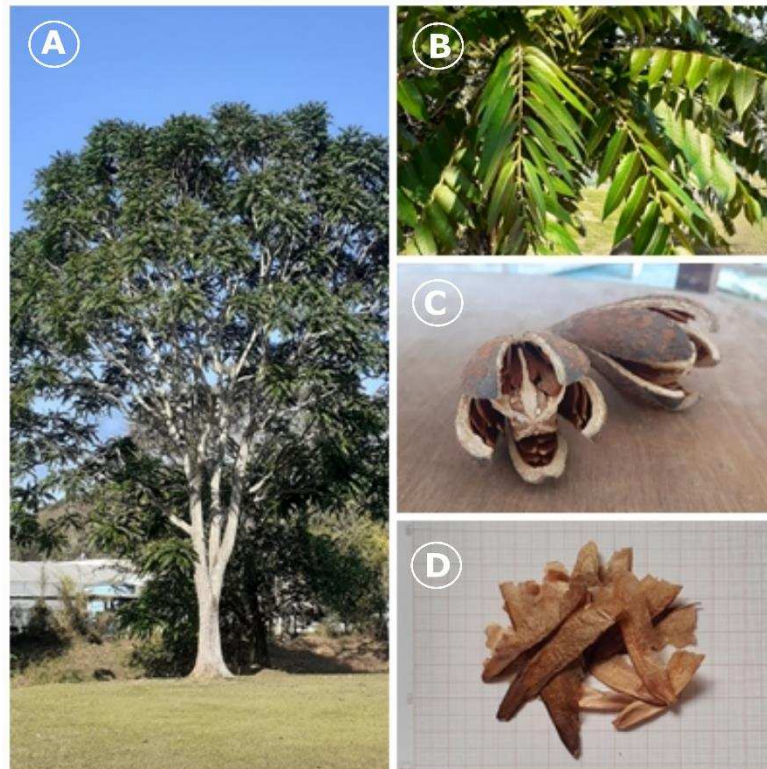
Em espécies florestais, diferenças na coloração das sementes são comuns e podem estar associadas à sua qualidade fisiológica (Oliveira et al., 2025; Santos et al., 2025). Essa característica morfológica pode indicar diferentes estágios de maturação, mesmo entre sementes de um mesmo fruto (Dalanhol et al., 2014) e tem sido associada à absorção de água, vigor e germinação em diferentes espécies (Santos et al., 2007; Mavi, 2010; Alves et al., 2013; Duarte et al., 2021), representando um critério promissor para seleção de sementes de qualidade fisiológica superior. Embora a variação na cor do tegumento tenha sido observada em sementes de *C. fissilis*, sua relação com a qualidade fisiológica ainda é pouco compreendida. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a relação entre a cor do tegumento e a qualidade fisiológica de sementes claras e escuras de *C. fissilis*, por meio de análises de atributos físicos, anatômicos, bioquímicos e fisiológicos.

## 2. CONTEXTO TEÓRICO

### 2.1 *Cedrela fissilis* Vellozo

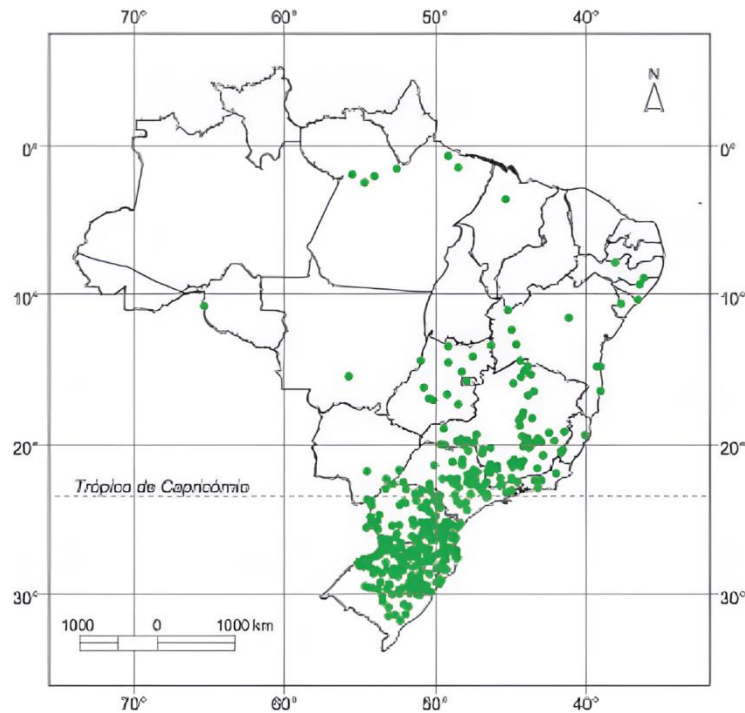
A família Meliaceae, da ordem Sapindales, inclui plantas dicotiledôneas floríferas e reúne entre 500 e 700 espécies distribuídas em cerca de 50 gêneros (Pennington; Styles, 1975; Flores et al., 2017). No Brasil, são encontradas 84 espécies agrupadas em 7 gêneros, que ocorrem de forma mais expressiva nos domínios fitogeográficos da Amazônia e da Mata Atlântica, embora estejam presentes em todas as regiões do país (BFG, 2015; Flores et al., 2017). Entre os representantes dessa família, destaca-se o gênero *Cedrela*, descrito por Browne em 1756, com oito espécies reconhecidas, das quais três são nativas do Brasil. Dentre elas, *Cedrela fissilis* Vellozo tem sido historicamente alvo de intensa exploração madeireira, o que resultou na extinção de diversas subpopulações (Pennington, 1981). Conhecidas popularmente como cedros, as espécies desse gênero são valorizadas pela madeira de alta qualidade, amplamente empregada pelas indústrias madeireira e moveleira (Lorenzi et al., 2003; Flores et al., 2017; Souza; Lorenzi, 2019).

*Cedrela fissilis* Vell., conhecida popularmente como cedro, cedro-cheiroso ou cedro-rosa, exibe porte arbóreo, alcançando de 8 a 40 m de altura e 20 a 300 cm de diâmetro à altura do peito (DAP) na idade adulta (Figura 2.0A). Trata-se de uma planta alógama, hermafrodita ou monóica, com flores unissexuais por aborto. As flores são pequenas, com pétalas branco-esverdeadas e ápice rosado. Suas folhas são compostas, paripinadas, medindo entre 25 e 45 cm, com 8 a 30 pares de folíolos (Figura 2.0B). Os frutos são cápsulas em forma de pêra, deiscentes, lenhosas, com coloração marrom e lenticelas claras, e abrigam de 30 a 100 sementes (Figura 2.0C) (Carvalho, 2005). Suas sementes são aladas em uma das extremidades, de cor bege a castanho-avermelhada, com um pequeno núcleo seminal, medindo até 35 mm de comprimento por 15 mm de largura (Figura 2.0D) (Carvalho, 2005). Todas as partes da planta, quando esmagadas, apresentam cheiro de alho (Carvalho, 2005).



**Figura 2.0** – *Cedrela fissilis* Vell. Árvore adulta (A), folhas paripinadas (B), fruto periforme (C), sementes aladas (D). Fonte: Autora.

*C. fissilis* é uma espécie florestal nativa, amplamente distribuída em todas as regiões do Brasil, com maior ocorrência nas regiões Sul e Sudeste do país (Carvalho, 2003) (Figura 2.1). A floração e a frutificação têm início entre 10 e 15 anos após o plantio. A floração ocorre em diferentes períodos ao longo do território nacional, geralmente entre setembro e março, e a frutificação ocorre, em média, dois meses após esse período (Carvalho, 2005). Contudo, a floração é irregular, não ocorrendo anualmente em todas as árvores (Ferraz et al., 1999). A dispersão das sementes pode ocorrer pela queda direta no solo, ainda dentro do fruto, ou pela ação do vento (Carvalho, 2005). A colheita de sementes deve ser realizada a partir de 32 semanas após a antese, e os frutos com coloração marrom-escuro e em início de deiscência (Corvello et al., 1999). As sementes de *C. fissilis* são classificadas como ortodoxas; entretanto, sua germinação e vigor reduzem significativamente durante o armazenamento, sendo a viabilidade comprometida após períodos superiores a 381 dias (Carvalho, 2006; Silva et al., 2020).



**Figura 2.1** - Mapa da distribuição de *C. fissilis* no Brasil. Os pontos verdes indicam os locais de ocorrência natural de *C. fissilis*. Fonte: Carvalho (2003).

No processo de sucessão, *C. fissilis* é considerada uma espécie secundária inicial e/ou secundária tardia, ocorrendo com frequência em capoeirões e matas secundárias, mas também apresentando capacidade de desenvolvimento no interior de florestas primárias (Carvalho, 2005). Além disso, pode atuar como espécie pioneira em vegetações secundárias, regenerando-se preferencialmente em clareiras e nas bordas de matas (Tabarelli; Mantovani, 1997). Trata-se de uma árvore de destaque no setor florestal, com múltiplas finalidades, sendo indicada para uso madeireiro, paisagístico, arborização urbana e de recuperação de áreas degradadas e reposição de matas ciliares, desde que em locais com ausência de inundação e em plantios heterogêneos (Carvalho, 2005). O plantio homogêneo da espécie enfrenta desafios significativos, especialmente devido ao ataque da mariposa *Hypsipyla grandella* (broca-do-cedro), considerada a principal ameaça a esses cultivos. A broca do cedro ataca as gemas laterais e leva ao desenvolvimento arbustiforme e, em casos mais extremos, a morte da planta (Pereira et al., 2016; Borges et al., 2019).

## 2.2 Heteromorfismo de sementes devido a cor do tegumento

O tegumento, também denominado cobertura, envoltório ou casca, é a camada externa da semente madura e exerce diferentes funções essenciais, como proteção do embrião, controle da embebição, regulação das trocas gasosas e, em alguns casos, participação na dispersão (Marcos-Filho, 2005). Sua formação tem início ainda nas fases iniciais do desenvolvimento do óvulo, ocorrendo em paralelo à embriogênese e à formação do endosperma. Os integumentos do óvulo, denominados primina (integumento externo) e secundina (integumento interno), sofrem modificações estruturais e funcionais que culminam na origem dos tegumentos da semente: a primina dá origem à testa e a secundina à tegma. A morfologia do tegumento pode variar significativamente entre espécies, e nem sempre há uma distinção clara entre testa e tegma. Em alguns casos, ocorre a fusão parcial ou total desses tecidos, ou ainda a diferenciação de cada um em diferentes subcamadas (Marcos-Filho, 2005). Esse tecido, de origem materna, é o principal modulador das interações entre a estrutura interna da semente e o meio ambiente, desempenhando papel importante em processos como germinação, vigor e longevidade das sementes (Souza; Marcos-Filho, 2001). Logo, o entendimento de sua estrutura e propriedades pode contribuir para explicar o comportamento de sementes.

Embora a maioria das características morfológicas do tegumento seja relativamente estável e determinadas pelo genótipo materno, fatores ambientais que atuam durante o desenvolvimento da semente podem induzir alterações maternas não genéticas nesse tecido, as quais, por sua natureza epigenética, não perpetuam por mais de uma geração (Gunn, 1981; Souza; Marcos-Filho, 2001). Essas modificações afetam principalmente a espessura, a composição bioquímica e a coloração do tegumento (Lacey et al., 1997; Souza e Marcos-Filho, 2001). Durante a maturação, sementes ortodoxas acumulam compostos de reserva e desenvolvem mecanismos de proteção essenciais para otimizar o vigor e garantir o desempenho sob condições ambientais adversas. Nesse processo, também ocorrem mudanças visíveis nas estruturas externas de frutos e sementes, como variações na coloração do tegumento, característica frequentemente utilizada como indicativo de maturidade em muitas culturas (Silveira et al., 2002; Cruz et al., 2021; Groot, 2022). Em muitas espécies, essa mudança de cor está associada a oxidação de compostos fenólicos, que estão presentes em altos níveis em tegumentos de sementes pigmentados (Corso et al., 2020). Tais substâncias exercem funções relevantes na ecologia e fisiologia da semente, incluindo a proteção contra herbivoria, ação antioxidante e inibição da germinação, colaborando para a regulação do

momento adequado de emergência das plântulas (Groot, 2022). Considerando que o processo de maturação raramente ocorre de forma sincronizada, mesmo em condições ambientais homogêneas, a variação na coloração das sementes produzidas por uma mesma planta pode refletir diferentes estágios de maturação, influenciando diretamente o seu potencial fisiológico.

A cor do tegumento tem se mostrado um indicador relevante da qualidade fisiológica de sementes em diferentes espécies, estando associada ao vigor, porcentagem de germinação, embebição e longevidade. Duarte et al. (2021), ao estudarem sementes amarelas e marrons de *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist, observaram diferenças significativas no vigor e na germinação, com melhores resultados em sementes de coloração marrom. Venturi; Randi (1997) também verificaram maior massa e maior porcentagem de germinação em sementes marrons de *Phyllanthus tenellus* Roxb. e *Phyllanthus niruri* L., comparadas com sementes amarelas. Resultados semelhantes foram encontrados por Alves et al. (2013) em sementes marrons de *Clitoria fairchildiana* R. A. Howard, comparadas com sementes pretas. Mavi (2010), estudando sementes de *Crimson Sweet* com coloração marrom, marrom claro, amarelo escuro e amarelo claro observou diferenças significativas no vigor, com melhores resultados em sementes de coloração marrom.

Em estudo com soja, Santos et al. (2007) concluíram que, dentro de uma mesma cultivar, sementes com tegumento marrom apresentaram melhor qualidade fisiológica, atribuída à maior concentração de lignina e proteína, o que resulta em uma taxa de embebição mais lenta. De forma complementar, Naflath et al. (2023) demonstraram que a cor do tegumento e o tamanho das sementes de soja influenciam diretamente sua longevidade. Sementes pretas e menores apresentaram maior viabilidade após armazenamento natural e envelhecimento acelerado, mantendo altas taxas de germinação mesmo após 20 meses. Em *Brassica napus* L., sementes com tegumento preto demonstraram maior vigor e germinação, associadas ao elevado teor de óleo (Zhang et al., 2013). Em contraste, em *Pterodon pubescens* B., sementes pretas foram associadas à baixa viabilidade, elevado estresse oxidativo (alta atividade de SOD e CAT) e danos celulares (alto conteúdo de MDA). Técnicas de colorimetria e radiografia confirmaram que sementes mais claras possuem maior densidade e melhor preenchimento interno, características associadas a um melhor desempenho fisiológico (Medeiros et al., 2022).

Esses estudos evidenciam que a variação na cor do tegumento pode refletir diferenças nas propriedades físicas, químicas e estruturais desse tecido, as quais contribuem para variações no potencial fisiológico de sementes com colorações distintas, ou ainda atuar como um marcador biológico de características fisiológicas internas das sementes. No entanto, a utilização da cor do tegumento como critério de seleção para sementes com melhor desempenho deve considerar a dependência da espécie, uma vez que essa associação está relacionada a atributos específicos de cada material genético.

### **2.3 Qualidade fisiológica de sementes**

A qualidade de um lote de sementes resulta da interação entre características genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias, determinando seu valor para a semeadura (Delouche, 1985). A qualidade fisiológica reúne informações sobre a germinação (viabilidade) e o vigor das sementes. A germinação é um processo fisiológico comumente avaliado pelo teste de germinação, realizado em condições ótimas para obtenção da máxima germinação (Marcos-Filho, 2005). A quantificação da germinação é geralmente feita contabilizando as sementes que germinaram, sendo esse valor expresso em porcentagem. Embora alguns modelos matemáticos considerem além da capacidade de germinação, o tempo gasto no processo, é incomum que incluam eventos como a morte de sementes ou a não observação da germinação, muitas vezes limitada pela duração do teste (Pires, 2019). Nesse contexto, a análise de sobrevivência, método estatístico amplamente utilizado em pesquisas médicas e emergente em estudos de germinação, oferece uma abordagem mais completa ao contabilizar além da porcentagem e tempo, observações censuradas como os eventos de morte e a não observação da germinação, aumentando a quantidade de informações sobre o processo (Scott et al., 1984; Pires, 2019; Roesler et al., 2023).

Um dos principais métodos dessa abordagem utiliza o Estimador de Kaplan-Meier para estimar a função de sobrevivência, visando determinar a probabilidade de falha (germinação) ao longo do tempo. Essa função, descrita pela equação 2.0, quantifica a proporção de sementes que ainda têm potencial para germinar após determinado período, considerando tanto as que já germinaram quanto as que foram censuradas. O Estimador de Kaplan-Meier é um método não paramétrico que calcula a função de sobrevivência  $S(t)$  como o produto acumulado das probabilidades de sobrevivência a cada intervalo de tempo  $t$  em que ocorre uma germinação ( $k$ -ésimo evento), ajustando o número de sementes em risco de germinação (vivas e não germinadas) e considerando as censuras (Kaplan; Meier, 1958). O

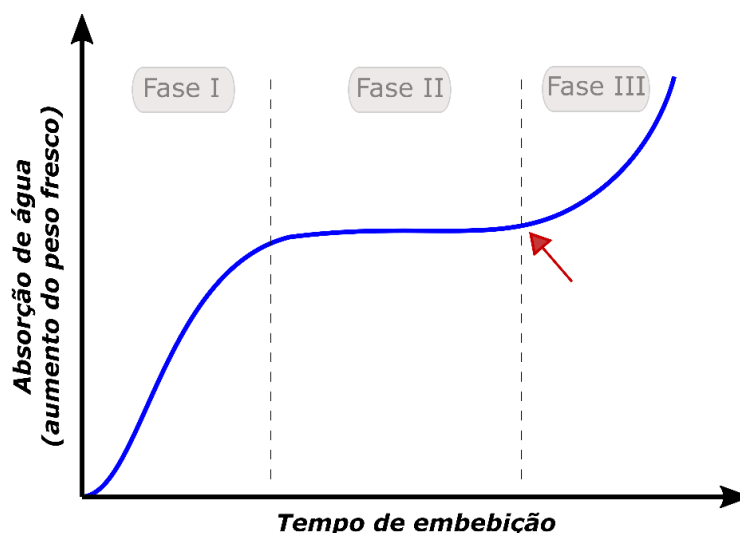
resultado é uma curva de sobrevivência em degraus, onde cada subida representa um evento de germinação, proporcionando uma visualização clara da dinâmica da viabilidade das sementes ao longo do tempo.

$$\hat{S}(t) = \prod_{t_j \leq t} \left(1 - \frac{d_j}{n_j}\right), \quad j = 1, 2, 3, \dots, k \quad ; \quad t_1 < t_2 < t_3, \dots, < t_k, \quad (2.0)$$

onde  $d_j$  representa o número de sementes germinadas no tempo  $t_j$  e  $n_j$  o número de sementes ainda em risco.

Durante o processo de germinação, muitos eventos fisiológicos acontecem e podem ser melhor compreendidos a partir da obtenção da curva de embebição. O processo de germinação se inicia quando sementes secas e viáveis absorvem água desencadeando uma série de eventos que culminam na protrusão da radícula. De acordo com Bewley e Black (1994), o processo germinativo pode ser descrito em três fases principais. A primeira fase da germinação, denominada reativação (Fase I), inicia-se com a embebição, durante a qual a absorção de água pela semente possibilita a retomada de atividades metabólicas essenciais, como a respiração celular. Nesse estágio, ativam-se mecanismos de reparo de danos causados pela desidratação ao final da maturação, bem como a atividade hidrolítica, mediada por enzimas sintetizadas previamente. A retomada do crescimento embrionário é inicialmente controlada por RNA mensageiro (RNA-m) armazenado, sendo posteriormente substituído por RNA-m recém-sintetizado, caracterizando a transição para um metabolismo funcional. A fase II, denominada indução do crescimento, é marcada por eventos bioquímicos essenciais, como a síntese de enzimas, ácidos nucleicos e proteínas, e pela intensa degradação das reservas em compostos mais simples. Esses processos promovem o acúmulo de solutos nos tecidos embrionários, facilitando a absorção de água, o alongamento celular, especialmente na radícula. Por fim, a fase III, denominada crescimento, é caracterizada pela protrusão da raiz primária, tornando visível a retomada de crescimento do embrião. Nessa fase ocorre a expansão celular, seguida de divisão celular; assimilação e síntese de novos compostos e o rompimento do tegumento.

O processo de absorção de água pelas sementes ocorre por meio de difusão passiva, sendo governado pelas diferenças de potencial hídrico entre os tecidos da semente e o substrato que fornece a água. Essa dinâmica segue o modelo trifásico proposto por Bewley e Black (1978), representado na Figura 2.3.



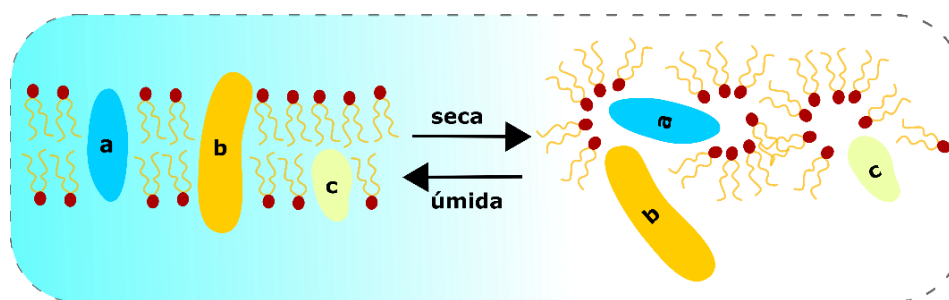
**Figura 2.3** - Padrão trifásico de absorção de água por sementes. A seta marca o momento da ocorrência dos primeiros sinais de protrusão da radícula (Bewley e Black, 1978).

A Fase I é marcada por rápida absorção de água devido à grande diferença entre os potenciais hídricos da semente seca e do substrato, promovendo a hidratação parcial dos tecidos da semente. Com o avanço da embebição, as estruturas da semente se hidratam, aumentando seu potencial hídrico e reduzindo o do substrato. Na Fase II, os fluxos hídricos se estabilizam, tornando a absorção mais lenta e alcançando um equilíbrio dinâmico. O acúmulo de solutos nessa fase diminui o potencial hídrico da semente, resultando em rápida transferência de água do substrato para a semente na Fase III (Bewley e Black, 1978; 1994). De modo geral, o formato da curva é influenciado pela ocorrência de cada uma das fases que, por sua vez, é afetado por fatores como os potenciais hídricos da semente e do substrato, a permeabilidade do tegumento e a composição química das reservas que afetam diretamente a dinâmica da embebição, podendo resultar em diferenças significativas entre espécies (Marcos-Filho, 2005). Logo, a curva de embebição representa uma ferramenta importante para compreender os eventos fisiológicos que ocorrem no processo de germinação, avaliar a integridade do tegumento, o vigor e a viabilidade das sementes (Marcos-Filho, 2005; Carvalho; Nakagawa, 2012). Nesse sentido, para além da análise visual, a quantificação dos parâmetros da curva de embebição por meio do ajuste de modelos matemáticos pode ajudar a identificar diferenças morfológicas e fisiológicas entre lotes de sementes.

Para uma avaliação mais precisa da qualidade das sementes, é essencial complementar o teste de germinação com testes de vigor. O vigor das sementes reflete um conjunto de características que irão determinar o seu desempenho em campo e no armazenamento, sendo

que sementes vigorosas apresentam maior chance de sucesso em diferentes condições de ambiente. Diferente do teste de germinação, que avalia o potencial de emergência em condições ideais, os testes de vigor são conduzidos sob condições específicas e permitem estimar o grau de deterioração das sementes, identificando alterações bioquímicas, tolerância a estresses e a eficiência de processos fisiológicos. Os sintomas da deterioração das sementes tornam-se evidentes durante a germinação e o desenvolvimento inicial das plântulas, refletindo em alterações fisiológicas cuja intensidade está diretamente relacionada ao vigor. Entre os principais efeitos, observam-se a redução na velocidade e uniformidade da germinação, o menor crescimento das plântulas, o aumento na frequência de plântulas anormais e a perda da capacidade de germinar (Bewley e Black, 1982; Marcos-Filho, 2005). Tais manifestações são frequentemente avaliadas por meio de índices de vigor, a partir de cálculos que estimam o número médio de plântulas formadas por dia e o tempo necessário para a germinação, além de medições diretas do comprimento das plântulas e de suas partes, e da contagem de plântulas normais e anormais nas primeiras e últimas leituras do teste de germinação (Maguire, 1962; Schuab et al., 2002; Ranal; Santana, 2006). No entanto, antes que esses sintomas se tornem visíveis, diversas alterações ultra estruturais e bioquímicas já podem ter ocorrido e ser detectadas por meio de testes mais específicos (Bewley; Black, 1982).

A degeneração das membranas celulares é considerada um dos primeiros eventos que caracteriza a deterioração de sementes (Delouche; Baskin, 1973; Delouche, 1985) e pode ser avaliada pelo teste de condutividade elétrica, que mede a liberação de eletrólitos durante a embebição. Esse teste se destaca pela rapidez e pela boa correlação com a emergência de plântulas em campo (Marcos-Filho et al., 1990; Torres et al., 2009). A organização do sistema de membranas se estrutura durante a maturação e se desintegra com a desidratação após a maturação. Essas membranas são compostas principalmente por proteínas e fosfolípidios organizados em uma camada fluida e a estabilidade dessa estrutura depende da interação entre os componentes da membrana e a água. Quando conteúdo de água fica abaixo de 25% (base úmida) ocorre a redistribuição das moléculas, formando canais, e a rápida embebição leva à liberação de solutos para o meio exterior, incluindo açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, proteínas, enzimas e íons inorgânicos ( $K^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$ ,  $Na^+$ ,  $Mn^{+2}$ ) (Bewley; Black, 1994; Marcos-Filho, 2005) (Figura 2.4).



**Figura 2.4** – Alterações na configuração de fosfolípidios de membranas conforme o conteúdo de água nas sementes; a,b,c representam proteínas presentes na bicamada lipídica. Baseado no modelo proposto por Bewley e Black (1982; 1994).

Com a embebição, os mecanismos de reparo são ativados, restaurando a permeabilidade das membranas e, assim, reduzindo ou interrompendo a liberação de eletrólitos. O princípio do teste de condutividade elétrica estabelece que sementes menos vigorosas (ou mais deterioradas) têm uma recuperação mais lenta da integridade das membranas, liberando maiores quantidades de solutos para o meio exterior (Marcos-Filho, 2005).

A qualidade fisiológica das sementes é determinada por uma combinação de fatores genéticos, ambientais e de manejo ao longo do ciclo de produção. As sementes atingem seu máximo potencial fisiológico no estágio de maturidade, quando também são alcançados os valores máximos de massa seca (Carvalho; Nakagawa, 2012; Sena et al., 2022). Antes desse ponto, a semente ainda depende metabolicamente da planta-mãe, o que impede o início de processos de deterioração (Marcos-Filho, 2005). No entanto, condições ambientais adversas durante a maturação, como estresse hídrico, variações térmicas e infecções por patógenos, podem comprometer a formação de sementes com alto vigor e viabilidade. Após a maturidade, a deterioração pode se iniciar de forma gradual e contínua, mesmo antes da colheita, sendo intensificada por fatores como atraso na colheita, alta umidade e exposição a agentes físicos e biológicos (Delouche; Baskin, 1973; Marcos-Filho, 2005). Esse processo afeta negativamente atributos fisiológicos como a germinação, o vigor e a longevidade das sementes (McDonald, 1999). Além disso, o desempenho fisiológico das sementes está diretamente relacionado ao seu genótipo e sofre influência das práticas de manejo adotadas nas etapas de colheita, beneficiamento e armazenamento (Carvalho; Nakagawa, 2012).

## 2.4 Estrutura de sementes

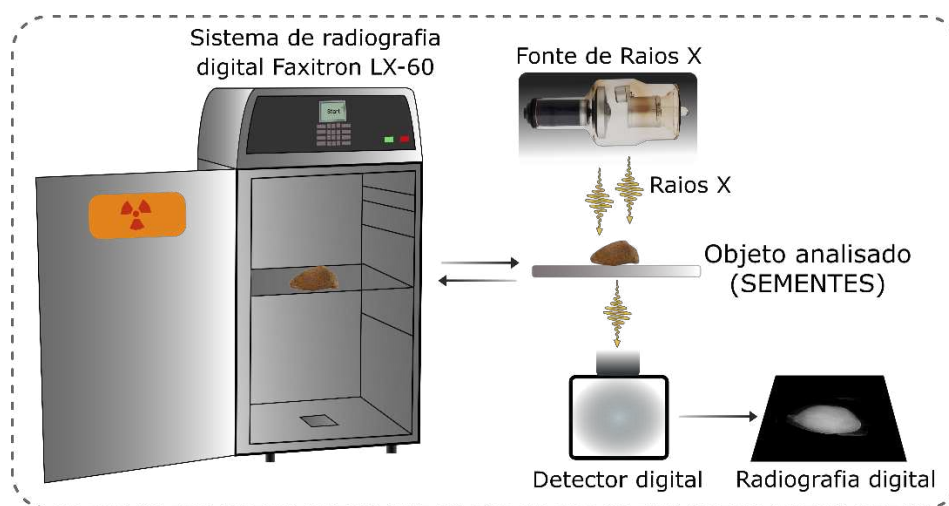
De forma geral, a semente se origina do óvulo fecundado e, quando madura, apresenta três estruturas principais: o tegumento (envoltório protetor), o tecido de reserva (endosperma ou perisperma) e o embrião (eixo embrionário e cotilédones) (Marcos-Filho, 2005). O tegumento, derivado dos integumentos do óvulo, pode variar em número, de um a dois, ou até estar ausente, sendo constituído principalmente por carboidratos estruturais (celulose, hemiceluloses e pectinas), compostos fenólicos (como a lignina) e lipídios (cutina e ceras) (Ventrella et al., 2013). O endosperma, um tecido de reserva triploide originado do núcleo endospermico, pode ou não estar presente na semente madura e, assim como o embrião, armazena substâncias de reserva: triacilgliceróis (em corpos lipídicos), proteínas (globulinas e prolaminas em corpos proteicos) e carboidratos, como amido (em amiloplastos), hemiceluloses (na parede celular), sacarose e oligossacarídeos da série rafinose (em vacúolos) (Ventrella et al., 2013).

Estudos sobre as características anatômicas, morfológicas, dimensões e peso de sementes de espécies florestais nativas e exóticas têm sido realizados com o objetivo de compreender e relacionar esses atributos à sua viabilidade, germinação, comportamento e adaptação (Iossi et al., 2006; Costa et al., 2006; Espitia-Camacho et al., 2020). A caracterização das estruturas internas constituintes da semente permite esclarecer dúvidas sobre a anormalidade de plântulas e a presença de sementes não germinadas nos testes de germinação (Silva et al., 2014).

Nos últimos anos, estudos nessa área têm sido realizados com base em técnicas de análise de imagens, sendo o teste de raios X uma das mais utilizadas, devido à sua capacidade de fornecer uma avaliação rápida e eficiente da morfologia interna de sementes de diferentes espécies (Gomes-Junior, 2010). Por meio dessa técnica, é possível visualizar danos causados por insetos, fraturas e trincas decorrentes de impactos mecânicos, além de outros fatores relacionados às etapas de pré e pós-colheita (Masetto et al., 2007; Carvalho et al., 2009a; Korobi et al., 2012). Além disso, a radiografia permite identificar anormalidades nos embriões e avaliar seu estágio de desenvolvimento (Korobi et al., 2012; Gomes et al., 2014). Essas informações são de grande relevância, pois a presença de sementes danificadas ou vazias pode comprometer diretamente os resultados dos testes de germinação (Oliveira et al., 2003; Pupim et al., Masetto et al., 2007; 2008; Carvalho et al., 2009a). Uma das grandes vantagens dessa técnica é a possibilidade de analisar as sementes no estado seco, sem a necessidade de preparo

prévio, o que simplifica o processo. Além disso, as baixas doses de radiação utilizadas garantem que a viabilidade das sementes não seja comprometida, permitindo sua semeadura após a obtenção das radiografias (Carvalho et al., 2009b). Esse aspecto torna o método ainda mais relevante, pois possibilita a comparação direta entre as imagens radiográficas e os resultados dos testes de germinação, viabilizando estudos sobre a relação entre morfologia, integridade física dos tecidos e o potencial fisiológico das sementes (Marcos-Filho et al., 2010).

O método consiste em posicionar as sementes entre uma fonte de raios X de baixa energia e um detector de imagem, como um filme radiográfico ou um sensor digital. Ao atravessar os tecidos da semente e alcançar o detector, os raios X formam uma imagem visível composta por regiões mais claras e mais escuras (Figura 2.5). Essas variações indicam diferenças na absorção da radiação, influenciadas por fatores como composição química, espessura e densidade dos tecidos, além do comprimento de onda da radiação ionizante (Brasil, 2009).



**Figura 2.5** – Esquema do sistema de radiografia digital e seus principais componentes.

Após a obtenção das radiografias, as sementes são classificadas com base em sua anatomia interna, e os resultados são expressos em porcentagens. As categorias incluem: sementes cheias, que possuem todos os tecidos essenciais para a germinação; sementes vazias, com menos de 50% dos tecidos; sementes danificadas por insetos, que apresentam larvas, orifícios ou outros sinais de infestação; e sementes danificadas fisicamente, que, apesar de estarem completas, possuem o revestimento externo rachado ou quebrado (Brasil, 2009).

Entre os parâmetros relacionados à obtenção das radiografias estão a tensão elétrica entre os eletrodos dentro de um tubo de raios X, a corrente elétrica aplicada ao tubo, o tempo de exposição da amostra e a distância entre o alvo e o sensor digital (Brasil, 2009). O aumento da tensão elétrica (kV) gera raios X de menor comprimento de onda e maior energia, influenciando diretamente o poder de penetração e a qualidade da imagem. Valores mais baixos de tensão elétrica proporcionam melhor contraste e resolução, enquanto valores mais altos reduzem a diferença de densidade entre os tecidos. A corrente elétrica (mA) no tubo de raios X determina a quantidade de raios X gerados. Um aumento da corrente eleva a densidade da imagem, mas não afeta seu contraste, podendo torná-la mais escura. O tempo de exposição corresponde ao período em que a semente é irradiada e está diretamente relacionada à corrente elétrica, sendo expresso em miliampere/segundo (mA/s) ou miliampere/minuto (mA/m). Para manter a densidade da imagem, qualquer aumento no tempo de exposição deve ser compensado por uma redução proporcional na corrente elétrica e vice-versa. A Distância Filme Foco (DFF) é a distância entre o alvo e o sensor digital, e sua ampliação reduz a intensidade da radiação, exigindo maior tempo de exposição para manter a densidade da imagem (Brasil, 2009).

Técnicas mais tradicionais, como as de microscopia de luz, também são fundamentais para o estudo da anatomia das sementes, possibilitando observação mais detalhada de suas estruturas internas. A microscopia óptica é amplamente utilizada para analisar a organização dos tecidos, como a camada de células do tegumento, a presença de reservas nutricionais no endosperma e a diferenciação do embrião, fatores essenciais para o processo fisiológico de germinação (Bewley et al., 2013). A histometria, que envolve a análise quantitativa de tecidos e estruturas celulares, utiliza técnicas de microscopia e processamento de imagem para medir características como espessura, volume e proporções dos componentes anatômicos. No estudo das sementes, a histometria é aplicada para avaliar aspectos como a espessura do tegumento e dos tecidos de reserva, contagem de camadas celulares em tecidos específicos, além do diâmetro e da distribuição dos corpos lipídicos e proteicos.

Como extensão dos estudos morfológicos, a biometria de sementes utiliza métodos quantitativos para mensurar atributos como espessura, largura, comprimento, peso e forma, fornecendo dados que complementam a análise anatômica e externa das sementes. As mensurações, realizadas com instrumentos como paquímetros digitais e balanças de precisão, permitem avaliar a variabilidade intra- e interespecífica, a qual pode influenciar diretamente processos fisiológicos como a germinação, o vigor e o crescimento inicial das plântulas

(Costa et al., 2006; Santos et al., 2009; Pereira et al., 2017). Durante o processo de maturação, as sementes passam por alterações significativas, aumentando de tamanho até atingirem valores característicos da espécie. No entanto, essas dimensões podem variar tanto entre diferentes espécies quanto dentro de uma mesma espécie, influenciadas por fatores ambientais e genéticos (Costa et al., 2006; Santos et al., 2009). Assim, a biometria não apenas descreve essas variações morfológicas, mas também contribui para a compreensão de como elas influenciam no estabelecimento das espécies.

## **2.5 Composição química de sementes**

O estudo das sementes quanto à composição química de suas reservas é de grande interesse na tecnologia de sementes, uma vez que o teor dos compostos presentes influencia diretamente o vigor e o potencial de armazenamento (Carvalho; Nakagawa, 2012). O processo de estabelecimento de uma espécie requer a mobilização de determinadas reservas, que serão usadas para a formação de estruturas físicas como, por exemplo, parede celular, ou como energia para a respiração (Borges; Rena, 1993; Corte et al., 2006). De maneira geral, carboidratos, proteínas e lipídios são as principais substâncias de reserva nas sementes, com suas proporções variando conforme a espécie (Bewley; Black, 1994). Entre os principais fatores que influenciam essa composição, destacam-se o genótipo, a posição da semente no fruto ou na inflorescência, as condições ambientais durante o enchimento, o grau de maturação e a idade fisiológica, especialmente devido aos efeitos da deterioração natural (Marcos-Filho, 2005).

Dentre as principais substâncias de reserva em sementes, os carboidratos desempenham papel central no fornecimento de energia para o desenvolvimento do embrião durante a germinação (Marcos-Filho, 2005). Eles podem ser classificados em monossacarídeos, que servem como fonte imediata de energia; oligossacarídeos, que além de fornecer energia auxiliam na estabilização de membranas e proteção contra desidratação; e polissacarídeos, que funcionam como reserva e componente estrutural das paredes celulares. Durante a germinação, a glicose resultante da hidrólise dessas reservas é utilizada na respiração celular, fornecendo energia para o crescimento do embrião (Marcos-Filho, 2005). Do ponto de vista químico, os carboidratos podem ser divididos em açúcares redutores e não redutores, de acordo com a presença de grupos funcionais livres capazes de doar elétrons (Taiz et al., 2017). Açúcares redutores, como as hexoses glicose e frutose, apresentam grupos aldeído ou cetona livres, o que lhes confere elevada reatividade e podem representar uma

ameaça, como as espécies reativas de oxigênio. Por outro lado, em açúcares não redutores, como a sacarose, esses grupos funcionais estão envolvidos em ligações glicosídicas, impedindo sua oxidação (Taiz et al., 2017).

Os lipídios são compostos insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos, formados principalmente por ácidos graxos e glicerol (Ahmed, 2023). Os lipídios de reserva são predominantemente triglicerídeos, nos quais uma molécula de glicerol se liga a três ácidos graxos e são armazenados em organelas especializadas denominadas oleossomos (Taiz et al., 2017). Durante a germinação, os triglicerídeos são hidrolisados por enzimas do tipo lipase, liberando glicerol e ácidos graxos, e parte destes é transformada posteriormente em açúcares, fornecendo energia para a germinação (Marcos-Filho, 2005). Além dos lipídios de reserva, destacam-se os fosfolipídios de natureza polar, que são componentes estruturais fundamentais das membranas celulares, incluindo as de organelas (Taiz et al., 2017). A integridade dessas membranas é determinante para o funcionamento adequado dos processos fisiológicos nas sementes, como a germinação e a manifestação do vigor. As membranas são também os principais alvos do processo de deterioração pós-maturidade; portanto, sua preservação é crucial para um bom desempenho fisiológico das sementes (Marcos-Filho, 2005).

As proteínas, por sua vez, são macromoléculas nitrogenadas formadas por cadeias de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Ribeiro, 2014). Nas sementes, além de atuarem como reserva energética, sendo degradadas durante a germinação para fornecer aminoácidos utilizados na respiração celular, também exercem funções estruturais, enzimáticas, de transporte e regulação fisiológica. Essa diversidade funcional torna as proteínas fundamentais para o metabolismo e a manutenção da viabilidade e vigor das sementes (Marcos-Filho, 2005). Além das substâncias de reserva, compostos secundários podem ser encontrados tanto em células comuns quanto em estruturas secretoras da semente (Ventrella et al., 2013). Entre esses compostos, os fenólicos se destacam por exercerem múltiplas funções fisiológicas e ecológicas nas sementes. Eles atuam na defesa contra estresses bióticos, como patógenos e herbívoros, e abióticos, incluindo radiação UV, seca e metais pesados. Além disso, participam da regulação da dormência e germinação, protegem o embrião, contribuem para a pigmentação e auxiliam na homeostase metálica (Corso et al., 2020).

## 2.6 Sistema antioxidante enzimático

A oxidação de biomoléculas, acompanhada de alterações no metabolismo celular, é um dos principais mecanismos envolvidos no processo de deterioração das sementes, afetando diretamente a sua qualidade fisiológica. A oxidação é promovida principalmente pela ação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que compreendem tanto radicais livres (radicais superóxido,  $O_2^{\bullet-}$ , radical hidroxila,  $\bullet OH$ ; radical per-hidroxila,  $O_2^{\bullet-}$  e radicais alcóxi -  $RO^{\bullet-}$ ) quanto formas não radicais (peróxido de hidrogênio,  $H_2O_2$  e oxigênio singleto,  $^1O_2$ ) (Gill; Tuteja, 2010; Sharma et al., 2012). EROs são geradas naturalmente durante a dessecação, germinação e envelhecimento das sementes, devido à redução parcial do oxigênio (Bailly, 2004; Kumar et al., 2015). Sua produção varia conforme o estado metabólico e fisiológico da semente. Em sementes secas, podem ser formadas por reações de Amadori e/ou Maillard e por peroxidação lipídica (Kumar et al., 2015). Após a embebição, com o metabolismo reativado, organelas e enzimas como mitocôndrias, glioxissomos e NADPH oxidases tornam-se as principais fontes de EROs (Kumar et al., 2015; Mhamdi; Breusegem, 2018). Durante a germinação, destaca-se a atividade mitocondrial como a principal responsável pela geração de EROs, em razão do escape de elétrons da cadeia transportadora na retomada da respiração aeróbia (Noctor et al., 2007; Bailly et al., 2008; Gomes; Garcia, 2013).

EROs desempenham papéis importantes em diferentes processos fisiológicos das sementes, como sinalização celular, apoptose, expressão gênica e transporte de íons (Govindaraj et al., 2017). No entanto, seu acúmulo excessivo pode causar estresse oxidativo, danificando membranas, lipídios, proteínas, ácidos nucleicos e carboidratos, contribuindo para a deterioração das sementes (Bailly, 2004; Sharma et al., 2012). A homeostase redox nas células vegetais é mantida por um equilíbrio entre a produção e a eliminação de EROs, controlado por um sistema de defesa antioxidante. Entre as principais enzimas desse sistema está a superóxido dismutase (SOD) que atua catalisando a dismutação do radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). Isoformas dessa enzima estão distribuídas em diferentes compartimentos celulares, como mitocôndrias, peroxissomos, citosol e apoplasto (Taiz et al., 2017). A eliminação do  $H_2O_2$  gerado é realizada por outras enzimas antioxidantes, como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e peroxidase (POX), que atuam por vias distintas. A APX utiliza o ácido ascórbico como agente redutor para decompor o  $H_2O_2$  e, assim como a SOD, está presente em vários compartimentos celulares. A CAT, por sua vez, está localizada principalmente nos peroxissomos, onde converte  $H_2O_2$  em água ( $H_2O$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ), desempenhando papel fundamental

na proteção contra o estresse oxidativo (Das; Roychoudhury, 2014). Já a POX, atua na decomposição do  $H_2O_2$  utilizando compostos fenólicos como doadores de elétrons, sendo particularmente ativa em processos de lignificação, suberização, defesa contra patógenos e resposta a estresses abióticos (Hiraga et al., 2001; Kawano, 2003; Passardi et al., 2004).

## **2.7 Técnicas para análises bioquímicas de sementes**

### *2.7.1 Histoquímica*

Quando associada a técnicas histoquímicas, a análise anatômica das sementes proporciona uma compreensão mais aprofundada de como as sementes armazenam nutrientes, como carboidratos, proteínas e lipídios. A histoquímica combina técnicas histológicas com métodos físicos e químicos, permitindo identificar e localizar compostos específicos ou grupos de compostos químicos dentro das células e tecidos, enriquecendo a análise estrutural e funcional das sementes. Além disso, a coloração histológica permite identificar alterações na integridade celular e na disponibilidade de nutrientes, auxiliando na avaliação do vigor e da viabilidade das sementes (Ventrella et al., 2013).

Para a detecção de compostos químicos, reagentes específicos são utilizados, permitindo, por meio de reações bioquímicas, detectar e localizar qualitativamente a presença desses compostos (Ventrella et al., 2013). O método utilizando Azul de Toluidina, descrito por O'Brien et al. (1964), é uma técnica histoquímica muito utilizada para evidenciar e estudar a composição e estrutura da parede celular vegetal, especialmente para identificar polissacarídeos ácidos que estão envolvidos na formação e rigidez da parede celular, como pectinas e hemiceluloses. O azul de toluidina é um corante metacromático, mudando de cor conforme o tipo de composto ao qual se liga, devido à alteração em sua estrutura molecular e propriedades ópticas. Polissacarídeos ácidos, como pectinas e mucilagens, interagem fortemente com os grupos catiônicos do corante, produzindo coloração roxa ou vermelha. Com celulose, de caráter neutro, a interação é mais fraca, resultando em coloração azul. Já lignina e compostos fenólicos, por possuírem estruturas aromáticas e hidrofóbicas, geram coloração verde devido à forte interação com o corante.

Para detectar a presença de proteínas em tecidos biológicos, uma das técnicas histoquímicas utilizadas é baseada no método descrito por Vidal (1970), utilizando o corante Xylidine Ponceau (XP). O corante XP é capaz de se ligar a grupos amino carregados

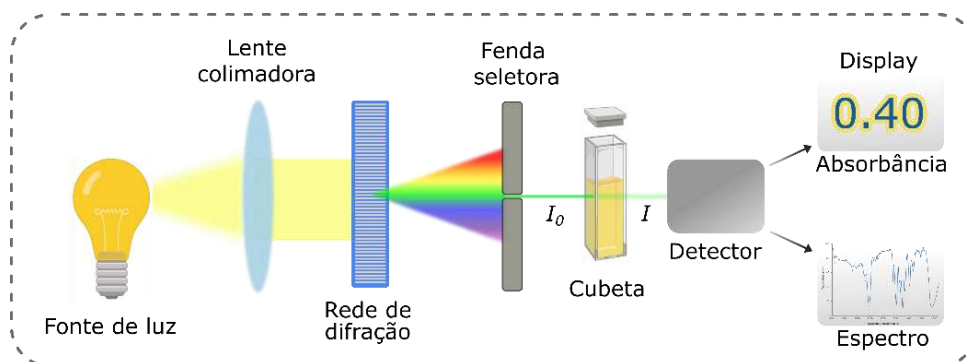
positivamente, principalmente em pH ácido, por meio de interações eletrostáticas. Ao formar esse complexo, o XP adquire uma coloração vermelha intensa, facilitando a visualização das proteínas ao microscópio, ajudando a identificar sua presença e organização nos tecidos. Já os lipídios podem ser detectados utilizando o reagente o Sudan III, com base no método descrito por Pearse (1972). Sudan III é um corante apolar que se dissolve preferencialmente em substâncias lipídicas devido à sua natureza lipofílica. Ele se liga fortemente às gotículas de gordura, membranas celulares lipídicas e outras estruturas lipídicas presentes no tecido. Ao se dissolver em estruturas lipídicas, o corante é incorporado fisicamente nas estruturas lipídicas, dando-lhes uma coloração alaranjada característica, o que permite a visualização das regiões ricas em lipídios.

A detecção de lignina em tecidos vegetais pode ser realizada por meio do teste histoquímico com floroglucina em meio ácido, conforme descrito por Johansen (1940). O princípio do teste baseia-se na reação específica entre a floroglucina e os grupos aldeído aromáticos presentes nas unidades de lignina. Como resultado dessa reação, regiões lignificadas da parede celular coram-se de rosa a vermelho. Na detecção de amido em tecidos vegetais, o reagente de Lugol é amplamente usado, especialmente em estudos anatômicos. Proposto por (Johansen, 1940), esse método baseia-se na reação entre o iodo e o amido, um polissacarídeo complexo formado por unidades de glicose, com dois componentes principais: amilose e amilopectina. O iodo molecular ( $I_2$ ), presente no reagente de Lugol, interage principalmente com as cadeias lineares da amilose por meio da formação de um complexo de inclusão, no qual o iodo fica aprisionado na estrutura helicoidal da amilose. Por outro lado, a amilopectina, devido à sua estrutura ramificada e ausência de configuração helicoidal regular, interage menos com o iodo, resultando em coloração menos intensa. Como resultado dessa interação de inclusão, o iodo ( $I_2$ ) adquire uma cor azul ou roxa, o que facilita a visualização do amido no tecido (Barreiros; Barreiros, 2012).

### *2.7.2 Espectroscopia no Ultravioleta e Visível (UV-Vis)*

Além de localizar, também é possível quantificar os compostos químicos presentes nas sementes. Os métodos mais utilizados para essas análises são baseados em técnicas de espectroscopia. Entre as técnicas mais comuns, destacam-se a espectroscopia óptica na faixa de luz ultravioleta e visível (UV/Vis) e no infravermelho próximo (NIR), que permitem quantificar e obter informações sobre a composição química da amostra. Os principais componentes de um espectrofotômetro são uma fonte de luz, para excitação da amostra, uma

lente colimadora para direcionar os feixes de luz, uma grade de difração ou prisma para separar os diferentes comprimentos de onda, uma fenda seletora para selecionar o comprimento de onda de interesse, um suporte para a amostra e um detector para medir a intensidade da luz após interagir com a amostra (Figura 2.6).



**Figura 2.6** – Esquema dos principais componentes de um espectrofotômetro UV/Vis.

A espectroscopia UV-Vis baseia-se na absorção de radiação eletromagnética pela amostra, sendo essa absorção determinada indiretamente por meio da transmitância. A luz que incide na amostra tem intensidade  $I_0$  e, após atravessá-la, no caso do espectrômetro por transmissão, chega ao detector com intensidade reduzida  $I$  devido à absorção pela amostra em comprimentos de onda específicos. A razão entre as duas intensidades  $I/I_0$  é definida como Transmitância ( $T$ ), que mede o percentual da luz transmitida pela amostra, dada pela equação 2.1 (Cosimo; Haller, 2025).

$$T = \frac{I}{I_0} \times 100. \quad (2.1)$$

A partir da determinação da transmitância, é possível determinar a absorbância ( $A$ ), conforme a equação 2.2. Essa grandeza adimensional é definida como o logaritmo negativo da transmitância, a qual expressa a quantidade de luz absorvida pela amostra (Cosimo; Haller, 2025).

$$A = -\log(T). \quad (2.2)$$

A partir da Lei de Beer-Lambert, é possível determinar a concentração de um analito de interesse a partir de sua absorbância, conforme a equação 2.3 (Cosimo; Haller, 2025).

$$A = \varepsilon cd \rightarrow c = \frac{A}{\varepsilon d}, \quad (2.3)$$

onde  $c$  é a concentração da amostra,  $d = 1$  cm é o caminho óptico (largura da cubeta), e  $\varepsilon$  o coeficiente de extinção, uma constante específica da amostra que descreve o quanto a amostra está absorvendo em um determinado comprimento de onda.

Cada substância possui um pico de absorção característico em um determinado comprimento de onda, o qual é selecionado para a quantificação do analito de interesse. Para estabelecer a relação entre absorbância e concentração, soluções-padrão de concentração conhecida são analisadas no comprimento de onda selecionado, gerando uma curva de calibração. A relação linear entre absorbância e concentração permite o ajuste de uma regressão linear, e, com base nessa equação, a concentração de uma amostra desconhecida pode ser determinada. Toda a análise é fundamentada na Lei de Beer-Lambert, e, portanto, alguns critérios devem ser seguidos: (i) as soluções-padrão devem ser suficientemente diluídas, pois a lei é derivada para soluções homogêneas e com baixa concentração, garantindo que a relação entre absorbância e concentração permaneça linear; (ii) os valores medidos em amostras com concentrações desconhecidas devem estar contidos dentro dos limites da curva de calibração, evitando extrapolações que possam comprometer a precisão dos resultados (Pavia et al., 2010; Skoog et al., 2019; Cosimo; Haller, 2025). Os processos descritos a seguir utilizam medições espectrofotométricas baseadas na Lei de Beer para a quantificação dos analitos de interesse.

Para a quantificação de proteínas solúveis, o método de Bradford (1976) é amplamente empregado devido à sua sensibilidade e rapidez. Esse método baseia-se na interação do corante Azul Brilhante de Coomassie G-250 com proteínas, promovendo uma mudança no máximo de absorção do corante de 465 nm para 595 nm. Assim, a determinação da concentração proteica é realizada por meio da leitura da absorbância a 595 nm. A curva de calibração é construída utilizando soluções-padrão de albumina sérica bovina (BSA) em concentrações previamente conhecidas, permitindo a quantificação das amostras com base na relação linear entre a absorbância e a concentração proteica.

O método UV-sulfúrico para determinação de açúcares totais baseia-se na reação dos açúcares com ácido sulfúrico concentrado, que provoca a hidrólise dos polissacarídeos e a formação de monossacarídeos (Albalasmeh et al., 2013). Durante essa reação, o ácido sulfúrico também causa desidratação dos açúcares, resultando na formação de compostos

derivados de furfural, capazes de absorver luz ultravioleta. A absorvência desses compostos é medida a 315 nm, onde ocorre a máxima absorção, e é diretamente proporcional à concentração de açúcares na amostra. A quantificação é realizada por comparação com uma curva padrão construída com soluções-padrão de glicose ou sacarose, permitindo a determinação dos açúcares totais presentes na amostra.

Para quantificar os açúcares redutores, pode-se utilizar o método DNS, que se baseia na reação do ácido 3,5-dinitrosalicílico, agente oxidante presente no reagente DNS, com o grupo carbonílico dos açúcares redutores, sob condições alcalinas. Essa reação resulta na redução do ácido 3,5-dinitrosalicílico a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, um composto de coloração vermelho alaranjada, cuja absorção máxima ocorre a 540 nm, permitindo a quantificação dos açúcares redutores por comparação com uma curva padrão, construída com soluções-padrão de frutose, com concentrações previamente conhecidas (Gonçalves et al., 2010).

A quantificação de amido pode ser realizada usando o método UV-sulfúrico, com modificações. O pellet residual da extração de açúcares solúveis é submetido à hidrólise com ácido sulfúrico concentrado. Nessa condição, o amido, um polissacarídeo composto por unidades de glicose, é hidrolisado em suas unidades monoméricas. O ácido também promove a desidratação dos açúcares, formando derivados de furfural que absorvem luz UV, com pico de absorvência a 315 nm. A concentração é determinada por comparação com uma curva padrão de glicose ou sacarose. Para expressar os resultados como amido, aplica-se o fator de conversão 0,9 para converter a massa de glicose em equivalente de amido, considerando que a unidade de glicose no amido está na forma anidra (sem a molécula de água que a glicose livre possui).

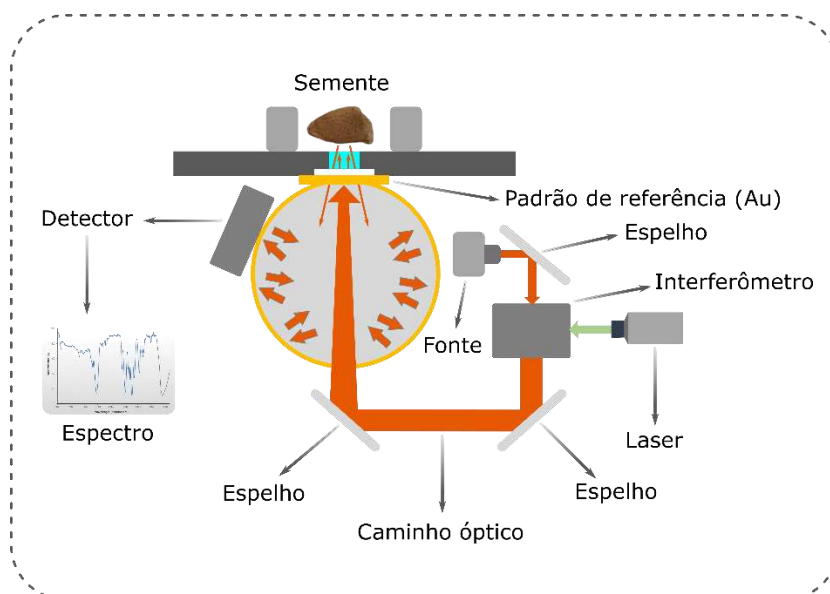
A quantificação dos compostos fenólicos totais pode ser realizada por meio do método Folin-Ciocalteu (Fu et tal., 2010), que se baseia na reação dos fenólicos com o reagente Folin-Ciocalteu, em um meio alcalino. Nessa reação, os compostos fenólicos transferem elétrons para o reagente, formando um complexo azul cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de fenólicos na amostra. A mudança na cor, que atinge absorvência máxima no comprimento de onda de 760 nm, é quantificada por espectrofotometria, permitindo a determinação dos compostos fenólicos totais por comparação com uma curva padrão, construída com soluções-padrão de ácido gálico com concentrações previamente conhecidas.

Em relação à atividade enzimática, esta pode ser detectada de forma mais intensa logo após o início da embebição das sementes. A determinação da atividade das enzimas do sistema antioxidativo em plantas segue etapas padronizadas que incluem a extração, preparação do meio de reação, leitura espectrofotométrica e cálculo da atividade específica. Inicialmente, é preparado um extrato enzimático bruto a partir de tecidos vegetais, como sementes, utilizando uma solução tampão enriquecida com agentes que auxiliam na estabilização das enzimas e na remoção de compostos que poderiam interferir nas análises (Buchanan et al., 2015; Taiz et al., 2017). O meio de reação é preparado de maneira específica para cada enzima, visando garantir condições ideais de pH, temperatura e disponibilidade de substratos. Esses meios contêm tampões apropriados e reagentes que participam diretamente da reação catalisada pela enzima-alvo, permitindo que sua atividade seja monitorada por espectrofotometria (Scopes, 2002). Em geral, a atividade enzimática é estimada a partir dos dados de absorvância, utilizando os coeficientes de extinção molar dos reagentes ou produtos e expressando os resultados em função da quantidade de proteína presente na amostra (Boeckx et al., 2017).

### *2.7.3 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)*

De maneira análoga à espectroscopia UV-Vis, é possível obter informações sobre os grupos funcionais presentes em uma amostra por meio da análise de seu espectro. Para isso, a amostra é exposta a diferentes comprimentos de onda, e a resposta espectral resultante é representada em um gráfico, indicando a quantidade de radiação absorvida em cada um deles. A espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) tem se destacado devido a suas vantagens, como a rapidez na análise, alto rendimento, com preparação mínima ou nenhuma de amostra, permitindo a análise de sementes inteiras, e sem o uso de reagentes (Xia et al., 2019). Quando se trabalha com material sólido, como uma semente inteira, a absorvância é determinada de forma indireta, por meio da medição da reflexão da luz pela superfície da amostra. Uma técnica que pode ser utilizada para esse fim é a espectroscopia NIR por reflexão, onde é feita uma varredura espectral na amostra a fim de se obter os picos de refletância da amostra. Na espectroscopia de reflexão NIR, como a luz não atravessa diretamente a amostra, não se mede a transmitância ( $I/I_0$ ), mas sim a refletância ( $R$ ), que representa a fração da luz refletida pela superfície do material. Para aproximar essa relação com a absorvância tradicionalmente utilizada na espectroscopia de transmissão, aplica-se a transformação matemática  $\log(1/R)$ . Essa conversão permite que os dados de refletância sejam analisados de forma semelhante à absorvância, facilitando a modelagem e a interpretação espectral (Norris, 2005).

Entre as tecnologias NIR mais utilizadas na literatura estão espectrômetros com Transformada de Fourier (FTIR). O espectrômetro emite radiação infravermelha de amplo espectro (780–2500 nm), que passa por um interferômetro, que divide e recombina os feixes de luz, e depois vai em direção a amostra e, após interagir com ela, a intensidade da luz refletida é lida no detector, como apresentado na Figura 2.7. A partir dos dados obtidos, uma transformada de Fourier é aplicada para gerar o espectro de absorção (Pavia et al., 2010).



**Figura 2.7** – Esquema dos principais componentes de um espectrofotômetro com Transformada de Fourier (FTIR).

A espectroscopia NIR é baseada na absorção de radiação eletromagnética em comprimentos de onda na faixa de 780–2500 nm. Quando a frequência da radiação infravermelha corresponde à frequência natural de vibração de uma ligação química específica, a radiação é absorvida pela molécula (Pavia et al., 2010). A absorção se dá principalmente por ligações C-H, O-H e N-H presentes nos principais compostos (água, açúcares, proteínas, lipídios etc.) da amostra e uma pequena faixa de absorção pode ser definida para cada tipo de ligação (Agelete; Hurburgh, 2014; Xia et al., 2019). Considerando que cada molécula possui um padrão único de absorção no infravermelho, determinado por sua estrutura química, é possível inferir sobre a presença de grupos funcionais presentes em amostras. Essa identificação é feita por meio da comparação dos espectros obtidos com bancos de dados de referência, permitindo a caracterização dos componentes presentes na amostra. Embora a concentração de compostos químicos na amostra possa ser estimada a partir da absorbância, por meio de uma curva de calibração, neste estudo, a espectroscopia

NIR foi utilizada para análise qualitativa. A abordagem adotada baseou-se na identificação dos picos de absorção nos espectros obtidos, combinada à aplicação de modelos de classificação, visando detectar possíveis diferenças na composição química entre sementes claras e escuras de cedro-rosa.

A heterogeneidade da superfície da semente inteira, aliada às variações no tamanho e formato, dificulta as análises, pois intensifica o espalhamento da luz durante as medições por NIR. A luz refletida incide em múltiplos ângulos (Figura 7), resultando em efeitos aditivos (deslocamento vertical) e multiplicativos (inclinação do espectro) em relação ao espectro de referência (Rinnan et al., 2009; Agelete; Hurburgh, 2014). Para mitigar esses efeitos, algumas transformações quimiométricas, que consistem na aplicação de métodos estatísticos e modelos matemáticos a dados de origem química (Ferreira et al., 1999), tem sido aplicada aos dados espectrais e se mostrado eficazes para minimizar os ruídos provenientes tanto das amostras quanto do equipamento. Esse pré-processamento dos dados antes da classificação contribui para realçar as características de interesse nos espectros e melhorar o desempenho do modelo de classificação (Rinnan et al., 2009). Entre os métodos de pré-processamento mais comuns estão o Multiplicative Scatter Correction (MSC), que ajusta os espectros com base em regressão em torno do espectro médio, e o Standard Normal Variate (SNV), que centraliza e padroniza os dados, reduzindo interferências instrumentais e amostrais (Dhanoa et al., 1994). Além desses, técnicas derivativas também são utilizadas: a primeira derivada remove a linha de base, e a segunda derivada, a linha de base e tendências lineares, embora alterem a forma espectral (Jonsson; Gabrielsson, 2009). O método de derivação proposto por Savitzky e Golay (1964) aplica uma etapa de suavização ao cálculo das derivadas espectrais por meio do ajuste polinomial em intervalos móveis, conhecidos como janelas.

Estudos recentes que utilizam espectros de infravermelho combinados com abordagens quimiométricas, têm apresentado resultados promissores na classificação de sementes (Choi et al., 2016; Panero et al., 2022; Soares, 2024). Esses modelos permitem diferenciar lotes de sementes com base em características como deterioração, viabilidade e vigor. Neste estudo, o uso de um modelo de classificação foi feito com o objetivo de classificar as sementes de acordo com a cor e identificar o pico de absorção mais relevante para diferenciar sementes claras de sementes escuras. O método PLS-DA (Partial Least Squares Discriminant Analysis) é amplamente empregado na modelagem de dados espectrais de sementes. Trata-se de uma técnica de classificação supervisionada que possibilita a atribuição de amostras a classes específicas, utilizando os dados espectrais e a categorização

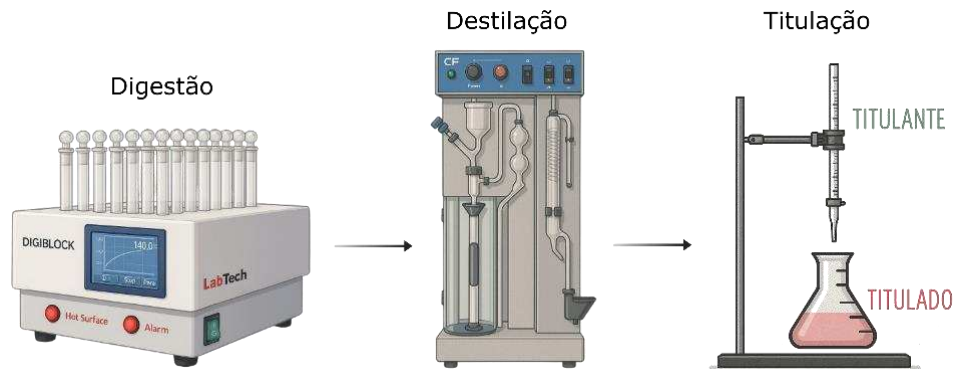
original dos lotes. Esse método é fundamentado na regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS) que usa os dados para criar variáveis latentes, as quais são usadas para prever os valores de resposta dos espectros (Wold et al., 2001).

Após a escolha do modelo, sua validação é etapa essencial no processo de modelagem, pois garante que ele seja aplicável à classificação de novas amostras, evitando previsões irreais ou superestimadas quanto à sua capacidade de classificar lotes futuros (Westad; Marini, 2015). O desempenho do modelo e sua capacidade preditiva podem ser avaliados por meio da validação com conjunto de teste, cuja eficiência é mensurada pela acurácia e pelo coeficiente kappa. Na validação com conjunto de teste, o modelo é calibrado utilizando um subconjunto dos dados (conjunto de treinamento) e, posteriormente, avaliado em um conjunto separado (conjunto de teste), que não foi utilizado durante o treinamento. Essa abordagem simula um cenário mais realista de previsão, garantindo que o modelo seja testado com dados verdadeiramente independentes (Mortensen et al., 2021). A acurácia é usada para avaliar modelos de classificação de aprendizado de máquina, representando a proporção de classificações corretas em relação ao total de observações analisadas com base nos valores reais (Manning et al., 2009). Já o coeficiente kappa, é um indicador estatístico que descreve o grau de concordância entre dois conjuntos de dados. Um valor kappa = 1 significa concordância perfeita, enquanto um valor kappa = 0 indica concordância equivalente ao acaso (Viera, 2005).

#### *2.7.4 Nitrogênio total pelo método de Kjeldahl*

O método de Kjeldahl (A.O.A.C, 1984) é uma técnica clássica utilizada para determinar o teor de nitrogênio total em amostras orgânicas, sendo amplamente empregada na estimativa de proteína total. O processo ocorre em três etapas principais: digestão, destilação e titulação (Figura 2.8). Na digestão, a amostra é aquecida com ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) concentrado, geralmente na presença de um catalisador (como sulfato de cobre ou selênio) e sulfato de potássio, que eleva o ponto de ebulição da mistura. Durante essa etapa, o nitrogênio orgânico presente na amostra é convertido em íons amônio ( $NH_4^+$ ), formando sulfato de amônio  $(NH_4)_2SO_4$  (Silva, 1990). A digestão é feita até que a solução fique límpida e incolor, indicando a completa decomposição da matéria orgânica. Na destilação, após a digestão, adiciona-se uma solução concentrada de hidróxido de sódio (NaOH) para tornar o meio alcalino, o que converte o íon amônio em amônia ( $NH_3$ ). A amônia liberada é destilada e capturada em um frasco contendo uma solução padrão de ácido bórico ou ácido sulfúrico,

formando um sal de amônio. Por fim, a quantidade de amônia (e, conseqüentemente, de nitrogênio) capturada é determinada por meio de uma titulação. Para obter o teor de proteína, multiplica-se o nitrogênio total por um fator de conversão, geralmente 6,25, considerando que as proteínas contêm em média 16% de nitrogênio (Silva, 1990).



**Figura 2.8** – Etapas da quantificação de nitrogênio total pelo método de Kjeldahl.

### 2.7.5 Extração de lipídios por Soxhlet

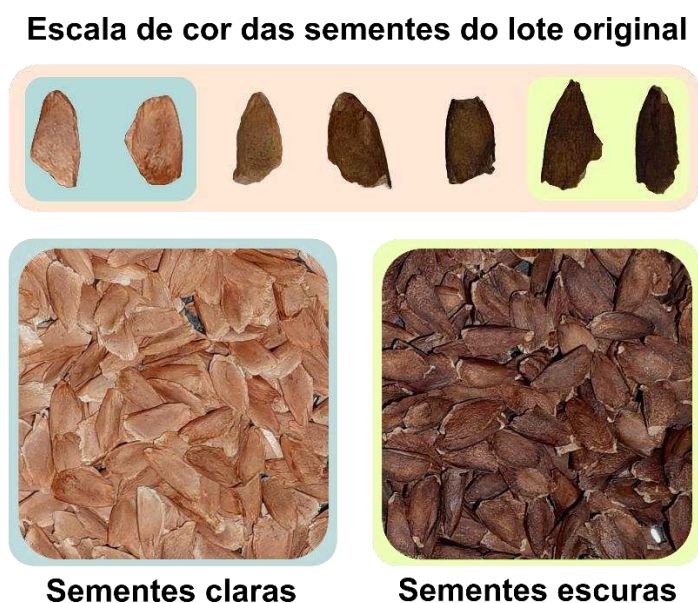
A extração de óleo por solvente é um processo físico baseado na transferência de compostos lipossolúveis (óleos e gorduras) de uma matriz sólida (geralmente material vegetal ou animal) para um solvente orgânico em contato com essa matriz. O método clássico, desenvolvido por Soxhlet em 1879, ocorre em três etapas principais: a penetração do solvente no tecido da amostra; a formação de uma micela intracelular entre o solvente e os lipídios; e a difusão da micela para o meio externo (Brum et al., 2009). O solvente utilizado no processo, geralmente éter de petróleo, éter dietílico ou n-hexano, é aquecido até se volatilizar, sendo então condensado e direcionado continuamente sobre a amostra. Esse ciclo promove a solubilização e a remoção da fração lipídica. A gordura extraída é calculada por diferença de massa da amostra antes e após a extração (Soxhlet, 1879; Silva, 1990).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo, são descritos os materiais e os métodos utilizados para as análises físicas, anatômicas, bioquímicas e fisiológicas, de sementes claras e escuras de *C. fissilis*.

#### 3.1 Material vegetal

O estudo foi conduzido com sementes de *Cedrela fissilis* Vell. coletadas no estado de São Paulo, Brasil, fornecidas pela Arbocenter. De acordo com o fornecedor, as sementes foram coletadas e beneficiadas em 2023, no amadurecimento dos frutos em diferentes árvores matrizes, com variabilidade genética, e as sementes apresentaram taxa de germinação inicial de 80%. As sementes foram adquiridas em 2024 e, até o momento das análises, estavam armazenadas em câmara fria (por um período de um ano) e foram utilizadas neste estudo devido à indisponibilidade de sementes recém-colhidas. Antes das avaliações, as alas foram removidas manualmente e as sementes foram classificadas visualmente em duas categorias de cor: claras e escuras (Figura 3.0). Essa classificação foi baseada nos tons mais contrastantes observados no lote original de sementes, e essas categorias foram consideradas os tratamentos experimentais. Portanto, sementes claras e escuras, sem alas, foram submetidas às avaliações descritas a seguir.



**Figura 3.0** - Variação de cor das sementes presentes no lote original. Sementes claras e escuras foram consideradas como tratamentos experimentais. Sementes de cores intermediárias não foram utilizadas neste estudo.

## **3.2 Qualidade física das sementes**

### *3.2.1 Biometria*

Para a avaliação biométrica, foram medidos o comprimento, a largura e a espessura de 100 unidades de sementes de cada cor, escolhidas aleatoriamente do lote original. As dimensões foram obtidas com um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm.

### *3.2.2 Peso de mil sementes*

O peso de mil sementes foi determinado segundo as Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009), utilizando oito repetições de 100 sementes por tratamento, pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g.

### *3.2.3 Grau de umidade*

O teor de umidade de cada tratamento foi determinado pelo método da estufa a  $105 \pm 3$  °C, durante 24 horas (Brasil, 2009). Foram utilizadas duas amostras de trabalho de  $4,5 \pm 0,5$  g cada, em cadinhos de 6 cm de diâmetro. As sementes foram pesadas em balança analítica com precisão de 0,001 g e secadas em estufa com circulação forçada de ar. Os resultados, expressos em porcentagem, foram calculados com base na massa úmida (Bu).

### *3.2.4 Teste de raios X*

Para a realização do teste de raios X, o número de sementes por imagem e a distância focal foram previamente testados. A melhor combinação de tensão elétrica e tempo de exposição foi determinada usando a função “*Automatic Exposure Control Toggle*” do equipamento para calibração automática. As sementes foram colocadas de forma ordenada em papel adesivo para permitir a identificação individual e o posterior rastreamento no teste de germinação. Imagens radiográficas digitais foram geradas usando o equipamento de radiografia digital Faxitron, modelo MX-20 (Faxitron X-ray Corp., Wheeling, IL, EUA), configurado para 15,7 segundos de exposição à radiação, tensão elétrica de 26 quilovolts (kV). Após a aquisição das radiografias, as imagens foram avaliadas visualmente para quantificar a proporção de sementes cheias, vazias, danificadas por insetos e danificadas fisicamente de acordo com as Regras para Análise de Sementes - RAS (Brasil, 2009).

### 3.3 Anatomia das sementes

As sementes de cada tratamento foram fixadas em FAA50 por 48 horas e então armazenadas em etanol 70% (v/v) (Johansen, 1940). Para obtenção de cortes histológicos, as sementes foram seccionadas em planos transversais com o auxílio de uma lâmina metálica e posteriormente embebidas em metacrilato (Historesin-Leica Biosystems Nussloch, Heidelberg, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Cortes transversais, com espessura de 8-10  $\mu\text{m}$ , foram obtidos utilizando um micrótomo rotativo de avanço automático (Leica RM2155, Leica Microsystems Inc., Deerfield, EUA). Os cortes foram então corados com reagentes específicos para a detecção e localização dos compostos de interesse (Tabela 3.0) e, posteriormente, montados em resina sintética (Permount®) para análise microscópica.

**Tabela 3.0** – Corantes histoquímicos utilizados, coloração esperada e respectivas metodologias.

Corante	Coloração esperada	Metodologia
Azul de toluidina	Mucilagens e paredes ricas em pectinas coram de roxo; paredes celulósicas coram de azul, e paredes lignificadas e fenólicos não estruturais coram de verde.	O'Brien et al., 1964
Xylidini Ponceau (XP)	Cospos proteicos coram de vermelho vivo	Vidal, 1970
Sudan III	Lipídios coram de alaranjado	Pearse, 1972
Floroglucina ácida	Ligininas coram de rosa a vermelho	Johansen, 1940
Lugol	Grãos de amido coram de marrom, roxo ou negro	Johansen, 1940

As lâminas foram analisadas e fotografadas em microscópio de luz (AX70 TRF, Olympus Optical, Tóquio, Japão), acoplado a uma câmera digital (Zeiss AxioCam HRc, Göttingen, Alemanha), utilizando o software Axio Vision para captura de imagens. A quantificação dos parâmetros anatômicos foi realizada utilizando o software de análise de imagens Image Pro-Plus (versão 4.5, Media Cybernetics, Silver Spring, EUA), considerando as seguintes variáveis: (i) espessura média do tegumento, do endosperma e dos cotilédones; e (ii) número de camadas celulares da região mediana do endosperma e dos cotilédones, além das extremidades do endosperma.

### 3.4 Análise bioquímica das sementes

#### 3.4.2 Lipídios

A extração de lipídios totais foi realizada de acordo com (Silva, 1990) em aparelho Soxhlet. Para cada repetição, foi utilizado 1 g de material em pó (massa seca) e hexano como solvente, durante 24 horas. O material foi previamente congelado, liofilizado, macerado e acondicionado em cartuchos de papel Germitest®. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento. Após a extração, o solvente foi evaporado em estufa a 40 °C por 24 horas. A quantidade de lipídios foi calculada pela diferença de massa antes e após a extração e expressos como valores médios em porcentagem.

#### 3.4.1 Carboidratos

*Açúcares Solúveis Totais (AST):* A quantificação dos açúcares solúveis totais foi realizada pelo método UV-ácido sulfúrico descrito por Albalasmeh et al., (2013), com modificações. Para isso, 100 mg de amostras de sementes desengorduradas, por repetição, foram colocadas em tubos Falcon e homogeneizadas com 4 mL de etanol a 80%. As amostras foram aquecidas a 70 °C por 1 hora, centrifugadas e o sobrenadante foi utilizado para quantificação. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 315 nm, em cubeta de quartzo, utilizando 40 µL do extrato alcoólico, 210 µL de água deionizada e 1,25 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Os resultados foram expressos em g/100 g de massa seca. Todas as leituras de absorbância para a determinação dos carboidratos foram realizadas em um espectrofotômetro Thermo Scientific™ UV-Vis Genesys 105.

*Açúcares Redutores (AR):* A quantificação dos açúcares redutores foi realizada de acordo com (Gonçalves et al., 2010), com modificações. Uma alíquota do extrato alcoólico, obtida previamente, foi homogeneizada com 500 µL da solução de DNS e incubada em banho-maria por 5 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados 4 mL de água deionizada e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm, em cubeta de vidro. A quantificação dos açúcares não redutores foi realizada pela diferença entre os resultados de açúcares solúveis totais e açúcares redutores. Os resultados foram expressos em g/100 g de massa seca.

*Amido:* A quantificação dos açúcares totais foi realizada pelo método UV-ácido sulfúrico descrito por (Albalasmeh et al., 2013), com modificações. O pellet foi lavado três vezes com 2 mL de álcool a 80%, seguido de banho-maria por 5 minutos a 70 °C e

centrifugação a 4000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as amostras foram colocadas em uma estufa por 24 horas a 45 °C. A massa de pellets de cada tubo foi pesada e homogeneizada com 4 ml de ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos, e uma alíquota foi utilizada para a leitura da absorbância a 315 nm, em cubeta de quartzo. Para o cálculo do amido, um fator de correção de 0,9 foi utilizado para converter glicose livre em amido. Os resultados foram expressos em g/100 g de massa seca.

### *3.4.3 Proteínas totais*

Foi realizada utilizando o método Semi-micro de Kjeldahl de acordo com Silva (1990). O material foi previamente congelado, liofilizado e, para cada repetição, 0,2 g (massa seca) de sementes foram colocados em tubos de ensaios juntamente com 1 g de mistura digestora, composta por sulfato de sódio (200 g), sulfato de cobre (20 g) e selênio (2 g), e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. As amostras foram digeridas em bloco digestor, a 150° C, por 1 hora, seguida por 300° C, por mais 6 horas. Após a digestão, com a solução fria, adicionou-se 10 mL de água destilada. Em seguida, adicionou-se 10 mL de hidróxido de sódio (50%) procedendo-se a destilação. O destilado foi coletado em Erlenmeyer (75 mL), contendo 10 mL de solução indicadora composta por ácido bórico a 2% e indicador misto (verde de bromocresol e vermelho de metila a 0,1% em álcool etílico). A titulação foi realizada utilizando solução de ácido clorídrico 0,02 N. O teor de proteínas foi estimado através do fator de 6,25 (Silva, 1990). Os teores foram expressos em g. 100 g<sup>-1</sup> de matéria seca.

### *3.4.3 Compostos fenólicos totais (CFT)*

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada pelo método GAE, de acordo com Fu et al., (2010), com modificações. Amostras de 0,5 g de sementes trituradas, por repetição, foram homogeneizadas com 10 mL de solução extratora composta por metanol, ácido acético e água deionizada, utilizando politron. Em seguida, as amostras foram filtradas em papel-filtro, transferidas para tubos Falcon e centrifugadas por 5 minutos a 4.000 rpm. Uma alíquota de 200 µL do sobrenadante, previamente diluído, foi adicionada a 1.000 µL da solução de Folin-Ciocalteu (1:10) e 800 µL da solução de carbonato de sódio a 7,5%. Após incubação no escuro por 30 minutos, em temperatura ambiente, a leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro a 760 nm, em cubeta de quartzo. A quantificação foi baseada em curva padrão de ácido gálico.

#### 3.4.4 Atividade de enzimas do sistema antioxidativo

Sementes de cada tratamento foram embebidas em papel Germitest por 0, 24, 48, 72 e 96 horas para ativar o metabolismo e avaliar a cinética da atividade enzimática durante a germinação. Em seguida, as sementes foram congeladas a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , liofilizadas e maceradas. Para a obtenção do extrato enzimático, 200 mg de sementes macerada foram homogeneizados em 1,8 mL de meio de extração, composto por tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 6,8), EDTA 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonila 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v), conforme Peixoto et al., (1999). A mistura foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , e o sobrenadante coletado. Todas as leituras de absorbância para a determinação das atividades enzimáticas foram realizadas em um espectrofotômetro Thermo Scientific™ UV-Vis Genesys 105.

*Superóxido dismutase (SOD):* A atividade da SOD foi avaliada pela combinação de 30  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático com 2,97 mL de meio de reação, composto por tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 7,8), contendo 13 mM de metionina, 2  $\mu\text{M}$  de riboflavina, 75  $\mu\text{M}$  de p-nitro azul de tetrazólio (NBT) e 0,1 mM de EDTA (Del Longo et al., 1993). Após a preparação do meio em sala escura, os tubos contendo as amostras foram colocados em uma câmara de reação iluminada por 15 minutos. A atividade enzimática foi medida a partir da absorbância a 560 nm, quantificando a formação de formazan azul devido à fotorredução do NBT, e expressa como a quantidade necessária para inibir 50% da fotorredução do NBT (Beauchamp; Fridovich, 1971).

*Ascorbato peroxidase (APX):* A atividade da APX foi determinada segundo Ramalheiro (2009), com modificações. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático bruto a 2,90 mL de solução de reação, composta por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,8), suplementado com ácido ascórbico 0,25 mM, EDTA 0,1 mM e  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 mM. O espectrofotômetro foi zerado com o meio de reação, e a absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 290 nm, durante 2 minutos, em cubeta de quartzo. A absorbância foi calculada a partir da diminuição durante a leitura ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ), e a atividade enzimática foi expressa em  $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, utilizando um coeficiente de extinção molar de  $2,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Nakano; Asada, 1981).

*Peroxidase (POX):* A atividade da POX foi determinada de acordo com (Kar; Mishra, 1976), adicionando-se 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático bruto a 2,90 mL de solução de reação,

composta por tampão fosfato de potássio 25 mM (pH 6,8), juntamente com 20 mM de guaiacol e 20 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O espectrofotômetro foi zerado com o meio de reação, e a absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 420 nm, durante 2 minutos, em cubeta de vidro. O aumento da absorbância foi calculado em um minuto ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ), e a atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, utilizando um coeficiente de extinção molar de  $26,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Chance; Maehly, 1955).

*Catalase (CAT)*: Uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático foi adicionada em 2,90 mL de solução de reação, composta por tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 7,0), suplementado com 12,5 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Havir e McHale, 1987). O espectrofotômetro foi zerado com o meio de reação, e a absorbância das amostras foi lida no comprimento de onda de 240 nm, por 2 minutos, em cubeta de quartzo. A atividade enzimática foi calculada com base na inclinação da linha de absorbância ( $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ ), e os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$  de proteína, utilizando o coeficiente de extinção molar de  $36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Anderson et al., 1995).

*Proteína solúvel*: A concentração de proteína solúvel nos extratos enzimáticos, utilizados para a quantificação da atividade enzimática, foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina sérica bovina (BSA) como padrão. Para a análise, 100  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático, previamente diluído, foram misturados a 1 mL do reagente de Bradford. A mistura foi homogeneizada e incubada por 20 minutos, seguida da leitura da absorbância a 595 nm.

### 3.4.5 Espectroscopia no infravermelho próximo (NIR)

Leituras espectrais foram conduzidas individualmente em 100 sementes de cada tratamento (grau de umidade:  $\sim 9\%$ ), totalizando 200 espectros para análise. Cada espectro foi obtido na faixa entre 1.000 e 2.500 nm, utilizando o espectrômetro no infravermelho próximo com transformada de Fourier (Antaris II FT-NIR Analyzer; Thermo Scientific) no modo de reflectância log (1/R). Cada semente foi colocada diretamente na saída da fonte infravermelha do dispositivo e, em seguida, coberta com a tampa do instrumento. Para cada leitura, o espectrômetro realizou 32 varreduras, registrando a média dos valores com uma resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Após a obtenção dos espectros, as sementes foram colocadas de forma ordenada em papel adesivo para permitir a identificação individual e o posterior rastreamento no teste de raios X e no teste de germinação.

### **3.5 Qualidade fisiológica das sementes**

#### *3.5.1 Teste de germinação*

O teste de germinação foi conduzido conforme as diretrizes estabelecidas por Brasil (2009) utilizando quatro repetições de 25 sementes, por tratamento. As sementes foram previamente desinfetadas em solução comercial de hipoclorito de sódio a 1%, por um período de 3 minutos e, posteriormente, enxaguadas com água deionizada. As sementes foram dispostas sobre duas folhas de papel Germitest®. Foi borrifada sobre elas uma solução de Captan (1,5%) antes de cobrir com uma terceira folha. O papel foi previamente umedecido com água deionizada em volume 2,5 vezes o peso seco do papel. Foram confeccionados rolos que foram mantidos em saco plástico em câmara de germinação tipo BOD com temperatura controlada a 25 °C, e fotoperíodo de 12 horas por 21 dias.

A partir dos dados obtidos no teste de germinação, foram calculados índices de vigor, como tempo médio de germinação (TmG), coeficiente de variação do tempo de germinação (CVt), taxa média de germinação (TMG), incerteza (I) e sincronia (S), de acordo com Ranal et al. (2009). Também foi avaliada a formação de plântulas normais na primeira contagem, realizada 14 dias após a instalação do teste, e na última, aos 21 dias. Foram consideradas plântulas normais aquelas que apresentavam sistema radicular, hipocótilo e cotilédones bem desenvolvidos, além de gema apical em desenvolvimento. Plântulas com até 50% de danos nos cotilédones também foram classificadas como normais. O índice de velocidade de emergência (IVE) foi calculado de acordo com (Maguire, 1962).

#### *3.5.2 Curva de embebição*

A curva de embebição foi determinada a partir da massa inicial de três repetições de 25 sementes de cada tratamento. Após a determinação da massa das sementes, foram adotados os mesmos procedimentos utilizados na montagem do teste de germinação. O monitoramento da massa das sementes foi conduzido ao longo de 11 dias (264 horas), com maior densidade de pontos nas primeiras 12 horas, em intervalos curtos (1 a 3 horas). Após esse período, uma nova pesagem foi realizada às 24 horas. Entre 24 e 168 horas, as pesagens ocorreram em intervalos regulares de 24 horas. Por fim, os últimos pontos foram obtidos a cada 48 horas, abrangendo os períodos de 168 a 264 horas. Imediatamente antes da obtenção da massa, as sementes eram removidas dos rolos e secas superficialmente com o auxílio de papel-toalha. O

teor de água das sementes (%) foi calculado em relação à massa inicial e massa úmida das sementes, de cada tratamento, nos diferentes intervalos de acordo com a equação 3.0.

$$\text{Conteúdo de água (\%)} = \frac{Mf - Mi}{Mi} \times 100, \quad (3.0)$$

onde,  $Mi$  é a massa inicial das sementes; e  $Mf$  é a massa final das sementes em cada intervalo.

Além da análise visual, um modelo matemático foi criado com o objetivo de quantificar os parâmetros da curva de embebição. A dinâmica de absorção de água pelas sementes é classicamente descrita como um processo trifásico, caracterizado por uma rápida absorção inicial de água (Fase I), um período de equilíbrio dinâmico dos fluxos hídricos (Fase II) e um novo aumento de absorção associado ao aumento de solutos na fase II e à protrusão da radícula (Fase III) (Bewley; Black, 1978; 1994), no qual a difusão da água através do tegumento e dos tecidos internos é o fenômeno determinante. Modelos teóricos baseados nas soluções de equações diferenciais de difusão indicam que a absorção segue padrões matemáticos de natureza exponencial (Leopold 1983; Finch-Savage et al., 2005; Meyer et al., 2007; Irving; Zhang, 2021). Desse modo, a escolha de uma função exponencial dupla para representar a curva de embebição não é apenas empírica, mas fundamentada em princípios físicos que descrevem a penetração da água em sistemas biológicos (Leopold, 1983; Louf et al., 2018; Irving; Zhang, 2021; Moret-Fernández et al., 2024). A equação (3.1) representa o modelo proposto:

$$\text{Conteúdo de água (\%)} = w(1 - e^{-kt})^n + e^{l(t + (t_{III} - t_{II}))}, \quad (3.1)$$

onde o parâmetro  $w$  representa a quantidade máxima de absorção de água na segunda fase (%), grama),  $k$  e  $l$  (*absorção/h*) descrevem as taxas de absorção iniciais e finais relacionadas às Fases I e III, respectivamente,  $n$  é um parâmetro adimensional, associado à resistência interna oferecida a entrada da água a medida que a semente enche de água, e  $t_{III}$  (horas) corresponde ao instante de tempo em que se inicia a Fase III, marcado pela protrusão da radícula. Este parâmetro é determinado empiricamente como o momento em que a primeira radícula é observada emergindo do tegumento da semente. O período de duração da Fase II ( $a$ ) é, portanto, calculado pela diferença entre o instante  $t_{III}$  e o tempo em que a Fase I atinge a saturação  $t_{II}$  (horas) (quando a variação na absorção de água se torna menor que 1%). As grandezas  $w$ ,  $n$ ,  $t_{II}$  e  $t_{III}$  são parâmetros de entrada que devem ser fornecidos para o ajuste do modelo, sendo que  $w$ ,  $t_{II}$  e  $t_{III}$  são obtidos diretamente da curva de embebição;  $n$  é um parâmetro que deve ser testado até a obtenção do melhor ajuste.

A taxa de embebição total ( $J$ ) (ou velocidade de embebição) é obtida fazendo a derivada temporal da equação 3.1 expressa pela equação (3.2):

$$\begin{aligned} J(\%/h) &= \frac{d}{dt} \left[ w(1 - e^{-kt})^n + e^{l(t + (t_{II} - t_{III}))} \right] \\ &= wnke^{-kt}(1 - e^{-kt})^{n-1} + le^{l(t + (t_{II} - t_{III}))}. \end{aligned} \quad (3.2)$$

Além de descrever o padrão trifásico de forma realista, a formulação do modelo em termos exponenciais possibilita a realização de análise dimensional, permitindo interpretar biologicamente cada parâmetro. Isso significa que cada ajuste gera não apenas um bom coeficiente de determinação, mas também informações fisiológicas e físicas do processo, como permeabilidade, capacidade de reativação metabólica e eficiência de protrusão da radícula. Modelos alternativos, como polinomiais de ordem superior (Zuchi et al., 2012, Pimenta et al., 2014; Araujo et al., 2018), embora úteis para ajustes numéricos, não permitem inferir diretamente os mecanismos de difusão envolvidos. Irving; Zhang (2021) propuseram um modelo baseado em três exponenciais para descrever a embebição de sementes sob estresse hídrico e salino. Além do modelo representado pela equação (3.1) ser mais compacto e representativo, ele possibilita associar a duração da fase II ao ajuste e inferir sobre a cinética de embebição das sementes, com estimativa da resistência anatômica à entrada de água ( $n$ ) e das taxas de embebição ( $k(n)$  e  $l$ ), uma vez que a interpretação de  $k$  é determinada conjuntamente pelo valor de  $n$ . Um valor de  $n < 1$  indica uma absorção de água imediata e super-rápida (baixa resistência), o que pode caracterizar sementes com tegumento poroso, danificado ou com vias de entrada preferenciais. O valor  $n = 1$  descreve uma absorção exponencial padrão, típica de um meio homogêneo que oferece resistência constante à água. Um valor  $n > 1$  revela uma curva sigmóide, sinalizando uma alta resistência inicial, na qual barreiras anatômicas como um tegumento espesso ou hidrofóbico precisam ser primeiro umedecidas e superadas antes que a taxa de absorção acelere.

A equação (3.1) foi empregada para estimar os parâmetros da curva de embebição, posteriormente utilizados no cálculo da equação (3.2) para determinação da taxa total de embebição. As análises foram realizadas no software OriginPro 8.5.

### 3.5.3 Teste de condutividade elétrica

O teste de condutividade elétrica foi realizado com quatro repetições de 25 sementes de *C. fissilis* por tratamento. Cada repetição foi pesada em balança analítica com precisão de 0,001 g e imersa em 75 mL de água destilada, permanecendo em câmara de germinação BOD a 25 °C por 24 horas (Vieira; Krzyzanowski, 1999). Após esse período, a condutividade elétrica da solução foi medida utilizando um condutivímetro MICRONAL (modelo B 330). O valor obtido foi dividido pelo peso das sementes, e os resultados foram expressos como valores médios em  $\mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  de sementes.

### 3.6 Análise estatística

O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, e as análises estatísticas foram realizadas no software R (R Core Team, 2025). A avaliação da germinação foi realizada por meio da análise de sobrevivência, empregando-se o estimador não paramétrico de Kaplan-Meier para estimar a função de sobrevivência, visando determinar a probabilidade de falha (germinação) ao longo do tempo (Mamani et al., 2024). A função de sobrevivência é descrita pela seguinte equação:

$$S(t) = P(T > t), t_0, \quad (3.3)$$

onde  $S(t)$  é a probabilidade de que a observação sobreviva (não germine) até um tempo  $t$ , o que significa que ela não falha.

Para determinar a probabilidade de falha (germinação), a função é descrita como:

$$F(t) = 1 - S(t), \quad (3.4)$$

onde  $F(t)$  é a função de distribuição cumulativa que indica a probabilidade de uma falha (germinação) ocorrer em um determinado momento  $t$ .

Foram traçados gráficos com as curvas de germinação derivadas da função de distribuição cumulativa com base nas funções estimadas de sobrevivência das sementes. Para comparar as curvas de germinação, utilizou-se o teste não paramétrico Log-rank (Mantel, 1966) e Wilcoxon (Gehan, 1965) com nível de significância de 5%.

Os dados espectrais foram submetidos a pré-processamento quimiométrico utilizando os métodos de Variável Normal Padrão (SNV), Correção de Espalhamento Multiplicativo (MSC) e derivadas de Savitzky-Golay (SG) de primeira e segunda ordem. Dados espectrais brutos e pré-processados foram utilizados para treinar o modelo de classificação baseado na Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Para tanto, 70% dos dados foram utilizados para treinamento (calibração) e os 30% restantes para teste (validação). O desempenho do modelo foi avaliado por meio da análise da acurácia e do coeficiente kappa, calculados para os conjuntos de dados de treinamento e teste, de acordo com as equações 3.5 e 3.6.

$$Acuracy = \frac{TP + TN}{TP + TN + FP + FN}, \quad (3.5)$$

$$Kappa\ Coeficient = \frac{(Po - Pe)}{(1 - Pe)}, \quad (3.6)$$

onde  $TP$  representa os verdadeiros positivos,  $TN$ , os verdadeiros negativos,  $FP$ , os falsos positivos,  $FN$ , os falsos negativos,  $Po$ , a proporção de concordância observada, e  $Pe$ , a proporção de concordância esperada.

A acurácia, uma métrica amplamente usada em modelos de classificação de aprendizado de máquina, representa a proporção de previsões corretas em relação aos valores de classe reais (Manning et al., 2009). Como uma medida de validação complementar, o coeficiente kappa foi calculado para avaliar o grau de concordância entre as classificações previstas e observadas. Um valor kappa de 1 indica concordância perfeita, enquanto valores próximos de 0 sugerem concordância aleatória (Viera; Garrett, 2005).

Os demais dados foram submetidos ao teste t de Student, adotando-se um nível de significância de 5%. As condições de normalidade e homogeneidade de variâncias dos resíduos foram verificadas e devidamente atendidas. Adicionalmente, realizou-se a análise de componentes principais (ACP) no software STATISTICA 12, com o objetivo de avaliar a discriminação entre os tratamentos e a estrutura de variância das variáveis analisadas. Para essa análise, foram utilizados os dados de atividade enzimática referentes às 72 horas de embebição, período correspondente ao início da fase II da germinação, quando ocorre o pico de absorção de água e intensificação do metabolismo celular, incluindo a atuação do sistema antioxidativo.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesse capítulo, são apresentados e discutidos os resultados das análises físicas, anatômicas, bioquímicas e fisiológicas de sementes claras e escuras de *C. fissilis*.

### 4.1 Qualidade física das sementes

De acordo com os dados biométricos, as sementes escuras foram, em média, mais longas e espessas do que as sementes claras (Tabela 4.0). Diferenças significativas na largura entre os dois grupos não foi observada. Durante a maturação, as sementes crescem até atingir o tamanho característico da espécie, embora variações possam ocorrer em função de fatores ambientais e da variabilidade genética (Carvalho; Nakagawa, 2000). Ao final desse processo, há perda de água e uma leve redução no volume das sementes (Marcos-Filho, 2005). O maior tamanho observado nas sementes escuras pode indicar um desenvolvimento completo ou até mesmo prolongado, seja por um início mais precoce ou por uma fase de maturação estendida. De acordo com (Carvalho; Nakagawa, 1983), sementes maiores geralmente foram melhor nutridas durante o desenvolvimento, o que favorece o acúmulo de reservas e resulta em maior vigor. Essa relação entre tamanho e vigor tem sido observada em sementes de jumbo-vermelho e cedro-rosa (Costa et al., 2006; Pereira et al., 2017).

**Tabela 4.0** – Média e desvio padrão (DP) de parâmetros biométricos de sementes claras e escuras de *C. fissilis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

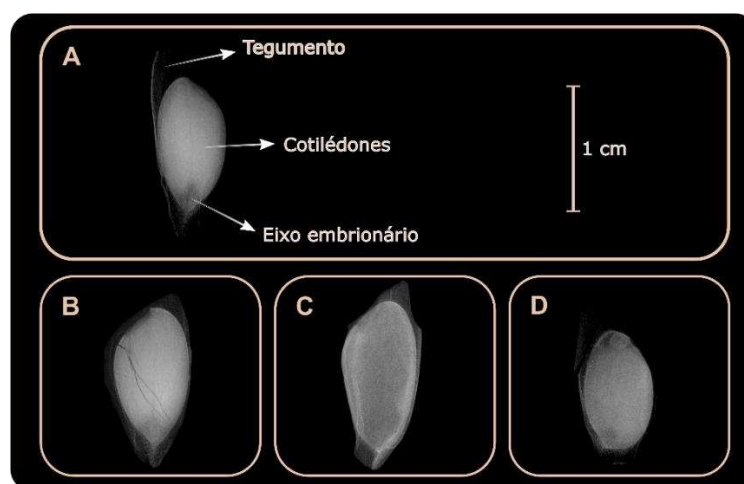
Biometria	Comprimento (mm)		Largura (mm)		Espessura (mm)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Claras</i>	12.64 b	1.12	5.91 a	0.53	1.61 b	0.21
<i>Escuras</i>	12.98 a	1.17	5.98 a	0.60	1.69 a	0.28

O grau de umidade das sementes claras e escuras, no momento da realização dos experimentos, encontrava-se próximo aos 9% (Tabela 4.1). Sementes escuras apresentaram, em média, maior massa do que sementes claras, conforme demonstrado pelo peso de mil sementes, sendo necessárias menos sementes escuras para obter 1 kg de sementes em comparação às sementes claras.

**Tabela 4.1** – Grau de umidade e peso de mil sementes claras e escuras de *C. fissilis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade.

Semente	Grau de umidade (%)	Peso de mil sementes (g)	Nº sementes/Kg
<i>Clara</i>	9,30	63,94 b	15639
<i>Escura</i>	9,48	65,43 a	15284

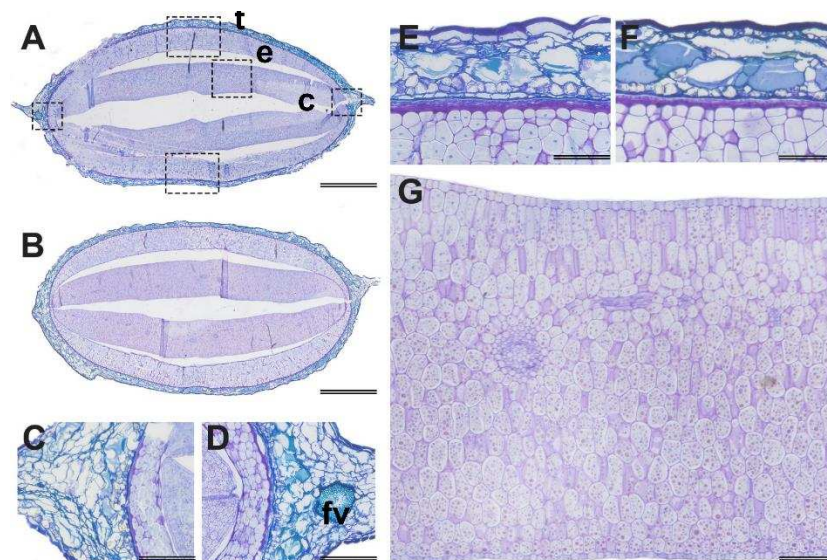
A partir das radiografias obtidas no teste de raios X, foram identificadas três sementes fisicamente danificadas (Figuras 4.0B e C), das quais duas eram escuras e uma era clara, além de uma semente escura com uma estrutura não identificada (Figura 4.0D). Sementes com esses padrões de imagem não germinaram. Esse resultado é corroborado pelo trabalho de Masetto et al. (2008), que constatou que o teste de raios X é eficiente na detecção de danos em sementes de cedro-rosa e que esses danos afetam negativamente a germinação, reduzindo a qualidade do lote. No entanto, a maior parte das sementes claras (99%) e escuras (97%) foram classificadas como cheia (Figura 4.0A), e muitas delas não germinaram. Logo, neste estudo, a integridade da morfologia interna das sementes demonstrou não ser uma variável muito explicativa para o resultado do teste de germinação.



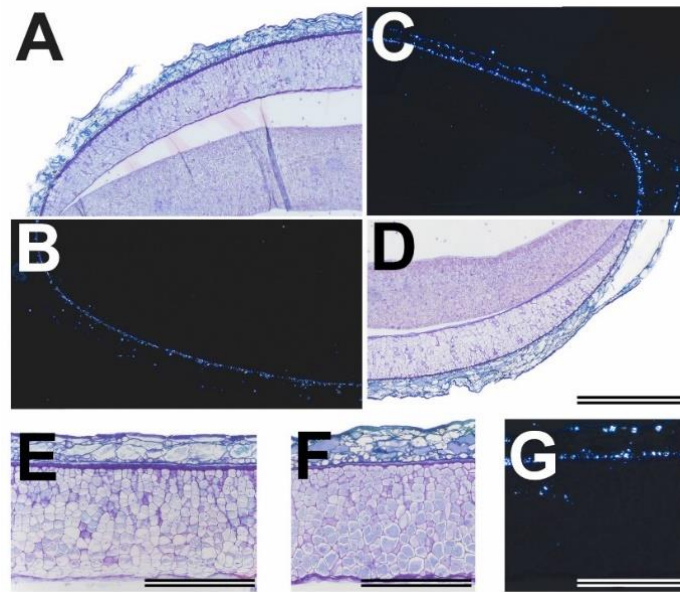
**Figura 4.0** – Sementes de *C. fissilis* classificadas por análise de imagem radiográfica: (A) - semente cheia (semente contendo todos os tecidos essenciais para germinação); (B) e (C) - sementes danificadas fisicamente (sementes trincadas ou manchadas); (D) - semente com estrutura não identificada.

## 4.2 Anatomia das sementes

A análise por microscopia de luz de cortes transversais corados com azul de toluidina permitiu a visualização da estrutura anatômica interna das sementes de *C. fissilis*, composta pelo tegumento, endosperma e cotilédones (Figura 4.1A-B). Em muitas sementes claras e escuras, foi possível observar, na extremidade do tegumento, a presença de feixes vasculares bem diferenciados, com elementos de xilema e floema (Figura 4.1C-D). A região mais externa do tegumento é composta por células colapsadas, seguidas por uma camada de células contendo cristais. Em seguida, observa-se a presença de células maiores e, mais próximas ao endosperma, uma nova camada de células menores, também com cristais. A presença desses cristais no tegumento é evidenciada na Figura 4.2, obtida por microscopia com luz polarizada. O início do endosperma é delimitado por uma linha espessa de coloração arroxeada, possivelmente composta por células colapsadas ou por camadas acelulares, resultantes da deposição de substâncias (Figura 4.1E-F). Na porção mais interna das sementes estão os dois cotilédones, representados com maior detalhe na Figura 4.1G.

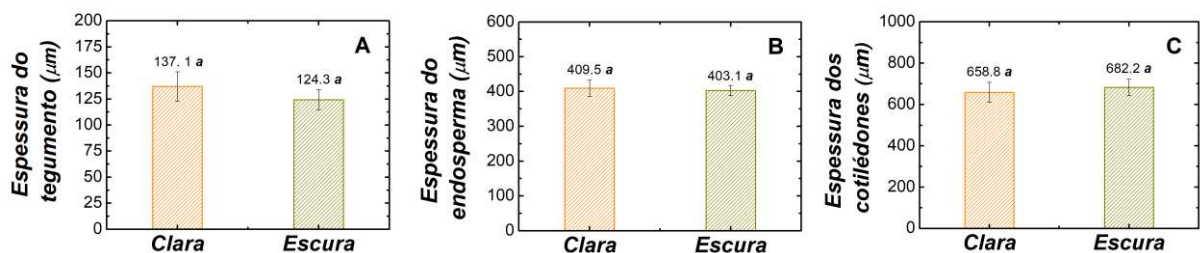


**Figura 4.1** - Corte transversal de sementes de *C. fissilis* corado com azul de toluidina. Semente clara (A), t: tegumento, e: endosperma, c: cotilédones, quadrados indicam as regiões em que foram medidas as espessuras e quantificado o número de camadas celulares dos tecidos; Semente escura (B); Extremidades semente clara (C, D), fv: feixes vasculares; Tegumento semente clara (E); Tegumento semente escura (F); Cotilédone semente escura (G). Barras: 1000  $\mu\text{m}$  (A, B), 200  $\mu\text{m}$  (C, D), 100  $\mu\text{m}$  (E-G).



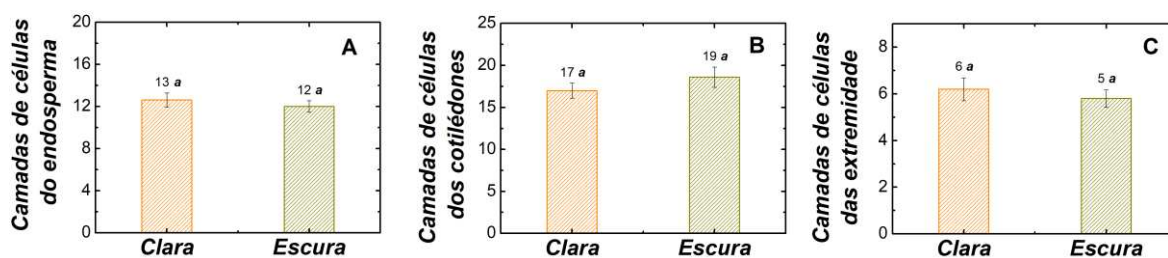
**Figura 4.2** – Cortes transversais de sementes de *C. fissilis* em luz polarizada. Sementes claras (A, B, E); C e D sementes escuras (C, D, F, G). Barras: 1000  $\mu\text{m}$  (A-D), 400  $\mu\text{m}$  (E-G).

A espessura média do tegumento, endosperma e cotilédones foi estatisticamente semelhante entre sementes claras e escuras ( $p > 0,05$ ), conforme apresentado na Figura 4.3. De forma geral, os cotilédones apresentaram espessura média em torno de 670  $\mu\text{m}$ , sendo mais espessos do que o tecido endospermico, que apresenta espessura média próxima de 400  $\mu\text{m}$ . O tegumento, por sua vez, é o tecido mais fino, com espessura média em torno de 130  $\mu\text{m}$ .



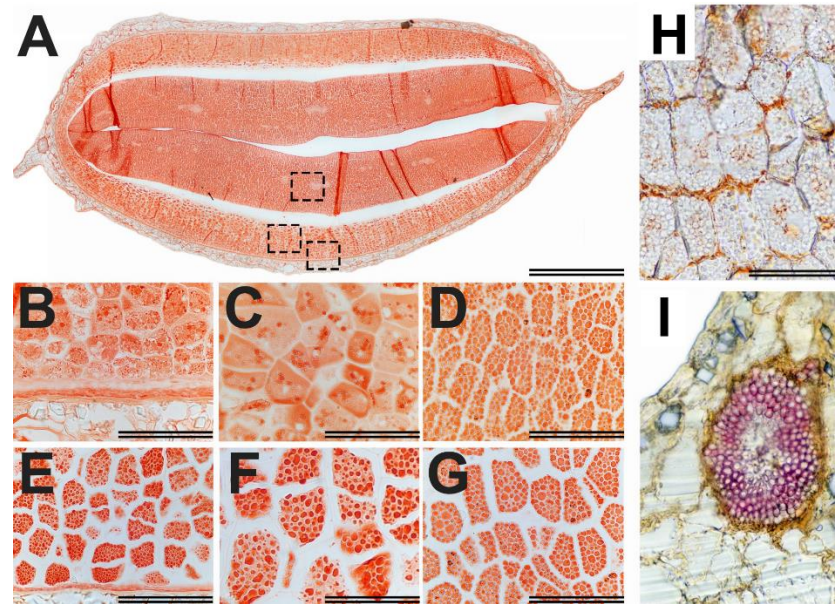
**Figura 4.3** – Espessura média do tegumento (A), endosperma (B) e cotilédones (C) de sementes claras e escuras de *C. fissilis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média.

O número de camadas celulares do endosperma, cotilédones e das extremidades foi estatisticamente semelhante entre sementes claras e escuras ( $p > 0,05$ ), conforme apresentado na Figura 4.4.



**Figura 4.4** – Número médio de camadas de células do endosperma (A), cotilédones (B) e das extremidades (C) de sementes claras e escuras de *C. fissilis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média.

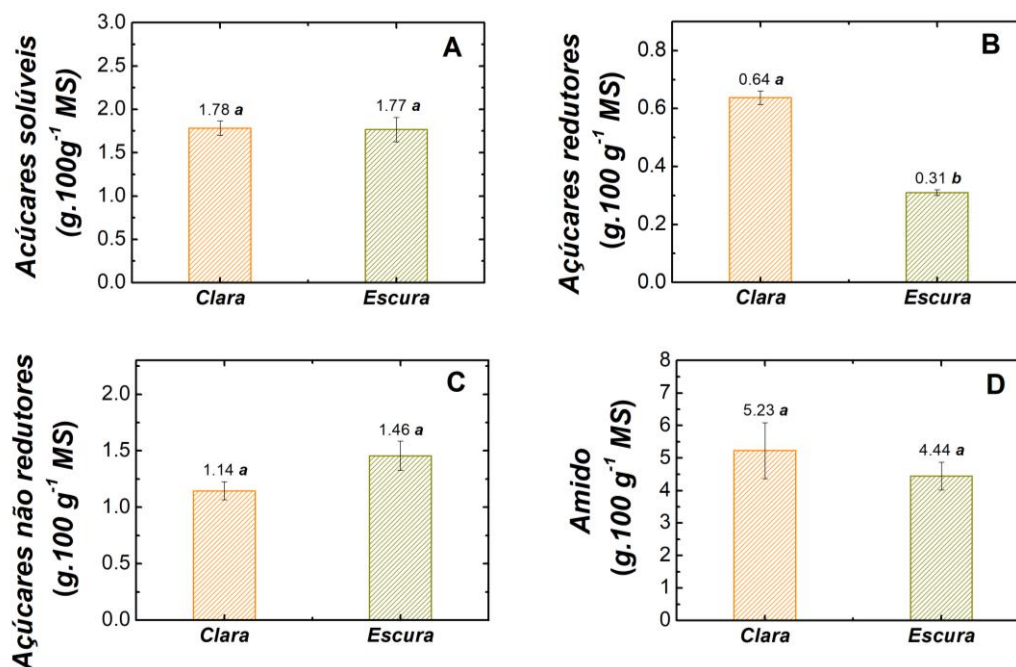
De acordo com o teste histoquímico realizado com o reagente XP, observou-se uma alta presença de proteínas nas sementes de cedro-rosa, detectadas no tegumento, endosperma e cotilédones (Figura 4.5). Nas sementes de coloração clara, os corpos proteicos na região do endosperma aparentaram ser menos estruturados ou de menor tamanho (Figura 4.5B-C), enquanto nas sementes escuras, observam-se corpos proteicos bem definidos, inclusive na região do endosperma (Figura 4.5E-F), indicando possíveis diferenças quantitativas no teor de proteína entre os tratamentos. De acordo com o teste histoquímico realizado com o reagente Sudan III, lipídios foram detectados principalmente entre células do endosperma de sementes claras e escuras (Figura 4.5H). A Figura 4.5I apresenta o resultado do teste histoquímico com ácido floroglucina, utilizado para a detecção de lignina, a qual foi observada apenas nos vasos do xilema localizados em uma das extremidades do tegumento, tanto nas sementes claras quanto nas escuras. Durante o desenvolvimento, as sementes estabelecem um sistema vascular especializado responsável pelo transporte de água e nutrientes da planta-mãe para os tecidos embrionários em desenvolvimento. Em espécies da família Meliaceae, esse sistema pode incluir feixes vasculares bem desenvolvidos que atravessam o tegumento e, mesmo após a maturação, podem permanecer dentro da semente, contribuindo para sua proteção contra danos mecânicos e estressores externos (Boesewinkel; Bouman, 1984). De acordo com o teste histoquímico realizado com o reagente lugol, a presença de amido foi pouco expressiva e de difícil visualização. Por esse motivo, as imagens correspondentes não foram apresentadas.



**Figura 4.5** – Histoquímica XP, para detecção de proteínas (A-G). Corte transversal de semente clara de *C. fissilis* (A); Região do endosperma logo abaixo do tegumento em semente clara (B) e maior detalhe (C); Região do cotilédone em semente clara (D); Região do endosperma logo abaixo do tegumento em semente escura (E) e maior detalhe (F); Região do cotilédone em semente escura (G). Histoquímica com Sudan III para lipídios detectados principalmente entre células do endosperma (H). Histoquímica com floroglucina ácida para lignina detectada nos vasos do xilema presentes na extremidade do tegumento (I). Barras: 1000  $\mu\text{m}$  (A); 100  $\mu\text{m}$  (B-I).

### 4.3 Bioquímica das sementes

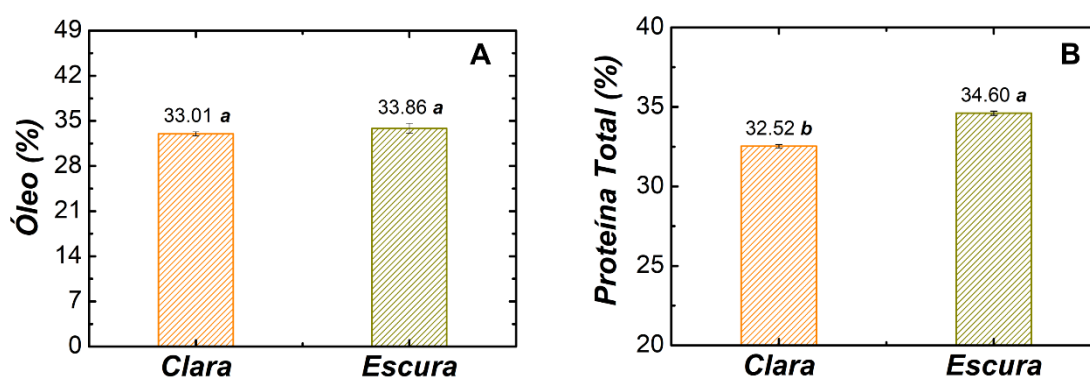
De acordo com os resultados obtidos na análise bioquímica de carboidratos, as sementes claras e escuras de *C. fissilis* apresentaram níveis semelhantes de açúcares solúveis totais, açúcares não redutores e amido (Figuras 4.6A, C e D). No entanto, foi observada diferença significativa no teor de açúcares redutores (Figura 6B).



**Figura 4.6** - Carboidratos em sementes claras e escuras de *C. fissilis*. Açúcares solúveis totais (A); Açúcares redutores (B); Açúcares não redutores (C); Amido (D). Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média.

Na fase final de maturação das sementes, ocorre diminuição dos açúcares redutores e aumento na concentração de açúcares não redutores, como a sacarose e os oligossacarídeos da família da rafinose, que contribuem para a estabilização de membranas e macromoléculas, protegendo as estruturas celulares dos danos causados pela perda de água durante a dessecação nesta fase (Koster; Leopold, 1988; Hoekstra et al., 2001; Groot, 2022). Portanto, os resultados encontrados possivelmente indicam que sementes de coloração clara não completaram o processo de maturação adequadamente. Por outro lado, o acúmulo anormal desses compostos também pode refletir processos de deterioração fisiológica, associados à degradação de polissacarídeos e ao estresse oxidativo celular. Além disso, esses açúcares participam da reação de Amadori, um processo não enzimático que ocorre entre os grupos carbonila dos açúcares redutores e os grupos amino das proteínas, levando à formação de compostos intermediários estáveis, que podem comprometer a integridade das proteínas (Marcos-Filho, 2005). Assim, o maior teor de açúcares redutores observado em sementes de coloração clara pode estar relacionado a um processo de maturação incompleto ou representar um indício precoce de deterioração das sementes.

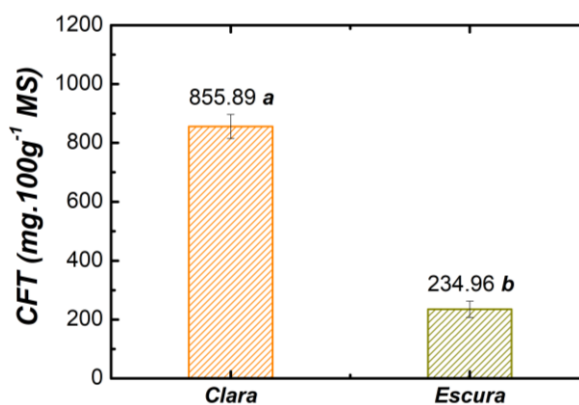
Sementes claras e escuras de *C. fissilis* apresentaram teor de óleo semelhante, com valores médios em torno de 33% (Figura 4.7A). Por outro lado, sementes escuras apresentaram maior teor de proteína total (Figura 4.7B), corroborando o resultado do teste histoquímico para detecção de proteínas. Silva et al. (2020), em um estudo com sementes de *C. fissilis*, observaram que a diminuição do teor de proteína total durante o armazenamento é prejudicial à germinação e ao vigor das sementes dessa espécie. Estudos conduzidos com sementes de grandes culturas, como trigo e milho, demonstraram que o teor de proteína é um determinante fundamental do vigor das plântulas (Ries; Everson, 1973; Wen et al., 2018). Ries e Everson (1973) mostraram que, independentemente do genótipo ou das condições ambientais, sementes com maior teor de proteína produzem mudas mais vigorosas.



**Figura 4.7** – Teor de óleo (A) e teor de proteína total (B) em sementes claras e escuras de *C. fissilis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média.

Maior conteúdo de compostos fenólicos totais foi detectado nas sementes claras (Figura 4.8). Embora uma relação inversa tenha sido relatada em sementes de ervilha (Troszynska; Ciska, 2002; Stanisavljević et al., 2015) e linhaça (Abtahi; Mirlohi, 2024), resultado semelhante foi observado em sementes de cártamo, nas quais as brancas exibiram maior teor de compostos fenólicos em comparação às marrons (Li et al., 2023). Tal resultado pode estar relacionado ao menor grau de polimerização ou oxidação dos compostos fenólicos nas sementes claras, permanecendo em formas solúveis que facilitam sua extração e quantificação. Em contraste, nas sementes escuras, é provável que esses compostos tenham sofrido maior polimerização ou oxidação, formando produtos insolúveis que contribuem para o escurecimento do tegumento. Os compostos fenólicos representam uma classe ampla de metabólitos especializados derivados principalmente da via dos fenilpropanóides e incluem

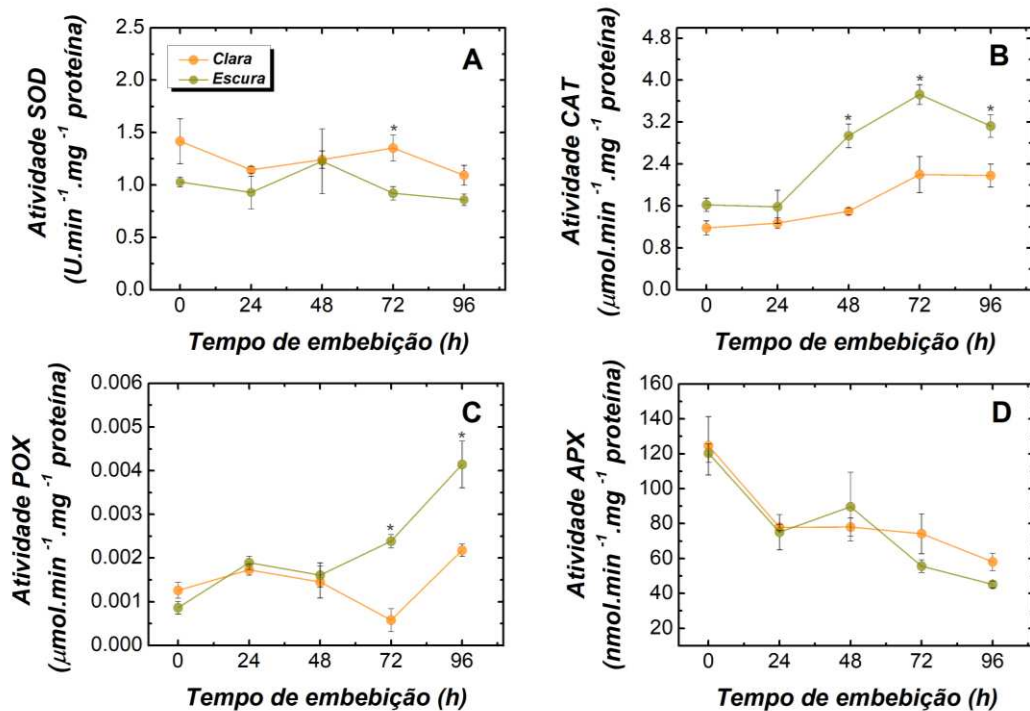
flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos e cumarinas. Nas sementes, os compostos fenólicos localizam-se principalmente no tegumento, cuja coloração é influenciada tanto pela concentração quanto pelo tipo desses compostos (Attree et al., 2015; Corso et al., 2020; Nicolás-García et al., 2021). Em *Arabidopsis thaliana*, por exemplo, flavonoides como os flavonóis e as proantocianidinas (PAs) são os fenólicos mais abundantes, sendo que as PAs, após oxidação, conferem coloração marrom ao tegumento durante a dessecação (Routaboul et al., 2006; Pourcel et al., 2007; Matsuda et al., 2010; Corso et al., 2020). Em sementes de mamão, compostos fenólicos concentram-se principalmente na esclerotesta e, em menor grau, na sarcotesta, estando praticamente ausentes no embrião e no endosperma; sua presença nesses tecidos tem sido associada à inibição da germinação (Tokuhisa et al., 2007). Em sementes de *C. fissilis*, no entanto, a influência dos compostos fenólicos totais na germinação ainda não é totalmente compreendida. Estudos adicionais são necessários para elucidar se as variações no conteúdo e na composição desses metabólitos, associadas à coloração do tegumento da semente, podem afetar a germinação da espécie.



**Figura 4.8** – Compostos Fenólicos Totais (CFT) em sementes claras e escuras de *C. fissilis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média.

A atividade enzimática do sistema antioxidante foi semelhante em sementes claras e escuras no estado seco, e apresentou variações entre os tratamentos a partir do segundo dia de embebição (Figura 7). A superóxido dismutase (SOD) permaneceu relativamente constante, com aumento significativo apenas em sementes claras em 72 h (Figura 7A). A catalase (CAT) apresentou aumento gradual, atingindo níveis mais elevados em sementes escuras após 48 h (Figura 7B). Da mesma forma, a atividade da peroxidase (POX) também aumentou durante a embebição, sendo maior em sementes escuras após 72 h (Figura 7C). Em contraste, a

atividade da ascorbato peroxidase (APX) diminuiu gradualmente, com níveis semelhantes observados em sementes claras e escuras (Figura 7D).



**Figura 4.9-** Atividade específica das enzimas superóxido dismutase - SOD (A), catalase - CAT (B), peroxidase - POX (C) e ascorbato peroxidase - APX (D) em sementes claras e escuras de *C. fissilis* durante o período de germinação. \* Indica diferença estatística pelo teste t de Student ( $P \leq 0,05$ ).  $n = 4$ ; as barras representam o erro padrão da média.

A SOD desempenha um papel fundamental na defesa contra espécies reativas de oxigênio, dismutando o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) em oxigênio ( $O_2$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). No entanto, a destoxificação de  $H_2O_2$ , que é menos reativo, mas tóxico em altas concentrações, requer a ação de outras enzimas, como catalase (CAT), peroxidase (POX) e ascorbato peroxidase (APX) (Das; Roychoudhury, 2014; Taiz et al., 2017). Nesse contexto, os resultados indicam que sementes de coloração clara intensificam a decomposição de  $O_2^{\cdot-}$ , especificamente quando o metabolismo acelera e a produção de ROS aumenta, enquanto sementes de coloração escura mantêm maior eficiência na decomposição subsequente de  $H_2O_2$  por meio da ação de enzimas como CAT e POX. Assim, a menor atividade dessas enzimas em sementes claras após 48 e 72 h, respectivamente, sugere que a conversão de  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$  foi mais pronunciada no pico de embebição (72 horas), sem uma capacidade correspondente de

remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Esse desequilíbrio pode comprometer a homeostase redox e refletir diferenças na tolerância ao estresse oxidativo entre sementes claras e escuras.

A redução da atividade da APX e o aumento da atividade da CAT ao longo da embebição, observados em sementes claras e escuras, sugerem uma preferência por uma via de desintoxicação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em detrimento da outra, ou ainda que as células estejam lidando com concentrações elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As rotas envolvendo APX e CAT atuam de forma concomitante, mas com diferentes eficiências e especificidades: a alta afinidade da APX pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sugere que essa enzima pode ser responsável pela modulação fina de espécies reativas de oxigênio (EROS) para sinalização, enquanto a CAT pode ser responsável pela remoção do excesso de EROS durante o estresse (Mittler, 2002). Embora presente apenas nos peroxissomos, a CAT é indispensável para a desintoxicação de EROS durante o estresse, quando altos níveis dessas espécies são produzidos e difundidos por todos os compartimentos, incluindo os próprios peroxissomos (Willekens et al., 1997; Lopez-Huertas et al., 2000).

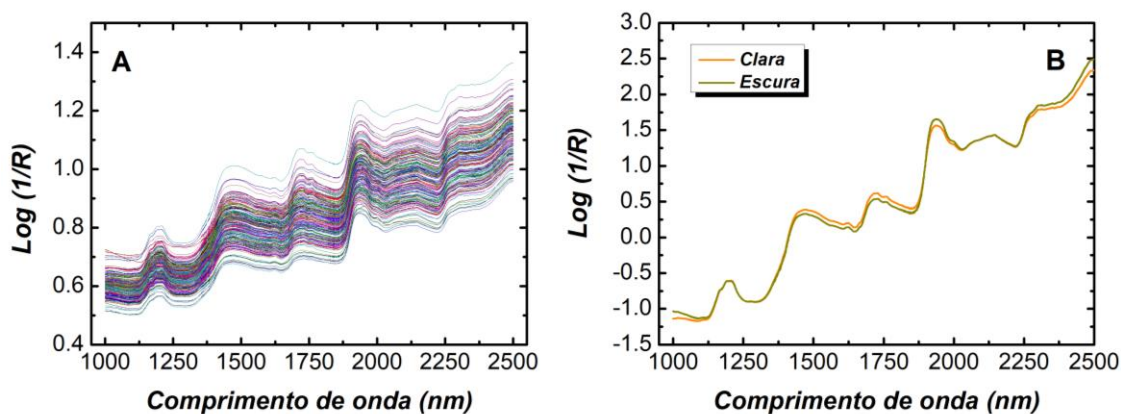
#### 4.4.1 Espectroscopia NIR

Em relação a utilização da radiação infravermelha próxima para caracterização qualitativa das sementes claras e escuras, a Tabela 4.2 apresenta os valores de acurácia e coeficiente kappa obtidos para o modelo PLS-DA testado usando espectros NIR submetidos a diferentes métodos de pré-processamento. Devido à natureza ampla e frequentemente sobreposta das bandas de absorção NIR, o pré-processamento de dados espectrais é uma etapa crítica para aprimorar características relevantes, facilitar o reconhecimento de padrões e melhorar o desempenho do modelo de classificação (Rinnan et al., 2009; Xia et al., 2019).

**Tabela 4.2** - Resultados de acurácia e coeficiente kappa para os conjuntos de dados de treinamento e teste para o modelo de classificação, usando diferentes métodos de pré-processamento, para classificar sementes de cedro-rosa com base na cor.

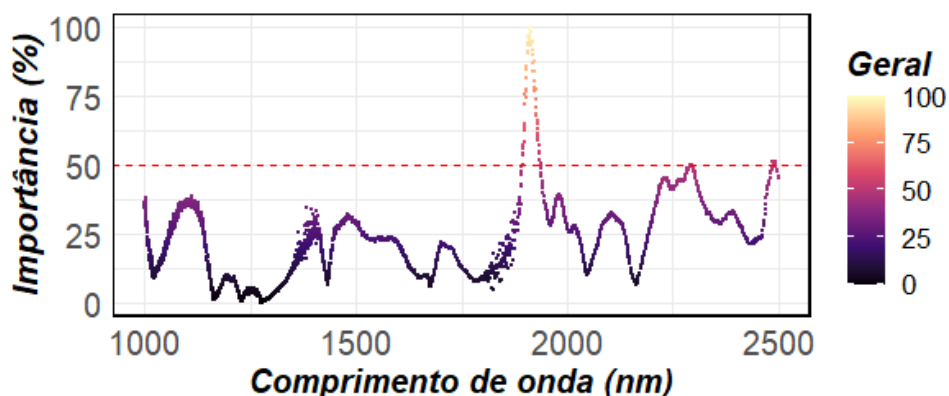
Modelo	Pré-processamento	Treinamento (n = 70)		Teste (n = 30)	
		Accuracia (%)	Coefficiente Kappa (%)	Accuracia (%)	Coefficiente Kappa (%)
PLS-DA	Dados cru	99,29	98,57	98,33	96,67
	MSC	99,28	98,57	1	1
	SNV	98,57	97,14	1	1
	SG (d1)	1	1	1	1
	SG (d2)	1	1	1	1

O classificador PLS-DA demonstrou alta capacidade discriminativa usando dados NIR brutos e pré-processados. O modelo atingiu uma precisão geral de teste inicial de 98,33%, atingindo 1,00 quando dados pré-processados foram utilizados. Uma tendência semelhante foi observada para o coeficiente kappa. De acordo com a escala de interpretação proposta por (Landis; Koch, 1977), os valores kappa indicam concordância quase perfeita (0,80–0,99), confirmando a forte capacidade do modelo de discriminar entre classes de coloração de sementes de cedro-rosa. A Figura 4.10A exibe os 200 espectros NIR brutos de sementes de *C. fissilis* de coloração clara e escura, registrados na faixa espectral de 1.000 a 2.500 nm. A Figura 4.10B mostra os espectros médios após o pré-processamento usando o método da variável normal padrão (SNV), que foi empregado como técnica de pré-processamento para a construção do modelo de calibração.



**Figura 4.10** - Espectros NIR brutos (A), média dos espectros brutos pré-processados usando o método SNV (B).

No presente estudo, o comprimento de onda mais relevante para o modelo foi identificado em torno de 1938 nm (Figura 4.11). Essa região está geralmente associada à presença de água, lignina, nitrogênio, proteínas, amido e celulose (Fourty et al., 1996). Os resultados obtidos para umidade, amido, proteína total e o teste histoquímico para lignina indicam que o teor de proteína total desempenhou um papel importante na diferenciação entre sementes claras e escuras por espectroscopia NIR. De acordo com a histoquímica para proteína, a diferença no teor de proteína estaria principalmente nos tecidos do endosperma.



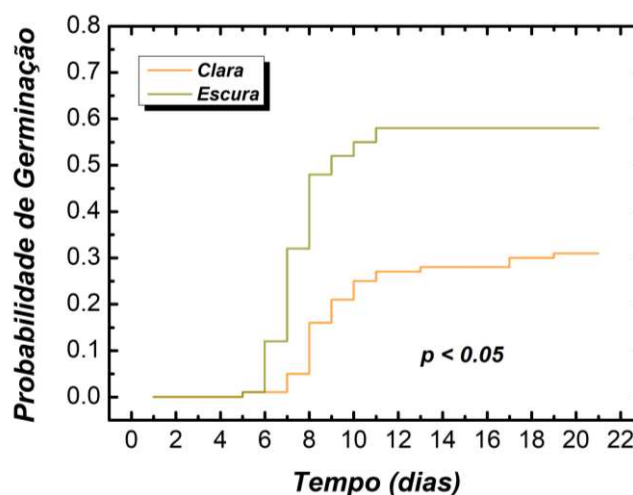
**Figura 4.11** - Importância das variáveis que indicam os principais comprimentos de onda do espectro para o desenvolvimento do modelo PLS-DA (SNV).

A profundidade de penetração da radiação infravermelha próxima em um objeto depende fortemente da composição, estrutura e espessura do tecido, bem como do comprimento de onda da radiação utilizada (Bashkatov et al., 2005). De maneira geral, em tecidos biológicos, a profundidade de penetração da radiação NIR é da ordem de milímetros (Dong et al., 2023; Wedding et al., 2024). Considerando que a espessura do tegumento das sementes de *C. fissilis* analisadas é de cerca de 130  $\mu\text{m}$ , é provável que a radiação NIR atravesse facilmente essa estrutura, atingindo tecidos internos da semente, como o endosperma, onde diferenças foram observadas no conteúdo de corpos proteicos a partir do teste histoquímico realizado com o reagente XP. Um artigo sobre o uso da técnica para avaliação de sementes de *Cedrela fissilis* Vell. com heteromorfismo de cor e sua relação com a qualidade fisiológica foi publicado na revista *Journal of Seed Science* e pode ser consultado no Apêndice B.

#### 4.4 Qualidade fisiológica das sementes

A curva de germinação (Figura 4.12) revelou diferenças significativas no desempenho germinativo entre sementes claras e escuras de *C. fissilis* ( $p < 0,05$ ). Sementes escuras apresentaram uma maior probabilidade acumulada de germinação (em torno de 60%) em comparação às sementes claras (em torno de 30%). Além disso, sementes de ambas as cores iniciaram a germinação por volta do 5º dia após a semeadura; no entanto, a partir do 6º dia, a germinação das sementes escuras foi mais rápida, finalizando o processo de germinação no 11º dia de teste, enquanto a germinação de sementes claras ocorreu de forma mais lenta,

finalizando o processo de germinação no 19º dia de teste, indicando desempenho fisiológico inferior.



**Figura 4.12** – Probabilidade de germinação por dia estimada pelo método de Kaplan-Meier para sementes claras e escuras de *C. fissilis*.

Conforme indicado pela curva de germinação, as sementes escuras apresentaram maior emissão de radícula, de forma mais rápida, uniforme e concentrada no tempo, em comparação às sementes claras, como evidenciado pelos valores superiores de germinabilidade (G), menor tempo médio de germinação (TmG), menor coeficiente de variação do tempo de germinação (CVtg) e maior velocidade média de germinação (TMG) (Tabela 4.3).

**Tabela 4.3** – Emissão de radícula no teste de germinação de sementes claras e escuras de *C. fissilis*. G: germinabilidade (%); TmG: tempo médio de germinação (dias); CVt: coeficiente de variação do tempo de germinação (%); TMG: taxa média de germinação (dia<sup>-1</sup>); I: incerteza (bit); S: sincronia (adimensional).

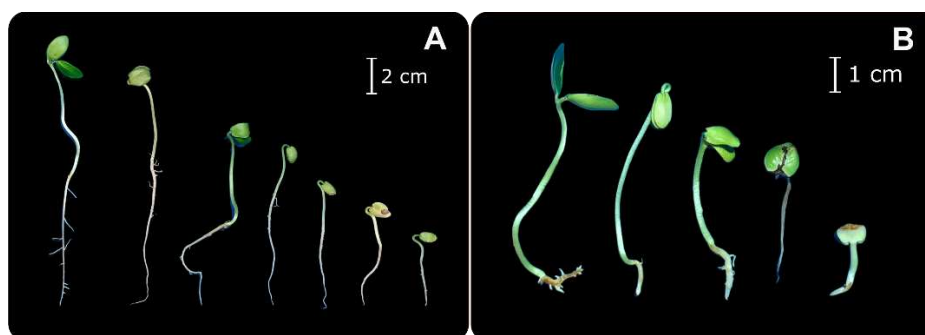
Sementes	G (%)	TmG (dias)	CV <sub>tg</sub> (%)	TMG (dia <sup>-1</sup> )	Incerteza	Sincronia
Claras	31 ± 11,49 b	11,49 ± 1,34 a	24,02 ± 11,56 a	0,09 ± 0,01 b	2,16 ± 0,25 a	0,15 ± 0,02 a
Escuras	58 ± 12,44 a	7,58 ± 0,25 b	18,40 ± 6,84 a	0,13 ± 0,00 a	1,97 ± 0,47 a	0,25 ± 0,10 a

A baixa taxa de germinação apresentada na Tabela 4.3 é consistente com os resultados de estudos anteriores sobre o armazenamento de sementes de *C. fissilis* (Flores et al., 2018; Silva et al., 2020), que indicam que tanto a germinação quanto o vigor das sementes dessa espécie sofrem um declínio significativo ao longo do tempo de armazenamento, com a

viabilidade sendo particularmente comprometida após períodos de armazenamento superiores a 380 dias. Além de apresentarem maior emissão de radícula, as sementes escuras demonstraram maior capacidade de originar plântulas normais, com média de 50%, em contraste com 20% obtido de sementes claras. A velocidade de emergência também foi superior nas sementes escuras, como indicado pelos valores mais elevados do Índice de Velocidade de Emergência (IVE), evidenciando maior vigor no estabelecimento das plântulas (Tabela 4.4). A Figura 4.13A representa as plântulas classificadas como normais, enquanto a Figura 4.13B ilustra aquelas consideradas anormais, conforme os critérios de avaliação.

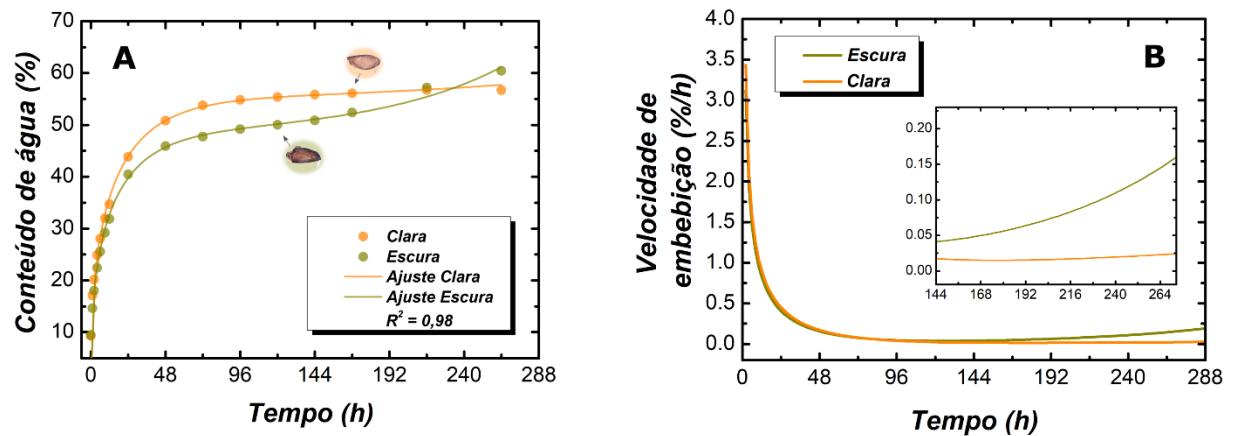
**Tabela 4.4** – Formação de plântulas normais no teste de germinação de sementes claras e escuras de *C. fissilis*.

Sementes	Emiss. radícula (%)	1 <sup>a</sup> cont. (%)	Últ. cont. (%)	IVE
<i>Claras</i>	31 b	12 b	8a	1.24 b
<i>Escuras</i>	58 a	39 a	11a	3.31 a



**Figura 4.13** – Plântulas normais (A) e anormais (B) de *C. fissilis*.

O processo de absorção de água pelas sementes de *C. fissilis* segue o padrão trifásico descrito por Bewley e Black, (1978), conforme ilustrado na Figura 4.14A. Com o ajuste da equação 3.1 aos dados experimentais da curva de embebição foi possível quantificar parâmetros associados a cada fase (Tabela 4.5) que foram usados para obter a taxa de embebição total (Figura 4.14B). De acordo com a curva de embebição, como indicado por  $w$ , ao final da fase I, e início da fase II, as sementes claras atingiram teores de água próximo de 55%, enquanto as sementes escuras alcançaram aproximadamente 48%. A protrusão da radícula ocorreu em 120 horas nas sementes escuras e em 168 horas nas sementes claras, marcando o início da fase III. Com base na diferença entre o momento da protrusão da radícula e o início da saturação da fase I ( $t_{III} - t_{II}$ ), foi possível determinar a duração da fase II, que foi de 48 horas para sementes escuras e 96 horas para sementes claras.



**Figura 4.14** – A) Curva de embebição de sementes claras e escuras de *C. fissilis* ajustadas. As setas indicam o momento em que o início da protrusão da radícula foi observado, quando uma semente havia emitido radícula. B) Taxa de embebição total de sementes claras e escuras de *C. fissilis*.

**Tabela 4.5** – Parâmetros do modelo ajustado para a curva de embebição de sementes claras e escuras de *C. fissilis*.  $w$ : grau máximo de absorção na fase I e II;  $k$ : taxa inicial de embebição;  $n$ : suavização da transição para a fase II;  $t_{II}$ : início da fase II;  $t_{III}$ : início da fase III;  $l$ : taxa de embebição da fase III.

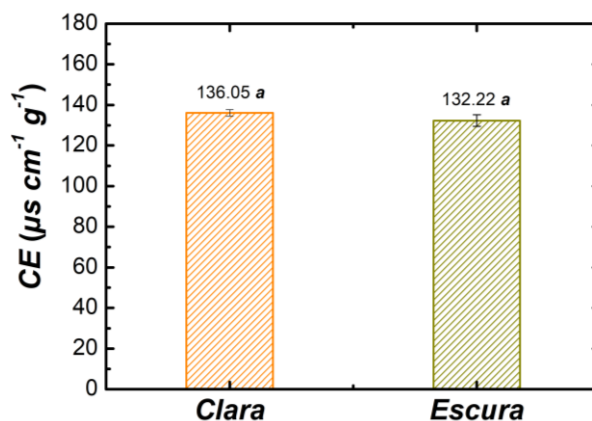
Semente	$w$ (%)	$t_{II}$ (h)	$t_{III}$ (h)	$k$ (absorção/h)	$l$ (absorção/h)	$n$
<i>Clara</i>	54,6	72	168	0,031	0,007	0,37
<i>Escura</i>	48,5	72	120	0,032	0,012	0,37

Considerando que a fase II é caracterizada por intensa atividade metabólica, as diferenças observadas no teor de água atingido e no tempo necessário para a protrusão da radícula entre sementes claras e escuras sugerem variações nos processos fisiológicos entre esses grupos. Sementes menos maduras ou deterioradas podem apresentar maior capacidade de absorção de água; no entanto, sua baixa eficiência metabólica pode comprometer a retomada das atividades celulares necessárias à protrusão da radícula, resultando em maior acúmulo de água sem progressão do processo germinativo (Bewley; Black, 1994). Em contrapartida, sementes mais maduras tendem a apresentar maior eficiência na reativação dos processos metabólicos e nos mecanismos de reparo celular essenciais à germinação, o que contribui para uma fase II mais curta (Bewley; Black, 1994; Marcos-Filho, 2005; Nonogaki et al., 2010). Assim, a maior duração da Fase II observada nas sementes claras pode estar

associada a uma menor eficiência dos processos metabólicos, notadamente da atividade das enzimas do sistema antioxidativo, conforme indicado pelos menores níveis de atividade enzimática da catalase e peroxidase encontrados na análise bioquímica, sobretudo a partir de 72 horas de embebição (início da fase II), quando ocorre a intensificação do metabolismo celular. Esses resultados reforçam a influência do grau de maturação e do vigor sobre a dinâmica da germinação.

Em relação à velocidade de embebição, o gráfico B da figura 4.15 apresenta a velocidade de embebição total. Logo nas primeiras horas (até cerca de 24 h), ambas as sementes apresentam alta velocidade de embebição, atingindo valores próximos de 3,5%/h. As curvas das sementes claras e escuras são bastante semelhantes nesse estágio, indicando que a permeabilidade inicial do tegumento é comparável, o que está de acordo com observações anatômicas que mostram espessuras semelhantes do tegumento. Entre aproximadamente 24 e 144 horas, observa-se uma redução acentuada na velocidade de embebição, que se mantém quase constante e próxima de zero. A semelhança das curvas nessa etapa sugere que, até esse ponto, as duas classes de sementes seguem padrões de hidratação semelhantes. O destaque do gráfico está no detalhe ampliado (inset), que mostra o comportamento a partir de 144 horas referente a fase III, em que sementes escuras apresentaram uma maior taxa de absorção de água, possivelmente em decorrência da redução do potencial hídrico das sementes após a fase II e do maior número de sementes germinadas entre 120 horas e o final do experimento, em comparação às sementes claras. Logo, as sementes claras, embora hidratem de forma semelhante às sementes escuras na fase I, mantêm-se metabolicamente menos ativas nas fases II e III, o que pode refletir menor eficiência enzimática e consequente atraso na germinação.

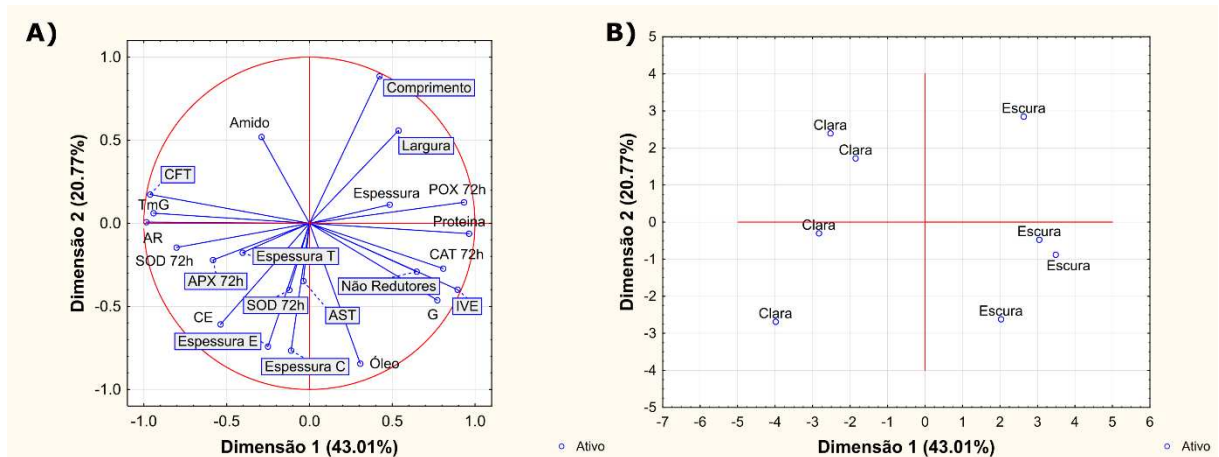
O teste de condutividade elétrica, reconhecido por sua eficiência na avaliação da capacidade de reorganização das membranas celulares, não revelou diferenças significativas entre sementes claras e escuras de *C. fissilis*, com valores médios em torno de  $130 \mu\text{S cm}^{-1} \text{g}^{-1}$  (Figura 4.15). Em estudos anteriores com a mesma espécie, Corvello et al. (1999) e Cherobini et al. (2008) usando o teste de condutividade elétrica, observaram que este foi eficiente para detectar diferenças na qualidade fisiológica entre lotes de sementes. No entanto, Flores et al. (2018) observaram que, comparado ao índice de velocidade de germinação, o teste de condutividade elétrica foi menos eficaz em indicar a perda da qualidade das sementes de *C. fissilis*.



**Figura 4.15** – Teste de condutividade elétrica de sementes claras e escuras de *C. fissilis*. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste t de Student a 5% de probabilidade. As barras representam o erro padrão da média.

#### 4.5 Análise de componentes principais (ACP)

A Figura 4.16 apresenta o resultado da Análise de Componentes Principais (ACP). Na Figura 4.16A, observa-se o círculo de correlação das variáveis originais e as respectivas pontuações nos dois primeiros componentes principais. Já a Figura 4.16B mostra o agrupamento dos tratamentos com base nas variâncias explicadas pelos componentes, evidenciando as relações entre os grupos e as variáveis analisadas. De acordo com a ACP, as variáveis que mais contribuíram para a discriminação de sementes claras e escuras foram o teor de açúcares redutores (AR), o teor de compostos fenólicos totais (CFT), comprimento da semente, o índice de velocidade de emergência (IVE), teor de proteína total, a atividade enzimática da peroxidase (POX) e catalase (CAT) e germinação (G).



**Figura 4.16** - Análise de componentes principais (ACP) baseada em variáveis físicas, anatômicas, bioquímicas e fisiológicas de sementes claras e escuras de *C. fissilis*. A) Círculo de correlação das variáveis originais; quanto mais próximo do círculo unitário, maior a importância da variável. B) Diagrama de ordenação.

Os dois primeiros componentes explicaram 63,78% da variabilidade total dos dados, sendo 43,01% no componente 1 e 20,77% no componente 2. No gráfico 4.16B, observa-se clara separação entre as sementes claras e escuras ao longo do componente 1, indicando que as variáveis associadas a esse componente foram determinantes para distinguir os tratamentos. As sementes escuras concentraram-se no lado positivo do eixo do componente 1, enquanto as claras ficaram no lado negativo, evidenciando diferenças entre os grupos. No gráfico 4.16A, o vetor correspondente à germinação (G) está fortemente associado, no mesmo quadrante, a IVE, CAT72h, teor de proteína total e óleo, indicando correlação positiva entre esses parâmetros.

Também foi realizado a análise de correlação multivariada entre a atividade enzimática e a probabilidade de germinação. Esse resultado corrobora a importância da enzima catalase no processo de germinação de sementes de cedro-rosa, o qual é apresentado no Apêndice A.

#### 4.6 Considerações finais

De maneira geral, as diferenças observadas entre sementes claras e escuras de *C. fissilis* sugerem a influência de diferentes estádios de maturação, bem como possíveis efeitos de deterioração resultantes do armazenamento. Sementes escuras exibiram maior comprimento, espessura, massa, maior teor de proteína total e maior atividade das enzimas

CAT e POX. Elas também demonstraram maior vigor, conforme indicado pela maior taxa de emergência da radícula, maior número de plântulas normais e maior índice de velocidade de germinação. Esses resultados são consistentes com sementes que atingiram a maturidade fisiológica, que é caracterizada por maior massa seca, maior acúmulo de reservas e maior potencial de germinação e vigor (Rubio et al., 2013; Brito et al., 2015; Groot, 2022). Em contraste, sementes de coloração clara apresentaram menor desempenho germinativo, menor teor de proteína total e maiores níveis de açúcares redutores, o que pode indicar maturação incompleta ou sinais precoces de deterioração. Assim, a cor do tegumento está associada ao estado fisiológico das sementes e pode ser utilizada como critério prático para seleção de sementes de qualidade superior. No entanto, é importante considerar o tempo de armazenamento, de aproximadamente um ano, e a variabilidade genética na interpretação dos resultados, uma vez que sementes recém-colhidas podem apresentar comportamento fisiológico diferente das sementes armazenadas, e a diversidade genética pode influenciar o grau de heteromorfismo, refletindo variações nos parâmetros fisiológicos. Além disso, o heteromorfismo observado nas sementes de *C. fissilis* pode contribuir para a formação de um banco de sementes, considerando que sementes escuras apresentaram maior longevidade, o que pode ter implicações importantes na dinâmica de germinação e sucessão de plantas.

## 5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que a qualidade fisiológica de sementes de *C. fissilis* varia de acordo com a coloração, sendo distinta entre sementes claras e escuras. Embora não tenham sido observadas diferenças anatômicas entre os tratamentos, sementes escuras exibiram maior comprimento, espessura, massa, maior teor de proteína total e maior atividade das enzimas catalase (CAT) e peroxidase (POX). A análise de componentes principais evidenciou que o melhor desempenho germinativo das sementes escuras de cedro-rosa está associado principalmente à maior atividade da enzima CAT e ao maior teor proteico, reforçando a influência desses fatores bioquímicos na qualidade fisiológica das sementes. Assim, a coloração das sementes pode ser considerada um biomarcador eficiente da qualidade fisiológica, representando um critério prático para a seleção de sementes de maior qualidade. O heteromorfismo observado nas sementes de *C. fissilis* também pode contribuir para a formação de um banco de sementes, considerando que sementes escuras apresentaram maior longevidade, podendo ter implicações importantes na dinâmica de germinação e sucessão de plantas. Além disso, a espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) demonstrou alta

precisão na distinção entre sementes claras e escuras, configurando-se como uma ferramenta promissora para o monitoramento da maturação e do estado de conservação fisiológica pós-colheita das sementes de *C. fissilis*, contribuindo para o avanço de estratégias não destrutivas de avaliação da qualidade de sementes florestais.

## APÊNDICE A – Análise de correlação multivariada

A relação entre a atividade das enzimas do sistema antioxidativo e a probabilidade de germinação das sementes durante o processo de embebição foi analisada por meio da correlação de Pearson. As enzimas que apresentaram correlação significativa com a germinação foram utilizadas como variáveis preditoras na modelagem. Para isso, foram ajustados Modelos Lineares Generalizados (MLG), assumindo distribuição binomial e função de ligação do tipo logit, conforme a equação geral apresentada a seguir:

$$\log \frac{p}{p-1} = \beta_0 + \beta_1 \times CAT + \beta_2 \times APX + \dots, \quad (A.1)$$

onde  $p$  representa a probabilidade de germinação e os coeficientes  $\beta$  indicam a contribuição de cada variável preditora para essa probabilidade.

O modelo foi testado com diversas combinações, e a escolha final foi baseada no menor valor do Critério de Informação de Akaike (AIC, do inglês Akaike Information Criterion), uma medida usada para comparar modelos estatísticos e selecionar aquele que melhor se ajusta aos dados com a menor complexidade, sendo que quanto menor o AIC melhor é o modelo em termos de ajuste e simplicidade (Fox, 2005; Fox, 2016; Fox e Bouchet-Valat, 2024; Lira et al., 2019).

Entre as enzimas avaliadas, a catalase foi a que teve sua atividade mais associada ao processo germinativo (Tabela A.1).

**Tabela A.1** – Correlação de Pearson entre a probabilidade de germinação e a atividade das enzimas do sistema antioxidativo de sementes de *C. fissilis*.

Variável	Coefficiente de correlação de Pearson (r)	p-valor
CAT × PG	0.82	< 0,0001
POX × PG	0.54	0,0003
APX × PG	-0.56	0,0002

De acordo com o Critério de Informação de Akaike (AIC; Tabela 4.3), o melhor modelo linear generalizado foi o GLM.1, em que a atividade da catalase (CAT) foi a variável preditora. Esse modelo é descrito pela equação:

$$\text{logit}(P(\text{germinação})) = -3,316 + 1,045 \times \text{CAT}, \quad (\text{A. 2})$$

O modelo foi estatisticamente significativo ( $p = 0,016$  para o coeficiente de CAT), com AIC igual a 31,99. O valor da odds ratio para a CAT foi de 2,84, indicando que, a cada unidade de aumento na atividade de catalase, a chance de germinação aumenta aproximadamente 2,84 vezes. Modelos mais complexos que incluíram as variáveis APX ou POX juntamente com CAT não resultaram em melhoria significativa do ajuste (valores de AIC maiores) ou apresentaram coeficientes não significativos ( $p > 0,05$ ). Esses resultados indicam que a atividade de catalase, isoladamente, constitui um preditor robusto da germinação.

**Tabela A.2** - Parâmetros das variáveis explicativas que influenciam a probabilidade de germinação de sementes de cedro-rosa.

Modelo	Variável	$\beta$	SE $\beta$	p-valor	AIC
GLM.1	Intercepto	-3.3161	1.1179	0.003**	31.998
	CAT	1.0452	0.4343	0.0161*	
GLM.2	Intercepto	-1.8955	2.1729	0.383	35.996
	CAT	0.8724	0.4903	0.0752	
	APX	-0.0141	0.018	0.4329	
	POX	20.6687	421.8734	0.9609	
GLM.3	Intercepto	-1.8443	1.9068	0.3334	34.097
	CAT	0.88	0.4648	0.0583	
	APX	-0.0145	0.0161	0.3675	
GLM.4	Intercepto	-3.4203	1.1379	0.0027**	33.099
	CAT	0.9419	0.4813	0.0504	
	POX	180.566	377.7579	0.6327	
GLM.5	Intercepto	0.0605	1.9203	0.975	45.704
	POX	286.7081	408.6301	0.483	
	APX	-0.0205	0.0187	0.273	
GLM.6	Intercepto	-1.9849	0.7831	0.0113*	43.779
	POX	557.1515	353.5499	0.1151	
GLM.7	Intercepto	1.148	1.2143	0.3445	46.889
	APX	-0.0278	0.0166	0.0936	

## APÊNDICE B – Artigo produzido a partir desse trabalho



**Journal of  
Seed Science**

ISSN 2317-1545  
www.abrates.org.br/revista

ARTICLE

### Evaluation of *Cedrela fissilis* Vell. seeds with color heteromorphism using near-infrared spectroscopy and their relationship with physiological quality

J. Seed Sci., 47: e202547022, 2025

<http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v47297619>



Karoline Geralda Mendes<sup>1\*</sup>, Laércio Junio da Silva<sup>2</sup>, Edgard Augusto de Toledo Picoli<sup>3</sup>, Vinícius Pinto Aguiar<sup>1</sup>, Lausanne Soraya de Almeida<sup>1</sup>, Jean Marcel Sousa Lira<sup>1</sup>

**ABSTRACT:** *Cedrela fissilis* Vell., commonly known as cedro-rosa, is a tree species native to Brazil, with ecological and economic relevance, that exhibits seed heteromorphism associated with seed coat color. In this study, the classification of light- and dark-colored seeds using near-infrared (NIR) spectroscopy and its relationship with physiological quality was evaluated. NIR spectra were obtained, reserve compounds were quantified, and germination and vigor tests were conducted. The NIR spectra, collected from individual seeds, were preprocessed and used to develop classification models based on the Partial Least Squares - Discriminant Analysis (PLS-DA) method. The physiological and biochemical composition data were analyzed using Student's t-test. Dark seeds showed higher thousand-seed weight, total protein content, as well as greater germination and vigor. Light seeds exhibited higher levels of reducing sugars, suggesting a lower degree of maturity or the onset of deterioration. NIR spectroscopy demonstrated high accuracy in distinguishing between light and dark seeds, especially in the spectral band near 1938 nm, whose relevance may be mainly associated with variations in total protein content. Seed coat color proved to be a reliable indicator of the physiological quality of *C. fissilis* seeds.

**Index terms:** *Cedro-rosa*, chemometrics, NIR spectroscopy, seed germination and vigor.

**RESUMO:** *Cedrela fissilis* Vell., conhecida como cedro-rosa, é uma espécie arbórea nativa do Brasil, de relevância ecológica e econômica, que apresenta heteromorfismo de sementes associado à cor do tegumento. Neste estudo, uma classificação de sementes claras e escuras por meio da espectroscopia no infravermelho próximo (NIR) e sua relação com a qualidade fisiológica foi avaliada. Foram obtidos espectros NIR, quantificados os compostos de reserva e realizados testes de germinação e vigor. Os espectros NIR, obtidos de sementes individuais, foram pré-processados e utilizados para modelagem com base no método da Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA). Os dados de qualidade fisiológica e composição bioquímica foram analisados pelo teste t de Student. Sementes escuras apresentaram maior peso de mil sementes, teor de proteína total, além de maior potencial de germinação e vigor. Sementes claras apresentaram conteúdo mais elevado de açúcares redutores, sugerindo menor grau de maturidade ou início de deterioração. A espectroscopia NIR mostrou alta precisão na distinção entre sementes claras e escuras, especialmente na região espectral próxima de 1938 nm, cuja relevância pode estar associada às variações no teor de proteína total. A coloração demonstrou ser um bom indicativo da qualidade fisiológica em sementes de *C. fissilis*.

**Termos para indexação:** Cedro-rosa, quimiometria, espectroscopia NIR, germinação e vigor de sementes.

\*Corresponding author  
karoline.mendes@ufv.br

Editor: Wilson Vicente Souza Pereira

Received: 06/06/2025.  
Accepted: 08/18/2025.

<sup>1</sup> Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Engenharia  
Florestal, 36570-900,  
Viçosa, MG, Brasil.

<sup>2</sup> Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Agronomia,  
36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Biologia Vegetal,  
36570-900, Viçosa, MG, Brasil.

J. Seed Sci., v.47, e202547022, 2025

MENDES et al., 2025. Doi: <https://doi.org/10.1590/2317-1545v47297619>

## REFERÊNCIAS

- ABTAHI, M.; MIRLOHI, A. Quality assessment of flax advanced breeding lines varying in seed coat color and their potential use in the food and industrial applications. *BMC Plant Biology*, v. 24, n. 1, p. 1–17, 2024. <https://doi.org/10.1186/s12870-024-04733-1>
- AGELET, L.E; HURBURGH, C.R. Limitations and current applications of Near Infrared Spectroscopy for single seed analysis. *Talanta*, v. 121, p. 288–299, 2014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.12.038>
- AHMED, S.; SHAH, P.; AHMED, O. Biochemistry, Lipids. *StatPearls*, 2023.
- ALBALASMEH, A.A.; BERHE, A.A.; GHEZZEHEI, T.A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. *Carbohydrate Polymers*, v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>
- ALVES, M.M.; ALVES, E.U.; BRUNO, R.L. A.; SILVA, K.R.G.; BARROZO, L.M.; SANTOS-MOURA, S.S.; CARDOSO, E.A. Germinação e vigor de sementes de *Clitoria fairchildiana* Howard (fabaceae) em função da coloração do tegumento e temperaturas. *Bioscience Journal*, v. 29, n. 1, p. 216–223, 2013.
- ANDERSON, M.D.; PRASAD, T.K.; STEWART, C.R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotyls of maize seedlings. *Plant Physiology*, v. 109, n. 4, p. 1247–1257, 1995. <https://doi.org/10.1104/pp.109.4.1247>
- ARAUJO, R.F., ABUD, H.F., MARIA, C., PINTO, F., FONTES, E., AUGUSTO, C., LEAL, M. Curva de embebição de sementes de pimentas biquinho e malagueta sob diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, v. 8, p. 51-56, 2018.
- A.O.A.C. **Official Methods of Analysis**. [S. l.: s. n.], 1984. Disponível em: <https://www.scirp.org/reference/referencespapers?referenceid=1515298>. Acesso em: 17 maio 2025.
- ATTREE, R.; DU, B.; XU, B. Distribution of phenolic compounds in seed coat and cotyledon, and their contribution to antioxidant capacities of red and black seed coat peanuts

(*Arachis hypogaea* L.). *Industrial Crops and Products*, v. 67, p. 448–456, 2015.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.01.080>

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, v. 14, n. 2, p. 93–107, 2004. <https://doi.org/10.1079/SSR2004159>

BAILLY, C.; EL-MAAROUF-BOUTEAU, H.; CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *Comptes Rendus - Biologies*, v. 331, n. 10, p. 806–814, 2008.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2008.07.022>

BARREIROS, A.L.B.S.; BARREIROS, M. L. *Carboidratos Experimental Meta*, 2012.

BASHKATOV, A.N.; GENINA, E.A.; KOCHUBEY, V.I.; TUCHIN, V.V. Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm. *Journal of Physics D: Applied Physics*, v. 38, n. 15, p. 2543–2555, 2005.  
<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0022-3727/38/15/004>

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 44, n. 1, p. 276–287, 1971.  
[http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. Volume 2: Viability, Dormancy, and Environmental Control*. 1982.

BEWLEY, J.D.; BLACK, M. *SEEDS Physiology of Development and Germination*. 2nd ed, 1994.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Springered, 2013.

BFG. Growing knowledge: An overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguesia*, v. 66, n. 4, p. 1085–1113, 2015.

BOECKX, J.; HERTOOG, M.; GEERAERD, A.; NICOLAI, B. Kinetic modelling: An integrated approach to analyze enzyme activity assays. *Plant Methods*, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2017.

BORGES, E.E.I.; RENA, A.B. Germinação de sementes. In Aguiar, I.B., Pina-Rodrigues, F.C.M. and Figliolia, M.B., Eds., Sementes Florestais Tropicais. *In*: Brasília: 1993. p. 83–136.

BORGES, R.; BOFF, M.I.C.; MANTOVANI, A.; BISCARO-BORGES, C.; BLASSIOLI-MORAES, M. C. Effect of canopy cover on development of cedar (*Cedrela fissilis*) and aspects of damage caused by *Hypsipyla grandella* in agroforestry system. *Ciencia Florestal*, v. 29, n. 3, p. 1324–1332, 2019. <https://doi.org/10.5902/1980509834378>

BOUMAN, F.D.; BOESEWINKEL, F. *Embryology of Angiosperms*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1984.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRASIL. Regras para Análise de Sementes. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2009.

BRASIL. Instruções para análise de sementes de espécies florestais. Brasília, DF: MAPA/ACS, 2013.

BRITO, C.D.; LOUREIRO, M.B.; SOUZA JUNIOR, A.P.; FERNANDEZ, L.G. CASTRO, R.D. Morphophysiological profile of *Jatropha curcas* L. fruits and seeds maturation. *Semina: Ciências Agrárias*, v.36, n.6, p. 3615–3628, 2015. <https://ojs.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/18661/17443>

BRUM, A.A.S.; ARRUDA, L.F.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 849–854, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000400005>

BUCHANAN, B.B., GRUISSEM, W.; JONES, R. L. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2015.

CAKMAK, T.; ATICI, O.; AGAR, G.; SUNAR, S. Natural aging-related biochemical changes in alfalfa (*Medicago Sativa* L.) seeds stored for 42 years. *International Research Journal of Plant Science*, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2010.

CARVALHO, P. E. R. Cedro. *Circular Técnica - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária*, n. 113, p. 17, 2005.

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas Brasileiras. In: *Cedrela fissilis*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, v. 1, p. 1–13, 2003.

CARVALHO, L. R. DE; SILVA, E. A. A. DA; DAVIDE, A. C. Classificação fisiológica de sementes florestais quanto à tolerância à dessecação e ao comportamento no armazenamento. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 28, n. 2, p. 15–25, 2006.

CARVALHO, L.R.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A. C. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de espécies florestais de Lauraceae. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 31, n. 4, p. 57–66, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222009000400007>

CARVALHO, M.L.M.; SILVA, C.D.; OLIVEIRA, L.M.; SILVA, D.G.; CALDEIRA, C. M. Teste de raios x na avaliação da qualidade de sementes de abóbora. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 31, n. 2, p. 221–227, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222009000200026>

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. Campinas, 1983.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. *Sementes: ciência, tecnologia e produção*. Jaboticabal: FUNEP, 2000.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. *Sementes Ciência, tecnologia e produção*. FUNEP. Jaboticabal, 2012.

CHANCE, B.; MAEHLY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. *Methods in Enzymology*, v. 2, n. C, p. 764–775, 1955.

CHEROBINI, E.A.I.; MUNIZ, M.F.B.; BLUME, E. Avaliação da qualidade de sementes e mudas de cedro. *Ciência Florestal*, v. 74, n. 15, p. 1795–1799, 2008. <https://doi.org/10.5902/19805098511>

CHOI, Y.H.; HONG, C.K.; PARK, G.Y.; KIM, C.K.; KIM, J.H.; JUNG, K.; KWON, J. A nondestructive approach for discrimination of the origin of sesame seeds using ED-XRF and NIR spectrometry with chemometrics. *Food Science and Biotechnology*, v. 25, n. 2, p. 433–438, 2016. <http://link.springer.com/10.1007/s10068-016-0059-x>

CORSO, M.; PERREAU, F.; MOUILLE, G.; LEPINIEC, L. Specialized phenolic compounds in seeds: structures, functions, and regulations. *Plant Science*, v. 296, p. 110471, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2020.110471>

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; PONTES, C.A.; LEITE, I.T.A.; VENTRELLA, M.C.; MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinoideae). *Revista Arvore*, v. 30, n. 6, p. 941–949, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622006000600009>

CORVELLO, W.B.V.; AMARAL VILLELA, F.A.; NEDEL, J. L.; P. S. T. Maturação fisiológica de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 21, p. 23–27, 1999.

COSIMO, A.C., HALLER, C. *UV / VIS Spectrophotometry*. 2025.

COSMO, N.L.; GOGOSZ, A.M.; REGO, S.S.; NOGUEIRA, A.C.; KUNIYOSHI, Y. S. Morfologia de fruto, semente e plântula, e germinação de sementes de *Myrceugenia euosma* (O. Berg) D. Legrand (Myrtaceae). *Floresta*, v. 47, n. 4, p. 479–488, 2017. DOI: 10.5380/rf.v47i4.46933

COSTA, R.S.; OLIVEIRA, I.V.M.; MÔRO, F.V.; MARTINS, A. B. G. Aspectos morfológicos e influência do tamanho da semente na germinação do jambo-vermelho. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 28, n. 1, p. 117–120, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452006000100032>

CRUZ, M.S.F.V.; MALAVASI, M.M.; RISTAU, A.C.P.; MALAVASI, U.C.; DRANSKI, J. A. L. Maturidade de sementes de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Ciência Florestal*, v. 31, n. 1, p. 515–532, 2021. <https://doi.org/10.5902/1980509835444>

DALANHOL, S.J.; REZENDE, E.H.; ABREU, D.C.A.; NOGUEIRA, A.C. Teste de condutividade elétrica em sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. *Floresta e Ambiente*, v. 21, p. 69-77, 2014.

<https://www.scielo.br/j/floram/a/dzWG8rjZk65YTkmRm6BjRzd/?format=pdf>

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, v. 2, p. 1–13, 2014. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2014.00053>

DEL LONGO, O.T.; GONZALEZ, C.A.; PASTORI, G.M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defences under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. *Plant and Cell Physiology*, v. 34, n. 7, p. 1023–1028, 1993. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a078515>

DELOUCHE, J.; BASKIN, C. C. Accelerated Aging Techniques for Predicting the Relative Storability of Seed Lots. *Seed Science Technology Journal*, v. 1, p. 427–452, 1973.

DELOUCHEL, J.C. Physiological Seed Quality. *Scholars Junction*, p. 51–59, 1985.

DHANOVA, M.S.; LISTER, S.J.; SANDERSON, R.; BARNES, R. J. The Link between Multiplicative Scatter Correction (MSC) and Standard Normal Variate (SNV) Transformations of NIR Spectra. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 2, n. 1, p. 43–47, 1994.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J.C.B. Recomposição de matas ciliares. IF Ser. Reg., São Paulo, n. 4, p. 1-14, 1990.

DONG, Y.; DU, G.; JIANG, L.; SHAN, Y.; LI, P. A new method for evaluating the penetration ability of near infrared diffuse reflectance light to fruit peel with chemometrics. *Vibrational Spectroscopy*, v. 129, n. September, p. 103599, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2023.103599>

DUARTE, J.A.P.; DIONISIO, L.F.S.; FURTADO, G.N.; SILVA, E.S. Influência da heteromorfia de sementes na morfometria, germinação, vigor e caracterização morfológica de plântulas de *Parahancornia fasciculata* (Poir) Benoist – ‘Amapá Amargoso’. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2021. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11985>

ESPITIA-CAMACHO, M.; TATIS, H. A.; AYALA, C. C. Morphological characteristics and seed viability of *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake. *Revista U.D.C.A Actualidad and Divulgacion Científica*, v. 23, n. 1, p. 1–9, 2020. <https://doi.org/10.31910/rudca.v23.n1.2020.1530>

FERRAZ, D.K., ARTES, R., MANTOVANI, W. E MAGALHÃES, L.M. Fenologia de árvores em fragmento de mata em São Paulo, SP. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, n. 2, p. 305–317, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0034-71081999000200013>

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.PL.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. *Química Nova*, v. 22, n. 5, p. 724–731, 1999. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421999000500016>

FINCH-SAVAGE, W.E.; ROWSE, H.R.; DENT, K.C. Development of combined imbibition and hydrothermal threshold models to simulate maize (*Zea mays*) and chickpea (*Cicer arietinum*) seed germination in variable environments. *New Phytologist*, v, 165, p. 825–838, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01272.x>

FLORES, A.V.; ATAÍDE, G.M; CASTRO, V.O.; BORGES, E.E.L. E; PEREIRA, R. M. D. Physiological and biochemical alterations on the storage of *Cedrela fissilis* Vellozo seeds. *Floresta*, v. 48, n. 1, p. 133–142, 2018. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.01309>

FLORES, T.B.; SOUZA, V.C.; COELHO, R.L.G. Flora do Espírito santo: Meliaceae. *Rodriguesia*, v. 68, n. 5, p. 1693–1723, 2017. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768512>

FOURTY, Th.; BARET, F.; JACQUEMOUD, S.; SCHMUCK, G.; VERDEBOUT, J. Leaf optical properties with explicit description of its biochemical composition: Direct and inverse problems. *Remote Sensing of Environment*, v. 56, n. 2, p. 104–117, 1996. [https://doi.org/10.1016/0034-4257\(95\)00234-0](https://doi.org/10.1016/0034-4257(95)00234-0)

FOX, J. Using the R Commander: A Point-and-Click Interface for R. *Journal of Statistical Software*, v. 75, n. Book Review 3, p. 1–4, 2016.

FOX, J., BOUCHET-VALAT, M. *Rcmdr: R Commander*.

FU, L.; XU, B.; XU, X.; QIN, X.; GAN, R.; LI, H. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules*, v. 15, n. 12, p. 8602–8617, 2010. <https://doi.org/10.3390/molecules15128602>

GEHAN, E. A. A generalized Wilcoxon test for comparing arbitrarily singly-censored samples. *Biometrika*, v. 52, p. 203–223, 1965. <https://doi.org/10.2307/2333825>

GILL, S.S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 48, n. 12, p. 909–930, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.08.016>

GOMES, M.P.; GARCIA, Q.S. Reactive oxygen species and seed germination. *Biologia*, v. 68, n. 3, p. 351–357, 2013. <https://doi.org/10.2478/s11756-013-0161-y>

GOMES, K.B.P.; MARTINS, R.C.C.; MARTINS, I.S.; JUNIOR, F.G.G. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Terminalia argentea* (Combretaceae) pelo teste de raios X. *Revista Ciência Agronômica*, v. 45, n. 4, p. 752–759, 2014. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000400013>

GOMES-JUNIOR, F. G. Aplicação da análise de imagens para avaliação da morfologia interna de sementes. *Informativo Abrates*, v. 20, n. January 2010, p. 33–51, 2010.

GONÇALVES, C.; Rodriguez-Jasso, R.M.; GOMES, N.; TEIXEIRA, J.A.; BELO, I. Adaptation of dinitrosalicylic acid method to microtiter plates. *Analytical Methods*, v. 2, n. 12, p. 2046–2048, 2010. <https://doi.org/10.1039/C0AY00525H>

GOVINDARAJ, P.M.; MASILAMANI, V.; ALBERT, A.; BHASKARAN, M. Role of antioxidant in seed quality- A review. *Agricultural Reviews*, v. 38, n. 03, 2017. DOI:10.18805/ag.v38i03.8977

GROOT, S.P.C. Seed maturation and its practical implications. *Seed Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 141–151, 2022. <https://doi.org/10.15258/sst.2022.50.1.s.08>

GUNN, C. R. Seed Topography in the Fabaceae. *Seed Science and Technology*, v. 9, p. 737–757, 1981.

HARPER, J. L. *Population Biology of Plants*. Academic Press, New York, 1977.

HAVIR, E. A.; MCHALE, N. A. Biochemical and Developmental Characterization of Multiple Forms of Catalase in Tobacco Leaves. *Plant Physiology*, v. 84, n. 2, p. 450–455, 1987. <https://doi.org/10.1104/pp.84.2.450>

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSU, H. A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, v. 42, n. 5, p. 462–468, 2001. <https://doi.org/10.1093/pcp/pce061>

HOEKSTRA, F. A.; GOLOVINA, E. A.; BUITINK, J. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science*, v. 6, n. 9, p. 431–438, 2001. DOI: 10.1016/s1360-1385(01)02052-0

IMBERT, E. Ecological consequences and ontogeny of seed heteromorphism. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, v. 5, n. 1, p. 13–36, 2002. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00021>

IOSSI, E.; VITTIMORO, F.; SADER, R. Seed anatomy and germination of *Phoenix roebelenii* O'Brien (Arecaceae). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 28, n. 3, p. 121–128, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222006000300018>

IRVING, L.J.; ZHANG, H. Modelling the effect of salt and peg on water uptake in wheat seeds. *Agronomy*, v. 11, p. 1–13, 2021. <https://doi.org/10.3390/agronomy11081660>

JOHANSEN, D. A. *Plant Microtechnique*. McGraw, New York, 1940.

FOX, J. The R Commander: A Basic-Statistics Graphical User Interface to R. *Proceedings - IEEE International Symposium on Circuits and Systems*, v. 14, n. 9, p. 2005, 2005.

JONSSON, H.; GABRIELSSON, J. Evaluation of Preprocessing Methods. *Comprehensive Chemometrics: Chemical and Biochemical Data Analysis*, v. 3, p. 77–82, 2009. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64165-6.02010-3>

KAPLAN, E.L.; MEIER, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association*, v. 53, n. 282, p. 457–481, 1958. <https://doi.org/10.2307/2281868>

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, Peroxidase, and Polyphenoloxidase Activities during Rice Leaf Senescence. *Plant Physiology*, v. 57, n. 2, p. 315–319, 1976. <https://doi.org/10.1104/pp.57.2.315>

KAWANO, T. Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Reports*, v. 21, n. 9, p. 829–837, 2003. DOI 10.1007/s00299-003-0591-z

KOBORI, N.N.; CICERO, S.M.; MEDINA, P.F. X-ray test to evaluate castor bean seed

quality. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 34, n. 1, p. 125–133, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222012000100016>

KOLLWR, D.; ROTH, N. Studies on the ecological and physiological significance of amphicarpny in *Gymnarrhena micrantha* (Compositae). *American Journal of Botany*, v. 51, n. 1, p. 26–35, 1964. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1964.tb06595.x>

KOSTER, K.L.; LEOPOLD, A.C. Sugars and Desiccation Tolerance in Seeds. *Plant Physiology*, v. 88, n. 3, p. 829–832, 1988. <https://doi.org/10.1104/pp.88.3.829>

KUMAR, S.P.J.; PRASAD, S.R.; BANERJEE, R.; THAMMINENI, C. Seed birth to death: Dual functions of reactive oxygen species in seed physiology. *Annals of Botany*, v. 116, n. 4, p. 663–668, 2015. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv098>

LACEY, E.; SMITH, S.; CASE, A. Parental effects on seed mass: seed coat but not embryo/endosperm effects. *American Journal of Botany*, v. 84, 1997.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. *Biometrics*, v. 33, n. 1, p. 159–174, 1977. <https://doi.org/10.2307/2529310>

LEOPOLD, A. C. Volumetric Components. *Plant Physiology*, p. 677–680, 1983.

LI, W.; YOO, E.; SUNG, J.; LEE, S.; HWANG, S.; LEE, G. Distinct Effects of Seed Coat and Flower Colors on Metabolite Contents and Antioxidant Activities in Safflower Seeds. *Antioxidants*, v. 12, n. 4, 2023. <https://doi.org/10.3390/antiox12040961>

LLOYD, D. G. Variation strategies of plants in heterogeneous environments. *Biological Journal of the Linnean Society*, v. 21, p. 357–385, 1984.

LOPEZ-HUERTAS, E.; CHARLTON, W.L.; JOHNSON, B.; GRAHAM, I.A.; BAKER, A. Stress induces peroxisome biogenesis genes. *EMBO Journal*, v. 19, n. 24, p. 6770–6777, 2000. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.24.6770>

LORENZI, H.; SOUZA, H.M.; TORRES, M.A.V.; BACHER, L. B. *Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas*. 2003.

LOUF, J.F., ZHENG, Y., KUMAR, A., BOHR, T., GUNDLACH, C., HaRHOLT, J., POULSEN, H.F.; JENSEN, K. H. Imbibition in plant seeds. *Physical Review E*, v. 98, p. 1–5, 2018. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.98.042403>

MAGUIRE, J.D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Science*, v. 2, p. 176–177, 1962. <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

MALLOCH, A.J.C.; BEWLEY, J.D.; BLACK, M. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. Volume 1: Development, Germination and Growth*. 1978.

MAMANI, G.Q.; DUARTE, M.L.; ALMEIDA, L.S.; FILHO, S.M. Non-parametric survival analysis in seed germination of forest species. *Journal of Seed Science*, v. 46, 2024. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v46288345>

MANDÁK, B. Seed heteromorphism and the life cycle of plants: A literature review. *Preslia*, v. 69, n. 2, p. 129–159, 1997.

MANNING, CD; RAGHAVAN, P.; SCHÜTZE, H. *Introduction to Modern Information Retrieval*. Library Review, v. 53, n. 9, p. 462–463, 2004.

MANTEL, N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports*, v. 50, p. 163–170, 1966.

MARCOS-FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Fealqed. Piracicaba, 2005.

MARCOS-FILHO, J.; JUNIOR, F.G.G.; BENNETT, M.A.; WELLS, A.A.; STIEVE, A. Using Tomato Analyzer software to determine embryo size in X-rayed seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 32, n. 2, p. 146–153, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222010000200018>

MARCOS-FILHO, J.; SILVA, W.R.; NOVENBRE, A.O.C.; CHAMMA, H. M. C. P. Estudo Avaliativo de métodos para a avaliação da qualidade fisiológica de sementes de soja, com ênfase ao teste de condutividade elétrica. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 25, n. 12, p. 1805–1815, 1990.

MASETTO, T.E.; FARIA, J.M.R.; QUEIROZ, S.E.E. Avaliação da qualidade de sementes de cedro (*Cedrela fissilis* - meliaceae) pelo teste de raios X. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 32, n. 6, p. 1708–1712, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1413-70542008000600004>

MASETTO, T.E.; DAVIDE, A.C.; SILVA, E.A.A.; FARIA, J.M.R. Avaliação da qualidade de sementes de *Eugenia pleurantha* (Myrtaceae) pelo teste de raios X. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 29, n. 3, p. 170–174, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222007000300020>

MATILLA, A.; GALLARDO, M.; PUGA-HERMIDA, M.I. Structural, physiological and molecular aspects of heterogeneity in seeds: a review. *Seed Science Research*, v. 15, n. 2, p. 63–76, 2005. <https://doi.org/10.1079/SSR2005203>

MATSUDA, F.; HIRAI, M.Y.; SASAKI, E.; AKIYAMA, K.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; PROVART, N.J.; SAKURAI, T.; SHIMADA, Y.; SAITO, K. AtMetExpress development: A phytochemical atlas of Arabidopsis development. *Plant Physiology*, v. 152, n. 2, p. 566–578, 2010. <https://doi.org/10.1104/pp.109.148031>

MAVI, K. The relationship between seed coat color and seed quality in watermelon Crimson sweet. *Horticultural Science*, v. 37, n. 2, p. 62–69, 2010. <https://doi.org/10.17221/53/2009-HORTSCI>

MCDONALD, R.P. *Test Theory A Unified Treatment*. Hillsdale, NJ Erlbaum. Hillsdale, 1999.

MEDEIROS, R.V.; SALES, J.F.; NASCIMENTO, K.J.T.; NETO, A.R.; ZUCHI, J.; RESENDE, O.; RODRIGUES, D.A.; RODRIGUES, A. A. Associations between integument color and physical and physiological quality in *pterodon pubescens* seeds. *Plants*, v. 11, n. 10, 2022. <https://doi.org/10.3390/plants11101302>

MEYER, C.J.; STEUDLE, E.; PETERSON, C.A. Patterns and kinetics of water uptake by soybean seeds. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, p. 717–732, 2007. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl244>

MHAMDI, A.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen species in plant development. *Development (Cambridge)*, v. 145, n. 15, 2018. <https://doi.org/10.1242/dev.164376>

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

MORET-FERNÁNDEZ, D.; TORMO, J.; LATORRE, B. A new methodology to characterize the kinetics of a seed during the imbibition process. *Plant and Soil*, v. 498, p. 181–197, 2024. <https://doi.org/10.1007/s11104-023-06427-3>

MORTENSEN, A.K.; GISLUM, R.; JORGENSEN, J.R.; BOELT, B. The use of multispectral imaging and single seed and bulk near-infrared spectroscopy to characterize seed covering structures: Methods and applications in seed testing and research. *Agriculture*, v. 11, n. 4, 2021. <https://doi.org/10.3390/agriculture11040301>

NAFLATH, T.V.; RAJENDRAPRASAD, S.; RAVIKUMAR, R.L. Evaluation of diverse soybean genotypes for seed longevity and its association with seed coat colour. *Scientific Reports*, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2023. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31071-3>

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen Peroxide is Scavenged by Ascorbate-specific Peroxidase. *Plant & Cell Physiology*, v. 22, n. May, p. 867–880, 1981. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076232>

NICOLÁS-GARCÍA, M.; PERUCINI-AVENDAÑO, M.; JIMÉNEZ-MARTÍNE, C.; MARÍA DE JESÚS PEREA-FLORES, M.J.; GÓMEZ-PATIÑO, M.B.; ARRIETA-BÁEZ, D.; DÁVILA-ORTI, G. Bean phenolic compound changes during processing: Chemical interactions and identification. *Journal of Food Science*, v. 86, 2021. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15632>

NOCTOR, G.; DE PAEPE, R.; FOYER, C.H. Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, v. 12, n. 3, p. 125–134, 2007.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G.W.; BEWLEY, J.D. Germination-still a mystery. *Plant Science*, v. 179, n. 6, p. 574–581, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.02.010>

NORRIS, K. H. Why Log (1/ R ) for Composition Analysis with Nir?. *NIR news*, v. 16, n. 8, p. 10–13, 2005. <https://doi.org/10.1255/nirn.865>

O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; MCCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, n. 2, p. 368–373, 1964. <http://link.springer.com/10.1007/BF01248568>.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A. C. Utilização do teste de raios-X na avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 25, n. 1, p. 116–120, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222003000100018>

OLIVEIRA, H.L.; BENEDITO, C.P.; SOUSA, G.D.; SILVA, P.F.; TORRES, S.B.; ROCHA D.F. Physical and physiological characterization of heteromorphic seeds of *Erythrina velutina* Willd. *J. Seed Sci.*, v. 47, p. 1-11, 2025. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v47290879>

PANERO, F.D.S.; SMIDERLE, O.; PANERO, J.S.; FARIA, F.S.D.V; PANERO, P.S.; RODRIGUEZ, A.F.R. Non-Destructive Genotyping of Cultivars and Strains of Sesame through NIR Spectroscopy and Chemometrics. *Biosensors*, v. 12, n. 2, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12020069>

PASSARDI, F.; PENEL, C.; DUNAND, C. Performing the paradoxical: How plant peroxidases modify the cell wall. *Trends in Plant Science*, v. 9, n. 11, p. 534–540, 2004.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.; VYVYAN, J.R. Introdução à espectroscopia. *Química Nova*, p. 708, 2010.

PEARSE, A.G.E. *Histochemistry, Theoretical and Applied*. Londres, 1972.

PEIXOTO, P.H.P; CAMBRAIA, J.; SANT'ANNA, R.; MOSQUIM, P.R.; MOREIRA, M.A. Aluminum effects on lipid peroxidation and on the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 11, n. 3, p. 137–143, 1999.

PENNINGTON, T.D. Meliaceae. *Flora Neotropica Monographs*, v. 28, 1981.

PENNINGTON, T.D.; B. D. STYLES, B. D. A generic monograph of the Meliaceae. *Blumea: Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, v. 22, n. 3, p. 419–540, 1975.

PEREIRA, L.D.; FLEIG, F.D.; MEYER, E.A.; LANZARIN, K.; WOLF, K. Suscetibilidade do cedro ao ataque de pragas em Floresta Estacional Decidual. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 51, n. 5, p. 607–614, 2016. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2016000500022>

PEREIRA, M.O.; NAVROSKI, M.C.; HOFFMANN, P.M.; GRABIAS, J.; BLUM, C.T.; NOGUEIRA, A.C.; ROSA, D. P. Quality of seeds and seedlings of *Cedrela fissilis* Vell. Due

to the biometry of berry and seeds in different origins. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 16, n. 4, p. 376–385, 2017.

PIRES, S.C. *Tempo de germinação de sementes dormentes por análise de sobrevivência*. Dissertação de Mestrado em Ciências Agrárias – Universidade Federal de Uberlândia, 2019. 43p.

PIMENTA, A.C.; ZUFFELATO-RIBAS, K.C.; LAVIOLA, B.G.; PANOBIONCO, M.; LANA, R.M.Q. Curva De Absorção De Água Em Sementes De Canola. *Agronomia: Elo Da Cadeia Produtiva*, v. 5, p.73–77, 2014. <https://doi.org/10.22533/at.ed.42519040410>

POURCEL, L.; ROUTABOUL, J.; CHEYNIER, V.; LEPINIEC, L.; DEBEAUJON, I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, v. 12, n. 1, p. 29–36, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2006.11.00>

PRODANOVIĆ, O.; PRODANOVIĆ, R.; BOGDANOVIĆ, J.; MITROVIĆ, A.; MILOSAVIĆ, N.; RADOTIĆ, K. Antioxidative enzymes during germination of two lines of Serbian spruce [*Picea omorika* (Panc.) Purkyně]. *Archives of Biological Sciences*, v. 59, n. 3, p. 209–216, 2007.

PUPIM, T.L.; NOVENBRE, A.D.L.C.; CARVALHO, M.L.M.; CICERO, S. M. Adequação do teste de raios x para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 30, n. 2, p. 28–32, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222008000200004>

RAMALHEIRO, J.P.S.C. *Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar, universidade Técnica de Lisboa. 2009. 51p.

RANAL, M.A.; SANTANA, D.G.; FERREIRA, W.R.; MENDES-RODRIGUES, C. Calculating germination measurements and organizing spreadsheets. *Brazilian Journal of Botany*, v. 32, n. 4, p. 849–855, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042009000400022>

RANAL, M.A.; SANTANA, D.G. How and why to measure the germination process?. *Brazilian Journal of Botany*, v. 29, n. 1, p. 1–11, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042006000100002>

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, 2025. <https://www.r-project.org/>

RIBEIRO, A.J.M. Proteína. *Revista de Ciência Elementar*, v. 2, n. 3, 2014.

RIBEIRO-OLIVEIRA, J.P.; RANAL, M.A. Sementes florestais brasileiras: início precário, presente inebriante e o futuro, promissor?. *Ciência Florestal*, v. 1, n. 22 Jan, p. 1–17, 2014. <https://doi.org/10.1590/1980-509820142403024>

RIES, S.K.; EVERSON, E.H. Protein Content and Seed Size Relationships with Seedling Vigor of Wheat Cultivars. *Agronomy Journal*, v. 65, n. 6, p. 884–886, 1973. <https://doi.org/10.2134/agronj1973.00021962006500060011x>

RINNAN, Å.; BERG, F.; ENGELSEN, S.B. Review of the most common pre-processing techniques for near-infrared spectra. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 10, p. 1201–1222, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.07.007>

ROESLER, G.D.; RODRIGUES, J.; FORTI, V.A. Bibliometric revision regarding the use of survival analysis in seed germination studies. *Ciencia Rural*, v. 53, n. 11, p. 1–12, 2023. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20220223>

ROUTABOUL, J.; DEBEAUJON, L.K.I.; POURCEL, L.; EINHORN, M.C.J.; LEPINIEC, L. Flavonoid diversity and biosynthesis in seed of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, v. 224, n. 1, p. 96–107, 2006.

RUBIO, F.; MENEGHEL, A.P.; GOMES, L.F.S.; MALAVASI, M. M. Estádios de maturação do fruto no desempenho germinativo e teor de óleo de sementes de *Jatropha curcas* Linn. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 34, n. 2, p. 663–668, 2013.

SANTOS, E.L.; PÓLA, J.N.; BARROS, A.S.R.; PRETE, C.E.C. Qualidade fisiológica e composição química das sementes de soja com variação na cor do tegumento. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 29, n. 1, p. 20–26, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222007000100003>

SANTOS, F.S.; PAULA, R.C.; SABONARO, D.Z.; VALADARES, J. Biometria e qualidade fisiológica de sementes de diferentes matrizes de *Tabebuia chrysotricha* (Mart. Ex A. DC.) Standl. *Cientia Florestalis*, v. 37, p. 163–173, 2009.

SANTOS, V.S.; DUARTE, M.L.; SILVÉRIO, S.; ALMEIDA, L.S.; FILHO, S.M. Do the elaiosome and seed coat color affect the seed quality of *Mabea fistulifera* Mart? *J. Seed Sci.*, v. 47, p. 1-12, 2025. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v47289194>

SAVITZKY, A.; GOLAY, M.J.E. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, v. 36, n. 8, p. 1627–1639, 1964. <https://doi.org/10.1021/ac60214a047>

SCHUAB, S.R.P.; BRACCINI, A.L.; NETO, J.B.F.; SCAPIM, C.A.; MESCHEDE, D. K. Utilização da taxa de crescimento das plântulas na avaliação do vigor de sementes de soja. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 24, p. 90–95, 2002.

SOARES, J.M.; NORONHA, B.G.; SILVA, M.F.; PINHEIRO, D.T.; DIAS, D.C.F.S.; SILVA, D.J. Dosagem do nitrogênio total pelo método Kjeldahl. Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos). Viçosa: Universidade Federal de Viçosa: *Imprensa Universitária*, p. 24–37, 1990.

SILVA, L.J. Near-infrared spectral evaluation of physiological potential, biochemical composition and enzymatic activity of soybean seeds. *Journal of Seed Science*, v. 46, 2024. <https://doi.org/10.1590/2317-1545v46291222>

SCOPEs, R.K. Enzyme Activity and Assays. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2002. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0000712>

SCOTT, S.J.; JONES, R.A.; WILLIAMS, W.A. Review of Data Analysis Methods for Seed Germination. *Crop Science*, v. 24, n. 6, p. 1192–1199, 1984. <https://doi.org/10.2135/cropsci1984.0011183X002400060043x>

SENA, D.V.A.; ALVES, E.U.; ARAÚJO, L.R.; SILVA, R.S.; NETO, A.P.A.; RODRIGUES, C. M. Seed maturation of *Sideroxylon obtusifolium* [(Roem. & Schult.) T.D. Penn.] at different times of collecting. *Ciencia Florestal*, v. 32, n. 3, p. 1106–1124, 2022. <https://doi.org/10.5902/1980509834217>

SHARMA, P.; JHA, A.B.; DUBEY, R.S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, v. 2012, p. 1–26, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/217037>

SILVA, D.; STUEPP, C.A.; WENDLING, I.; HELM, C.V.; ANGELO, A.C. Physiological and biochemical changes in *Cedrela fissilis* seeds during storage. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 55, p. 1–8, 2020. <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2020.v55.01309>

SILVA, P.P.; FREITAS, R.A.; CÍCERO, S.M.; MARCOS-FILHO, J.; NASCIMENTO, W. M. Análise de imagens no estudo morfológico e fisiológico de sementes de abóbora. *Horticultura Brasileira*, v. 32, n. 2, p. 210–214, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0102-05362014000200016>

SILVEIRA, M.A.M.; VILLELA, F.A.; TILLMANN, M.Â.A. Maturação fisiológica de sementes de calêndula (*Calendula officinalis* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 24, p. 31–37, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222002000100006>

SILVERTOWN, J. W. Phenotypic variety in seed germination behavior: the ontogeny and evolution of somatic polymorphism in seeds. *American Naturalist*, v. 124, n. 1, p. 1–16, 1984.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R. *Principios de analisis instrumental*. 2019.

SOUSA LIRA, J. M.; SALGADO, E. G.; BEIJO, L. A. Which factors does the diffusion of ISO 50001 in different regions of the world is influenced?. *Journal of Cleaner Production*, v. 226, p. 759–767, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.04.127>

SOUZA, F.H.D.; MARCOS-FILHO, J. The seed coat as a modulator of seed-environment relationships in Fabaceae. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 24, n. 4, p. 365–375, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0100-84042001000400002>

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil*. 2019.

SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dinglers Polytechnisches Journal*, v. 232, p. 461–465, 1879.

STANISAVLJEVIĆ, N.S.; ILIĆ, M.; JOVANOVIĆ, Ž.S.; ČUPIĆ, T.; DABIĆ, D. Č.; NATIĆ, M.M.; TEŠIĆ, Ž.; RADOVIĆ, S. S. Identification of seed coat phenolic compounds from differently colored pea varieties and characterization of their antioxidant activity. *Archives of Biological Sciences*, 2015.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. Colonização de clareiras naturais na floresta atlântica no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 20, n. 1, p. 57–66, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0100-84041997000100006>

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal Diversidade vegetal*. 6 ed., 2017.

TORRES, S.B.; MEDEIRO, M.A.; TOSTA, M.S.; GLEIDER MARIA DE MENEZES COSTA, G. M. M. Teste de condutividade elétrica em sementes de gergelim. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 31, n. 3, p. 70–77, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222009000300008>

TOKUHISA, D.; DIAS, D.C.F.S.D.; ALVARENGA, E.M.; PAULO CÊSAR HILST, P.C.; DEMUNER, A.J. Compostos fenólicos inibidores da germinação em sementes de mamão (*Carica papaya* L.). *Revista Brasileira de Sementes*, v. 29, n. 3, p. 180-188, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0101-31222007000300022>

TROSZYŃSKA, A.; CISKA, E. Phenolic Compounds of Seed Coats of White and Coloured Varieties of Pea (*Pisum sativum* L.) and Their Total Antioxidant Activity. *Czech J. Food Sci.*, v. 20, n. 1, p. 15–22, 2002.

VENABLE, D. L. The evolutionary ecology of seed heteromorphism. *American Naturalist*, v. 126, n. 5, p. 577–595, 1985. <https://doi.org/10.1086/284440>

VENTRELLA, M.C.; ALMEIDA, A.L.; NERY, L.A.; MIRANDA COELHO, V. P. M. *Métodos Histoquímicos Aplicados às Sementes*. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013.

VENTURI, S.; RANDI, Á.M. Influência da coloração das sementes na germinação de *Phyllanthus tenellus* Roxb. e *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, v. 11, n. 1, p. 87–94, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0102-33061997000100009>

VIDAL, B. C. Dichroism in collagen bundles stained with Xylidine-Ponceau 2R. *Annales d'Histochemie*, v. 15, p. 289–296, 1970.

VIEIRA, R.D.; KRZYŻANOWSKI, F.C.T. Teste de condutividade elétrica. *In: Vigor de sementes: conceitos e testes*. ABRATES, Londrina: 1999. p. 1–26.

VIERA, A.J.; GARRETT, J.M. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Family Medicine*, v. 37, p. 360–363, 2005.

WEDDING, B.B.; WRIGHT, C.; GRAUF, S.; WHITE, R. D. Wavelength variation of the depth of penetration of near infrared radiation in “Hass” avocado fruit. *Technology in Horticulture*, v. 4, n. 1, p. 0–0, 2024.

WEN, D.; HOU, H.; MENG, A.; MENG, J.; XIE, L.; ZHANG, C. Rapid evaluation of seed vigor by the absolute content of protein in seed within the same crop. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23909-y>

WESTAD, F.; MARINI, F. Validation of chemometric models - A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, v. 893, p. 14–24, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.056>

WILLEKENS, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; MONTAGU, M.V.; INZÉ, D.; CAMP, W.V. Catalase is a sink for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and is indispensable for stress defence in C<sub>3</sub> plants. *EMBO Journal*, v. 16, n. 16, p. 4806–4816, 1997. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4806>

WOLD, S.; SJÖSTRÖM, M.; ERIKSSON, L. PLS-regression: A basic tool of chemometrics. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 58, n. 2, p. 109–130, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(01\)00155-1](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(01)00155-1)

XIA, Y.; XU, Y.; LI, J.; ZHANG, C.; FAN, S. Recent advances in emerging techniques for non-destructive detection of seed viability: A review. *Artificial Intelligence in Agriculture*, v. 1, p. 35–47, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aiia.2019.05.001>

ZHANG, J.; CUI, Y.; ZHANG, L.; WANG, Y.; LI, J.; YAN, G.; HU, L. Seed Coat Color Determines Seed Germination, Seedling Growth and Seed Composition of Canola (*Brassica Napus*). *International Journal of Agriculture and Biology*, v. 15, n. 3, p. 535–540, 2013.

ZUCHI, J.; PANOZZO, L.E.; HEBERLE, E.; ARAUJO, E.F. Curva de embebição e condutividade elétrica de sementes de mamona classificadas por tamanho X1 - Imbibition and electrical conductivity of castor bean seeds classified by size. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 34, p. 504–509, 2012.