

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**TEOR DE CLOROFILA, DANOS OXIDATIVOS E QUALIDADE DE SEMENTES DE
SOJA**

RENAKE NOGUEIRA TEIXEIRA

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Agricultura)

BOTUCATU - SP

Junho - 2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**TEOR DE CLOROFILA, DANOS OXIDATIVOS E QUALIDADE DE SEMENTES DE
SOJA**

RENAKE NOGUEIRA TEIXEIRA

Prof. Dr. Cláudio Cavariani
Orientador

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de Botucatu,
para obtenção do título de Mestre em Agronomia
(Agricultura)

BOTUCATU - SP

Junho - 2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - SERVIÇO TÉCNICO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO UNESP -FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

Teixeira, Renake Nogueira, 1984-
T266t Teor de clorofila, danos oxidativos e qualidade de sementes de soja / Renake Nogueira Teixeira. - Botucatu : [s.n.], 2010
vi, 92 f.: il., color., grafs., tabs.

Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2010
Orientador: Cláudio Cavariani
Inclui bibliografia.

1. *Glycine max.* 2. Clorofila. 3. Peroxidação de Lipídeos. 4. Sementes - Qualidade. I. Cavariani, Cláudio. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Campus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu. III. Título.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CAMPUS DE BOTUCATU

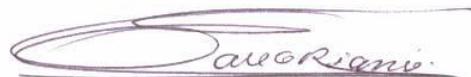
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO: TEOR DE CLOROFILA, DANOS OXIDATIVOS E QUALIDADE
DE SEMENTES DE SOJA**

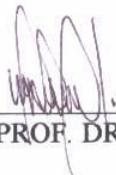
ALUNA: RENAKE NOGUEIRA TEIXEIRA

ORIENTADOR: PROF. DR. CLAUDIO CAVARIANI

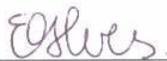
Aprovado pela Comissão Examinadora



PROF. DR. CLAUDIO CAVARIANI



PROF. DR. EDVALDO APARECIDO AMARAL DA SILVA



PROFª DRª ELZA ALVES

Data da Realização: 21 de junho de 2010.

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Aos meus pais **Maria Helena Nogueira Teixeira** e
Vitor Hugo Teixeira, pelo amor e apoio em todas
as etapas da minha vida, por serem tão essenciais.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos às pessoas e instituições que colaboraram e tornaram possível a realização desta Dissertação:

Agradeço a **Deus**, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, me abençoando e guiando os meus passos.

Aos meus pais, **Maria Helena** e **Vitor Hugo**, pelo amor, carinho, dedicação e por sempre apoiarem todas as minhas decisões. Sem vocês nada seria possível!

Ao meu irmão **Diego**, pelo carinho incondicional.

Ao **Caio**, meu namorado, que com todo amor e paciência, sem exigências nem cobranças foi compreensivo e me apoiou em todos os momentos. Obrigada pelo seu carinho, atenção e amor!

À Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista – UNESP, pela oportunidade de realização do Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. **Cláudio Cavariani**, a quem expressei minha gratidão pela orientação e liberdade na condução do trabalho.

À Prof. Dra. **Elza Alves**, pela disponibilidade, amizade, paciência, compreensão e preciosa colaboração.

Ao Prof. Dr. **João Nakagawa**, pela atenção, sugestões e valiosos ensinamentos.

À Prof. **Ana Catarina Cataneo**, do Departamento de Bioquímica pela colaboração nas análises bioquímicas.

Ao Prof. Dr. **Edivaldo Domingues Velini**, pela colaboração na elaboração do projeto e tão indispensável ajuda na análise dos dados.

Aos membros da banca pela disponibilidade e valiosa contribuição.

À todos os professores do Departamento de Produção Vegetal – Agricultura, da Faculdade de Ciências Agrônômicas – UNESP/ Botucatu pela atenção e ensinamentos.

Aos funcionários do Departamento de Produção Vegetal (Agricultura), em especial à **Valéria**, pelo apoio constante e por sempre colaborar nos momentos em que precisei À **Lana** e à **Vera** pela agradável convivência e ajuda indispensáveis.

À todos os amigos do Departamento de Produção Vegetal – Agricultura, da Faculdade de Ciência Agrônômicas – UNESP/ Botucatu, em especial às amigas do Laboratório de Análise de Sementes pela ajuda nos trabalhos, pelos conhecimentos divididos e pela amizade acima de tudo.

Às estagiárias do Laboratório de Análise de Sementes, que colaboraram com a execução das análises, em especial à **Lenise Baldini**.

Aos amigos **Maria Renata, José Iran, Guilherme, Guiné** pela amizade construída, pelas tantas risadas e por todos os momentos juntos, essenciais nesta etapa da minha vida.

Ao Dr. **José de Barros França Neto** pela colaboração na elaboração e desenvolvimento do trabalho.

Às empresas Sementes Adriana, Bocchi Agronegócios, Sementes Plantar, Sementes Paraná, Mauá Sementes, Integrada – Cooperativa Agroindustrial e à Cooperativa dos Agricultores da Região de Orlândia (CAROL) pelo envio dos lotes de sementes de soja.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse trabalho,

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

1	RESUMO	1
2	SUMMARY	3
3	INTRODUÇÃO	5
4	REVISÃO DE LITERATURA	7
4.1	Respostas fisiológicas durante a maturação de sementes	7
4.2	Retenção de clorofila em sementes	11
4.3	Retenção de clorofila e qualidade das sementes	14
4.4	Degradação da clorofila	18
4.5	Danos oxidativos	22
5	MATERIAL E MÉTODOS	26
5.1	Atividade fotossintética	31
5.2	Porcentagem de sementes verdes	31
5.3	Teor de clorofila total	34
5.4	Determinação do teor de lipoperóxidos	36
5.5	Avaliação da qualidade das sementes	36
5.6	Análise dos dados	38
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
6.1	Atividade fotossintética das sementes	39
6.2	Ocorrência de sementes verdes em diferentes regiões	41
6.3	Relação entre a presença de clorofila e a qualidade das sementes de soja	59
6.4	Armazenamento das sementes	68
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
8	CONCLUSÕES	78
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

1 RESUMO

A retenção de clorofila tem afetado a produção de sementes de soja no Brasil, principalmente na região dos cerrados. Como consequência, tem-se a redução da qualidade dos lotes, constatada por queda na germinação e vigor, com prejuízos no estabelecimento de população adequada de plantas, no momento da semeadura.

A degradação da clorofila pode ser afetada pelo estágio de maturação, por condições de secagem, aplicação de produtos químicos dessecantes e pelas condições climáticas, especialmente durante as fases de acúmulo de reservas e maturação das sementes. O processo de maturação, além de ter grande efeito na degradação da clorofila, influencia a produção de enzimas específicas da germinação. A presença do pigmento verde pode estar relacionada à produção de radicais livres que causam danos oxidativos, os quais afetam a longevidade das sementes.

Este estudo teve como objetivo averiguar a relação entre a clorofila, a qualidade fisiológica e os danos oxidativos que afetam o potencial de conservação das sementes de soja.

A pesquisa foi conduzida no Departamento de Produção Vegetal – Agricultura, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Campus de Botucatu. Os tratamentos constaram de 67 lotes de soja, de diferentes cultivares, provenientes de áreas dos Estados do Mato Grosso, de São Paulo e do Paraná, com variações nos graus de retenção de

clorofila. Para cada lote foi determinada a porcentagem de sementes verdes, utilizando-se método visual de classificação de cores com auxílio da carta de Munsell, e o teor de clorofila, através de extração química pelo método de Arnon (1949) adaptado no presente estudo. O Fluorômetro foi utilizado para avaliar a atividade fotossintética das sementes com presença de clorofila. Avaliou-se, também, os danos oxidativos sofridos por cada lote através da determinação de lipoperóxidos. Todos os parâmetros foram relacionados com a qualidade das sementes avaliada em três épocas: inicial, logo após o recebimento das sementes e após três e seis meses de armazenamento. Os dados obtidos foram analisados por teste de correlação e por curvas de distribuição de frequências não acumuladas, associadas à estatística descritiva.

A análise dos lotes agrupados por regiões não foi consistente em consequência do conjunto de dados avaliados. Com o uso do fluorômetro foi possível atestar que sementes maduras de soja com retenção de clorofila não possuem atividade fotossintética. A ocorrência de sementes verdes em lotes de soja é indicativo de menor qualidade, sem relação clara, no entanto, entre o conteúdo de clorofila das sementes e a qualidade fisiológica dos lotes. Constatou-se, também, que o teor de clorofila de um lote não tem relação direta com a peroxidação de lipídeos e a conseqüente redução da qualidade; contudo, o conteúdo de lipoperóxidos possui relação direta com os danos oxidativos causados às sementes e com a redução da qualidade dos lotes de soja após o armazenamento.

Palavras-chave: *Glycine max*, clorofila, peroxidação de lipídeos, qualidade de sementes.

RELATIONSHIP BETWEEN CHLOROPHYLL CONTENT, OXIDATIVE DAMAGE AND SOYBEAN SEEDS QUALITY. Botucatu, 2010. 93p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista.

Author: RENAKE NOGUEIRA TEIXEIRA

Adviser: CLÁUDIO CAVARIANI

2 SUMMARY

The retention of chlorophyll has affected the production of soybeans in Brazil, mainly in the cerrado biome. As a result there has been a reduction in the quality of the lots, evidenced by a decrease in germination and vigor, with losses in the establishment of appropriate plants population at sowing time.

The degradation of chlorophyll can be affected by ripening stage, by drying conditions, application of chemical desiccants, and climatic conditions, especially during periods of reserve accumulation and seed maturation. The maturation process, besides having great effect on the degradation of chlorophyll, has importance in the production of specific enzymes of germination. The presence of green pigment may be related to the production of free radicals that cause oxidative damage, which affects seed longevity.

This study aimed to investigate the relationship between chlorophyll, the physiological quality and oxidative damage affecting the conservation potential of soybean seeds.

The research was conducted at the Department of Crop Production - Agriculture, Faculty of Agronomic Sciences, UNESP, Botucatu. The treatments consisted of 67 soybean lots of different cultivars from areas in Mato Grosso, Sao Paulo and Parana, with variable degrees of chlorophyll retention. For each batch was determined the percentage of green seeds using a visual method of classification with the aid of the Munsell color card, and the chlorophyll content by chemical extraction, using the method of Arnon (1949) adapted in this study. The fluorometer was used to evaluate the photosynthetic activity of the seeds with chlorophyll retention. We evaluated also the oxidative damage suffered by each lot by determining lipoperoxide. All parameters were related to the quality of seeds valued at three

times; initial date, soon after receiving the seed and after 3 and 6 months of storage. The data were analyzed by correlation test and by analysis of distribution curves of not accumulated frequencies, associated with the descriptive statistics.

The plots grouped by regions analysis was not consistent as a result of the data set evaluated. Using the fluorometer was possible to demonstrate that mature seeds of soybean showing retention of chlorophyll have no photosynthetic activity. The occurrence of green seeds in soybean lots is indicative of lower quality, however, no clear relationship was found between chlorophyll content and seeds quality. It was also noted that the chlorophyll content of a lot has no direct relationship to lipid peroxidation and the consequent reduction in quality, however, the contents of lipoperoxide, has direct relation with the oxidative damage caused to seed and the degradation of soybeans lots after storage.

Keywords: *Glycine max*, chlorophyll, lipid peroxidation, seed quality.

3 INTRODUÇÃO

A soja pode ser considerada, hoje, a principal cultura dos setores agrícola e agroindustrial do país por representar parte expressiva das exportações brasileiras. Para atender o crescimento da produção de soja, o mercado necessita de grande quantidade de sementes de alta qualidade.

A qualidade de sementes de soja, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, pode ser influenciada por diversos fatores que ocorrem antes e durante a colheita, e nas etapas posteriores da produção, como na secagem, no beneficiamento, no armazenamento e no transporte. Na fase de campo, períodos de seca, danos por insetos, extremos de temperatura durante as fases de histodiferenciação e maturação da cultura, resultam na maturação forçada das sementes, acarretando baixos rendimentos e ocorrência de sementes esverdeadas, com conseqüente redução da qualidade (FRANÇA NETO et al., 2005).

A retenção de clorofila em sementes de soja produzidas no Brasil tem ocasionado sérios problemas aos produtores nos últimos anos, em razão do fato estar associado à baixa qualidade dos lotes, com decréscimo do poder germinativo e do vigor, afetando, de forma significativa, o estabelecimento de estandes iniciais. Estudo de Zorato et al. (2007) mostrou haver relação inversa entre o índice de sementes esverdeadas e a intensidade da tonalidade verde dos cotilédones com a qualidade fisiológica de sementes de soja.

Os cotilédones esverdeados, conseqüência da degradação parcial da clorofila, resultam em prejuízos para o setor sementeiro de soja e, também, para a indústria de

óleos comestíveis. O óleo proveniente da extração de grãos verdes sofre redução em sua estabilidade oxidativa, levando o produto ao processo de rancificação e, conseqüentemente, à redução da vida útil de prateleira. Além disso, a coloração escura desse óleo é indesejável comercialmente, e a remoção dos pigmentos verdes por adsorção em agentes clarificantes eleva o custo de refinação.

O teor de clorofila em sementes maduras de soja é determinado pelo genótipo e, portanto, variável entre as cultivares. Esse nível, conforme o estágio de maturação das sementes pode ser influenciado pelas condições de secagem, ou pelas condições climáticas que afetam o amadurecimento normal em condições de campo (SINNECKER, 2002).

Condições adversas a que ficam expostas as plantas no campo podem determinar variação e desuniformidade da maturação das sementes, com agravamento do processo de deterioração decorrente de bloqueios metabólicos impeditivos das transformações bioquímicas que ocorrem normalmente no final do processo de maturação como, por exemplo, a degradação da clorofila presente nas sementes.

Apesar da evidente importância da degradação da clorofila em sementes oleaginosas, os mecanismos responsáveis pelo processo, tanto durante a maturação em campo quanto durante o armazenamento, ainda são pouco elucidados. Faltam informações que permitam atribuir, de forma clara, relação entre clorofila e qualidade de sementes de soja.

Diante da escassez de informações na literatura, o estudo realizado objetivou averiguar possível relação entre a clorofila, a qualidade fisiológica das sementes de soja e os danos oxidativos que afetam o potencial de conservação dos lotes.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Respostas fisiológicas durante a maturação de sementes

A semente, desenvolvida a partir do óvulo fecundado, é formada por tecidos maternos e por tecidos embrionários. O processo de desenvolvimento da semente é controlado geneticamente e compreende uma série de etapas, verificadas a partir da fecundação, até que se tornem maduras e independentes da planta-mãe.

O desenvolvimento da semente, da fertilização à semente madura, pode ser dividido em três fases. A fase I é caracterizada pelo crescimento inicial, devido à divisão celular e a um aumento rápido no peso fresco da semente. Na fase II ocorre acúmulo de material de reserva na semente. O teor de água diminui enquanto a matéria seca substitui a água nas células. Finalmente, a fase III compreende a dessecação ou a desidratação das sementes, em função do declínio rápido do teor de água e da diminuição do peso fresco. Ocorre, então, redução gradual no metabolismo da semente e o embrião passa para um estado quiescente (BEWLEY & BLACK, 1994).

A concentração de água ($\text{g H}_2\text{O/g}$ peso fresco) é muito alta durante a fase I e declina até que a maturidade fisiológica da semente seja atingida. A semente de soja contém níveis moderados de óleo e altos níveis de proteínas e tem alta concentração de água,

ao redor de 800 g/kg, no início do desenvolvimento e declina expressivamente até atingir valores ao redor de 550 g/kg na maturidade fisiológica (EGLI, 1998).

A água desempenha papel fundamental na produção vegetal, de maneira que sua deficiência, ou seu excesso, afeta de forma decisiva o crescimento e o desenvolvimento das plantas. A seqüência de modificações no teor de água da semente constituiu-se em característica relativamente eficiente para estudar o desenvolvimento da semente e empregada, com freqüência, na determinação da maturidade fisiológica (VILLELA & MARCOS FILHO, 1998).

Nas considerações de alguns autores citados por Adams et al. (1983), a maturação em sementes de soja é a fase final da produção. Ela ocorre naturalmente quando a semente alcança o máximo de peso seco no estágio descrito como maturidade fisiológica. Todavia, a maturação não depende apenas da planta-mãe, ou apenas do estágio de desenvolvimento da semente. A maturação é uma fase metabolicamente ativa, envolvendo proteína, utilização de amido e produção de açúcares solúveis.

Indicadores visuais da maturidade têm sido desenvolvidos para muitas culturas e eles são freqüentemente baseados em mudanças na cor ou nas características da semente. De acordo com Marcos Filho (1980), uma população de sementes de soja está madura quando a coloração amarela e hilo heterocromo (coloração diferente da do tegumento), ocorrem em aproximadamente 95% das sementes. É muito difícil, segundo Egli (1998), detectar diferenças significativas no campo entre lotes colhidos no estágio de maturação R7.1 (início a 50% de amarelecimento de folhas e vagens) e a total maturidade R8.1 (início a 50% de desfolha).

As modificações do vigor da semente ocorrem paralelamente à evolução da transferência de matéria seca da planta para as sementes, ou seja, a proporção de sementes vigorosas aumenta com o decorrer da maturação, com um máximo em época muito próxima ou coincidente com o máximo acúmulo de reservas (MARCOS FILHO, 2005).

Apesar de muitas pesquisas ressaltarem maior germinação e vigor da semente na maturidade fisiológica, Ellis & Pieta Filho (1992) ofereceram uma mudança nessa concepção. Eles sugeriram que o máximo potencial fisiológico das sementes de cevada e de trigo ocorre após o máximo acúmulo de matéria seca, razão para proporem o termo “maturidade de massa” para separar a ocorrência da máxima massa de matéria seca do

máximo vigor das sementes. Assim, segundo os autores, a semente está fisiologicamente madura somente quando o máximo vigor é alcançado.

Os efeitos ambientais durante o desenvolvimento das sementes podem ter grande potencial em causar alterações bioquímicas na composição da semente madura. O estresse hídrico durante a formação das sementes acelera a senescência de folhas e encurta o período de maturação das sementes de soja. As sementes, na ocorrência de estresse hídrico da planta, podem não completar a mesma seqüência de desenvolvimento como em plantas sem deficiência e a composição química desde o estágio de desenvolvimento pode ser afetada na semente madura. Pouco se sabe sobre a interação entre a duração do período de formação da semente e a sua composição na maioria das espécies cultivadas (EGLI, 1998).

O intervalo entre a maturidade fisiológica e a colheita é como um período de armazenamento no campo em que a ocorrência de chuvas e condições oscilantes de temperatura e umidade relativa do ar causam o intumescimento diferenciado dos tecidos externos das sementes em relação aos internos. Esse processo pode ocasionar rugas e rachaduras no tegumento e fissuras no eixo embrionário e nos cotilédones, sintomas típicos de deterioração severa. Essa deterioração geralmente está associada à maior predisposição das sementes aos danos mecânicos e ao ataque de pragas e patógenos (COSTA et al., 1987).

Após a maturidade fisiológica, alterações degenerativas começam a ocorrer nas sementes, de modo que a qualidade fisiológica pode ser mantida ou decrescer, dependendo das condições ambientais no período que antecede a colheita, da condução dos processos de colheita, de secagem, de beneficiamento e das condições de armazenamento (DELOUCHE & BASKIN, 1973; MCDONALD, 1975).

Abdul-Baki & Anderson (1973) definiram deterioração como toda e qualquer transformação degenerativa ocorrida na semente, tratando-se de um processo contínuo, de progresso variável entre espécies, entre lotes de sementes da mesma espécie e entre sementes do mesmo lote. Essas transformações podem ser de origem bioquímica, física ou fisiológica (DELOUCHE & BASKIN, 1973).

As reações oxidativas são, em parte, responsáveis pela deterioração das sementes (PRIESTLEY et al., 1985; WILSON & MCDONALD, 1986) e ocorrem por peroxidação. A oxidação de ácidos graxos insaturados é citada, na maioria das vezes, como a primeira reação do processo de envelhecimento, produzindo radicais livres que atacam

lipídeos, proteínas e ácidos nucléicos (HARRINGTON, 1973). De acordo com a literatura, tem sido relatado o envolvimento de enzimas nas reações oxidativas do processo de envelhecimento, como as lipoxigenases que mantêm sua atividade em sementes de soja, mesmo em baixos níveis de água (PRIESTLEY et al., 1985).

Muitas outras mudanças fisiológicas provavelmente ocorram durante a maturação da semente, embora haja pouca informação das exigências para a produção de sementes maduras e viáveis. Para McIntyre (1987), a drástica redução do grau de umidade das sementes, após a maturidade fisiológica, torna-se suficiente para explicar a inibição do crescimento e o declínio associado a atividade metabólica. Eglí (1990) encontrou dados sugerindo que o acúmulo de matéria seca pelas sementes de soja pode continuar enquanto houver uma rede de absorção de água para dirigir a expansão celular. Na ausência dessa rede, um acúmulo contínuo de matéria seca causa a dessecação que desencadeia a maturação. Também apontou mecanismos da semente, desencadeadores do final de seu desenvolvimento, podendo operar independentemente de mudanças na disponibilidade de assimilados.

Há significativos índices de correlação entre os níveis de clorofila e a maturidade das sementes na época da colheita (CENKOWSKI et al., 1989 a e b; LIU, 1996). Na prática, a presença de sementes verdes é resultado de condições climáticas desfavoráveis e/ou de procedimentos de colheita antecipada para reduzir as perdas (LEVADOUX et al., 1987; CENKOWSKI & JAYAS, 1993). Na maturidade fisiológica, são elevados os teores de clorofila e de água, mas o pigmento pode ser degradado naturalmente se as sementes forem secas lentamente à temperatura ambiente (SINNECKER, 2002).

Adams et al. (1983) mostraram, a maturação, por meio de desidratação lenta, processo necessário para produção de sementes de soja de alta qualidade, para obtenção de efeitos distintos na degradação de clorofilas e na influência do genoma para permitir a produção das enzimas específicas de germinação, a malato sintase e a isocitrato liase. Em sementes de soja, essas enzimas são chaves na regulação do ciclo do glioxalato, onde os lipídios insolúveis das sementes são convertidos em açúcares solúveis (sacarose), forma em que são translocados para os meristemas radicular e apical (CIONI et al., 1981; BEWLEY & BLACK, 1994).

Corroborando tais informações, Jalink et al. (1998) apontaram o estado da maturidade como um importante aspecto da qualidade de sementes, e que as imaturas ou não totalmente maduras são geralmente de menor qualidade que as sementes maduras.

Pouco é conhecido sobre a função da clorofila em sementes. Quebedeaux e Chollet (1975) observaram declínio progressivo da concentração de clorofila em vagens de soja com o aumento do peso das sementes entre a antese e a maturação. Sugimoto et al (1987) mostraram haver atividade fotossintética em cotilédones imaturos de soja quando em desenvolvimento; a intensidade de luz que atinge os cloroplastos teria a importância reduzida com o acúmulo de substâncias de reserva durante a maturação, resultando em perda gradual da atividade fotossintética.

A função da clorofila na vagem foi investigada por Andrew e Svec (1975). Os autores constataram que, embora a taxa bruta de fotossíntese das vagens por peso fresco tenha sido ligeiramente inferior à das folhas, a concentração de clorofila é muito maior nas folhas; todavia, a taxa fotossintética nas vagens foi maior que nas folhas, quando expressa em base de mg de clorofila. O aumento da taxa fotossintética bruta em base de clorofila, observada como o aumento do tamanho das vagens, pode ser importante durante o período de acúmulo rápido de matéria seca nas sementes. Bewley e Black (1994) afirmaram que em algumas leguminosas, por exemplo, ervilha e algumas cultivares de soja, a sacarose produzida pela fotossíntese nas folhas e vagens pode ser temporariamente armazenada como amido nas vagens antes de ser remobilizada e transferida para as sementes em desenvolvimento.

Portanto, a clorofila presente em vagens e sementes de soja em desenvolvimento parece estar ativa desempenhando função na geração de energia e acúmulo de reservas.

4.2 Retenção de clorofila em sementes

A quantidade de clorofila, para maioria das espécies agrícolas, decresce no tegumento da semente, durante a maturação, ao mesmo tempo em que a cor da semente muda de verde para a cor característica de cada espécie ou cultivar. Esse processo é

chamado “degreening”, que significa perda da cor verde (WARD et al., 1995; JALINK et al., 1998).

De acordo com Sinnecker (2002), a soja, no estágio de maturação R6, contém um elevado teor de clorofila e, entre R6 e a maturidade fisiológica, ocorre a degradação praticamente total da clorofila, restando apenas quantidades residuais.

Em circunstâncias normais, durante a maturação das sementes, a enzima clorofilase degrada a clorofila em sementes de soja. No entanto, em condições climáticas de altas temperaturas e deficiência hídrica as sementes amadurecem mais rápido do que o habitual, cessando a atividade da enzima antes que toda a clorofila tenha sido degradada (BOHNER, 2010).

Os efeitos dos estresses ambientais, principalmente os causados pela temperatura, ainda não são completamente conhecidos. Estudos sobre o assunto sugerem que a elevação de temperatura, até atingir valores superiores a 30°C, provocam a translocação muita rápida das reservas da planta para as sementes, impedindo a degradação completa da clorofila, provocando a formação de sementes esverdeadas, de baixa qualidade e com desempenho comprometido (MARCOS FILHO, 2005).

De forma generalizada, os fatores que predispõem a soja à expressão de sementes esverdeadas, de acordo com França Neto et al. (2005), são os estresses bióticos e abióticos que resultam na morte prematura ou em maturação forçada da planta. Dentre os estresses bióticos estão doenças como fusariose (raiz), cancro da haste e de folhas e a ferrugem asiática e dentre os fatores abióticos são citados o manejo inadequado, como distribuição irregular de calcário ou de fertilizantes, aplicação de dessecantes antes do estágio ideal e deficiência hídrica associada com temperaturas elevadas.

Condições climáticas adversas, como intenso “veranico” durante as fases de histodiferenciação e maturação na cultura da soja, resultam na maturação forçada das sementes, acarretando baixos rendimentos e ocorrência de sementes esverdeadas, o que resultará em acentuada redução de sua qualidade (FRANÇA NETO et al., 2005). Tal problema foi relatado na região dos Cerrado no Brasil Central, na China (THEANJUMPOL, 2002), em várias regiões próximas a Ontário, no Canadá e na região de Kansas, nos Estados Unidos (BOHNER, 2010).

O grau de coloração verde dependerá do estágio de desenvolvimento da planta e da intensidade dos estresses que possam causar sua morte prematura. Se o estresse ocorrer no final da fase de enchimento das sementes, a coloração verde permanecerá restrita ao tegumento e poderá diminuir durante o período de armazenamento; a ocorrência do estresse no início ou no meio da fase de enchimento determinará a distribuição da coloração verde por toda a semente e permanecerá estável, mesmo após longo tempo de armazenamento (WIEBOLD, 2002, citado por MANDARINO, 2005).

Geralmente, a associação de fatores em campo torna a taxa de retenção de clorofila mais significativa. A hipótese que, de forma provável, justifica a alteração fisiológica das sementes na região dos cerrados brasileiro é a ocorrência de estresse hídrico, associados às condições de microclima a exemplo da alta temperatura do ar, baixa umidade relativa, elevada luminosidade e baixa retenção de umidade nos diferentes solos, no período considerado fundamental para a degradação da clorofila, qual seja na passagem do estágio R₆ para R₇ de acordo com Fukushima e Lanfer-Marquez (2000).

Plantas de soja submetidas a condições de estresses hídrico e térmico, com início em R₆, produzem altos índices de sementes verdes, de menores tamanho e massa, com elevado teor de clorofila e baixa atividade de clorofilase, sem variações de ocorrência de sementes verdes nas diferentes partes da planta no que se refere a sua posição nos terços inferior, médio e superior (PÁDUA, 2006).

Temperaturas elevadas são consideradas as principais responsáveis pela maturação “forçada” em soja (FRANÇA NETO et al., 2005). Dados obtidos por Pádua (2006) confirmaram tal informação uma vez que mesmo em condição de máxima deficiência hídrica, associada a temperaturas amenas, foi baixo o índice de ocorrência de sementes verdes.

O teor de clorofila em sementes de soja é influenciado, também, pelo genótipo e pode haver, portanto, variação significativa entre as cultivares. Ward (1992) e McGregor (1991) relataram a influência similar do genótipo e das condições climáticas, principalmente a temperatura no período de maturação das sementes. Pádua (2006) afirmou existir variação de resposta à retenção de clorofilas em sementes de cultivares de soja produzidas em condições de estresse hídrico e térmico. Em seus estudos, as cultivares MG/BR 46 (Conquista) e BRS 251 (Robusta) mostraram-se suscetíveis e as cultivares BRS 133 e CD 206 menos suscetíveis às condições de estresse causadores do esverdeamento.

Adams et al., (1983) consideraram a temperatura e a umidade relativa do ar como fatores influenciadores no processo de maturação, época em que as clorofilas são degradadas; observaram, também, que sementes de soja passando por desidratação de maneira rápida, não perdem a clorofila no mesmo grau como as sementes desidratadas de forma lenta. Diferentes velocidades de perda de água das sementes determinaram taxas distintas de degradação da clorofila. Sementes desidratadas de modo lento geralmente têm $1\mu\text{g clorofila.semente}^{-1}$, enquanto as sementes visivelmente verdes, que foram desidratadas rapidamente, mantêm até $29\mu\text{g clorofila.semente}^{-1}$ (ADAMS et al., 1983).

Consoante tais informações, Sinnecker (2002) constatou o efeito do estágio de maturação, das condições de secagem ou das condições climáticas na maturação normal de plantas de soja no campo. O autor concluiu que, após a colheita da soja, a degradação da clorofila é altamente dependente da temperatura de secagem. Quando esta é realizada de forma lenta, próximo à temperatura ambiente (25°C), é possível colher a soja mesmo dias antes da maturidade fisiológica (R_7), pois a clorofila é completamente degradada. Por outro lado, em colheitas antecipadas acompanhadas de secagem acima de 40°C , ocorre retenção de clorofila.

Ward et al. (1992) obtiveram resultados semelhantes com sementes de canola, ou seja, interrupção da degradação da clorofila, decorrente de rápida perda de água na câmara de secagem do secador, resultando em altos níveis de clorofila.

4.3 Retenção de clorofila e qualidade das sementes

A ocorrência de sementes verdes tem sido apontada como um fator importante na perda de qualidade de lotes de soja. A literatura informa ser maior o impacto do pigmento verde sobre a qualidade fisiológica quanto mais elevado for o índice de sementes esverdeadas e quanto maior a intensidade da tonalidade do verde nos cotilédones das sementes do lote. Contudo, além do aspecto fisiológico, as sementes esverdeadas também apresentam alterações no aspecto físico, com tamanho e massa inferiores.

Nos Estados Unidos e no Canadá, a incidência de grãos verdes é observada na canola, trazendo problemas especialmente para a indústria de extração de óleo.

Desta forma, o pigmento verde é considerado um parâmetro qualitativo em grãos dessa espécie em tais países. No Canadá, de acordo com Cenkowski e Jayas (1993), o teor máximo de clorofila permitido em grãos de canola de primeira qualidade é 22 mg/kg (base seca). Na Suécia, o preço da canola também é estabelecido pelo teor de clorofila no óleo, sendo que grãos de primeira qualidade correspondem a um óleo com um máximo de 30 ppm de clorofila total (DAHLÉN, 1973; MOUNTS et al., 1990).

Segundo Bohner (2010), são considerados no Canadá dois tipos de soja verde, tendo em vista a comercialização de grãos para extração de óleo. O primeiro caracteriza-se pela coloração verde na parte externa dos grãos, enquanto o interior permanece amarelo, sendo classificado como “Grau 2”. No outro tipo a coloração verde é encontrada por todo o grão, classificado como “danificado”. As sementes verdes são descontadas dos produtores de soja canadenses, em razão da presença de clorofila influenciar negativamente a qualidade do óleo extraído.

Estudos sobre os efeitos de vários níveis de sementes verdes sobre a qualidade fisiológica de lotes de diferentes cultivares de soja, indicaram índices superiores a 10% como impossibilitadores da comercialização como semente fiscalizada (COSTA et al., 2001). Já Pádua et al. (2007) constataram 9% de sementes verdes como a porcentagem segura para comercialização de lotes de soja e que estas sementes, em sua maioria, estão mortas ou originam plântulas anormais.

Índices superiores de germinação foram encontrados por Medina et al. (1997) nos tratamentos com remoção das sementes de soja esverdeadas e verdes. A remoção de sementes verdes de lotes de soja também foi estudada por França-Neto et al. (2007). Os autores concluíram que a classificação das sementes por tamanho, utilizando peneiras de tela plana, foi eficiente para reduzir a porcentagem de sementes esverdeadas nos lotes de sementes da cultivar Conquista; a maior porcentagem de sementes verdes (19%) foi constatada dentre a porção de sementes menores (inferior a 6,0 mm), em comparação com as sementes maiores (7,5 mm), que apresentavam apenas 5% de incidência de sementes verdes. A estratificação das sementes permite a seleção de lotes, tornando possível descartar aqueles com elevados índices de esverdeamento. Contudo, a mesa gravitacional foi testada e considerada ineficiente na separação de sementes esverdeadas dos lotes.

Trabalhando com dois lotes de sementes de soja, cultivar Conquista, com 11,8% e 37,4% de sementes verdes, Zorato et al. (2007) verificaram que as sementes verdes apresentaram baixa germinação, menor uniformidade no desenvolvimento das plântulas, alta taxa de deterioração, menor comprimento de plântulas, baixo peso de 1000 sementes e baixa emergência de plântulas em campo, independentemente do índice de sementes esverdeadas nos lotes, embora os piores resultados tenham sido observados com 37,4% de sementes verdes no lote.

A ocorrência de sementes de soja com coloração verde-escura intensa principalmente na área do eixo embrionário, foi relatada por Costa et al. (2001). Sementes com essas características são, geralmente, detentoras de elevados índices de deterioração por umidade que podem levar à redução da germinação, do vigor e da viabilidade.

Pádua et al. (2007) constataram reduções lineares de viabilidade, de germinação e de vigor da semente de soja com o aumento dos índices de semente verde; foi evidente, neste trabalho, que a semente esverdeada, com maiores índices de lixiviação de solutos, tem seus sistemas de membranas celulares desorganizados, fruto da maturação forçada e da morte prematura da planta.

Em sementes esverdeadas é nítida e preocupante a deterioração por umidade nas diferentes regiões das sementes. Existe a concordância da importância vital do eixo embrionário (plúmula e radícula) nas sementes; porém, os cotilédones, quando detentores de pigmento verde mais intenso, são seriamente comprometidos, com grande quantidade de células deterioradas, o que pode provocar danos na translocação de reservas para o eixo embrionário no momento da germinação (ZORATO, 2007). O mesmo autor afirma que o vigor, avaliado pela condutividade elétrica, confirmou a expectativa de menor integridade de membranas das sementes que degradaram parcialmente a clorofila.

Da mesma forma, Adams et al. (1983) constataram, em sementes de soja com maturação e secagem rápidas, que não degradaram a clorofila, lixiviação de grande quantidade de fosfato inorgânico durante a embebição, e de açúcares e proteínas solúveis, em relação às que secaram lentamente. Esses autores consideraram, ainda, a possibilidade de a secagem rápida romper membranas celulares e estruturas internas. Vieira e Krzyzanowski (1999) também relacionaram a quantidade de lixiviados na solução de embebição à integridade das membranas celulares. Caso as membranas tornem-se permeáveis, pode não

ocorrer a síntese de enzimas, a alongação celular e a divisão da célula (HARRINGTON, 1973).

Jalink et al. (1998) apontaram o estado de maturidade como um importante aspecto da qualidade de sementes e que as imaturas, ou não totalmente maduras, são geralmente de menor qualidade que as maduras. As modificações do vigor da semente ocorrem paralelamente à evolução da transferência de matéria seca da planta para as sementes, ou seja, a proporção de sementes vigorosas aumenta com o decorrer da maturação e atinge o máximo em época muito próxima, ou coincidente, com o máximo acúmulo de reservas (MARCOS FILHO, 2005).

A fluorescência da clorofila em tegumento de sementes foi proposta por Jalink et al. (1998) como um método para determinar a maturidade e a qualidade das sementes. Nesse estudo, as sementes de repolho (*Brassica oleracea*) foram divididas em sub-amostras com base nos sinais de fluorescência da clorofila das sementes individuais intactas. Os resultados mostraram que as sementes com a menor quantidade de fluorescência da clorofila apresentaram a maior porcentagem de germinação. No teste de deterioração controlada, as sementes com maior sinal de fluorescência da clorofila apresentaram germinação e porcentagem de plântulas normais muito baixas. As vantagens do método de fluorescência para determinar a maturidade da semente e qualidade incluem sua alta sensibilidade, a natureza não-destrutiva, além da alta velocidade em que a fluorescência é gerada e medida.

Suhartanto (2002), trabalhando com sementes de tomate (*Solanum lycopersicum*), constatou o importante papel da clorofila durante o desenvolvimento das sementes de forma que, nesta fase, baixas quantidades de clorofila provocaram a produção de sementes de baixa qualidade. Já, durante a maturação, o nível de clorofila foi negativamente relacionado com o desempenho das sementes. No entanto, em situações nas quais ocorreram distúrbios durante o processo de maturação, levando a uma degradação parcial da clorofila, não houve relação clara entre a quantidade do pigmento e o desempenho das sementes. O autor concluiu, ainda, que embora a clorofila seja requerida durante os estádios iniciais de desenvolvimento das sementes, sua presença é altamente indesejável durante a maturação.

A indústria, outro segmento da cadeia da soja, do mesmo modo, tem apresentado problemas decorrentes de recebimento de grãos ou sementes esverdeadas, em

razão da clorofila ser uma molécula prooxidante, reduzir a estabilidade oxidativa do óleo, além de diminuir a velocidade do processo de hidrogenação por bloquear os centros ativos do catalisador. Os óleos com elevado teor de clorofila apresentam coloração escura, tornando-se comercialmente inadequados, devido à alta taxa de rancificação e redução de sua vida de prateleira (ENDO et al., 1984; USUKI et al., 1984; WARD et al., 1992 e 1995; JALINK et al., 1999; SINNECKER, 2002).

Vários estudos indicaram a relação negativa entre a presença de sementes verdes e a qualidade de lotes de soja; contudo, ainda não existem informações claras sobre o efeito da clorofila, pigmento que confere a coloração verdes às sementes sobre a qualidade das mesmas.

4.4 Degradação da clorofila

Clorofila corresponde a um grupo de pigmentos verdes absorventes de luz e ativos na fotossíntese, abundantes nas plantas verdes. Todas as clorofilas têm uma complexa estrutura em anel que é quimicamente relacionada com os grupos porfirinas encontrados na hemoglobina e nos citocromos. Há, quase sempre, uma longa cauda de hidrocarboneto ligada à estrutura do anel (TAIZ & ZEIGER, 2004). A fotossíntese é um processo conduzido em duas etapas interdependentes e simultâneas: a fotoquímica ou reação luminosa e a etapa química ou reação de fixação do carbono. Os mais importantes pigmentos absorvedores de luz são as clorofilas, podendo haver também os pigmentos acessórios, como os carotenóides (β -caroteno e xantofila) e as ficobilinas (ficoeritrina e ficocianina). Os pigmentos que absorvem a luz estão arranjados em conjuntos ou feixes funcionais chamados de fotossistemas (LEHNINGER et al., 1995).

Segundo Bobbio & Bobbio (1989), a clorofila é uma mistura de duas substâncias relacionadas, clorofila *a* (verde azulada) e clorofila *b* (verde amarelada), encontradas sempre na proporção 3:1 (clorofila *a*: clorofila *b*), em folhas. São ésteres solúveis na maioria dos solventes orgânicos (etanol, acetona, benzeno, éter e clorofórmio), mas não solúveis em água. Sensíveis à luz, ao calor, ao oxigênio e à degradação química, absorvem luz vermelha e azul-violeta, refletem luz verde e ocorrem em cinco formas conhecidas (*a*, *b*, *c*, *d*,

e). Tanto em acetona como em éter etílico, ela é máxima a 428-430 nanômetros (nm) e 660-662 nm. Todas as plantas verdes contêm clorofila *a* e clorofila *b* (PORRA et al., 1989).

A degradação da clorofila é iniciada durante a senescência das plantas, por fatores endógenos e pode ser influenciada também por fatores externos como estresse hídrico, redução de luz, mudanças de temperatura, aumento do teor de etileno, ou por fatores internos, tais como aumento de permeabilidade da membrana e mudança de pH. Esses fatores interferem no processo normal, acelerando ou retardando a degradação da clorofila (HEATON & MARANGONI, 1996; TAKAMIYA et al., 2000).

Apesar da importância da transformação da clorofila em seus derivados durante o amadurecimento da soja, pouco se conhece sobre o mecanismo de degradação do pigmento na semente, durante o processo de maturação e armazenamento. Aparentemente, trata-se de um processo enzimático, evidenciado pelo aumento de clorofilídeos, embora acoplado a um mecanismo químico não enzimático, que resulta em aumento de feofitinas e outros derivados fitilados (HEATON & MARANGONI, 1996; MANGOS & BERGER, 1997; SUZUKI et al., 1999; SINECKER, 2002).

Alguns pesquisadores estudaram a degradação da clorofila durante o desenvolvimento de sementes de canola. Johnson-Flanagan e Thiagarajah (1990) demonstraram mudança da ultra-estrutura dos cloroplastos e degradação dos complexos clorofila-proteína quando o grau de umidade das sementes diminuiu e estas perderam a cor verde.

Segundo Hendry et al. (1987), o processo de degradação da clorofila envolve dois tipos de reações:

- a) A degradação Tipo I inclui a perda de magnésio e fitol, e as modificações das cadeias laterais da estrutura tetrapirrólica da clorofila originando feofitinas e feoforbídeos devido à ação de cinco enzimas. A seqüência na qual estas enzimas atuam sobre a clorofila é ainda incerta.
- b) A degradação do Tipo II envolve a clivagem do sistema de anel macrocíclico e subsequente degradação de fragmentos menores de carbono/nitrogênio. A reação do tipo II exige luz e oxigênio.

Por meio de estudos mais aprofundados, citados por Gossauer & Engel (1996), considerando a estrutura e os mecanismos do catabolismo da clorofila, tem sido demonstrado o envolvimento de duas enzimas, a clorofilase e a magnésio-chelatase, neste processo. Tal fato ficou evidenciado nos estudos de Pádua (2006), pela constatação de que o conteúdo de clorofilas *a*, *b* e total em sementes verdes de soja é inversamente proporcional à atividade da enzima clorofilase.

Heaton e Marangoni (1996) propuseram um mecanismo de degradação da clorofila em etapas. A primeira etapa corresponde à clivagem do grupo fitol da clorofila pela ação da enzima clorofilase, resultando na formação de clorofilídeo. Paralelamente pode ocorrer a remoção do íon Mg^{2+} em meio ácido, formando feofitina. O clorofilídeo, por sua vez, pode ser convertido em feoforbídeo pela perda do grupo fitol. Numa segunda etapa ocorre a clivagem do anel da porfirina, provavelmente pela ação da enzima oxigenase, formando compostos fluorescentes e incolores. A ação desta enzima requer um redutor como co-fator, tal como glucose-6-fosfato. Os compostos são exportados dos cloroplastos para o vacúolo, onde são convertidos em compostos não fluorescentes (rusty pigments). Esta etapa consiste em uma mudança da localização das duplas ligações, levando a uma perda da fluorescência. O produto final é incolor. Não é conhecido se, nesse momento, os compostos não fluorescentes são ainda degradados dentro do vacúolo ou se permanecem estáveis até a morte da célula.

Sinnecker (2002) sugere que a degradação da clorofila em sementes de soja ocorre primordialmente por um sistema enzimático, envolvendo as enzimas oxigenases, que atuam degradando o pigmento verde para compostos incolores, sendo o mecanismo o mesmo independente do estágio de maturação. No entanto, após a colheita, a degradação da clorofila é altamente dependente da temperatura do ar de secagem. Em secagem lenta à temperatura ambiente (25°C), o mecanismo de degradação parece ser semelhante ao observado durante a maturação no campo, enquanto na secagem em estufa a 40°C e 75°C a degradação ocorre por via enzimática e química e apenas por via química, respectivamente.

Nas folhas, os reguladores de crescimento (etileno, auxinas e ácido abscísico) aumentam a atividade da clorofilase, enzima envolvida na degradação da clorofila, enquanto outros reguladores (citocininas e giberelina) inibem tal atividade (DRAZKIEWICZ, 1994). Embora em geral a giberelina atue retardando a senescência (ABELES et al., 1989), Rodriguez et al (1987) mostraram que o GA_3 aumentou a degradação da clorofila,

possivelmente pela indução de outras enzimas tais como peroxidase, lipoxigenase ou oxidase. Também é possível que o aumento da degradação da clorofila por GA₃ seja devido a um incremento na acessibilidade das enzimas envolvidas na degradação da clorofila aos seus respectivos substratos.

O processo de degradação da clorofila é complexo e pode refletir ou não na qualidade do lote. Ainda existem fatores interferentes nesse processo que foram pouco elucidados. Alguns autores citaram que o etileno promoveu aumento na atividade das enzimas clorofilase e oxidases (SHIMOKAWA et al., 1978; YAMAUCHI et al., 1997), responsáveis pela degradação da clorofila e desaparecimento da cor verde, e também estimulou a carotenogênese, promovendo o aparecimento da cor amarela (STEWART & WHEATON, 1972). No entanto, Johnson-Flanagan e Spencer (1996) relataram que a atividade da clorofilase não é afetada pelo etileno de forma direta.

Da mesma forma, Ward et al. (1995) contataram correlação positiva entre a degradação da clorofila em sementes e a produção de etileno durante o amadurecimento, mas níveis mais elevados de etileno não pareceram controlar a taxa de degradação da clorofila. O pico da produção de etileno iniciou-se após o início da perda de umidade e a degradação da clorofila, sugerindo que o etileno endógeno não foi responsável por desencadear estes eventos.

Comumente, o desaparecimento da clorofila é um dos critérios que indicam que as culturas estão amadurecendo. Vários autores têm estudado a cinética de síntese e degradação da clorofila em sementes de diversas espécies. Alguns estudos basearam-se em indicadores do teor de clorofila, utilizando diversas técnicas com extração por solventes orgânicos associados à espectrofotometria, fluorescência de clorofila, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de massa, ressonância magnética nuclear (BREEMEN et al., 1991; JALINK et al., 1998; SCHWARTZ & LORENZO, 1990; SINNECKER, 2002; SUHARTANTO, 2002).

Apesar da evidente importância da degradação da clorofila durante o processo de maturação das sementes oleaginosas, pouco se conhece sobre os mecanismos que atuam na degradação desse pigmento nas sementes, bem como seus efeitos sobre a qualidade das mesmas.

4.5 Danos oxidativos

O estresse oxidativo em sistemas biológicos, incluindo os vegetais, é resultante de uma superprodução das espécies reativas do metabolismo de oxigênio (ERMOS), tais como radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila (OH^{\cdot}), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2) (SCANDALIOS, 1993; SMIRNOFF, 1993; FOYER et al., 1994; THÉRON et al., 2000). Como consequência, as ERMOS causam peroxidação de lipídios, modificações protéicas, rompimento das cadeias de DNA, destruição de clorofilas e extravasamento iônico, entre outros, de modo que tais eventos podem culminar com a morte celular (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1984; BAKER & ORLANDI, 1995; GIARDI et al., 1997; BELIGNI & LAMATTINA, 1999; FERREIRA, 2007; MOLLER et al., 2007).

As ERMOS podem ser utilizadas como indicadores celulares de estresse e como mensageiros secundários envolvidos na sinalização de resposta ao estresse (Laloi et al., 2004). Sendo assim, as células das plantas possuem dois diferentes mecanismos para regular a concentração de ERMO intracelular; um que possibilita fina modulação de baixos níveis de ERMO para intensificar a sinalização e outro que possibilita a desintoxicação do excesso de ERMO, especialmente durante a condição de estresse (MITTLER, 2002).

Nesse contexto, o sistema natural de defesa antioxidante nos vegetais inclui três classes gerais: (a) antioxidantes lipossolúveis associados às membranas, como α -tocoferol e β -caroteno; (b) redutores hidrossolúveis, como o tripeptídeo glutationa (GSH) e o ascorbato; e (c) enzimas antioxidantes, tais como superóxido dismutases (SODs), catalase (CAT), peroxidases (PODs), ascorbato peroxidase (APX), glutationa peroxidase (GPX) e glutationa redutase (GR) (ELSTNER, 1982; WINSTON, 1990; SMIRNOFF, 1993; SIES, 1997; RAO & DAVIS, 1999; DAVIS & SWANSON, 2001; MITTLER, 2002; MISRA & GUPTA, 2006; SUN et al., 2007). As glutationa S-transferases (GSTs) atuam na proteção das plantas submetidas a estresses (DROOG et al., 1995; GRONWALD & PLAISANCE, 1998), podendo também ser consideradas como enzimas antioxidantes (FLURY et al., 1998; POLIDOROS & SCANDALIOS, 1999; DAVIS & SWANSON, 2001).

Existem diversos indicadores bioquímicos de estresse oxidativo, dentre os quais, teores de lipoperóxidos e pigmentos fotossintéticos. A formação de lipoperóxidos, que é uma das consequências da produção de ERMOS, é um indicador utilizado para avaliar o

nível de estresse oxidativo ocorrido nas plantas (HUNG & KAO, 2003; VERMA & DUBEY, 2003). A importância das ERMOS em causar alterações nos lipídios tem levado a numerosas pesquisas para determinar o melhor marcador de estresse oxidativo em tecidos e fluidos biológicos (THÉRON et al., 2000).

Aumentos dos teores de lipoperóxidos têm sido relatados em plantas submetidas a severo estresse hídrico (BAISAK et al., 1994), altas temperaturas (BECANA et al., 2000), radiação ultravioleta (MALANGA & PUNTARULO, 1995) e toxidez por cádmio e zinco (PRASAD et al., 1999; SHAH et al., 2001). Contudo, as plantas possuem diferentes sistemas de defesa contra os estresses ambientais (BOR et al., 2003), o que lhes permitem adaptar-se para minimizar os danos que podem ocorrer pela ação das ERMOS (RADETSKI et al., 2000).

Aceptores de elétrons do fotossistema I fazem a mediação da transferência de elétrons para o oxigênio, gerando ERMOS que peroxidam os lipídios das membranas e causam a cascata de reações oxidativas, resultando na inativação de enzimas, peroxidação de lipídios, degradação de proteínas, quebra da fita de DNA e destruição de pigmentos (PRASAD & RENGEL, 1998).

Células fotossintéticas estão constantemente expostas ao estresse oxidativo, resultante do acúmulo de ERMOS durante vários processos metabólicos básicos (FOYER, 1997). Sob condições naturais de estresse, diferentes ERMOS podem ser produzidas simultaneamente nos cloroplastos. Entretanto, é difícil testar a possível atividade biológica de cada uma dessas ERMOS separadamente (LALOI et al., 2004).

As enzimas e sistemas de transporte de elétrons que geram O_2^- presumivelmente servem também de fontes indiretas de 1O_2 . Nas plantas, a clorofila também pode ser uma fonte primária de 1O_2 . Após a iluminação, a clorofila age como fotossensibilizador, transferindo energia de excitação para a produção de 1O_2 (RABINOWITCH & FRIDOVICH, 1983). É provável que a formação de oxigênio singleto a partir de clorofila é reforçada durante a senescência com o declínio de transporte de elétrons e, portanto, a clorofila do centro de reação é menos capaz de dispor de sua energia de excitação.

Reforçando este fato, Endo et al. (1984) afirmaram que os produtos de oxidação da clorofila podem ter efeitos prooxidantes ou atividades fotooxidativas e a clorofila pode reagir com compostos intermediários de peroxidação de lipídios e peróxidos. Wilson e

McDonald (1986) foram consistentes no relato de que a peroxidação de lipídios é uma das causas de deterioração das sementes e está correlacionada com o declínio de vigor e viabilidade.

O efeito de oxidação causado pela clorofila pode, contudo, ser atenuado pela presença de carotenóides nas sementes. Uma função importante dos carotenóides é agir como fotoprotetor na prevenção de danos fotooxidativos (COGDELL, 1988; RAU, 1988).

Cogdell (1988) afirma que quando a clorofila é excitada pela luz, ocorre a produção de radicais livres. Contudo, os carotenóides são capazes de prevenir a ação reativa dos oxigênios singlete produzidos pela clorofila. Portanto, sementes que degradaram uma porção maior de clorofila durante a maturação acumularam, proporcionalmente, mais carotenóides capazes de combater o estresse oxidativo e, por isso, essas sementes apresentam maior qualidade e longevidade no armazenamento quando comparadas àquelas que degradaram clorofila em menor quantidade.

Assim, a maturidade das sementes pode ser importante para reduzir a possibilidade da clorofila produzir radicais livres, que podem causar danos oxidativos (JALINK et al., 1999) determinantes na longevidade das sementes.

Segundo Hendry (1993) a perda de viabilidade, associada com o envelhecimento, tem sido explicada em termos de degradação da membrana que, por sua vez, tem sido associada à perda de lipídios, alterações na saturação dos lipídeos, ocasionadas por peroxidação. O autor afirma, ainda, que os lipoperóxidos têm sido um indicador de dano oxidativo às membranas amplamente utilizado, existindo uma multiplicidade de métodos, muitas vezes que determinam diferentes produtos de peroxidação, e que variam muito em sensibilidade e especificidade.

A peroxidação lipídica das membranas resulta em uma série de eventos independentes. Ocorrem abstrações de hidrogênio a partir de lipídios da membrana biológica diminuindo sua fluidez. Associado com mudanças na estrutura das membranas estão a inativação de proteínas ligadas a membrana, incluindo proteínas de receptoras e de transporte, e mudanças na permeabilidade da membrana. Os hidroperóxidos de lipídeos se decompõem em etano e vários aldeídos citotóxicos e insaturados, de forma acelerada por metais de transição. Concretiza-se assim, a deterioração da membrana (HENDRY, 1993).

Oxidações de ácidos graxos insaturados são apontadas como reação primária no processo de envelhecimento, por produzirem radicais livres que atacam posteriormente lipídios, proteínas e ácidos nucléicos numa reação em cadeia (HARRINGTON, 1973; VERTUCCI & LEOPOLD, 1987). Reações de oxidações, no processo de envelhecimento envolvem enzimas, tal como lipoxidase e, enzimas oxidativas que podem funcionar em baixa atividade da água (VERTUCCI & LEOPOLD, 1987). Esses fatos tornam mais compreensível o declínio do potencial fisiológico das sementes, sejam elas esverdeadas ou não, com o período de armazenamento.

5 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi realizada no Departamento de Produção Vegetal – Agricultura, da Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Campus de Botucatu. Os tratamentos constaram de 67 lotes de soja, de diferentes cultivares, provenientes de áreas de produção dos estados do Mato Grosso, de São Paulo e do Paraná, com variações nos graus de retenção de clorofila (Figura 1).

Para cada lote foi determinada a porcentagem de sementes verdes, utilizando-se método visual de classificação de cores, com auxílio da carta de Munsell, e o teor de clorofila, através de extração química pelo método de Arnon (1949) adaptado no presente estudo. O Fluorômetro foi utilizado para verificar a atividade fotossintética das sementes com presença de clorofila. Foram avaliados, também, os danos oxidativos sofridos por cada lote através da determinação do teor de lipoperóxidos. Todos os parâmetros foram relacionados com a qualidade das sementes avaliada em três épocas: época inicial, logo após o recebimento das sementes, e após três e seis meses de armazenamento.

As características dos lotes avaliados são apresentadas nas tabelas 1, 2, 3.



FIGURA 1. Níveis de sementes verdes encontrados nos lotes analisados: A) lote da cultivar BRS 184 com 0% de sementes verdes ou esverdeadas; B) lote da cultivar BRS Valiosa com 50% de sementes verdes ou esverdeadas; C) lote da cultivar BMX Titon RR com 62% de sementes verdes ou esverdeadas.

Tabela 1. Características dos 24 lotes de soja provenientes do estado do Mato Grosso.

Lotes	Cultivares	Sementes verdes (%)	Teor de clorofila (ppm)	Teor de lipoperóxidos ($\mu\text{mol/mg}$)	Geminação época inicial (%)	Germinação 3 meses (%)	Germinação 6 meses (%)	Peso 1000 (g)	Teor de água época inicial (%)	Teor de água 3 meses (%)	Teor de água 6 meses (%)
1	ZMG 123 RR	32	1,11	12,39	0	31	35	118,3	10,3	8,7	6,0
2	ZMG 123 RR	62	3,25	8,54	4	84	76	86,9	10,4	8,6	5,6
3	ZMG 123 RR	8	0,00	5,59	74	66	37	126,3	10,3	9,1	6,1
4	ZMG 123 RR	10	0,85	14,60	66	80	53	129,4	10,3	9,3	6,0
5	TMG 123 RR	20	0,00	12,80	90	88	46	131,1	10,3	9,4	6,1
6	TMG 123 RR	6	0,00	13,10	77	57	37	126,1	10,4	9,3	6,0
7	TMG 123 RR	34	4,45	6,11	79	74	48	119,0	10,3	9,1	6,1
8	TMG 123 RR	50	1,17	7,48	83	88	74	87,0	10,3	9,8	6,3
9	BRS Valiosa	0	1,85	5,91	92	88	79	138,1	10,3	9,2	6,5
10	BRS Valiosa	22	1,24	4,84	90	88	80	137,5	10,5	9,4	6,5
11	BRS Valiosa	80	3,93	5,05	3	77	68	139,9	10,2	9,3	6,5
12	TMG 803	44	5,64	8,24	42	50	27	134,7	10,6	8,7	6,4
13	TMG 803	28	2,01	6,34	90	81	57	136,4	10,5	9,0	6,4
14	TMG 803	14	2,80	6,77	77	76	55	160,4	10,5	9,4	6,3
15	BRS Valiosa	40	1,90	5,46	91	83	74	168,8	10,2	8,3	5,9
16	TMG 803	22	1,60	7,14	85	75	56	135,5	10,3	8,4	6,0
17	BRS Valiosa	20	0,81	6,77	90	91	76	138,0	10,4	9,0	6,2
18	BRS Valiosa	50	1,88	6,67	96	93	84	167,5	10,3	8,2	6,0
19	BRS Valiosa	64	0,86	5,55	84	84	60	136,9	10,3	8,6	6,1
20	TMG 803	38	1,14	5,66	25	71	44	136,5	10,6	9,0	6,1
21	TMG 803	26	3,68	7,46	78	79	55	164,1	10,5	8,7	6,1
22	BRS Valiosa	30	1,72	5,61	95	90	75	136,8	10,6	8,6	6,1
23	TMG 803	26	3,16	9,29	92	71	51	134,1	10,6	9,2	6,1
24	TMG 803	42	2,13	6,41	90	82	63	134,4	10,6	8,1	6,0

Tabela 2. Características dos 25 lotes de soja provenientes do estado de São Paulo.

Lotes	Cultivares	Sementes verdes (%)	Teor de clorofila (ppm)	Teor de lipoperóxidos (μmol/mg)	Geminação época inicial (%)	Germinação 3 meses (%)	Germinação 6 meses (%)	Peso 1000 (g)	Teor de água época inicial (%)	Teor de água 3 meses (%)	Teor de água 6 meses (%)
1	MSOY 6101	44	2,05	7,3548	0	50	14	130,0	10,5	8,9	5,8
2	MSOY 6101	48	1,68	5,9570	3	59	9	176,9	10,4	9,6	6,1
3	MSOY 6101	40	2,26	6,1505	6	29	0	207,4	10,3	8,6	6,1
4	MSOY 6101	46	0,00	7,7204	54	70	19	193,8	10,4	9,0	6,1
5	MSOY 6101	42	1,68	6,1505	97	91	74	151,5	10,6	9,4	6,2
6	CD 226 RR	38	1,77	14,0430	45	30	3	126,6	10,8	10,4	6,1
7	CD 208	18	1,28	9,2258	85	93	81	138,8	10,7	9,4	6,5
8	BRS 284	20	4,50	14,4086	64	47	13	151,0	10,3	9,1	6,4
9	CD 224	22	1,08	1,6559	83	88	69	120,0	10,9	9,1	6,0
10	CD 208	24	1,56	1,0968	84	91	77	133,5	10,9	9,6	6,2
11	CD 208	48	1,69	4,7957	76	69	29	135,1	10,7	9,5	6,5
12	CD 208	44	0,96	4,3441	63	54	46	104,1	10,6	9,1	6,3
13	TMG 3003	40	2,40	4,6882	20	24	6	131,3	10,7	9,6	6,2
14	M 7908 RR	26	1,65	6,2366	88	91	82	154,5	10,7	8,6	6,1
15	M 7908 RR	16	1,37	5,6989	87	95	81	167,3	10,7	8,9	6,2
16	M 7908 RR	18	1,75	6,3441	85	93	77	168,5	10,5	9,2	6,2
17	BRS Valiosa RR	54	1,74	7,1398	88	81	62	142,4	10,5	9,4	6,2
18	BRS Favorita RR	66	2,51	7,4624	68	84	64	136,3	10,8	8,9	6,3
19	BRS Favorita RR	56	2,20	6,5591	83	85	70	156,2	10,7	9,0	6,3
20	BRS MG 68	44	1,89	5,5699	92	96	88	140,1	10,8	9,4	6,2
21	BRS MG 68	50	3,51	5,6129	93	96	78	138,6	11,0	9,5	6,1
22	BRS MG 68	56	3,57	5,1828	95	94	87	138,7	10,8	9,2	6,1
23	M 7908 RR	62	5,37	4,9247	81	87	74	147,4	11,2	9,5	6,2
24	MSOY 8001	46	2,97	5,4409	82	90	80	139,8	10,8	9,5	6,2
25	CD 224	38	1,70	11,9355	91	79	51	113,8	10,8	8,6	5,9

Tabela 3. Características dos 18 lotes de soja provenientes do estado do Paraná.

Lotes	Cultivares	Sementes verdes (%)	Teor de clorofila (ppm)	Teor de lipoperóxidos ($\mu\text{mol/mg}$)	Geminação época inicial (%)	Germinação 3 meses (%)	Germinação 6 meses (%)	Peso 1000 (g)	Teor de água época inicial (%)	Teor de água 3 meses (%)	Teor de água 6 meses (%)
1	BRS 245	58	2,14	7,61	0	60	51	104,8	11,8	9,2	6,2
2	BRS 255	68	1,55	7,59	20	74	45	165,4	11,4	9,5	6,2
3	BMX Titon	46	3,87	7,05	30	21	12	175,5	11,6	9,5	6,2
4	Don Mário 701	48	0,73	9,23	82	65	33	124,3	11,4	9,5	6,2
5	BRS 284	48	0,00	10,56	80	47	44	116,0	11,3	8,8	6,0
6	BRS 184	56	0,81	12,69	65	44	41	175,3	11,1	9,2	6,2
7	BMX Titon RR	36	1,72	8,80	85	69	49	149,6	11,8	9,6	6,1
8	BMX Titon RR	62	4,54	7,85	38	18	3	151,4	11,4	9,3	5,9
9	NK 7059 RR	52	4,59	6,95	73	77	56	178,2	11,6	9,5	6,1
10	NK 7059 RR	50	1,47	6,24	81	88	80	185,3	11,4	9,6	6,2
11	NK 7059 RR	56	4,63	9,01	68	35	24	176,4	11,3	9,3	6,1
12	NK 7059 RR	40	4,13	7,48	27	24	16	172,2	11,1	9,0	6,1
13	BRS 283	60	3,74	4,67	77	38	37	129,9	11,0	9,2	6,2
14	BRS 283	66	3,10	5,18	73	39	43	133,6	10,9	9,0	6,1
15	BRS 283	48	0,00	7,55	72	50	32	131,9	11,0	9,1	6,1
16	BRS 184	84	0,68	10,52	76	70	54	138,7	11,2	9,8	6,2
17	BRS 255	90	1,96	11,35	73	44	25	135,2	11,4	9,5	6,2
18	CD 214 RR	50	0,91	12,28	60	30	9	128,7	11,6	9,5	6,8

5.1 Atividade fotossintética

Para medir a fluorescência da clorofila em sementes de soja, foi utilizado o fluorômetro portátil (PEA - Plant Efficiency Analyser, Hansatech, King's Lynn, Norkfolk, UK). O aparelho capta a atividade de elétrons do fotossistema II utilizado, normalmente, para avaliação em folhas.

No presente estudo levantou-se a hipótese de que seria possível avaliar se a clorofila nas sementes é fotossinteticamente ativa, ou não, com a utilização do fluorômetro, baseando-se nos estudos de Suhartanto (2002). Para tanto, foram utilizadas 100 sementes secas, selecionadas aleatoriamente dentro de cada lote, que passaram por análise individual, não destrutiva. As sementes contendo com baixo teor de água têm reduzida atividade metabólica; assim, procedeu-se embebição das mesmas na expectativa de que a ativação do metabolismo concorreria para elevação da atividade fotossintética da clorofila.

Para proceder a embebição, utilizou-se amostras de 100 sementes de cada lote, as quais foram acondicionadas em caixas plásticas e colocadas diretamente em água destilada. Estas foram mantidas em câmaras BOD à 25°C na presença e ausência de luz por 4, 8, 12 e 24 horas. Após cada período foi realizada leitura com o fluorômetro. Os dados computados foram referentes aos valores de leitura de ETR (taxa de transporte de elétrons) do aparelho.

5.2 Porcentagem de sementes verdes

A avaliação visual da coloração foi realizada pelo sistema de notação de cores de Munsell (1976), sob luz natural (luz do dia), por um único observador. De cada lote de sementes previamente homogeneizado, foram retiradas, aleatoriamente, 50 sementes. Suas cores foram avaliadas por comparação com as cores da carta de Munsell. Os resultados obtidos após a avaliação visual foram expressos em “Hue” (tonalidade ou matiz, determinadas pelo comprimento de onda), “Value” (valor, indica brilho ou intensidade luminosa) e “Chroma” (saturação da cor).

As cores indicadas nas cartas individuais de tonalidade ou matiz (“Hue”) constante são designadas por um símbolo no canto superior direito do cartão. Neste estudo a carta utilizada foi a 5Y. Verticalmente, as cores tornam-se sucessivamente mais escuras da parte superior para a inferior de cada carta, de forma equivalente e visível de uma etapa para outra. Horizontalmente, as cores aumentam em saturação (“Chroma”) da esquerda para a direita e sua escala é indicada na parte inferior. A notação valor (“Value”) é indicada pela escala vertical à esquerda da carta. A carta utilizada está representada na Figura 2.

As sementes de soja dos diferentes lotes foram classificadas em “Values”, que variaram do 8 ao 4, e em “Chroma” variável de 4 a 6.

Todas as sementes que apresentaram “Value” 8, independentemente da notação “Chroma”, foram consideradas amarelas, ou seja, ausentes de qualquer pigmento ou tonalidade verde. As sementes que variaram em “Value” de 7 a 4, independente de “Chroma”, foram consideradas verdes. Portanto, a porcentagem de sementes verdes foi computada considerando-se qualquer nuance da cor verde. Os exemplos são apresentados na Figura 3.

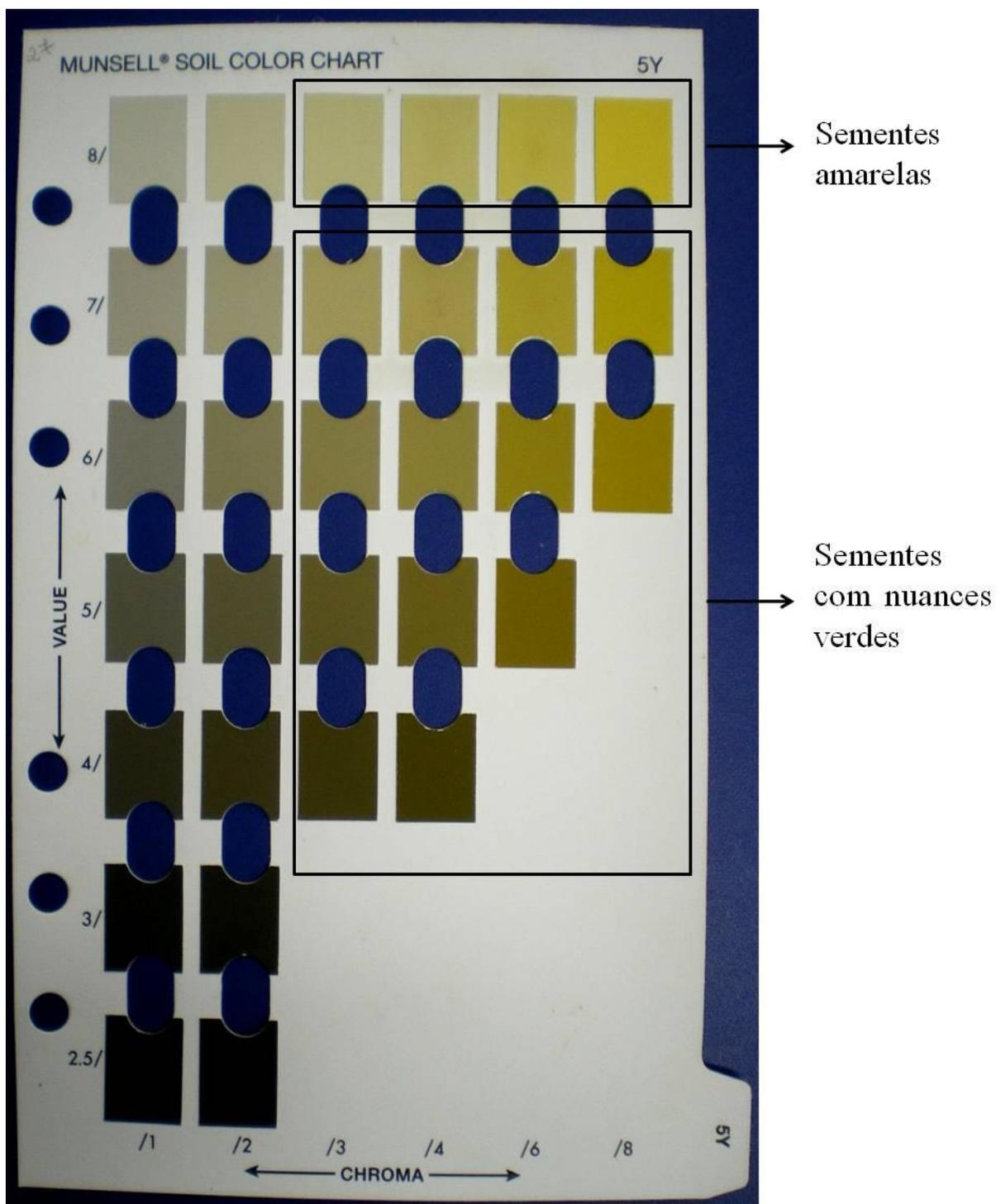


FIGURA 2. Carta de Munsell utilizada na classificação visual da porcentagem de sementes verdes nos lotes de soja (MUNSELL, 1976).

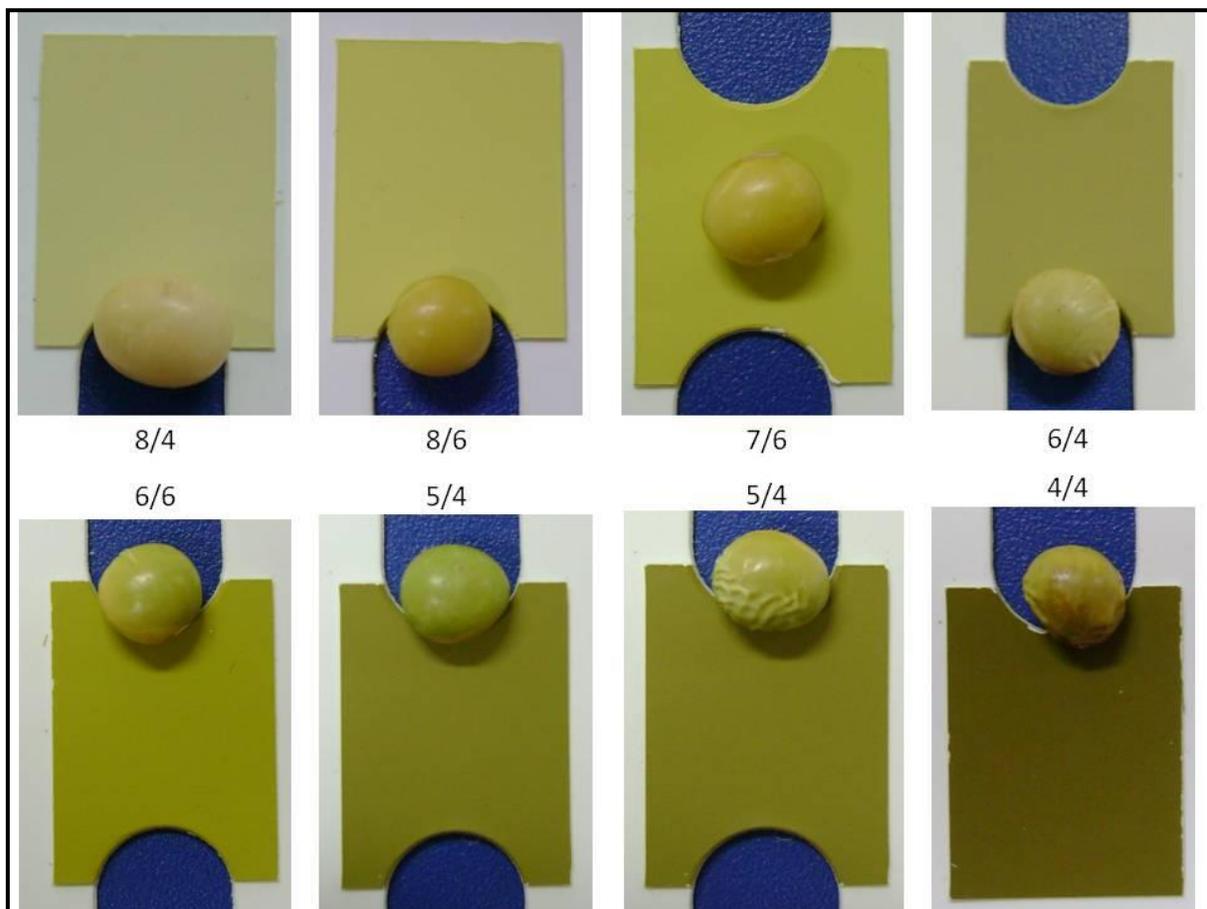


FIGURA 3. Exemplos de classificação da coloração das sementes de soja segundo a Carta de Munsell (MUNSELL, 1976).

5.3 Teor de clorofila total

As amostras para determinação dos teores de clorofila foram obtidas pela moagem de cerca de 100 sementes, adicionando-se nitrogênio líquido mais uma alíquota de polyvinyl pyrrolidone (PVP). Em seguida as amostras foram acondicionadas em recipiente de plástico preto e mantidas em deep freezer a -80°C , até o momento da manipulação.

Para a determinação da concentração de clorofila em cada lote foi utilizada a metodologia de Arnon (1949), adaptada de forma a possibilitar a extração e determinação dos pigmentos em sementes. O procedimento de extração foi realizado com cuidados para minimizar os efeitos da luz, da temperatura e da ação enzimática sobre a degradação da clorofila, protegendo-se as amostras contra a incidência de luz e utilizando-se solventes gelados.

A extração dos pigmentos verdes foi realizada em duas repetições, sendo que cada uma delas foi dividida antes da leitura em espectrofotômetro, originando quatro repetições. Amostras de dois gramas foram homogeneizadas (turax) por 10 minutos a aproximadamente 4.000 rpm, com 20ml de solução gelada de acetona (80%) e tampão Tris-HCl (20%).

Durante todo o período de homogeneização as amostras foram mantidas imersas em recipiente com gelo para evitar a evaporação da solução. Após este processo, o sobrenadante foi retirado e centrifugado por 5 minutos a 2000 rpm em temperatura de 4°C. As amostras foram novamente transferidas para frascos limpos e armazenadas em congelador (-20°C) até a leitura da absorbância em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 663nm e 645nm. O cálculo do conteúdo de clorofila foi realizado conforme as equações:

$$\text{Clorofila a} = [(12,7 \cdot A_{663}) - (2,69 \cdot A_{645})]$$

$$\text{Clorofila b} = [(22,9 \cdot A_{645}) - (4,68 \cdot A_{663})]$$

$$\text{Clorofila total} = [(20,2 \cdot A_{645}) + (8,02 \cdot A_{663})]$$

Onde: A = absorbância no comprimento de onda subscrito

Os resultados obtidos são expressos em miligrama por litro (mg l^{-1}), mas para análise foram transformados para ppm ($\mu\text{g/g}$), forma em que o teor de clorofila é, mais comumente, expresso. Para análise dos resultados, no entanto, utilizou-se apenas o teor de clorofila total.

5.4 Determinação do teor de lipoperóxidos

O teor de lipoperóxidos foi determinado de acordo com a técnica descrita por Heath & Packer (1968), citados por Rama Devi & Prasad (1998), no Laboratório de Bioquímica de Plantas do Departamento de Química e Bioquímica - IB da Universidade Estadual Paulista (UNESP/Botucatu). As amostras utilizadas foram descritas no item 4.1.3. Foram utilizados três repetições de 0,5g da amostra de sementes moídas às quais foram adicionados 5mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tricloroacético (TCA) 10% e incubadas em banho-maria a 90°C por uma hora. Após resfriamento em banho de gelo, o homogeneizado foi centrifugado a 5.000 giros por 25 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido a leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 560 e 600 nm. Para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($155 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos em μmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) por mg^{-1} de matéria fresca.

5.5 Avaliação da qualidade das sementes

Para avaliação da qualidade das sementes foram empregadas as seguintes determinações:

Teor de água: o teor de água foi determinado com duas repetições de 20 sementes, pelo método da estufa elétrica de desidratação, sem ventilação forçada, a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 24 horas, conforme metodologia descrita nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Peso de mil sementes: o peso de mil sementes foi efetuado mediante a pesagem de oito repetições de 100 sementes, calculando-se o coeficiente de variação e, não excedendo a 4%, representou a média das mesmas conforme instruções constantes nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

Germinação: a germinação foi avaliada em quatro repetições de 50 sementes por tratamento, dispostas em rolos de papel toalha, umedecidos com água destilada correspondente a 2,5 vezes a massa do papel seco. Os rolos foram levados para um germinador regulado a temperatura de 25°C, na ausência de luz por 8 dias. A avaliação constou de duas contagens, aos 5 e aos 8 dias, sendo computadas as porcentagens de plântulas normais, anormais e sementes mortas, segundo Brasil (2009).

Envelhecimento acelerado: o teste de envelhecimento acelerado foi realizado pelo método de caixas plásticas, onde, para cada tratamento, as sementes foram dispostas sobre a tela no interior das mesmas, em camada única, sem entrarem em contato com os 40 mL de água destilada contidos no fundo. As caixas foram fechadas e mantidas a 41°C por 48 horas no interior de câmara de germinação. Imediatamente após o término do período de envelhecimento, quatro repetições de 50 sementes, em rolos de papel, foram avaliadas quanto à germinação, como descrito anteriormente, porém em contagem única, aos 5 dias após a semeadura (MARCOS FILHO, 1999). O teor de água das sementes foi novamente determinado após o período de envelhecimento.

Condutividade elétrica: a condutividade elétrica foi avaliada com quatro repetições de 50 sementes de cada tratamento, com massas conhecidas, colocadas em copos plásticos com capacidade de 200 mL, adicionando-se 75 mL de água destilada. Os copos foram mantidos em germinador regulado a 25°C por 24 horas para, a seguir, proceder-se a leitura com condutivímetro (VIEIRA & KRZYZANOWSKI, 1999).

Comprimento de plântulas: a avaliação do comprimento de plântulas foi realizada em rolo de papel, conforme indicado para o teste de germinação, empregando-se quatro repetições de 10 sementes. A semeadura foi efetuada sobre uma linha traçada no terço superior do papel, no sentido transversal. Os rolos, embalados em sacos plásticos, foram acondicionados verticalmente em germinador (NAKAGAWA, 1994) e mantidos por cinco dias a 25°C. Decorrido esse período, as plântulas normais foram medidas com auxílio de régua graduada, considerando a extremidade da radícula à inserção dos cotilédones. O comprimento médio da plântula foi calculado pelo quociente da soma das medidas tomadas em cada repetição pelo número de sementes empregadas.

Massa seca de plântulas: a massa seca das plântulas foi determinada retirando-se os cotilédones das plântulas obtidas no teste de comprimento de plântulas descrito

anteriormente e levando-as, em sacos de papel, para secagem em estufa com circulação de ar à temperatura de 80°C durante 24 horas (NAKAGAWA, 1994).

5.6 Análise dos dados

Os lotes foram analisados em função da sua origem (estados do Mato Grosso, de São Paulo e do Paraná) e todas as variáveis foram submetidas ao teste de correlação simples, aos níveis de 1% e 5% de probabilidade.

Com os dados relativos ao teor de clorofila total presente nos lotes de sementes de cada região analisada foram elaboradas curvas de distribuição de frequências não acumuladas. A construção das curvas de frequências foi baseada no modelo Gompertz ($FN = c \cdot e^{(a - bc \cdot X - e^{(-b \cdot c \cdot X)})}$), conforme indicação de Velini (1995). O deslocamento da curva ao longo do eixo x é representado pelo módulo do parâmetro “b”, e a inclinação ou concavidade da curva em relação à frequência acumulada pelo parâmetro “c”.

Para melhor visualização dos resultados, optou-se por apresentar as frequências não-acumuladas que correspondem à derivada primeira do modelo e que permite a interpretação biológica dos resultados obtidos neste trabalho. Foram determinados, também, com base no modelo de Gompertz, as medidas de posição (moda, media e mediana) e de dispersão (amplitude, variância, desvio padrão, coeficientes de curtose e assimetria, nível de confiança e coeficiente de variação) dos dados analisados. A precisão do ajuste dos dados no modelo de Gompertz foi avaliada pelos coeficientes de determinação (R^2) das equações, com auxílio do software estatístico SAS.

Para análise dos lotes em geral (não agrupados por região), foi utilizado teste de correlação simples, relacionando-se todos os parâmetros avaliados entre si, pela utilização do programa Estatística.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Atividade fotossintética das sementes

A fluorescência da clorofila e o envolvimento desse pigmento na atividade fotossintética das sementes de soja foram avaliados através do fluorômetro. No entanto, não foi possível obter leituras com o aparelho.

Uma hipótese foi levantada no decorrer do teste: as sementes avaliadas encontravam-se desidratadas e, por isso, com atividade metabólica bastante baixa; a clorofila, nessa situação, também poderia encontrar-se metabolicamente inativa. Na tentativa de ativar o metabolismo das sementes, procedeu-se a embebição destas em água, para posterior avaliação com o fluorômetro, sem ter sido obtido êxito na iniciativa.

A distribuição de pigmentos verdes nas sementes dos diferentes lotes foi variável. Em alguns casos, o pigmento estava distribuído por todas as estruturas da semente: tegumento, cotilédones e eixo embrionário. Em outros casos, as sementes tinham o tegumento amarelo com uma distribuição interna bastante irregular de coloração verde (Figura 4). Sendo assim, é possível que a metodologia não tenha sido capaz de detectar a atividade fotossintética da clorofila quando localizada somente no interior das sementes, situação representada pela maioria delas.



FIGURA 4. Semente de soja apresentando degradação da clorofila no tegumento e retenção do pigmento nos cotilédones.

Com os resultados observados, inferiu-se que, nas condições em que as sementes analisadas se encontravam, a clorofila apresentava-se fisiologicamente inativa.

A dedução suporta o relato de Jalink et al. (1998), que constataram presença de clorofila fotossinteticamente inativa uma vez que o metabolismo das sementes de couve-flor apresentava-se bastante reduzido devido a secagem. Assim, contrariamente às folhas e frutos úmidos, as sementes não apresentam a chamada “fluorescência variável” que é decorrência da atividade fotossintética e que, geralmente, é medida com fluorômetro através de modulação de amplitude de pulso (PAM) (SCHREIBER, 1986).

Cabe destacar, por outro lado, resultados de alguns estudos indicativos de clorofila fotossinteticamente inativa e funcional em sementes em desenvolvimento. Em sementes jovens de tomate foi constatada presença de clorofila em forma ativa, como

demonstrado com a utilização do fluorômetro (Suhartanto, 2002); foi concluído a funcionalidade do fotossistema II nos cloroplastos de sementes de tomate em desenvolvimento. O potencial de assimilação de CO₂ foi comprovado por um pequeno aumento da atividade da Rubisco entre 30 e 40 dias após o florescimento (DAF), coincidente com o pico no conteúdo de amido verificado em torno de 42 DAF. Nos estágios posteriores de desenvolvimento o nível de atividade da rubisco foi desprezível, assim como a atividade fotossintética e a fluorescência da clorofila das sementes.

Apuya et al. (2001) demonstraram que embriões de *Arabidopsis* exigem cloroplastos funcionais para o seu desenvolvimento normal. A clorofila presente nas sementes em desenvolvimento pode ser usada nas reações fotossintéticas para gerar ATP e NADPH necessários para a conversão do suprimento materno de sacarose em ácidos graxos para a síntese e armazenamento de óleo (SINGAL et al., 1987; ASOKANTHAN et al., 1997).

Sugere-se, portanto, que as sementes avaliadas, mesmo quando detentoras de pigmento verde, não possuíam atividade fotossintética, por inatividade da clorofila. Entretanto, ressalta-se a necessidade de testes mais específicos, como avaliação de atividade de enzimas relacionadas à rota fotossintética para se afirmar, com segurança, que as sementes de soja maduras, contendo clorofila, não realizam fotossíntese.

6.2 Ocorrência de sementes verdes em diferentes regiões

Alguns autores relataram a ocorrência de sementes verdes em lotes de soja produzidos em algumas regiões brasileiras, nos últimos anos agrícolas, como um grave problema e motivo de preocupação aos produtores. Costa et al. (2001) analisaram lotes de soja produzidos em Goiás e Minas Gerais com presença de sementes verdes, enquanto Zorato et al. (2007) relataram sementes esverdeadas no Estado de Mato Grosso como causa de prejuízos em campo, resultado de sua baixa qualidade.

No presente estudo os lotes de sementes de soja analisados são provenientes de diferentes localidades nos Estados do Mato Grosso, de São Paulo e do Paraná, circunstância que sugere comportamento fisiológico distinto dos mesmos, justificável pelas diferenças climáticas ocorridas durante a fase de maturação das sementes.

Nas Tabelas de 4 a 12 são apresentadas análises de correlação simples entre os parâmetros de qualidade de sementes e os teores de clorofila e a porcentagem de sementes verdes dos lotes para cada região em três épocas de análise. Observou-se comportamento bastante variado dos lotes de cada região.

Os lotes provenientes do Estado do Mato Grosso revelaram correlação entre o teor de clorofila e a porcentagem de sementes verdes em todas as épocas analisadas (TABELAS 4, 5 e 6), significando, assim, que quanto maior o teor de clorofila de um lote, maior foi a porcentagem de sementes verdes encontrada. Houve da mesma forma, correlação entre a porcentagem de sementes verdes e a germinação e vigor (primeira contagem da germinação) na primeira época de análise.

Zorato et al. (2007), trabalhando com lotes de soja da região sul do Mato Grosso, constataram influência do pigmento verde sobre a germinação e o vigor das sementes, sendo evidente a maior influência sobre lotes com maior percentual de sementes esverdeadas.

De forma semelhante, Costa et al. (2001) obtiveram menor qualidade de lotes com maiores porcentagens de sementes verdes. Esses autores concluíram que níveis superiores a 10% de sementes verdes, geralmente apresentam problemas na qualidade fisiológica, em função dos elevados índices de deterioração por umidade, que na maioria dos casos resulta em declínio do vigor, da viabilidade e da germinação.

Porém, essa correlação não foi significativa após o armazenamento dos lotes (Tabelas 5 e 6). Provavelmente, tal fato se explica porque com o armazenamento das sementes os lotes de melhor qualidade sofreram deterioração, se aproximando dos lotes que já apresentavam qualidade mais baixa na avaliação inicial, não havendo, portanto, correlação entre as sementes verdes e a qualidade dos lotes nesta situação.

Na época inicial de análise das sementes não houve correlação entre os teores de lipoperóxidos, a presença de clorofila e a qualidade dos lotes (Tabela 4). Contudo, mesmo não havendo relação entre o conteúdo de clorofila e a peroxidação de lipídeos, após três meses de armazenamento os maiores teores de lipoperóxidos relacionaram-se com menor germinação e vigor, avaliados pela primeira contagem da germinação (Tabela 5). De forma que a correlação se estendeu para o teste de envelhecimento acelerado aos seis meses de armazenamento (Tabela 6).

TABELA 4. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de qualidade efetuados em sementes de 24 lotes de soja provenientes do Estado de Mato Grosso, na época inicial de avaliação.

Época Inicial	Época Inicial										
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	PM	TA
Clorofila											
% Verdes	0,41*										
Lipoperóxidos	-0,27 ^{ns}	-0,33 ^{ns}									
Germinação	-0,28 ^{ns}	-0,46*	-0,17 ^{ns}								
Primeira Contagem da Germinação	-0,27 ^{ns}	-0,44*	-0,17 ^{ns}	0,99**							
Envelhecimento Acelerado	-0,39 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	0,003 ^{ns}	0,32 ^{ns}	0,33 ^{ns}						
Condutividade Elétrica	0,11 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,21 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	-0,35 ^{ns}					
Comprimento de Plântulas	-0,09 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	0,62**	0,62**	0,26 ^{ns}	-0,47*				
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,54**	0,14 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	0,33 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,15 ^{ns}			
Peso de Mil Sementes	0,09 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	-0,28 ^{ns}	0,33 ^{ns}	0,38 ^{ns}	-0,006 ^{ns}	-0,55**	0,35 ^{ns}	0,27 ^{ns}		
Teor de Água	0,20 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	0,12 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,26 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,08 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

TABELA 5. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de qualidade efetuados em sementes de 24 lotes de soja provenientes do Estado de Mato Grosso, após três meses de armazenamento.

Armazenamento - 3 meses	Armazenamento - 3 meses									
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	TA
Clorofila										
% Verdes	0,41*									
Lipoperóxidos	-0,27 ^{ns}	-0,33 ^{ns}								
Germinação	-0,14 ^{ns}	0,09 ^{ns}	-0,41*							
Primeira Contagem da Germinação	-0,01 ^{ns}	0,15 ^{ns}	-0,60**	0,90**						
Envelhecimento Acelerado	-0,05 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,31 ^{ns}	0,66**	0,58**					
Condutividade Elétrica	0,31 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,26 ^{ns}	-0,70**	-0,56**	-0,68**				
Comprimento de Plântulas	0,11 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,17 ^{ns}	0,43*	-0,04 ^{ns}			
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,08 ^{ns}	0,03 ^{ns}	-0,34 ^{ns}	0,43*	0,43*	0,67**	-0,49*	0,75**		
Teor de Água	-0,17 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	0,23 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,31 ^{ns}	-0,46*	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

TABELA 6. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de qualidade efetuados em sementes de 24 lotes de soja provenientes do Estado de Mato Grosso, após seis meses de armazenamento.

Armazenamento - 6 meses	Armazenamento - 6 meses									
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	TA
Clorofila										
% Verdes	0,41*									
Lipoperóxidos	-0,27 ^{ns}	-0,33 ^{ns}								
Germinação	-0,05 ^{ns}	0,25 ^{ns}	-0,47*							
Primeira Contagem da Germinação	-0,01 ^{ns}	0,27 ^{ns}	-0,49*	0,99**						
Envelhecimento Acelerado	0,06 ^{ns}	0,25 ^{ns}	-0,60**	0,85**	0,85**					
Condutividade Elétrica	0,15 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,27 ^{ns}	-0,64**	-0,63**	-0,73**				
Comprimento de Plântulas	0,27 ^{ns}	0,35 ^{ns}	-0,52 ^{ns}	0,46*	0,49*	0,45*	-0,18 ^{ns}			
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,14 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0,01**	0,03 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,43*		
Teor de Água	0,20 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,34 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,04 ^{ns}	0,25 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0,11 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

Na presença de oxigênio, o envelhecimento das sementes é freqüentemente associado à peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados. A peroxidação de lipídeos tem potencial considerável em danificar membranas, sendo importante na deterioração de sementes armazenadas, reduzindo a longevidade destas sob condições naturais (HARRINGTON, 1973; STEWART & BEWLEY, 1980; WILSON & MCDONALD, 1986; HENDRY et al., 1992; HENDRY, 1993). Tal informação torna compreensível o maior efeito do acúmulo de lipoperóxidos sobre a qualidade dos lotes após o armazenamento, as sementes apresentando ou não vestígios de clorofila.

Os lotes provenientes do Estado de São Paulo (Tabelas 7, 8 e 9) mostraram comportamento extremo quanto à falta de correlação entre os parâmetros analisados, especialmente quando comparado à análise dos lotes do Mato Grosso. Para os lotes dessa região não houve correlação entre os testes utilizados para detectar a presença de clorofila, ou entre a porcentagem de sementes verdes e a qualidade dos lotes em nenhuma das épocas avaliadas. Tampouco houve correlação entre a peroxidação de lipídeos e a qualidade das sementes, mesmo após o armazenamento.

Possivelmente este resultado se deva ao conjunto de lotes analisados, quanto à uniformidade destes no que se refere ao conteúdo de clorofila, quando comparado ao conjunto de dados referentes à qualidade fisiológica.

A análise das Tabelas 10, 11 e 12 indica que não houve correlações entre o teor de clorofila e a porcentagem de sementes verdes com a qualidade dos lotes provenientes do Paraná, mas houve correlação entre o teor de clorofila e o teor de lipoperóxidos.

de Jalink et al. (1999). Os autores afirmaram que a maturidade das sementes pode ser importante para reduzir a possibilidade de a clorofila produzir radicais livres, os quais podem causar danos oxidativos, determinantes na longevidade das sementes. De fato, nas plantas, a clorofila pode ser uma fonte primária de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Após a iluminação, a clorofila age como fotossensibilizador, transferindo energia de excitação para a produção de $^1\text{O}_2$ (RABINOWITCH & FRIDOVICH, 1983).

TABELA 7. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de qualidade efetuados em sementes de 25 lotes de soja provenientes do Estado de São Paulo, na época inicial de avaliação.

Época Inicial	Época Inicial										
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	PM	TA
Clorofila											
% Verdes	0,32 ^{ns}										
Lipoperóxidos	0,14 ^{ns}	-0,09 ^{ns}									
Germinação	0,08 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,12 ^{ns}								
Primeira Contagem da Germinação	0,09 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	0,99**							
Envelhecimento Acelerado	0,11 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	0,84**	0,33 ^{ns}						
Condutividade Elétrica	-0,08 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,35 ^{ns}	-0,72**	-0,35 ^{ns}	-0,92**					
Comprimento de Plântulas	0,18 ^{ns}	0,22 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	0,76**	0,62**	0,89**	-0,79**				
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,12 ^{ns}	0,14 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	0,69**	0,33 ^{ns}	0,85**	-0,82**	0,89**			
Peso de Mil Sementes	-0,06 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	0,38 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	-0,21 ^{ns}	0,03 ^{ns}		
Teor de Água	0,31 ^{ns}	0,18 ^{ns}	-0,34 ^{ns}	0,52**	0,12 ^{ns}	0,51**	-0,42*	0,49*	0,41*	-0,51**	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

TABELA 8. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de qualidade efetuados em sementes de 25 lotes de soja provenientes do Estado de São Paulo, após três meses de armazenamento.

Armazenamento - 3 meses	Armazenamento - 3 meses									
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	TA
Clorofila										
% Verdes	0,32 ^{ns}									
Lipoperóxidos	0,14 ^{ns}	-0,09 ^{ns}								
Germinação	0,008 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,35 ^{ns}							
Primeira Contagem da Germinação	0,008 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	-0,37 ^{ns}	0,98**						
Envelhecimento Acelerado	0,07 ^{ns}	0,01 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	0,94**	0,94**					
Condutividade Elétrica	-0,08 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,36 ^{ns}	-0,94**	-0,93**	-0,90**				
Comprimento de Plântulas	0,21 ^{ns}	0,23 ^{ns}	-0,28 ^{ns}	0,88**	0,86**	0,90**	-0,83**			
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,15 ^{ns}	0,09 ^{ns}	-0,28 ^{ns}	0,92**	0,90**	0,94**	-0,91**	0,92**		
Teor de Água	0,12 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

TABELA 9. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de qualidade efetuados em sementes de 25 lotes de soja provenientes do Estado de São Paulo, após seis meses de armazenamento.

Armazenamento - 6 meses	Armazenamento - 6 meses									
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	TA
Clorofila										
% Verdes	0,32 ^{ns}									
Lipoperóxidos	0,14 ^{ns}	-0,09 ^{ns}								
Germinação	0,09 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,39 ^{ns}							
Primeira Contagem da Germinação	0,13 ^{ns}	0,006 ^{ns}	-0,32 ^{ns}	0,98**						
Envelhecimento Acelerado	0,14 ^{ns}	0,004 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	0,94**	0,91**					
Condutividade Elétrica	-0,08 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,36 ^{ns}	-0,87**	-0,85**	-0,85**				
Comprimento de Plântulas	0,11 ^{ns}	0,11 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	0,93**	0,92**	0,88**	-0,81**			
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,34 ^{ns}	0,23 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	0,76**	0,78**	0,73**	-0,67**	0,81**		
Teor de Água	0,11 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,02 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,35 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

Contudo, nos resultados obtidos com o estudo dos lotes do Paraná a correlação entre a clorofila e o processo de oxidação celular, atestado pelo teor de lipoperóxidos, foi contrária ao esperado. Observou-se, em todas as épocas analisadas, que os maiores teores de clorofila se correlacionaram com menores teores de lipoperóxidos nos lotes de soja.

Segundo Thompson (1987), é provável que a formação de oxigênio singlete a partir de clorofila seja reforçada durante a senescência com o declínio de transporte de elétrons e, portanto, a clorofila do centro de reação é menos capaz de dispor de sua energia de excitação. Nas sementes analisadas, a clorofila está presente em uma forma inativa fotossinteticamente e, possivelmente estável, não sofrendo o processo de degradação que ocorre durante a maturação. Sendo assim, possivelmente a clorofila nas sementes não seria a fonte principal de radicais livres.

Supunha-se, inicialmente, que a presença de clorofila poderia favorecer a deterioração das sementes, causada pela peroxidação de lipídeos, com base nas informações

Portanto, na situação do presente estudo, sugere-se que as sementes com coloração verde, com maiores teores de clorofila, não passaram pelo processo de acúmulo de radicais livres provenientes da degradação desse pigmento, apresentando taxas inferiores de peroxidação de lipídeos. Enquanto nos lotes com menor teor de clorofila, a degradação desta poderia ter propiciado a peroxidação de lipídeos, que associado a prováveis problemas na maturação, resultou em menor qualidade desses lotes explicando a correlação inversa entre clorofila e lipoperóxidos.

TABELA 10. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de qualidade efetuados em sementes de 18 lotes de soja provenientes do Estado do Paraná, na época inicial de avaliação.

Época Inicial	Época Inicial										
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	PM	TA
Clorofila											
% Verdes	-0,05 ^{ns}										
Lipoperóxidos	-0,52*	0,18 ^{ns}									
Germinação	-0,30 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,15 ^{ns}								
Primeira Contagem da Germinação	-0,23 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,16 ^{ns}	0,96**							
Envelhecimento Acelerado	-0,18 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,38 ^{ns}	0,23 ^{ns}	0,29 ^{ns}						
Condutividade Elétrica	0,27 ^{ns}	0,01 ^{ns}	0,38 ^{ns}	-0,42 ^{ns}	-0,34 ^{ns}	-0,68**					
Comprimento de Plântulas	-0,32 ^{ns}	0,14 ^{ns}	0,10 ^{ns}	0,66**	0,71**	0,62**	-0,48*				
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,13 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,26 ^{ns}	0,28 ^{ns}	0,25 ^{ns}	0,48*	-0,56*	0,59**			
Peso de Mil Sementes	0,45 ^{ns}	0,20 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	0,09 ^{ns}	0,60**		
Teor de Água	0,06 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	0,17 ^{ns}	-0,33 ^{ns}	-0,36 ^{ns}	0,08 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,02 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo
 Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

TABELA 11. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de qualidade efetuados em sementes de 18 lotes de soja provenientes do Estado do Paraná, após três meses de armazenamento.

Armazenamento - 3 meses	Armazenamento - 3 meses									
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	TA
Clorofila										
% Verdes	-0,05 ^{ns}									
Lipoperóxidos	-0,52*	0,18 ^{ns}								
Germinação	-0,41 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,07 ^{ns}							
Primeira Contagem da Germinação	-0,40 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	0,99**						
Envelhecimento Acelerado	-0,32 ^{ns}	0,22 ^{ns}	-0,30 ^{ns}	0,56*	0,54*					
Condutividade Elétrica	0,18 ^{ns}	-0,006 ^{ns}	0,39 ^{ns}	-0,78**	-0,77**	-0,57*				
Comprimento de Plântulas	-0,74**	0,27 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,55*	0,54*	0,69**	-0,50*			
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,10 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,06 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	-0,22 ^{ns}	-0,25 ^{ns}	-0,13 ^{ns}		
Teor de Água	-0,06 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,18 ^{ns}	0,45 ^{ns}	0,46 ^{ns}	0,26 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	0,14 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

TABELA 12. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de qualidade efetuados em sementes de 18 lotes de soja provenientes do Estado do Paraná, após seis meses de armazenamento.

Armazenamento - 6 meses	Armazenamento - 6 meses									
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	TA
Clorofila										
% Verdes	-0,05 ^{ns}									
Lipoperóxidos	-0,52*	0,18 ^{ns}								
Germinação	-0,33 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,22 ^{ns}							
Primeira Contagem da Germinação	-0,33 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,22 ^{ns}	0,99**						
Envelhecimento Acelerado	-0,25 ^{ns}	0,26 ^{ns}	-0,19 ^{ns}	0,91**	0,91**					
Condutividade Elétrica	0,17 ^{ns}	0,07 ^{ns}	0,44 ^{ns}	-0,79**	-0,79**	-0,74**				
Comprimento de Plântulas	-0,11 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,43 ^{ns}	0,74**	0,74**	0,74**	-0,78**			
Massa de Matéria Seca de Plântulas	-0,14 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	-0,35 ^{ns}	0,78**	0,78**	0,67**	-0,80**	0,82**		
Teor de Água	-0,30 ^{ns}	0,02 ^{ns}	0,38 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,02 ^{ns}	-0,17 ^{ns}	-0,20 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

A análise do teor de lipoperóxidos de todos os lotes, independente da região, somente foi realizada por ocasião da recepção dessas sementes. Uma análise da peroxidação de lipídeos durante o progresso do armazenamento poderia mostrar correlação entre este parâmetro e a queda da qualidade dos lotes, principalmente daqueles com maiores porcentagens de sementes verdes. Considerando-se que as sementes verdes estão em um estágio menos maduro, provavelmente sofreram um acúmulo anormal de reservas e não completaram a formação de sistemas enzimáticos importantes, como por exemplo a formação de enzimas antioxidantes. E neste caso seriam menos eficientes em combater os estresses oxidativos e apresentariam, portanto, maiores taxas de peroxidação de lipídeos com conseqüente queda de qualidade.

Para ajudar na compreensão dos resultados obtidos na análise dos lotes agrupados por regiões, foi feito um estudo de freqüências com base no teor de clorofila dos lotes, associado à estatística descritiva dos dados de teor de clorofila, de lipoperóxidos e da qualidade representada apenas pela germinação e primeira contagem da germinação na época inicial de análise.

Na Figura 5 estão apresentados os dados das freqüências não acumuladas em função dos teores de clorofila dos lotes de cada região. Por análise dos resultados obtidos constata-se que a distribuição das freqüências acumuladas são assimétricas para as três regiões, portanto os valores de média, mediana e moda são diferentes entre si.

O coeficiente de assimetria indica, como se refere o nome, a assimetria da curva. Quando uma distribuição é normal, os valores da média, moda e mediana coincidem e o coeficiente de assimetria é nulo. Este coeficiente pode assumir valores negativos ou positivos, quando a moda, mediana e média alinham-se de forma crescente ou decrescente, respectivamente (VELINI, 1995). De La Loma (1966) destaca que coeficientes de assimetria inferiores a 0,1 (em módulo), indicam pequena assimetria da curva, ao passo que valores superiores a 0,3 (em módulo) indicam assimetria acentuada.

Como em todos os casos tem-se assimetria positiva, a média e a mediana apresentam valores superiores à moda. Infere-se assim, que nas três regiões houve predominância de lotes com maiores teores de clorofila em relação aqueles com teores mais baixos na curva de distribuição da freqüência

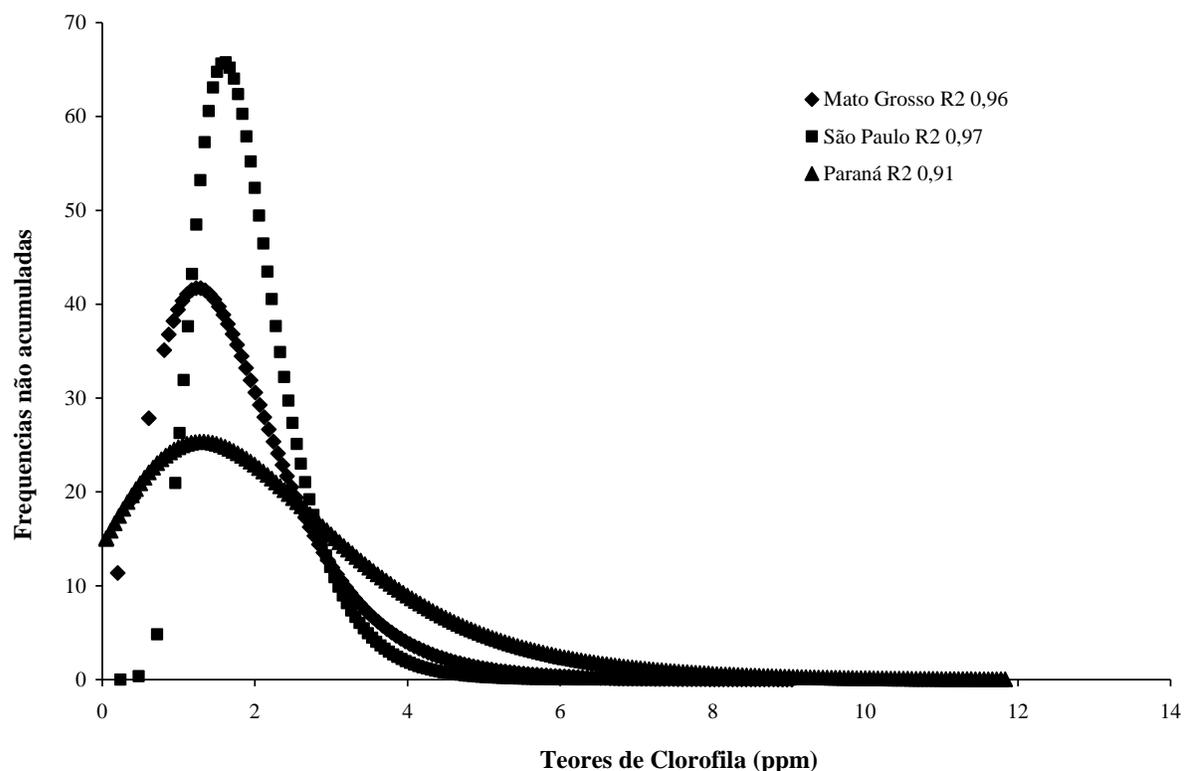


FIGURA 5. Frequências não acumuladas em função do teor de clorofila dos lotes de soja provenientes das regiões do Mato Grosso, São Paulo e Paraná.

Os resultados da análise de regressão para todas as regiões, assim como as estimativas dos parâmetros do modelo de Gompertz, estão apresentados na Tabela 13. Os valores modais, representados pela maior frequência de valores nas equações de frequências não acumuladas do modelo de Gompertz (Figura 5), indicaram as regiões do Mato Grosso e do Paraná com maior ocorrência de lotes ausentes de clorofila em detrimento dos lotes com algum nível de retenção de clorofila, não sendo possível obter um valor modal para os lotes de São Paulo.

Segundo De La Loma (1966), Spiegel (1977) e Berquó et al. (1981), a curtose indica a concavidade da curva de distribuição das frequências não acumuladas; uma curva normal, apresenta curtose igual a 3.

TABELA 13. Resultados da análise de regressão das frequências não acumuladas do teor de clorofila dos lotes de soja provenientes de diferentes localidades do Mato Grosso, São Paulo e Paraná, utilizando o modelo de Gompertz, as médias, modas e medianas (ppm).

Modelo	Regiões			
		Mato Grosso	São Paulo	Paraná
Estimativas dos parâmetros	A	4,5400	4,5500	4,5900
	B	-1,5200	-3,0200	-0,9100
	C	1,2110	1,8900	0,7000
R ²		0,97	0,97	0,96
Coeficiente de Curtose		3,3912	5,1706	1,5315
Coeficiente de Assimetria		0,8190	1,2174	0,2412
Mínimo		0	0	0
Máximo		5,6	5,4	4,6
Média		2,0	2,1	2,3
Mediana		1,8	1,7	1,8
Moda		0		0
Variância da Amostra		2,11	1,30	2,69
Desvio Padrão		1,45	1,14	1,64
Erro Padrão		0,30	0,23	0,39
Coeficiente de Variação (%)		73,8	53,6	72,8
Nível de Confiança (95%)		0,6	0,5	0,8

Quanto menor o coeficiente de curtose, mais plana é a curva, maior é a frequência de valores extremos e, neste caso, maior a desuniformidade de distribuição dos lotes analisados quanto ao teor de clorofila. Tem-se, nesse estudo, o maior coeficiente para os lotes de São Paulo, condição associada a maior concavidade da curva da frequência não acumulada. O valor do parâmetro “C” do modelo de Gompertz também está associado à curtose, de forma que quanto maior esses valores, mais uniforme a distribuição dos dados. Constata-se, portanto, que os lotes de São Paulo possuem distribuição mais uniforme quanto à concentração de clorofila, enquanto os lote com distribuição mais desuniforme, neste caso, foram provenientes do Paraná.

Os resultados da estatística descritiva para o teor de lipoperóxidos dos lotes das diferentes regiões estão apresentados na Tabela 14. Foi realizada, também, a estatística descritiva dos parâmetros de qualidade dos lotes, optando-se por utilizar dados

percentuais de germinação e de primeira contagem da germinação, avaliados na época inicial, como representativos da qualidade desses lotes por ocasião da recepção (Tabelas 15 e 16).

TABELA 14. Resultados da estatística descritiva dos dados de teor de lipoperóxidos ($\mu\text{mol/MG}$) dos lotes das regiões de Mato Grosso, São Paulo e Paraná.

Estatística Descritiva	Regiões		
	Mato Grosso	São Paulo	Paraná
Coefficiente de Curtose	3,9120	4,8550	2,4681
Coefficiente de Assimetria	1,4079	1,0858	0,3302
Mínimo	4,8	1,1	4,7
Máximo	14,6	14,4	12,7
Média	7,7	6,6	8,5
Mediana	6,7	6,2	7,7
Moda		6,2	
Variância da Amostra	7,76	9,64	5,20
Desvio Padrão	2,79	3,10	2,28
Erro Padrão	0,57	0,62	0,54
Coefficiente de Variação (%)	36,4	46,8	26,9
Nível de Confiança (95%)	1,2	1,3	1,1

TABELA 15. Resultados da estatística descritiva dos dados de germinação (%) dos lotes das regiões de Mato Grosso, São Paulo e Paraná, para a época inicial de avaliação.

Estatística Descritiva	Regiões		
	Mato Grosso	São Paulo	Paraná
Coefficiente de Curtose	4,002	3,698	3,206
Coefficiente de Assimetria	-1,543	-1,393	-1,182
Mínimo	0	0	0
Máximo	96	97	85
Média	70	68	60
Mediana	83	83	73
Moda	90	83	73
Variância da Amostra	962,23	913,59	644,06
Desvio Padrão	31,02	30,23	25,38
Erro Padrão	6,33	6,05	5,98
Coefficiente de Variação (%)	44,1	44,3	42,4
Nível de Confiança (95%)	13,1	12,5	12,6

TABELA 16. Resultados da estatística descritiva dos dados de primeira contagem da germinação (%) dos lotes das regiões de Mato Grosso, São Paulo e Paraná, para a época inicial de avaliação.

Estatística Descritiva	Regiões		
	Mato Grosso	São Paulo	Paraná
Coefficiente de Curtose	3,8265	3,7609	2,9263
Coefficiente de Assimetria	-1,4813	-1,4160	-1,1404
Mínimo	0	0	0
Máximo	96	96	83
Média	69	67	54
Mediana	82	81	67
Moda	90	86	0
Variância da Amostra	959,47	897,98	753,35
Desvio Padrão	30,98	29,97	27,45
Erro Padrão	6,32	5,99	6,47
Coefficiente de Variação (%)	44,8	44,6	50,5
Nível de Confiança (95%)	13,1	12,4	13,6

A análise dos resultados dos lotes de São Paulo apontou maior uniformidade de distribuição destes com relação ao teor de clorofila e, também, ao teor de lipoperóxidos. Contudo, foi constatada grande variabilidade na qualidade dos lotes, o que possivelmente ocasionou a falta de correlação entre a presença de clorofila e a peroxidação de lipídeos com a qualidade das sementes de soja nessa região, como já comentado anteriormente.

Comportamento bastante variado foi apresentado pelos lotes originários do Paraná, com relação aos dados da estatística descritiva, dificultando a interpretação dos resultados. Foram os lotes mais desuniformes, quanto a freqüência de distribuição dos teores de clorofila, porém com menor variação na peroxidação de lipídeos, apesar de, em média, apresentarem maior conteúdo de lipoperóxidos. O Paraná estava representado por lotes que possuíam qualidade média inferior à dos lotes das demais regiões.

Com os resultados obtidos, inferiu-se, especialmente considerando os coeficientes de variação das análises, a existência de grande variabilidade entre os dados de

modo que o número de amostras utilizadas para representar cada região não permitiu interpretação segura com relação ao comportamento dos lotes na presença de clorofila.

A variação climática entre estados, e entre localidades de um mesmo estado, pode afetar de forma diferenciada, a maturação de cada lote e, portanto, ter gerado variações no teor de clorofila e, principalmente, na qualidade desses lotes. Portanto, propôs-se que uma análise mais segura, provavelmente poderia ser realizada com o conjunto total dos lotes, tendo-se assim maior número de amostras, aumentando a confiabilidade da análise e extrapolando o comportamento das sementes quanto à presença de clorofila a um número maior de condições de campo.

6.3 Relação entre a presença de clorofila e a qualidade das sementes de soja

A relação entre a clorofila, a porcentagem de sementes verdes, o teor de lipoperóxidos e a qualidade foi analisada por diferentes testes, nos lotes não separados por regiões.

Nas Tabelas 17, 18 e 19 são dispostos os coeficientes de correlação simples para todos os parâmetros estudados, nas épocas inicial de avaliação, após três e seis meses de armazenamento, respectivamente, considerando os 67 lotes de sementes de soja.

Ambos os métodos, bioquímico e visual, utilizados para classificação dos lotes quanto à presença de clorofila nas sementes de soja foram satisfatórios, e correlacionados entre si, de forma que quanto maior a porcentagem de sementes verdes em um lote, maior o teor de clorofila (Figura 7). A elevada quantidade de lotes analisados resultou em correlação positiva entre os dois parâmetros, muito embora tenha sido constatada, considerando a análise dos pontos na Figura 6, a diversidade do comportamento dos lotes.

Em casos extremos foi observado que lotes com ausência de sementes verdes, revelaram teor razoável de clorofila, próximo à 2 ppm. Provavelmente o fato ocorreu porque externamente o tegumento das sementes exibia coloração amarela, de forma que o pigmento verde no interior estava fora do alcance do olho humano (Figura 6). Em outras situações, a análise visual apontava altas porcentagens de ocorrência de sementes verdes enquanto a análise bioquímica indicava ausência de clorofila. É possível que, neste caso, a

coloração esverdeada observada nas sementes tenha recebido a contribuição de outros pigmentos além da clorofila, ou mesmo os critérios visuais adotados para identificar qualquer nuance de verde tenham sido ineficientes. Jalink et al. (1998) já haviam atestado a dificuldade de precisão da análise visual, pois, aparentemente, sementes de diferentes graus de maturidades, que parecem ter a mesma cor para o olho humano, podem conter quantidades diferentes de clorofila.

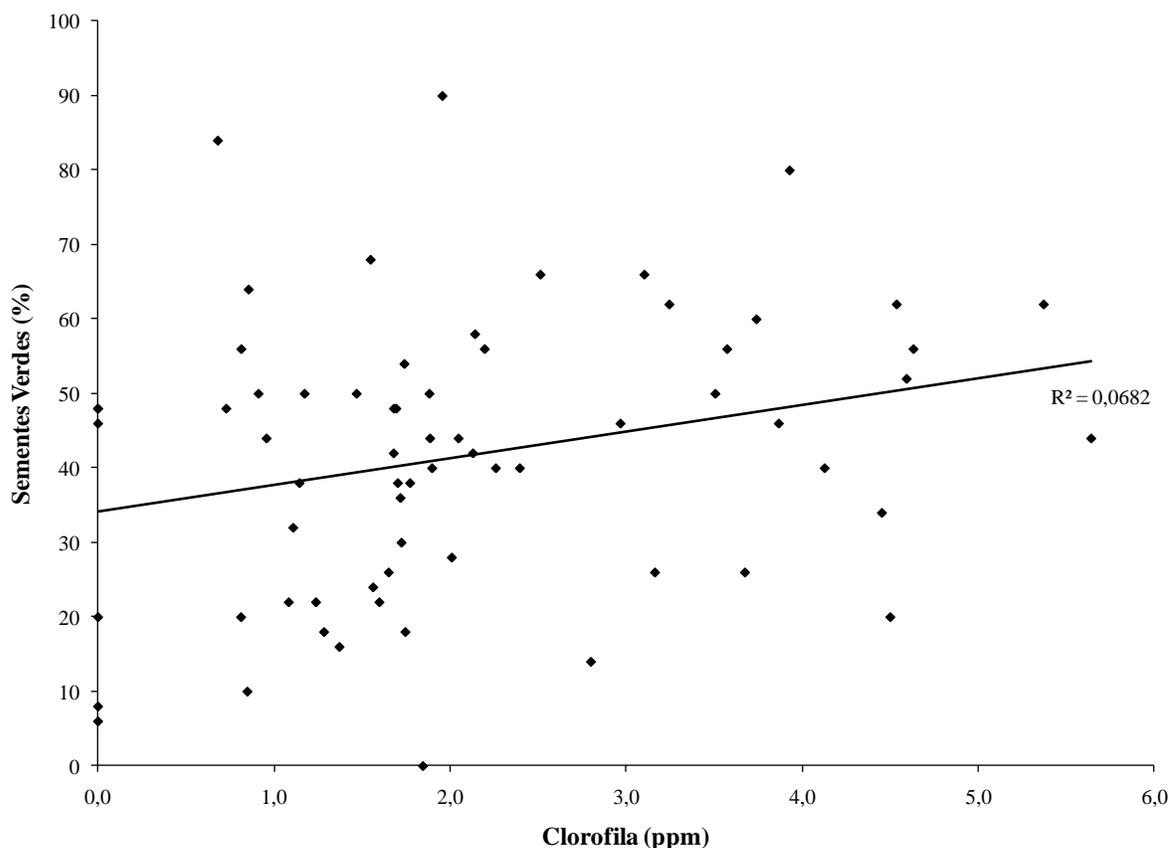


FIGURA 6. Correlação entre teor de clorofila e porcentagem de sementes verdes em lotes de soja.

Os resultados da análise de correlação mostraram ausência de correlação entre o teor de clorofila das sementes dos lote de soja e a qualidade avaliada tanto pelo teste de germinação quanto de vigor. Por outro lado, quanto maior a porcentagem de

sementes verdes nos lotes, menores foram a porcentagem de germinação e o vigor, quando avaliado pelo teste de primeira contagem da germinação na época inicial (Tabela 17).

É importante ressaltar que a baixa qualidade dos lotes com maior porcentagem de sementes verdes não se deveu ao conteúdo de clorofila, como atestado pela análise de correlação. Outros fatores relacionados ao processo de maturação dessas sementes devem ter exercido maior influência sobre a qualidade dos lotes, pois, assim como o amadurecimento adequado das sementes em condições favoráveis de campo é essencial para a completa degradação da clorofila, é também essencial para a completa formação do embrião, o acúmulo normal de reservas e a formação de enzimas relacionadas à germinação.

A análise dos dados verificados nas épocas seguintes de avaliação indicou, no entanto, ausência de correlação entre a porcentagem de sementes verdes e a qualidade dos lotes (Tabelas 18 e 19). Provavelmente, durante o armazenamento, aquelas sementes que apresentavam germinação e vigor elevados sofreram deterioração aproximando-se, ou mesmo igualando-se, àquelas que já apresentavam baixa qualidade na análise inicial, justificando a falta de correlação entre a porcentagem de sementes verdes e a qualidade após o armazenamento.

Os fatores mais freqüentemente relatados como causas da expressão de sementes verdes em soja são os estresses ambientais que geralmente ocorrem durante a fase específica de maturação dessas sementes, especialmente entre R6 e R7, provocando senescência prematura das plantas e a maturação forçada das sementes.

O estado de maturidade foi apontado por Jalink et al. (1998) como um importante fator da qualidade de sementes, já que as sementes imaturas, ou não totalmente maduras, são geralmente de menor qualidade que as maduras.

TABELA 17. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de avaliação da qualidade efetuados em sementes de 67 lotes de soja, na época inicial de avaliação.

Época Inicial	Época Inicial										
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	PM	TA
Clorofila											
% Verdes	0,26*										
Lipoperóxidos	-0,17 ^{ns}	-0,05 ^{ns}									
Germinação	-0,17 ^{ns}	-0,28*	-0,11 ^{ns}								
Primeira Contagem da Germinação	-0,16 ^{ns}	-0,29*	-0,12 ^{ns}	0,99**							
Envelhecimento Acelerado	-0,11 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,33**	0,52**	0,54**						
Condutividade Elétrica	0,08 ^{ns}	0,15 ^{ns}	0,38**	-0,53**	-0,53**	-0,81**					
Comprimento de Plântulas	-0,03 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	-0,32**	0,66**	0,68**	0,76**	-0,72**				
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,3*	-0,02 ^{ns}	-0,24*	0,24 ^{ns}	0,24 ^{ns}	0,38**	-0,42**	0,52**			
Peso de Mil Sementes	0,18 ^{ns}	0,04 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	-0,16 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	0,15 ^{ns}		
Teor de Água	0,15 ^{ns}	0,43**	0,08 ^{ns}	-0,06 ^{ns}	-0,12 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	0,18 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,09 ^{ns}	0,11 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; PM = peso de mil sementes; TA = teor de água.

TABELA 18. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de avaliação da qualidade efetuados em sementes de 67 lotes de soja, no terceiro mês de armazenamento.

Armazenamento - 3 meses	Armazenamento - 3 meses									
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	TA
Clorofila										
% Verdes	0,26*									
Lipoperóxidos	-0,17 ^{ns}	-0,05 ^{ns}								
Germinação	-0,18 ^{ns}	-0,24 ^{ns}	-0,35**							
Primeira Contagem da Germinação	-0,14 ^{ns}	-0,18 ^{ns}	-0,42**	0,97**						
Envelhecimento Acelerado	-0,08 ^{ns}	-0,13 ^{ns}	-0,39**	0,82**	0,79**					
Condutividade Elétrica	0,08 ^{ns}	0,05 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,79**	-0,77**	-0,80**				
Comprimento de Plântulas	-0,22 ^{ns}	-0,004 ^{ns}	-0,30*	0,62**	0,60**	0,69**	-0,55**			
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,07 ^{ns}	-0,01 ^{ns}	-0,28*	0,49**	0,48**	0,64**	-0,66**	0,33**		
Teor de Água	-0,009 ^{ns}	0,13 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	-0,11 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	0,07 ^{ns}	-0,15 ^{ns}	-0,07 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

TABELA 19. Correlação linear simples (r) entre os teores de clorofila, de lipoperóxidos e os testes de avaliação da qualidade efetuados em sementes de 67 lotes de soja, no sexto mês de armazenamento.

Armazenamento - 6 meses	Armazenamento - 6 meses									
	Clor	% Verdes	Lipo	Germ	1ª Cont	EA	CE	CP	MS	TA
Clorofila										
% Verdes	0,26*									
Lipoperóxidos	-0,17 ^{ns}	-0,05 ^{ns}								
Germinação	-0,08 ^{ns}	-0,14 ^{ns}	-0,39**							
Primeira Contagem da Germinação	-0,06 ^{ns}	-0,10 ^{ns}	-0,36**	0,99**						
Envelhecimento Acelerado	0,01 ^{ns}	0,08 ^{ns}	-0,43**	0,86**	0,84**					
Condutividade Elétrica	0,02 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	0,36**	-0,63**	-0,60**	-0,74**				
Comprimento de Plântulas	0,05 ^{ns}	0,10 ^{ns}	-0,33**	0,72**	0,73**	0,66**	-0,55**			
Massa de Matéria Seca de Plântulas	0,11 ^{ns}	-0,05 ^{ns}	-0,27*	0,63**	0,65**	0,51**	-0,41**	0,70**		
Teor de Água	0,04 ^{ns}	-0,03 ^{ns}	-0,04 ^{ns}	-0,002 ^{ns}	0,008 ^{ns}	0,12 ^{ns}	-0,08 ^{ns}	0,06 ^{ns}	0,16 ^{ns}	

** significativo no teste F, a 1% de probabilidade; * significativo no teste F, a 5% de probabilidade; ns não significativo

Clor = clorofila; Lipo = lipoperóxidos; Germ = germinação; 1ª Cont = Primeira Contagem da Germinação; EA = envelhecimento acelerado; CE = condutividade elétrica; CP = comprimento de plântulas; MS = massa de matéria seca de plântulas; TA = teor de água.

Adams et al. (1983), estudando a maturação de sementes de soja, mostraram a desidratação lenta durante a maturação, um processo necessário para produção de sementes de soja de alta qualidade, para obtenção de efeitos distintos na degradação de clorofilas e na influência do genoma para permitir a produção das enzimas específicas de germinação, a malato sintase e a isocitrato liase. Em sementes de soja, essas enzimas são consideradas essenciais à regulação do ciclo do glioxalato, em que os lipídios insolúveis das sementes são convertidos em açúcares solúveis (sacarose), forma em que são translocados para os meristemas radicular e apical (CIONI et al., 1981; BEWLEY & BLACK, 1994). Jalink et al. (1999) observaram baixo número de plântulas normais oriundas de sementes que fisiologicamente não completaram a maturação.

Alguns autores apontaram o efeito dos níveis crescentes de sementes verdes em lotes de soja sobre a sua qualidade fisiológica. Afirmaram que o aumento da incidência de sementes verdes nos lotes determina queda linear do vigor, da viabilidade e da germinação avaliados por diversos testes em diferentes cultivares (COSTA et al., 2001; MEDINA et al., 1997; ZORATO et al. 2007). Contudo, em alguns desses estudos as sementes amareladas, selecionadas de lotes com alto nível de sementes verdes mostraram germinação inferior à das sementes amarelas selecionadas de lotes com níveis mais baixos de sementes verdes. Este fato dá embasamento à hipótese de que outros problemas relacionados a distúrbios durante o processo de maturação são, muito provavelmente, a causa da queda de qualidade das sementes que apresentam tonalidade verde, não sendo um efeito direto da clorofila.

Considerando o peso de mil sementes, a análise indicou que não há influência do teor de clorofila ou da porcentagem de sementes verdes (Tabela 17). Entretanto, Zorato (2003) constatou diferenças significativas no peso de mil sementes entre os tratamentos de sementes esverdeadas em relação às sementes amarelas, em dois lotes estudados. O autor afirmou, ainda, que este fato manifesta o elo da clorofila, além do aspecto fisiológico, também com o aspecto físico das sementes. Medina et al. (1997) também verificaram menor peso de sementes verdes e esverdeadas de soja, quando comparadas com as sementes amarelas. Jalink et al. (1998), contudo, relacionaram o maior peso de sementes e baixo sinal de fluorescência de clorofila (lote com menor incidência de verdes) com o estágio de maturação dessas sementes; a elevação do peso das sementes durante a última fase do processo de maturação e a

permanência por maior tempo na planta foi a justificativa para maior desenvolvimento, indicando, portanto, sementes mais maduras.

Pádua (2006) concluiu que a imposição de estresses de elevada temperatura e corte total de irrigação, no estágio de desenvolvimento R6, propiciaram acentuada ocorrência de sementes verdes, com reduções do potencial fisiológico e do peso de 100 sementes, relacionando, portanto, a redução da massa das sementes ao estresse que ocorreu durante a maturação das mesmas. Egli (1975) já havia observado o aumento de peso nas sementes relacionado à capacidade da comunidade de plantas fixar carbono durante o período de enchimento ou translocação do carboidrato armazenado em outras partes da planta. Dornbos et al. (1989) evidenciaram que a massa da semente, um componente primário de produção, é determinada pela taxa de desenvolvimento da semente e pela duração do período de enchimento.

As sementes avaliadas neste estudo foram provenientes de um grande número de lotes produzidos em situações diversas no campo, durante a fase de maturação, sem ter havido seleção prévia de amostras e subamostras com sementes amarelas e esverdeadas. A realização da pesquisa com os lotes originais pode, talvez, constituir a razão para ausência de efeito da presença de sementes verdes sobre a massa, fato destacado em trabalho de França Neto et al. (2007). Segundo os referidos autores, a estratificação das sementes de soja por tamanho permite o descarte de lotes com elevados índices de sementes verdes, uma vez que a maior proporção destas (19%) foi constatada dentre a porção de sementes de menor tamanho (inferior a 6,0 mm), em comparação com as sementes maiores (7,5 mm) que tinham apenas 5% de incidência de sementes verdes. Portanto, a manipulação de lotes para seleção de amostras com sementes verdes tende a selecionar as de tamanho inferior e, por conseqüência, de menor massa de mil sementes.

De acordo com Endo et al. (1984), os produtos da oxidação da clorofila podem ter efeitos prooxidantes ou atividades fotooxidativas, além da possibilidade de reação do pigmento com compostos intermediários da peroxidação de lipídios e peróxidos.

Ensaio de Jalink et al. (1999) destacaram a maturidade das sementes como característica importante para redução da possibilidade da clorofila produzir elétrons livres capazes de causar injúria oxidativa. Conforme os autores, a deterioração das sementes

durante o armazenamento tem, de modo freqüente, relação com a ação de radicais livres mediando prejuízos oxidativos às proteínas, aos ácidos nucléicos e às membranas.

Considerando o relato deste fato, foi formulada a hipótese da possível associação entre a presença de clorofila com o aumento no teor de lipoperóxidos, que são produtos da oxidação dos lipídeos. No entanto, os dados verificados neste estudo mostraram ausência de relação entre a clorofila ou a porcentagem de sementes verdes com a quantidade de lipoperóxidos presente nos lotes.

Nas plantas, a clorofila pode ser uma fonte primária de oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Após a iluminação, a clorofila age como fotossensibilizador, transferindo energia de excitação para a produção de $^1\text{O}_2$ (RABINOWITCH & FRIDOVICH, 1983). É provável que a formação de oxigênio singleto, a partir de clorofila, seja reforçada durante a senescência com o declínio de transporte de elétrons e, portanto, com menor capacidade da clorofila do centro de reação dispor de sua energia de excitação (THOMPSON, 1987).

A clorofila presente nas sementes, mas de forma inativa, como comprovado por análise com o fluorômetro, possivelmente não exerce influencia alguma sobre a atividade metabólica das sementes e tampouco poderia ter efeito sobre a peroxidação de lipídeos. No caso de sementes ainda em desenvolvimento, nas quais a clorofila presente está ativa, esta poderia contribuir com o processo de oxidação, apresentando o mesmo comportamento da clorofila presente em plantas.

Outra linha de pensamento poderia ser considerada. Nos estudos de Suhartanto (2002) foi demonstrado ausência de degradação de clorofila em sementes de tomate armazenadas no escuro, e redução do conteúdo total desse pigmento naquelas mantidas sob ação da luz. As sementes de soja empregadas na pesquisa foram armazenadas em ausência total de luz o que, provavelmente, não teria induzido qualquer nível de degradação de clorofila, não ocasionando a produção de radical livres e, portanto, seria a razão da falta de relação entre o teor de lipoperóxidos e o conteúdo de clorofila dos lotes. Contudo, o mesmo autor foi enfático ao afirmar a inexistência de indicações claras de maior estresse oxidativo em sementes maduras com alto conteúdo de clorofila durante a deterioração controlada, resultado que pode ser extrapolado para situações de armazenamento.

Wilson & McDonald (1986) foram consistentes ao relatarem a peroxidação de lipídios como uma das causas de deterioração das sementes e relacioná-la com

o declínio de viabilidade e vigor. Concordando com o que foi relatado, o teor de lipoperóxidos mostrou correlação significativa com os testes de vigor (envelhecimento acelerado, condutividade elétrica, comprimento de plântulas e massa de matéria seca de plântulas) na época inicial (Tabela 17). Nas épocas subseqüentes de avaliação essa correlação foi observada também, com os testes de germinação e de primeira contagem da germinação, indicando que os danos oxidativos são mais evidentes após o armazenamento (Tabelas 18 e 19). Contrariamente ao esperado, a redução qualitativa das sementes deveu-se, possivelmente, ao processo natural de envelhecimento causado por deteriorações oxidativas, como evidenciado pela correlação entre os lipoperóxidos e os testes de qualidade, sem qualquer relação com o conteúdo de clorofila ou porcentagem de sementes verdes.

Com os resultados verificados nesse estudo, considerando análise crítica das informações constantes na literatura consultada, foi possível enfatizar a importância das condições ambientais, durante a fase reprodutiva, época em que também as clorofilas são degradadas, na ocorrência e qualidade das sementes verdes e esverdeadas.

6.4 Armazenamento das sementes

Como citado anteriormente, não foi constatada relação entre a quantidade de clorofila presente nas sementes dos lotes analisados e o estresse oxidativo por elas sofrido, evidenciado pelo acúmulo de lipoperóxidos, antes e durante o armazenamento (Tabelas 17, 18 e 19). Contudo, alta correlação entre a peroxidação de lipídeos e a qualidade das sementes, especialmente após o armazenamento, foi verificada.

Na presença de oxigênio o envelhecimento das sementes é, freqüentemente, associado à peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (HARRINGTON, 1973; STEWART & BEWLEY, 1980; WILSON & MCDONALD, 1986; HENDRY et al., 1992; HENDRY, 1993). A peroxidação de lipídeos tem potencial considerável em danificar membranas celulares e constitui importante causa de deterioração de sementes armazenadas, por reduzir a longevidade destas sob condições naturais. Reações de oxidações, no processo de envelhecimento, envolvem enzimas, tal como lipoxidase, e enzimas oxidativas que podem atuar em baixa atividade da água (VERTUCCI & LEOPOLD, 1987). Tais conclusões tornam

mais compreensível o declínio do potencial fisiológico das sementes, sejam elas esverdeadas ou não, com o decorrer do armazenamento.

Freqüentemente, a deterioração ocorrida durante o armazenamento está associada à formação de plântulas anormais, geralmente por necrose da raiz primária. Neste caso, nos estágios iniciais de germinação ocorre principalmente o alongamento celular, provavelmente, não envolvendo a replicação do material genético. Mais tarde, quando iniciada a divisão celular, o efeito de dano genético se manifesta e o desenvolvimento é impedido (VILLIERS & EDGCUMBE, 1975).

O fenômeno da morte incipiente de plântulas, que geralmente ocorre durante a germinação de sementes envelhecidas, sugere a presença de um elemento destrutivo, tornado ativo somente após a embebição. O modelo de peroxidação lipídica propõe que este elemento destrutivo está representado por ácidos graxos oxigenados. Após a ativação enzimática da semente, estes são transformados em aldeídos citotóxicos, mutagênicos, que interferem no início da mitose. Em sementes que possuem grandes quantidades de ácidos graxos oxigenados, a morte ocorre mais rapidamente devido à destruição das vias respiratórias por esses aldeídos tóxicos e, eventualmente, através da formação de radicais livres secundários e decomposição de peróxidos (WILSON & MCDONALD, 1986).

Conforme a figura sete foi constatada relação inversa entre o teor de lipoperóxidos nos lotes analisados e a germinação das sementes, de forma que o efeito da deterioração ocasionada pela peroxidação de lipídeos foi mais pronunciado após seis meses de armazenamento.

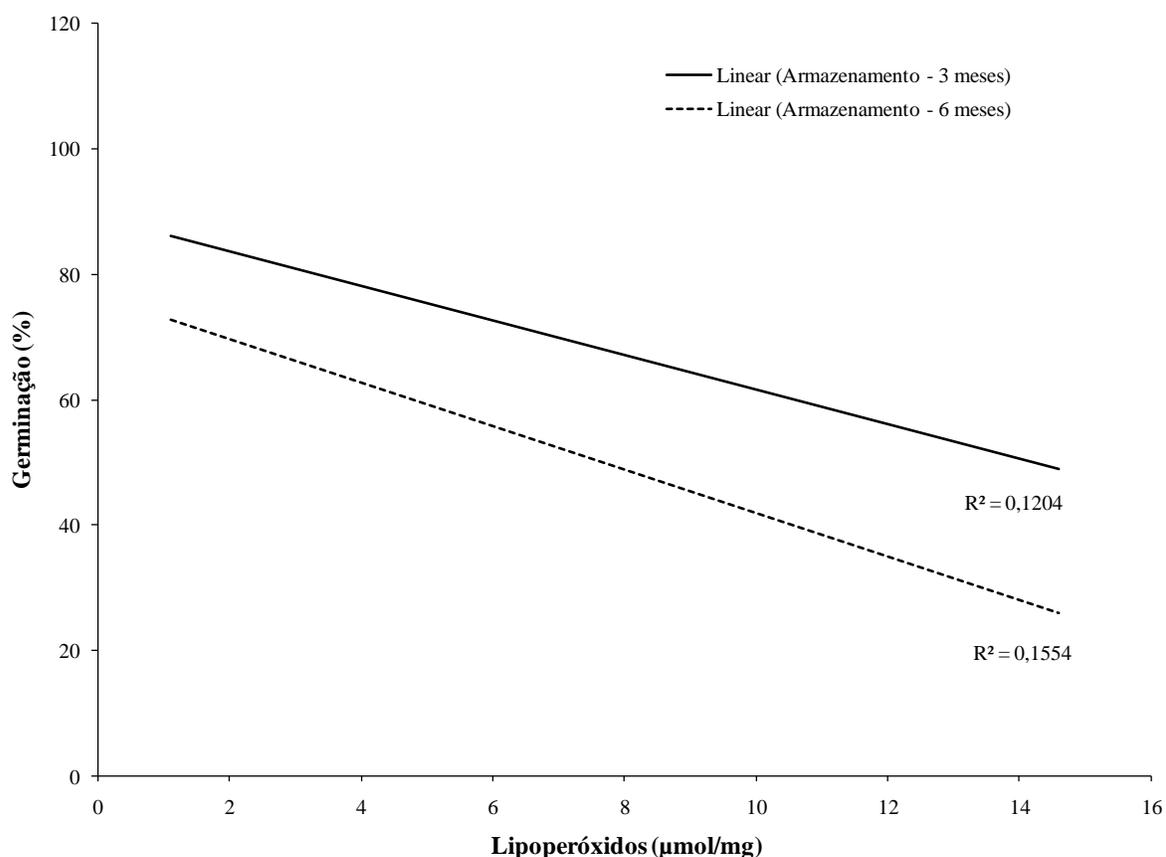


FIGURA 7. Correlação entre lipoperóxidos e a germinação de sementes de 67 lotes de soja após três e seis meses de armazenamento.

Algumas alterações associadas à deterioração tais como redução da porcentagem de germinação, da taxa de crescimento de plântulas e da tolerância às condições adversas de ambiente, ocorrem quando as sementes são armazenadas (ANDERSON, 1973). Para avaliar as conseqüências das referidas mudanças é realizado o teste de envelhecimento acelerado, que estima o potencial de armazenamento dos lotes conforme a resistência das sementes à elevadas temperatura e umidade relativa, com base na velocidade de deterioração das mesmas (MARCOS-FILHO, 1999). Ressalta-se, todavia, observações de Priestly & Leopold (1983) segundo as quais o mecanismo de envelhecimento acelerado é diferente do envelhecimento fisiológico natural em sementes de soja.

De acordo com a Figura oito, a elevação do teor de lipoperóxidos nas sementes correspondeu à redução da porcentagem de germinação após o teste de

envelhecimento acelerado, com efeitos mais evidentes após o armazenamento. Considera-se que os lotes com maior teor de lipoperóxidos encontravam-se em estado mais avançado de deterioração devido aos efeitos da oxidação e, portanto, revelaram, de forma mais acentuada, os efeitos do teste. Esses resultados são concordantes aos relatos de Mendonça et al. (2000) de que sementes de menor qualidade deterioram-se mais rapidamente do que as mais vigorosas, quando expostas às condições adversas de alta temperatura e umidade relativa no teste de envelhecimento acelerado.

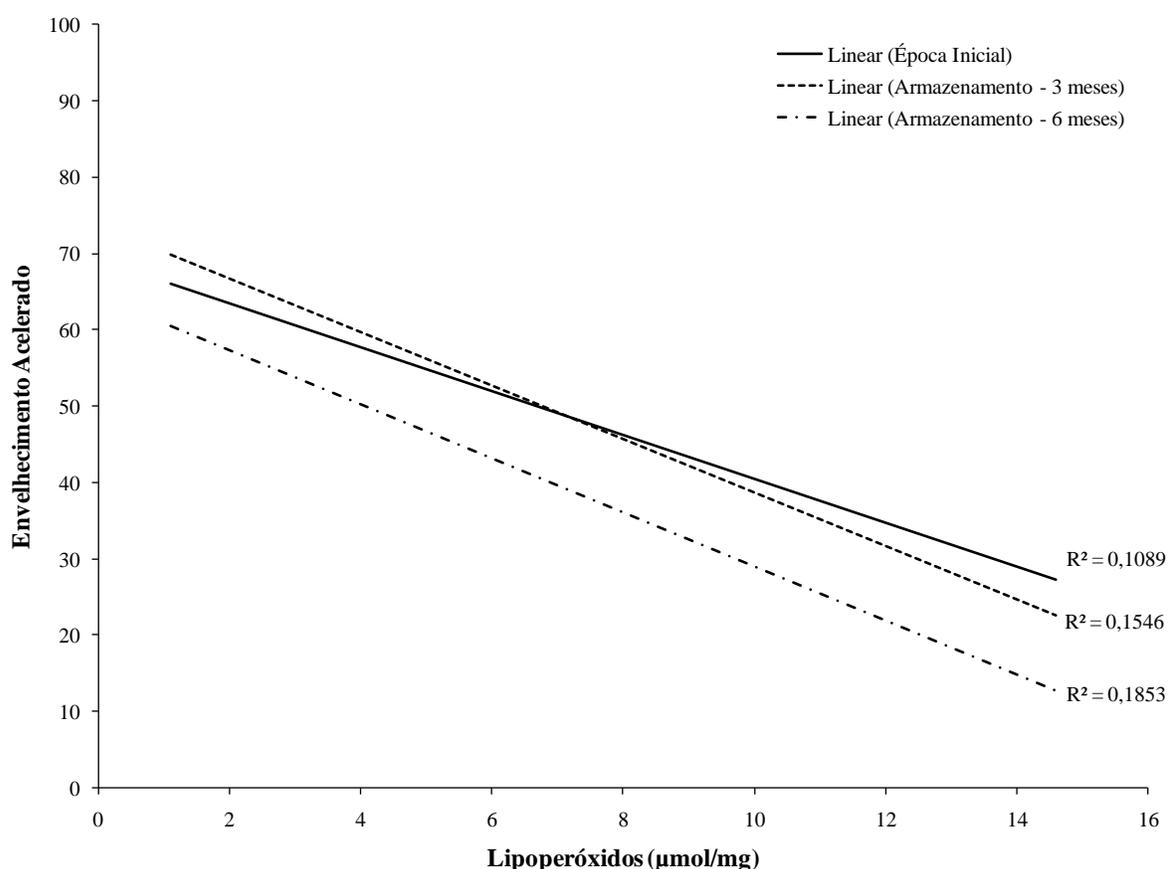


Figura 8. Correlação entre lipoperóxidos e o teste de envelhecimento acelerado em sementes de 67 lotes de soja em três épocas de avaliação.

O teor de lipoperóxidos correlacionou-se negativamente, também, com o vigor das sementes avaliado pelo teste de primeira contagem da germinação após três e seis meses de armazenamento (Figura 9). Wilson e McDonald (1986) foram consistentes ao

relatarem a peroxidação de lipídios como uma das causas de deterioração das sementes e relacioná-la com o declínio da viabilidade e do vigor.

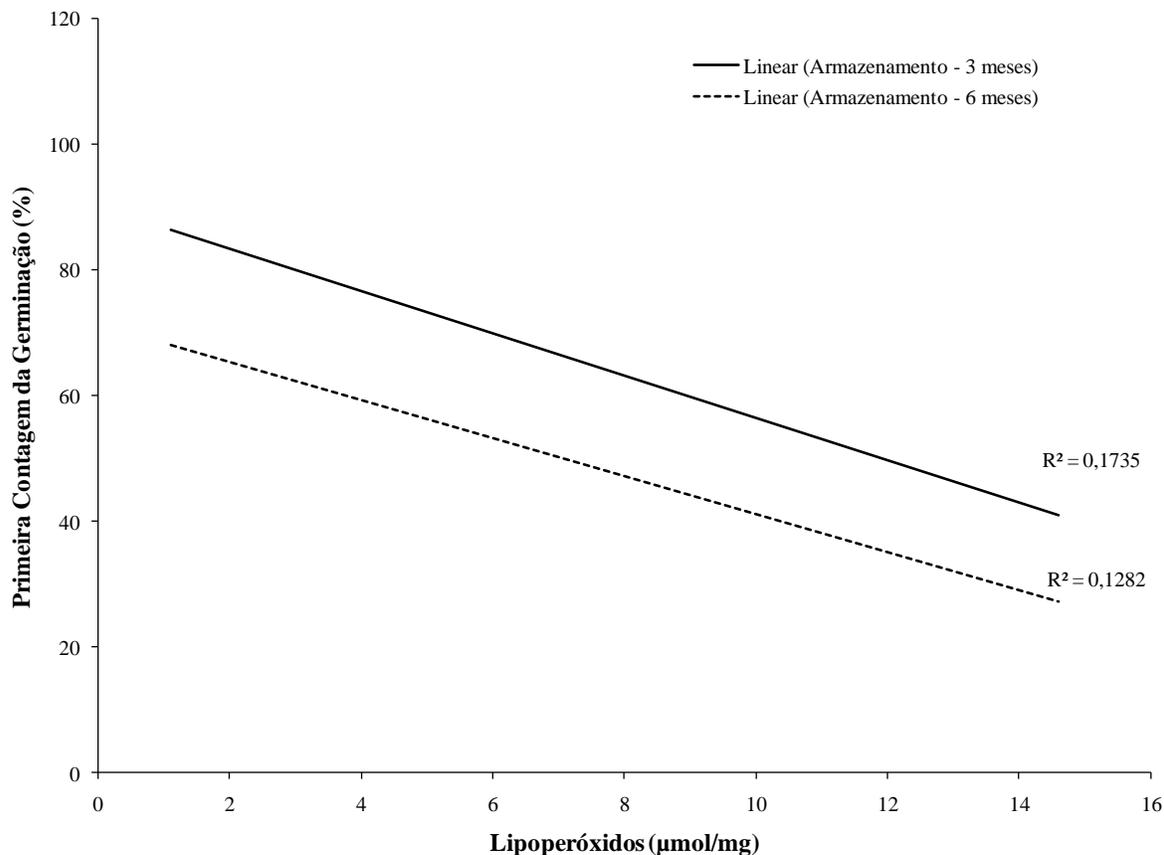


FIGURA 9. Correlação entre lipoperóxidos e a primeira contagem da germinação de sementes de 67 lotes de soja após o armazenamento.

Foi observada relação direta entre o conteúdo de lipoperóxidos e as leituras de condutividade elétrica da solução de embebição de sementes de soja (Figura 10); quanto maior a peroxidação de lipídeos maiores foram os danos causados às membranas e, conseqüentemente, maiores a taxa de lixiviação de solutos e a condutividade da solução.

De acordo com Adams et al. (1983) foi verificada, durante a embebição, lixiviação de grande quantidade de fosfato inorgânico, de açúcares e de proteínas solúveis de sementes de soja que sofreram processo de maturação e secagem rápida e que não degradaram a clorofila, em relação às que secaram lentamente. Esses autores consideraram,

ainda, a possibilidade da secagem rápida causar rompimento de membranas celulares e estruturas internas. Vieira & Krzyzanowski (1999) também relacionaram a quantidade de lixiviados na solução de embebição à integridade das membranas celulares. As membranas tornando-se permeáveis, pode não ocorrer a síntese de enzimas, a expansão e a divisão celular (HARRINGTON, 1973).

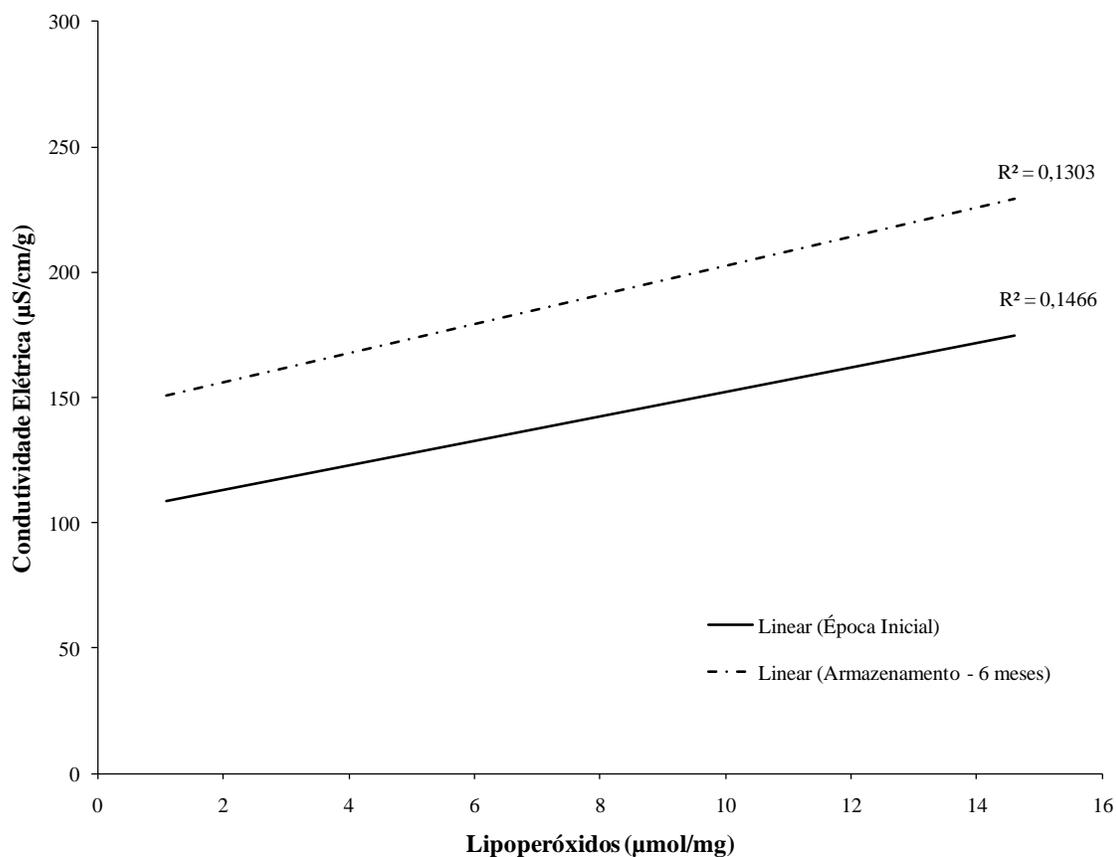


FIGURA 10. Correlação entre lipoperóxidos e o teste de condutividade elétrica em sementes de 67 lotes de soja na época inicial e no sexto mês de armazenamento.

A deterioração, cabe ressaltar, determinante de maiores leituras de condutividade elétrica da solução, não teve relação com o teor de clorofila. Todavia, as sementes verdes encontradas nos lotes analisados possivelmente sofreram distúrbios na maturação, fato mais provável de causa da deterioração desses lotes, conforme discutido anteriormente.

Nas três épocas de avaliação o comprimento das plântulas de soja diminuiu com o aumento no teor de lipoperóxidos (Figura 11), mais acentuadamente aos seis meses de armazenamento. Lotes com maior teor de lipoperóxidos estão mais deteriorados, portanto menos vigorosos. Khan et al. (1996) demonstraram relação entre a peroxidação de lipídeos e o acúmulo de radicais livres com o declínio da germinação, como também com a extensão do hipocótilo de plântulas de soja. Dan et al. (1987), também trabalhando com soja, verificaram maior comprimento de plântulas originadas de sementes mais vigorosas e justificaram esse fato pela maior capacidade de utilização do material de reserva existente nos cotilédones.

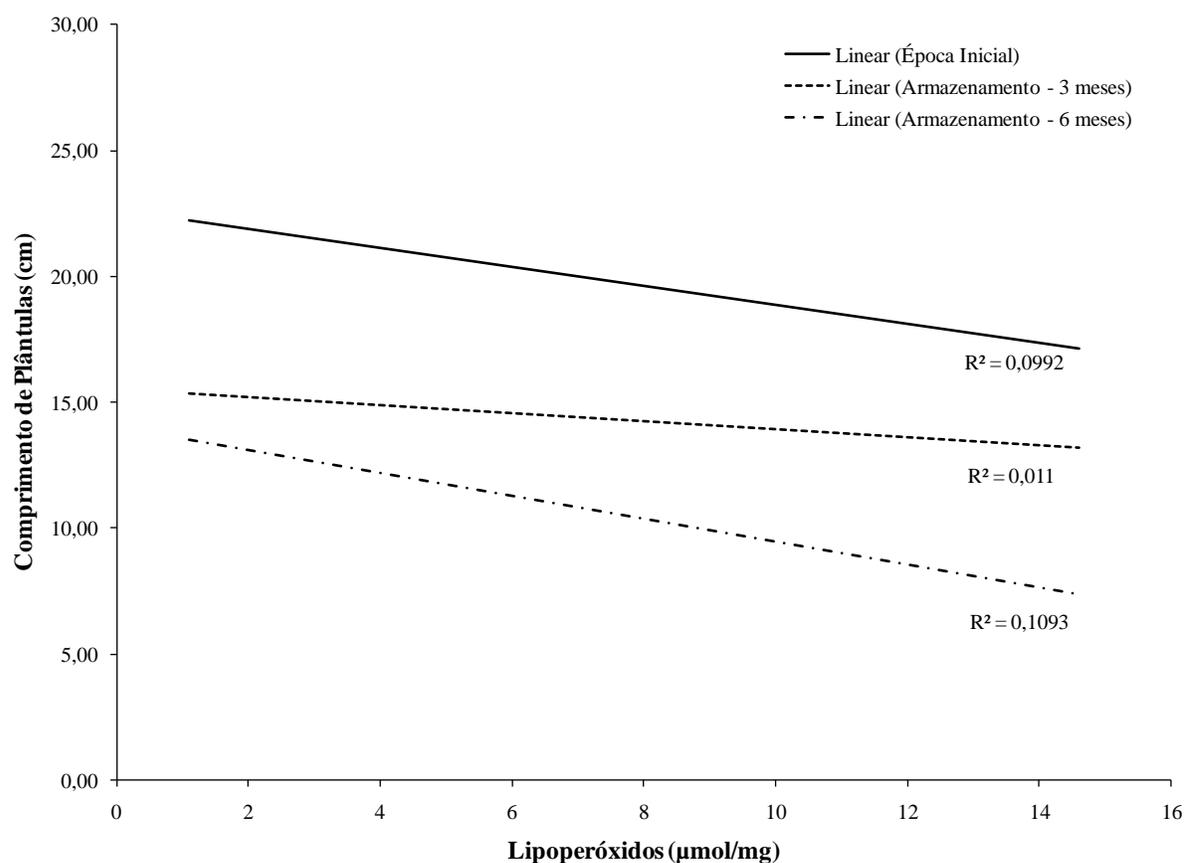


Figura 11. Correlação entre lipoperóxidos e o teste de comprimento de plântulas oriundas de sementes de 67 lotes de soja em três épocas de avaliação.

De modo semelhante, o conteúdo de lipoperóxidos encontrado nos lotes teve relação negativa com a massa de matéria seca de plântulas (Figura 12). As sementes provenientes de lotes com elevadas taxas de peroxidação de lipídeos originaram plântulas que se desenvolveram menos; possivelmente, a translocação de assimilados dos cotilédones para os tecidos em crescimento das plântulas foi menor e, portanto, resultou em massa de matéria seca inferior.

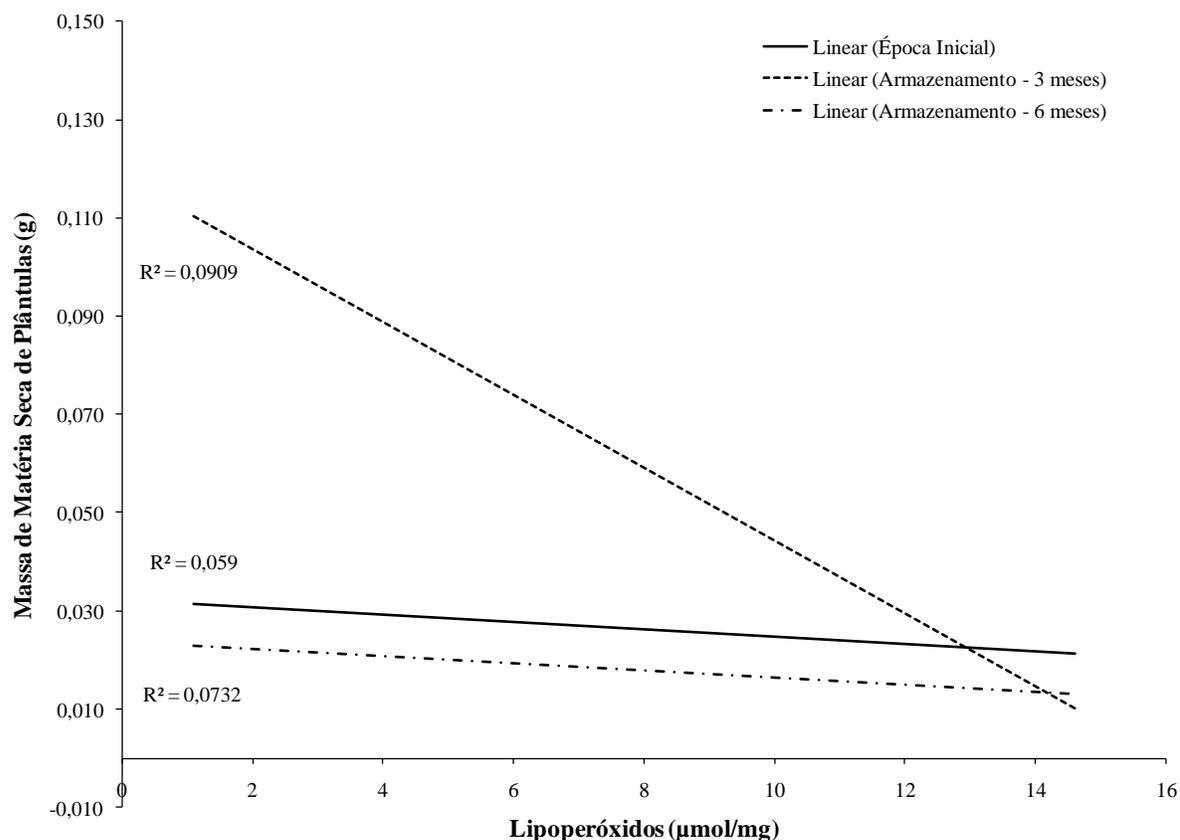


Figura 12. Correlação entre lipoperóxidos e o teste de massa de matéria seca de plântulas oriundas de sementes de 67 lotes de soja em três épocas de avaliação.

É, portanto, compreensível sementes com altos teores de lipoperóxidos terem reduzida qualidade fisiológica (germinação e vigor), efeito que acentua-se durante o armazenamento.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Qualidade de sementes é um conceito complexo, e envolve vários componentes, cada um representando princípios fisiológicos diferentes, como por exemplo potencial germinativo, viabilidade, vigor e longevidade. Por causa dessa complexidade, tem sido problemático encontrar marcadores físicos, bioquímicos ou moleculares que, de modo inequívoco e reprodutível, predigam o desempenho das sementes em campo ou após armazenamento.

O processo de formação e desenvolvimento exerce influência sobre o comportamento das sementes, conseqüentemente sobre a qualidade destas. Sendo assim, informações a respeito da maturação das sementes são essenciais ao estudo de fisiologia de sementes, pois sementes de diferentes estádios de maturação podem apresentar atividades bioquímicas variadas, o que ocasiona diferentes comportamentos fisiológicos.

Portanto, a qualidade das sementes é definida durante a fase de desenvolvimento e maturação, de forma que estudos realizados nos últimos anos mostraram a clorofila como indicador de maturidade das sementes e, assim, indiretamente de sua qualidade.

Nos estudos de Suhartanto (2002) ficou claro o maior teor de clorofila sementes de tomate como determinante de qualidade inferior, quando analisadas antes de atingir a maturidade fisiológica. No entanto, após a maturidade fisiológica não há evidências

claras de que essa correlação ocorre de forma negativa. O autor, do mesmo modo, não encontrou indicações claras de que sementes maduras com alto conteúdo de clorofila sofreram mais com os estresses oxidativos que àquelas com menor conteúdo de clorofila.

No presente estudo não ficou clara a relação entre a clorofila e a qualidade das sementes, tampouco a relação entre esse pigmento e a peroxidação de lipídeos, uma das causas da deterioração de sementes. Há indicativos de que a presença de clorofila não é a causa da baixa qualidade em sementes verdes de soja. Contudo, são fortes as evidências de que o estágio de maturação das sementes exerça influência mais significativa sobre a qualidade de lotes com altos índices de sementes verdes.

Com os resultados obtidos nesse estudo pode-se enfatizar a importância das condições ambientais, especialmente durante as fases de deposição de reservas e maturação das sementes de soja. Todavia, estudos futuros, utilizando metodologias diferentes, são necessários para tornar possível o estabelecimento de uma relação segura entre a clorofila e os possíveis estresses oxidativos que poderiam ser a causa de qualidade inferior dos lotes com presença de sementes verdes.

8 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se afirmar que:

- Sementes maduras de soja com retenção de clorofila não possuem atividade fotossintética.
- O resultado do comportamento dos lotes agrupados por regiões, quanto à presença de clorofila e sua relação com a qualidade das sementes, não foi consistente considerando o conjunto de dados analisados.
- A ocorrência de sementes verdes em lotes de soja é indicativo de qualidade inferior, sem relação clara, no entanto, entre o teor de clorofila das sementes e a qualidade fisiológica dos lotes.
- O teor de lipoperóxidos expressou relação inversa com a qualidade dos lotes de soja após o armazenamento, independente da presença de sementes verdes ou esverdeadas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-BAKI, A. A.; ANDERSON, J. D. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. **Crop Science**, Madison, v. 13, n. 6, p. 630-633, Nov./Dec. 1973.

ABELES, F. B.; HERSHBERGER, W. L.; DUNN, L. J. hormonal regulation and intracellular localization of a 33-kD cationic peroxidase in excised cucumber cotyledons. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 86, p. 664-668, 1989.

ADAMS, C. A.; FJERSTAD, M. C.; RINNE, R. W. Characteristics of soybean seed maturation: necessity for slow dehydration. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 2, p. 265-267, 1983.

ADAMS, C. A.; FJERSTAD, M. C.; RINNE, R. W. Characteristics of soybean seed maturation: necessity for slow dehydration. **Crop Science**, Madison, v. 23, n. 2, p. 265-267, 1983.

ANDERSON, J. D. Metabolic changes associated with senescence. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 2, p. 401-416, 1973.

ANDREWS, A. K.; SVEC, L. V. Photosynthetic activity of soybean pods at different growth stages compared to leaves. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 55, p. 501-505, 1975.

APUYA, N. R. et al. The Arabidopsis embryo mutant achlepperless has a defect in the Chaperonin-60 alfa gene. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 126, p. 717-730, 2001.

ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidases in *Beta vulgaris*. **Plant physiology**, Minneapolis, v. 24, n. 1, p. 1-15, 1949.

ASOKANTHAN, P. S.; JOHNSON, R. W.; GRIFFITH, M.; KROL, M. The photosynthetic potential of canola embryos. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 101, p. 353-360, 1997.

BAISAK, R. et al. Alterations in the activities of active oxygen scavenging enzymes of wheat leaves subjected to water stress. **Plant Cell Physiology**, Nagoya, v. 35, p. 489-95, 1994.

BAKER, C. J; ORLANDI, E. W. Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review Phytopathology**, Davis, v. 33, p. 299-321, 1995.

BECANA, M. et al. Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. **Physiology Plant**, v. 109, p. 372-81, 2000.

BELIGNI, M. V.; LAMATTINA, L. Nitric oxide counteracts cytotoxic processes mediated by reactive oxygen species in plant tissues. **Planta**, Heidelberg, v. 208, p. 337-344, 1999.

BERQUÓ, E.; SOUZA, J. M. P.; GOTLIEB, S. L. D. **Bioestatística**. 2. ed. São Paulo: Pedagógica Universitária, 1981. 350 p.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. **Introdução à química de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Varela, 1989. 223 p.

BOHNER, H. **Green soybeans**. 2002. Disponível em:
<http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/field/news/croptalk/2002/ct_1102a2.htm>.
Acesso em: 26 mar. 2010.

BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; TÜRKAN, I. The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. 77-84, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para a análise de sementes**. Brasília, DF, 2009. 399 p.

BREEMEN, R. B.; CANJURA, F. L.; SCHWARTZ, S. J. Identification of chlorophyll derivatives by mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 39, n. 8, p. 1452-1456, Aug. 1991.

CENKOWSKI, S.; JAYAS, D. S. Pontencial of in-field and low-temperature drying for reducing chlorophyll contents in canola (*Brassica napus* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Bognor Regis, v. 63, p. 377-383, 1993.

CENKOWSKI, S.; SOKHANSANJ, S.; SOSULSKI, F. W. Effect of harvest date and swathing on moisture content and chlorophyll content of canola seed. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 69, n. 7, p. 925-928, 1989a.

CENKOWSKI, S.; SOKHANSANJ, S.; SOSULSKI, F. W. The effect of drying temperature on green color and chlorophyll content of canola seed. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, Ottawa, v. 22, n. 4, p. 383-386, 1989b.

CIONI, M.; PINZAUTI, G.; VANNI, P. Comparative biochemistry of the glyoxylate cycle. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 70, n. 1, p. 1-26, 1981.

COGDELL, R. The functions of pigments in chloroplasts. In: GOODWIN, T. W. (Ed.). **Plant Pigments**. London: Academic Press, 1988. p. 183-230.

COSTA, A. V.; SEDIYAMA, T.; SILVA, R. F. **Alguns fatores que afetam a qualidade fisiológica da semente de soja**. Goiânia: EMGOPA, 1987. 48 p.

COSTA, N. P. et al. Efeito de sementes verdes na qualidade fisiológica de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 23, n. 2, p. 102-107, 2001.

DAHLÉN, J. A. H. Chlorophyll content monitoring of Swedish rapeseed and its significance in oil quality. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, Champign, v. 50, n. 8, p. 312-327, 1973.

DAN, E. L. et al. Transferência de matéria seca como método de avaliação do vigor de semente de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 9, n. 3, p. 45-55, 1987.

DAVIS, D. G.; SWANSON, H. R. Activity of stress-related enzymes in the perennial weed leafy spurge (*Euphorbia esula* L.). **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 46, p. 95-108, 2001.

DE LA LOMA, J. L. **Experimentación agrícola**. México: Hispano Americana, 1966. 500 p.

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

DORNBOS, D. L.; MULLEN, R. E.; SHIBLES, R. M. Drought stress effects during seed fill on soybean seed germination and vigor. **Crop Science**, Madison, v. 29, n. 2, p. 476-480, 1989.

DROOG, F. N. J.; HOOYKAAS, P. J. J.; VAN DER ZAAL, B. J. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxinregulated type-III tobacco glutathione S-transferases. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 107, p. 1139-46, 1995.

EGLI, D. B. Rate of accumulation of dry weight in seed of soybeans and its relationship to yield. **Canadian Journal Plant Science**, Ottawa, v. 55, n. 1, p. 215-219, 1975.

EGLI, D. B. Seed growth and development . In: EGLI, D. B. (Ed.). **Seed biology and the yield of grain crops**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 15-37.

EGLI, D. B. Seed water relations and the regulation of the duration of seed growth in soybean. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, n. 223, p. 243-248, 1990.

ELLIS, R. H.; PIETA FILHO, C. The development of seed quality in spring and winter cultivars of barley and wheat. **Seed Science Research**, Wallingford, v. 2, n. 1, p. 9-15, Mar. 1992.

ELSTNER, E. F. Oxygen activation and oxygen toxicity. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 33, p. 73-96, 1982.

ENDO, Y.; USUKI, R.; KANEDA, T. The photooxidative alteration of chlorophylls in methyl linoleate and prooxidant activity of their decomposition products. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 985-989, 1984.

FERREIRA, L. C. **Ação protetora do óxido nítrico em plantas de soja (*Glycine Max L. Merrill*) submetidas ao lactofen**. 2007. 155 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas em Botânica)-Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

FLURY, T.; KREUZ, K.; WAGNER, E. H₂O₂ generation and the influence of antioxidants during the 2,3,5-triodobenzoic acid-mediated induction of glutathione Stransferase in soybean. **Phytochemistry**, v. 49, p. 37-41, 1998.

FOYER, C. H.; LELANDAIS, M.; KUNERT, K. J. Photooxidative stress in plants. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 92, p. 696-717, 1994.

FOYER, C.H., LOPEZ-DELGADO, H., DAT, J.F., SCOTT, I.M. Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signaling. **Physiologia Plantarum**, Lund, v.100, p. 241-254, 1997.

FRANÇA NETO, J. B. et al. **Semente esverdeada de soja e sua qualidade fisiológica**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005. 8 p. (Circular técnica, 38).

FRANÇA NETO, J. B. et al. Tecnologia de produção de sementes. In: EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA SOJA. **A cultura da soja no Brasil**. Londrina, 2000. 1 CD-ROM.

FRANÇA-NETO, J. B. et al. Removal of green seeds of soybean from seed lots by processing. In: INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION CONGRESS, 28., Foz do Iguaçu, 2007. **Abstracts...** Foz do Iguaçu, 2007. p. 12.

FUKUSHIMA, P. S.; LANFER-MARQUEZ, U. M. Chlorophyll derivatives of soybean during maturation and drying conditions. In: INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND

UTILIZATION CONFERENCE, 3., 2000, Tsukuba. **Proceedings...** Foz do Iguaçu, 2000. p. 87-88.

GIARDI, M. T.; MASOJIDEK, J.; GODDE, D. Effects of abiotic stresses on the turnover of the D1 reaction centre II protein. **Physiologia Plantarum**, Lund, v. 101, p. 635-42, 1997.

GOSSAUER, A.; ENGEL, N. Chlorophyll catabolism: structures, mechanisms, conversions. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology**, Lausanne, v. 32, n. 3, p. 141-151, Feb. 1996.

GRONWALD, J. W.; PLAISANCE, K. L. Isolation and characterization of glutathione S-transferase isozymes from sorghum. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 117, p. 877-92, 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals, and disease. **Biochemical Journal**, Gothenburg, v. 219, p. 1-14, 1984.

HARRINGTON, J. F. Biochemical basis of seed longevity. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 1, n. 2, p. 453-461, 1973.

HEATON, J. W.; MARANGONI, A. G. Chlorophyll degradation in processed foods and senescent plant tissues. **Trends in Food Science and Technology**, Oxford, v. 7, n. 1, p. 8-15, Jan. 1996.

HENDRY, G. A. F. et al. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, Lancaster, v. 122, p. 273-279, 1992.

HENDRY, G. A. F. Oxygen, free radical processes and seed longevity. **Seed Science Research**, New York, v. 3, p. 141-153, 1993.

HENDRY, G. A. F.; HOUGHTON, J. D.; BROWN, S. The degradation of chlorophyll- a biological enigma. **New Phytologist**, Lancaster, v. 107, n. 2, p. 255-302, 1987.

HUNG, K. T.; KAO, C. H. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 871-9, 2003.

JALINK, H. et al. Chlorophyll fluorescence of *Brassica oleracea* seeds as a non-destructive marker for seed maturity and seed performance. **Seed Science Research**, New York, v. 8, n. 4, p. 437-443, 1998.

JALINK, H. et al. Seed chlorophyll content as an indicator for seed maturity and seed quality. **Acta Horticulturae**, Wageningen, v. 504, n. 12, p. 219-228, 1999.

JOHNSON-FLANAGAN, A. M.; SPENCER, M. S. Chlorophyllase and peroxidase activity during degreening of maturing canola (*Brassica napus*) and mustard (*Brassica juncea*) seed. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 97, p. 353-359, 1996.

JOHNSON-FLANAGAN, A. M.; THIAGARAJAH, M. R. Degreening in canola (*Brassica napus*, cv. Westar) embryos under optimum conditions. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 136, n. 2, p. 180-186, May 1990.

KHAN, M. M. et al. Free radical accumulation and lipid peroxidation in testas of rapidly aged soybean seeds: a light-promoted process. **Seed Science Research**, New York, v. 6, p. 101-107. 1996.

LALOI, C.; APEL, K.; DANON, A. Reactive oxygen signalling: the latest news. **Current Opinion in Plant Biology**, Oxford, v. 7, p. 323-328, 2004.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839 p.

LEVADOUX, W. L. et al. Pigment removal from canola oil using chlorophyllase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v. 64, n. 1, p. 139-144, 1987.

LIU, K. Immature soybeans: direct use for food. **INFORM**, Champaign, v. 7, n. 11, p. 1217-1223, 1996 a.

MALANGA, G.; PUNTARULO, S. Oxidative stress and antioxidant content in *Chlorella vulgaris* after exposure to ultraviolet-B radiation. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 94, p. 672-9, 1995.

MANDARINO, J. M. G. **Coloração esverdeada nos grãos de soja e seus derivados**. Londrina: EMBRAPA Soja, 2005. 4 p. (Comunicado técnico, 77).

MANGOS, T. J.; BERGER, R. G. Determination of major chlorophyll degradation products. **Zitschrift fur Lebensmittel – Untersuchung und-Forschung**, New York, v. 204, n. 5, p. 345-350, 1997.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.495p.

MARCOS FILHO, J. Maturidade fisiológica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 15, n. 4, p. 447-460, abr. 1980.

MARCOS FILHO, J. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYZANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA-NETO, J. B. (Eds.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap. 3, p. 1-24.

McDONALD, M. B. Jr. A review and evaluation of seed vigor tests. **Proceedings of the Association of Official Seed Analysts**, Lansing, v. 65, p. 109-139, 1975.

McGREGOR, D. I. Influence of environment and genotype on rapeseed/canola seed chlorophyll content. **Sees Science and Tecnology**, Zurich, v. 19, n. 1, p. 109-139, 1991.

McINTYRE, G. I. The role of water in the regulation of plant development. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 65, n. 7, p. 1287-1298, 1987.

MEDINA, P. F. et al. Composição física e qualidade de lotes de sementes de soja com incidência de sementes esverdeadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 10., 1997, Foz do Iguaçu. **Informativo ABRATES**, Curitiba, p. 36, 1997.

MENDONÇA, E. A. F. et al. Teste de deterioração controlada em sementes de brócoli (*Brassica oleraceae* L.) var. *itálica*. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 22, n. 1, p. 280-287, 2000.

MISRA, N.; GUPTA, A. K. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 163, p. 11-18, 2006.

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

MOLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 58, p. 459-81, 2007.

MOUNTS, T. L. et al. Quality of soybeans in export. **Journal of the American Chemical Society**, Champaign, v. 67, n. 11, p. 743-746, 1990.

MUNSELL, A. H. **Munsell book of color**. Baltimore: Macbeth Division of Kollmorgen, 1976.(Mathefinish collection).

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados na avaliação das plântulas. In: VIEIRA, R. D.; CARVALHO, N. M. (Eds.). **Testes de vigor em sementes**. Jaboticabal: FUNEP, 1994. p. 49-85.

PÁDUA, G. P. et al. Tolerance level of green seed in soybean lots after storage. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 112-120, 2007.

PÁDUA, G. P. **Retenção de clorofila e seus efeitos sobre a qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2006. 160 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

POLIDOROS, A. N.; SCANDALIOS, J. G. Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.). **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 106, p. 112-20, 1999.

PORRA, R.; THOMPSON, W. A.; KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equation for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 975, p. 384-394, 1989.

PRASAD, K. V. S. K.; SARANDHI, P. P.; SHARMILA, P. Concerted action of antioxidant enzymes and curtailed growth under zinc toxicity in *Brassica juncea*. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 42, p. 1-10, 1999.

PRASAD, M. N. V.; RENGEL, Z. Plant acclimation and adaptation to natural and anthropogenic stress. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 851, p. 216-223, 1998.

PRIESTLEY, D. A. et al. Organic free radical levels in seeds and pollen: The effects of hydration and aging. **Physiologia Plantarum**, Munksgaard, v. 64, n. 1, p. 88-94, 1985.

PRIESTLEY, D. A.; LEOPOLD, A. C. Lipids changes during natural aging of soybean seeds. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 59, n. 1, p. 467-470, 1983.

QUEBEDEAUX, B.; CHOLLET, R. Growth and development of soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) pods. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 55, p. 745-748, 1975.

RABINOWITCH, H. D.; FRIDOVICH, L. Superoxide radicals, superoxide dismutases and oxygen toxicity in plants. **Photochemistry and Photobiology**, v. 37, p. 679-690, 1983.

RADETSKI, C. M.; COTELLE, S.; FÉRARD, J. F. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. **Environmental and Experimental Botany**, Amsterdam, v. 44, p. 221-9, 2000.

RAMA DEVI, S.; PRASAD, M. N. V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L. (Coontail), a free floating macrophyte: response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 138, p. 157-65, 1998.

RAO, M. V.; DAVIS, R. D. Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in *Arabidopsis*: the role of salicylic acid. **The Plant Journal**, v. 17, p. 603-614, 1999.

RAU, W. Functions of carotenoids other than in photosynthesis. In: GOODWIN, T. W. (Ed.). **Plant pigments**. London: Academic Press, 1988. p. 231-255.

RODRIGUEZ, M. T.; GONZALES, M. P.; LINARES, J. M. Degradation for chlorophyll and chlorophyllase activity in senescing barley leaves. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 129, p. 369-374, 1987.

SCANDALIOS, J. G. Oxygen stress and superoxide dismutases. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 101, p. 7-12, 1993.

SCHREIBER, U. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high frequency modulated chlorophyll fluorometer. **Photosynthesis Research**, v. 9, p. 261-272, 1986.

SCHWARTZ, S. J.; LORENZO, T. V. Chlorophylls in foods. **Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 29, n. 1, p. 1-17, 1990.

SHAH, K. et al. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. **Plant Science**, Amsterdam, v. 161, p. 1135-1144, 2001.

SHIMOKAWA, K.; SHIMADA, S.; YAEO, K. Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of Citrus unshiu Marc. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 8, n. 2, p. 129-135, 1978.

SIES, H. et al. Glutathione peroxidase protects against peroxynitrite-mediated oxidations. A new function for selenoproteins as peroxynitrite reductase. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 272, p. 27812-27817, 1997.

SINGAL H. R.; SHEORAN, I. S.; SINGH R. Photosynthetic carbon fixation characteristics of fruiting structures of *Brassica campestris* L. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 83, p. 1043-1047, 1987.

SINNECKER, P. **Degradação da clorofila durante a maturação e secagem de semente de soja**. 2002. 103 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SMIRNOFF, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. **New Phytologist**, Lancaster, v. 125, p. 27-28, 1993.

SPIEGEL, R. **Schaum`s outline and problems of probability and statistics**. 3 ed. São Paulo: MCGraw-Hill, 2008. 432 p.

STEWART, I.; WHEATON, T. A. Carotenoids in citrus: their accumulation induced by ethylene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 20, n. 2, p. 448-449, Mar./Apr. 1972.

STEWART, R. R. C.; BEWLEY, J. D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. **Plant Physiology**, Michigan,, v. 65, p. 245-246, 1980.

SUGIMOTO, T. et al. Photosynthetic activity in the developing cotyledon of soybean seeds. **Agricultural of Biology Chemistry**, v. 51, p. 1227-1230, 1987.

SUHARTANTO, M. R. Chlorophyll in tomato seeds: marker for seed performance? 2002. PhD Thesis. Wageningen University, Wageningen, 2002.

SUN, B. et al. Protective effect of nitric oxide on iron deficiency-induced oxidative stress in maize (*Zea mays*). **Journal of Plant Physiology**, v. 164, p. 536-43, 2007.

SUZUKI, Y.; TANABE, K.; SHIOI, Y. Determination of chemical oxidation products of chlorophyll and porphyrin by high-performance liquid chromatography. **Journal Chromatography**, Amsterdam, v. 839, n. 1/2, p. 85-91, Apr. 1999.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2002. 719 p.

TAKAMIYA, K.; TSUCHIYA, T.; OHTA, H. Degradation pathway(s) of chlorophyll: what has gene cloning revealed? **Trends in Plant Science**, London, v. 5, n. 10, p. 426-431, Oct. 2000.

THEANJUMPOL, P. **Effect of moisture content and curing temperature on seed color and quality of soybean**. 2002. Master Thesis. Chiang Mai University, 2002.

THÉRON, P. et al. Biomarkers of oxidative stress: an analytical approach. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, London, v. 3, p. 373-84, 2000.

THOMPSON, J. E.; LEGGE, R. L.; BARBER, R. F. the role of free radicals in senescence and wounding. **New Phytologist**, Lancaster, v. 105, p. 317-344, 1987.

USUKI, R.; ENDO, Y.; KANEKO, T. Prooxidant activities of chlorophylls and pheophytins on the photooxidation of edible oils. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 48, n. 4, p. 991-994, 1984.

VELINI, E. D. **Estudos e desenvolvimento de métodos experimentais e amostrais adaptados à matologia**. 1995. 250 f. Tese (Doutorado em Agronomia)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 1995.

VERMA, S.; DUBEY, R. S. Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. **Plant Science**, Amsterdam, v. 164, p. 645-655, 2003.

VERTUCCI, C. W.; LEOPOLD, A. C. Oxidative processes in soybean and pea seeds. **Plant Physiology**, Michigan, v. 84, n. 4, p. 1038-1043, 1987.

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

VILLELA, F. A.; MARCOS-FILHO, J. Estados energéticos e tipos de água na semente. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 20, n. 2, p. 317-321, 1998.

VILLIERS, T. A.; EDGECUMBE, D. J. On the cause of seed deterioration in dry storage. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 3, p. 761-774, 1975.

WARD, K. et al. Chlorophyll degradation in summer oilseed rape and summer turnip rape during seed ripening. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 75, n. 2, p. 413-420, 1995.

WARD, K. et al. Effects of genotype and environment on seed chlorophyll degradation during ripening in four cultivars of oilseed rape (*Brassica napus*). **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v. 72, n. 3, p. 643-649, 1992.

WILSON, D. O.; McDONALD, M. B. The lipid peroxidation model of seed aging. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 14, p. 296- 300, 1986.

WINSTON, G. W. Physiochemical basis for free radical formation in cells: production and defenses. In: ALSCHER, R. G.; CUMMING, J. R. (Eds). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York: Wiley-Liss, 1990. p. 57-86.

YAMAUCHI, N. et al. Chlorophyll degradation in Wase satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit with on-tree maturation and ethylene treatment. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 71, n. 1/2, p. 35-42, 1997.

ZORATO, M. de F. et al. Presença de sementes esverdeadas em soja e seus efeitos sobre seu potencial fisiológico. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 1, p. 11-19, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)