



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE**  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNIDADE ACADÊMICA ESPECIALIZADA EM CIÊNCIAS AGRÁRIAS - UAECIA  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FLORESTAIS**



**Envolvimento das reações hidrolíticas na deterioração das sementes de *Moringa oleifera* Lam. durante o armazenamento**

DANILO FLADEMIR ALVES DE OLIVEIRA

MACAÍBA/RN  
FEVEREIRO - 2017

**DANILO FLADEMIR ALVES DE OLIVEIRA**

Envolvimento das reações hidrolíticas na deterioração das sementes de *Moringa oleifera* Lam. durante o armazenamento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias, como parte integrante dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Florestais.

Orientador: Prof. Eduardo Luiz Voigt

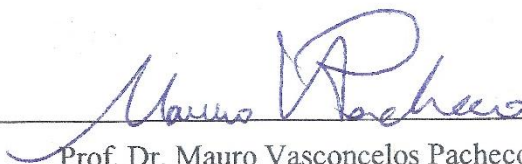
Coorientador: Prof. Mauro Vasconcelos Pacheco

MACAÍBA/RN  
FEVEREIRO - 2017

**Envolvimento das reações hidrolíticas na deterioração das sementes de  
*Moringa oleifera* Lam. durante o armazenamento**

Danilo Flademir Alves de Oliveira

Dissertação julgada para obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIAS FLORESTAIS, na área de Concentração em *CIÊNCIAS FLORESTAIS* (Linha de Pesquisa em *MANEJO E UTILIZAÇÃO DOS RECURSOS FLORESTAIS*), e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais, da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).



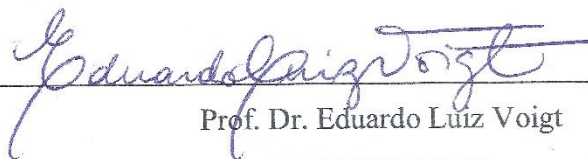
Prof. Dr. Mauro Vasconcelos Pacheco

Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Florestais

Prof. Dr. Fábio de Almeida Vieira

Vice Coordenador do Programa de Pós-Graduação  
em Ciências Florestais

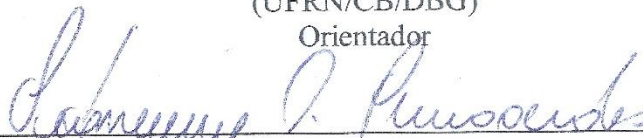
Banca examinadora:



Prof. Dr. Eduardo Luiz Voigt

(UFRN/CB/DBG)

Orientador



Prof. Dr. Sidney Carlos Praxedes

(UFRN/UAECIA)

Examinador interno



Dr. Thiago Barros Galvão

Examinador externo à instituição

Divisão de Serviços Técnicos  
Catalogação da Publicação na Fonte.  
Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Campus Macaíba  
Biblioteca Setorial Professor Rodolfo Helinski

Oliveira, Danilo Flademir Alves de  
Envolvimento das reações hidrolíticas na deterioração das sementes de  
*Moringa oleifera* Lam. durante o armazenamento / Danilo Flademir Alves de  
Oliveira . – Macaíba, RN, 2017.

45 f. -

Orientador (a): Prof. Prof. Dr. Eduardo Luiz Voigt  
Coorientador(a): Prof. Dr. Mauro Vasconcelos Pacheco

Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Campus Macaíba. Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais.

1. Armazenamento de sementes – Dissertação. 2. Hidrólise não enzimática – Dissertação. 3. Qualidade de sementes – Dissertação. 4. Reações de deterioração – Dissertação. I. Voigt, Eduardo Luiz. II. Pacheco, Mauro Vasconcelos. III. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. IV. Unidade Acadêmica Especializada em Ciências Agrárias Campus Macaíba. V. Título.

RN/UFRN/BSPRH

CDU: 631.528.2

Para as pessoas que possuem fé, não importa a crença, de que através do trabalho estão fazendo a diferença neste mundo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por mais uma oportunidade de estudo e por todos os presentes que Ele tem me dado, além da confiança que Ele me passa todos os dias. Muito obrigado, Senhor.

À CAPES por contribuir para a realização deste projeto.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte pelas instalações e pelo atendimento dos funcionários.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Florestais de UFRN por contribuírem para minha carreira profissional.

Ao Professor Eduardo Luiz Voigt por mais uma vez estar tão presente e motivado na realização deste projeto. Cada vez mais me faltam palavras para expressar a gratidão que eu tenho por todo seu empenho e atenção, sendo um exemplo que eu terei comigo por toda vida, além da amizade estabelecida ao longo de todos estes anos. E anos melhores virão! Muito obrigado!

À Professora Cristiane Macêdo e ao Professor Paulo Marinho pela disponibilização dos laboratórios para que este projeto fosse possível.

Aos companheiros do Laboratório de Estudos em Biotecnologia Vegetal, Yuri, Cibelle e Ingrid pelas experiências compartilhadas.

Aos amigos e membros da equipe de pesquisa, Ana Paula, Hanieri, Saniely, Willianne, Víctor, Natália, Francival, José Luiz, Eryhudson e Felipe pela força, ajuda e os bons momentos de descontração (que tenhamos mais momentos para as risadas). Em especial Saniely, por ser o braço direito para a execução deste trabalho e Ana Paula e Hanieri, grandes amigos que sabiam de perto tudo que acontecia durante todo este tempo e entendem minha maneira espontânea de ser. Obrigado!

Aos amigos Thiago, Jussara, Laís, Isabel, Emerson, Ciro, Paula, Demétrios, Denilson e Hudson pelo aprendizado e amizade durante a estadia de vocês no laboratório e por tudo que aprendemos e produzimos juntos.

Aos amigos Lucas (sem palavras para dizer o quanto você me ajudou pessoalmente), Januário, Víctor Moura, Míclécia, Djalma, Elisama, Luanna, Beatriz e Roniclepson por mais uma

vez me darem a certeza de que eu sou muito abençoado por ter todos vocês em minha vida.

Aos amigos e colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Florestais da UFRN, em especial a Guilherme Vinícius e Jéssica Mayara por todos os momentos de trabalho e descontração.

Aos amigos do grupo Emanuel – Deus conosco, em especial a Wagner e Jefferson por serem amigos muito especiais e exemplos de fé. Obrigado!

Aos meus pais, Edna e Jailton, minhas irmãs, Emannuella e Rafhaella, e meus cunhados, Cláudio e Nilberg por serem o alicerce e a maior motivação para tudo isso. A alegria e o mérito da conclusão deste projeto também são de vocês. Muito obrigado.

A todas as pessoas que buscam a felicidade em fazer o que gosta, irradiando alegria por onde passa.

**OBRIGADO!**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	3
1.1 Deterioração de sementes .....	3
1.2 Reservas nutritivas e degradação hidrolítica .....	5
1.3 <i>Moringa oleifera</i> Lam. ....	8
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	10
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	11
3.1 Obtenção das sementes.....	11
3.2 Condições de armazenamento .....	11
<b>3.3 Determinações físicas</b> .....	11
3.3.1. Teor de água das sementes .....	11
<b>3.4 Determinações fisiológicas</b> .....	11
3.4.1 Porcentagem de germinação.....	11
3.4.2 Tempo médio de germinação .....	12
3.4.3 Comprimento de plântula .....	12
3.4.4 Massa seca de plântula .....	12
<b>3.5 Determinações bioquímicas</b> .....	12
3.5.1 Obtenção dos embriões .....	12
3.5.2 Lipídios neutros.....	12
3.5.3 Açúcares solúveis totais, açúcares não redutores e aminoácidos livres totais.....	13
3.5.4 Amido.....	13
3.5.5 Proteínas solúveis.....	13
<b>3.5.6 Atividades enzimáticas</b> .....	14
3.5.6.1 Lipases.....	14
3.5.6.2 Amilases.....	14
3.5.6.3 Proteases ácidas.....	14
<b>3.6 Delineamento experimental</b> .....	15
<b>4. RESULTADOS</b> .....	16
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	21
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	28



**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 Teor de água (**A**), porcentagem de germinação (**B**) e tempo médio de germinação (**C**) para sementes de moringa armazenadas sob refrigeração ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e 65% de UR, círculo fechado). 17
- Figura 2 Massa seca (**A**) e comprimento (**B**) de plântulas oriundas de sementes de moringa ao longo do armazenamento sob refrigeração ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e 65% de UR, círculo fechado). 18
- Figura 3 Conteúdo de lipídios neutros (**A**) e atividade de lipases (**B**) em embriões provenientes de sementes de moringa armazenadas sob refrigeração ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e 65% de UR, círculo fechado). 19
- Figura 4 Conteúdo de proteínas solúveis totais (**A**), atividade de proteases ácidas (**B**) e conteúdo de aminoácidos livres totais (**C**) em embriões provenientes de sementes de moringa armazenadas sob refrigeração ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e 65% de UR, círculo fechado). 20
- Figura 5 Conteúdo de amido (**A**), atividade de amilases (**B**), conteúdo de açúcares solúveis totais (**C**) e açúcares não redutores (**D**) em embriões provenientes de sementes de moringa armazenadas sob refrigeração ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e 65% de UR, círculo fechado). 21

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**AAL** – aminoácidos livres

**AALT** – aminoácidos livres totais

**AGEs** – produtos finais de glicação avançada (do inglês *Advanced Glycation End-Products*)

**ANR** – açúcares não redutores

**AR** – açúcares redutores

**AST** – açúcares solúveis totais

**DNS** – 3,5-dinitro-salicilato

**EROs** – Espécies reativas de oxigênio

**LN** – lipídios neutros

**MF** – massa fresca

**MS** – massa seca

**OSRs** – oligossacarídeos da série rafinósica

**PS** – proteínas solúveis

**TAG** – triacilglicerol

**TMG** – tempo médio de germinação

**UR** – umidade relativa

**VEPs** – vacúolos de estocagem de proteínas

**%G** – porcentagem de germinação

## Resumo

Este trabalho almejou investigar o envolvimento das reações hidrolíticas na perda da qualidade de sementes *Moringa oleifera* Lam. (moringa) durante o armazenamento sob condições controladas. Para tanto, as sementes foram acondicionadas em embalagens plásticas semipermeáveis e foram armazenadas em câmara de crescimento ( $27 \pm 2$  °C e UR de 65%) e em refrigerador ( $4 \pm 2$  °C e UR de 25%) por 18 meses. As coletas foram realizadas antes do armazenamento e a cada três meses. Foram avaliados o teor de água das sementes, a porcentagem e o tempo médio de germinação, o comprimento e a massa seca de plântulas, o conteúdo de lipídios neutros, amido, proteínas solúveis, açúcares solúveis totais e não redutores e aminoácidos livres totais, além da atividade de lipases, amilases e proteases ácidas. Apenas nas sementes armazenadas em refrigerador, não houve alterações significativas no teor de água, na viabilidade e no vigor, assim como não ocorreu diminuição do conteúdo de lipídios neutros, amido, açúcares solúveis totais e não redutores e aminoácidos livres totais, ao final de 12 meses. O conteúdo de proteínas solúveis diminuiu progressivamente ao longo do tempo, independente do ambiente de armazenamento. A partir dos 12 meses, a diminuição da viabilidade e do vigor foi acompanhada pela redução do conteúdo de lipídios neutros, proteínas solúveis, açúcares solúveis totais e açúcares não redutores e pelo aumento da atividade de lipases e proteases ácidas, nas sementes conservadas em câmara de crescimento e em refrigerador. Discute-se o papel da hidrólise enzimática e não enzimática na deterioração das reservas nutritivas ao longo do armazenamento. Pelo menos para fins de plantio, recomenda-se que as sementes de moringa sejam armazenadas em ambiente refrigerado com baixa UR por até 12 meses.

**Palavras-chave:** Armazenamento de sementes; Hidrólise não enzimática; Qualidade de sementes; Reações de deterioração.

## **Involvement of hydrolytic reactions in the deterioration of *Moringa oleifera* Lam. seeds during storage**

### **Abstract**

The aim of this work was to investigate the deterioration of *Moringa oleifera* Lam. (moringa) seeds during storage under controlled conditions. Seeds were conditioned in semipermeable plastic bags and stored in a growth chamber ( $27 \pm 2$  °C and RH 65%) and in a refrigerator ( $4 \pm 2$  °C and RH 25%) for 18 months. Harvests were performed prior to storage and every 3 months. Water content, germination percentage, mean germination time, seedling length and dry weight, and content of neutral lipids, starch, soluble proteins, total soluble sugars, non-reducing sugars, and total free amino acids, as the activity of lipases, amylases and acid proteases were evaluated. Water content, viability, and vigor remained unchanged, as well as the content of neutral lipids, starch, total soluble sugars, non-reducing sugars, and total free amino acids did not decrease in the seeds stored under refrigeration during 12 months. The content of soluble proteins decreased progressively over time, regardless of the storage environment. Viability and vigor loss was accompanied by a decrease in the content of neutral lipids, soluble proteins, total soluble sugars and non-reducing sugars and an increase in the activity of lipases and acid proteases in the seeds stored in the growth chamber and in the refrigerator. The role of enzymatic and non-enzymatic hydrolysis in deterioration of food reserves during natural aging is discussed. For cultivation purposes, moringa seeds should be stored under refrigeration at low relative humidity for up to 12 months.

**Key words:** Deterioration reactions; Non-enzymatic hydrolysis; Seed quality; Seed storage

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 - Deterioração de sementes

As sementes apresentam elevada importância para o estabelecimento de plantios florestais voltados à produção de bens e serviços e à recuperação de áreas degradadas (SENA, 2008). Além disso, as sementes consistem em insumos para o estabelecimento das lavouras, alimento para os seres humanos e os animais domesticados (BEWLEY et al., 2013) e fontes de matérias-primas para a indústria de alimentos (BUCKERIDGE et al., 2004) e, mais recentemente, de biocombustíveis (DABDOUB e BRONZEL, 2009).

A utilização das sementes como insumos florestais, agrícolas, industriais e fontes de alimentos baseia-se nas reservas nutritivas armazenadas. Se a degradação das reservas for desencadeada durante o armazenamento das sementes, a sua qualidade para o plantio, o consumo ou o uso industrial pode ser comprometida. De forma similar, a alteração das reservas por fatores físicos, químicos e biológicos deve ser evitada para a manutenção da qualidade das sementes até a sua utilização. Assim sendo, o estudo da deterioração das sementes no decorrer do armazenamento é fundamental para programas de conservação e produção de sementes no setor agroflorestal, além do desenvolvimento de tecnologias voltadas à indústria de alimentos e biocombustíveis.

A deterioração das sementes pode ser definida como mudanças nocivas que ocorrem na semente ao longo do tempo, as quais podem ser detectadas durante o armazenamento. Este processo é causado por uma combinação de vários fatores decorrentes dos eventos de dessecação ou de pós-maturação e a consequente incapacidade de reparar lesões, impedindo as células de completarem processos essenciais para a germinação, acarretando na morte da semente (BLACK et al., 2006).

Os fatores externos que promovem a deterioração das sementes durante o armazenamento são a temperatura, a umidade relativa do ar e a pressão parcial do oxigênio (SHABAN, 2013). Além disso, fatores bióticos como fungos e insetos também contribuem para o processo de deterioração (BILAL e ABIDI, 2015). Entretanto, a temperatura e a umidade relativa do ar são os principais fatores que contribuem para a longevidade das sementes. O grau com que os processos de deterioração atuam depende da resistência das

sementes a estes fatores e os mecanismos de proteção utilizados, os quais variam entre as espécies de plantas (MOHAMMADI et al., 2011).

Os processos que ocorrem durante a deterioração das sementes são irreversíveis, consistindo em uma sequência de etapas iniciada por eventos bioquímicos em cascata, culminando com a redução da velocidade de germinação, além de danos em membranas e em reações de biossíntese, resultando em baixa performance no campo, no aumento da frequência de plântulas anormais e finalmente a morte das sementes (BILAL e ABIDI, 2015). Ao nível molecular, ocorrem alterações estruturais e metabólicas durante o envelhecimento, como a diminuição da capacidade para biossíntese de RNA e proteínas, a degeneração das mitocôndrias, o aumento de quebras nos cromossomos, a peroxidação dos lipídios de membrana (BEWLEY et al., 2013) e alterações enzimáticas, como a redução da atividade de lipases, amilases, proteases, ribonucleases, peroxidases, entre outras (SHABAN e MOTLAGH, 2014; BILAL e ABIDI, 2015).

Várias reações químicas e físicas contribuem para a deterioração das sementes durante o armazenamento. As reações físicas alteram a estrutura de biomoléculas ou a distribuição destas dentro das células, como mudanças na polaridade dos lipídios, que podem resultar na perda da função das membranas ao longo do tempo. Além disso, alterações nas estruturas de proteínas acarretam a perda da função de algumas enzimas e mudanças na configuração de carboidratos podem levar à cristalização, comprometendo a função protetora destas biomoléculas (BLACK et al., 2006).

As reações químicas decorrentes do processo de deterioração ocorrem em diferentes condições de umidade e o balanço entre estes tipos de reações varia dentro das células conforme a concentração dos substratos disponíveis, mas geralmente consistem na degradação de grandes biomoléculas em moléculas menores. Estas reações podem ser classificadas como hidrolíticas, oxidativas e peroxidativas e ocorrem sob condições de alta, intermediária ou baixa umidade relativa, respectivamente (BLACK, 2006). Exemplos de reações hidrolíticas incluem a desesterificação de lipídios, produzindo ácidos graxos e glicerol, bem como a despolimerização do amido em açúcares. Os açúcares livres podem participar das primeiras etapas das reações de Amadori e Maillard, reagindo com o grupo amino de aminoácidos, peptídeos ou proteínas para formar as bases de Schiff. Em seguida, reações não enzimáticas sucessivas originam os produtos de Amadori, os quais se agrupam em novos arranjos moleculares, produzindo intermediários

altamente reativos, até formarem os produtos de glicação avançada (AGEs), relacionados com o envelhecimento celular (BLACK et al., 2006; POPOVA et al., 2010; NEDIĆ et al., 2013; SZALKA et al., 2014;).

As reações de oxidação envolvem tanto as reações de oxirredução, nas quais há remoção de elétrons dos átomos de C, quanto as reações de peroxidação, que envolvem a inserção de átomos de O na molécula. As reações de oxirredução podem ocorrer por mecanismos não enzimáticos desencadeados por luz, calor ou metais, mas também podem ser catalisadas por enzimas, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem causar danos oxidativos. Em contraponto, as reações de peroxidação envolvem especialmente as cascatas de auto-oxidação nas caudas de ácidos graxos insaturados, as quais podem ser iniciadas pela formação de hidroperóxidos de lipídios, seguidas por clivagem das caudas e produção de radicais hidroxila, danificando severamente as membranas celulares (BLACK et al., 2006).

Acredita-se que estes tipos de radicais livres ou as reações químicas não enzimáticas que ocorrem nas sementes com baixo teor de água sejam os principais responsáveis pela deterioração das sementes durante o armazenamento. Alguns antioxidantes, como fenóis, tocoferóis e ascorbato podem destruir os radicais livres, minimizando os danos causados nas sementes. Contudo, nos baixos teores de água presentes nas sementes secas, as enzimas necessárias para ativar estes antioxidantes estão inoperantes, possibilitando a ação nociva destes compostos ou reações nas sementes (BEWLEY et al., 2013).

## **1.2 - Reservas nutritivas em sementes e degradação hidrolítica**

As sementes apresentam uma variedade de substâncias armazenadas como fontes de reserva nutritiva que dão suporte durante o estabelecimento da plântula. As principais reservas armazenadas nas sementes consistem em grupos específicos de carboidratos, lipídios e proteínas. Os carboidratos mais comuns presentes nas sementes são a sacarose, os oligossacarídeos da série rafínosica (OSRs) e o amido (BEWLEY et al., 2013).

A sacarose consiste em uma unidade de D-glicose e uma de D-frutose unidas entre si por ligação do tipo  $\alpha 1 \leftrightarrow 2\beta$ , sendo este o principal açúcar de transporte utilizado pelas plantas. Os OSRs são galactosil sacaroses unidas a um resíduo de galactose (rafinose) ou a dois resíduos (estaquiose) por ligações do tipo  $\alpha 1 \rightarrow 6$  (KERMODE, 2011). Devido ao tipo de ligação formada

por esses carboidratos, tanto a sacarose quanto os OSRs são açúcares não redutores, o que garante maior estabilidade química destes compostos durante o armazenamento (BUCKERIDGE et al., 2004).

A degradação dos OSRs ocorre através da atuação de enzimas denominadas  $\alpha$ -galactosidases, hidrolisando estas moléculas a D-galactose e sacarose (BEWLEY et al., 2013). A hidrólise da sacarose pode ser catalisada pela ação de enzimas como invertases ou  $\alpha$ -glucosidases, as quais clivam este carboidrato aos seus monômeros, D-glicose e D-frutose (DI ADDEZIO, 2014; VRIET et al., 2014), bem como a ação de sintases da sacarose, convertendo-a a UDP-glicose e D-frutose (VRIET et al., 2014).

O amido é o carboidrato de armazenamento mais abundante nas plantas superiores e ocorre em grânulos insolúveis que variam em tamanho e forma (2-150  $\mu\text{m}$  de diâmetro), armazenados em amiloplastos nas células parenquimáticas dos tecidos de reserva. O amido é um amplo polímero de moléculas de D-glicose, consistindo em uma mistura de dois polissacarídeos: a amilose e a amilopectina. A amilose consiste em uma cadeia linear de moléculas de D-glicose unidas entre si por ligações do tipo  $\alpha 1 \rightarrow 4$ , enquanto que a amilopectina é um polissacarídeo altamente ramificado, apresentando uma cadeia linear principal de unidades de D-glicose unidas entre si por ligações do tipo  $\alpha 1 \rightarrow 4$ , na qual as ramificações são unidas por ligações do tipo  $\alpha 1 \rightarrow 6$  (KERMODE, 2011).

Devido à sua complexidade estrutural, o amido é despolimerizado em açúcares livres por uma série de enzimas que agem de forma coordenada. A  $\alpha$ -amilase, uma endoenzima, cliva aleatoriamente as ligações  $\alpha 1 \rightarrow 4$  presentes no interior das amiloses e amilopectinas, formando malto-oligossacarídeos e dextrinas. As exoenzimas, incluindo as glicoamilases e  $\alpha$ -glucosidases, clivam as ligações  $\alpha 1 \rightarrow 4$  e  $\alpha 1 \rightarrow 6$  dos resíduos externos de amiloses e amilopectinas e as  $\beta$ -amilases, atacam exclusivamente ligações  $\alpha 1 \rightarrow 4$ , produzindo maltose e dextrinas. As enzimas desramificadoras catalisam a hidrólise de resíduos  $\alpha 1 \rightarrow 6$  nas amilopectinas e as transferases são responsáveis por clivar as ligações glicosídicas  $\alpha 1 \rightarrow 4$  e transferi-las para um terminal não redutor para a formação de uma nova ligação glicosídica (HII et al., 2012).

Em sementes oleaginosas, os lipídios são as principais fontes de carbono, perfazendo até 60% da massa seca (THEODOLOU e EASTMOND, 2012). Estes lipídios, conhecidos como óleos, geralmente são armazenados na forma de triacilgliceróis (TAGs). Os TAGs são acumulados em estruturas especializadas conhecidas como oleossomos ou corpos lipídicos, os



quais apresentam entre 0,2-2  $\mu\text{m}$  de diâmetro e são compostos por um núcleo hidrofóbico de TAGs envolvido por uma monocamada de fosfolipídios com proteínas específicas denominadas oleosinas (QUETTIER e EASTMOND, 2009).

O primeiro passo na hidrólise dos lipídios é catalisado pela ação das lipases, as quais clivam os TAGs em ácido graxo e glicerol. A atividade das lipases está associada às membranas e pode ser encontrada na superfície dos oleossomos (GRAHAM, 2008). Os ácidos graxos liberados são transportados para os glioxissomos (peroxissomos especializados), onde são ativados a acil-CoA graxos e transformados em acetil-CoA através do processo de  $\beta$ -oxidação. O acetil-CoA produzido é canalizado para o ciclo do glioxilato, formando succinato, que é transportado para a mitocôndria, onde é convertido a malato pelo ciclo de Krebs. Finalmente, o malato é liberado no citosol como precursor da gliconeogênese, produzindo sacarose para transporte à longa distância durante os eventos pós-germinativos (EASTMOND e GRAHAM, 2001; QUETTIER e EASTMOND, 2009).

Nos vegetais superiores, as proteínas de reserva de sementes (PRS) são as principais fontes de nitrogênio, correspondendo entre 5 a 50% a massa fresca da semente (BLACK et al., 2006). As PRS características de dicotiledôneas são as albuminas, solúveis em água e em tampões diluídos em pH neutro, e as globulinas, solúveis em soluções salinas e insolúveis em água. As albuminas são amplamente distribuídas, embora estejam presentes em pequenas quantidades. Já as globulinas são mais abundantes nas sementes de espécies leguminosas e podem consistir a maior fração das reservas em algumas espécies. Estas reservas são armazenadas nos tecidos de reserva dentro de vacúolos de estocagem de proteínas – VEPs (BEWLEY et al., 2013).

A hidrólise das PRS envolve a ação de várias proteases, as quais podem degradar parcialmente ou totalmente os substratos, dependendo da sua localização intracelular. Estas enzimas são classificadas de acordo com a reação catalisada. As endopeptidases clivam as ligações peptídicas internas das proteínas para formar polipeptídeos menores dentro dos VEPs. Em seguida, as carboxipeptidases hidrolisam estes polipeptídeos na região carboxi-terminal. Os peptídeos resultantes são transportados para o citosol, sendo degradados pelas aminopeptidases. Os aminoácidos liberados são reutilizados na síntese de proteínas ou desaminados para servirem como esqueletos de carbono no processo de respiração ou na conversão em outros metabólitos (BEWLEY et al., 2013).

Alguns trabalhos têm caracterizado as alterações fisiológicas de sementes florestais durante o armazenamento por meio de testes de germinação e vigor, como nas espécies *Handroanthus umbellatus* (Sond.) Mattos (MARTINS e PINTO, 2014), *Melanoxylon brauna* Schott (CORTE et al., 2010) e *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud (REIS et al., 2012). Outros trabalhos utilizam, além dos testes fisiológicos, alguns métodos bioquímicos para descrever as alterações que ocorrem durante o armazenamento em *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (ABBADÉ e TAKAKI, 2014) e *Tabebuia serratifolia* Vahl Nich (SILVA et al., 2011). Evidências experimentais indicam que reações hidrolíticas não catalisadas por enzimas podem ser responsáveis por desencadear mecanismos de deterioração em sementes de *Jatropha curcas* L. (MONCALEANO-ESCANDON et al., 2012) e de *Fagus sylvatica* L. (RATAJCZAK et al., 2015).

Poucos esforços têm sido realizados no sentido de elucidar o envolvimento das reações hidrolíticas na perda da qualidade em sementes florestais. Neste sentido, estudos que visem a quantificação das reservas armazenadas, dos produtos de hidrólise e da atividade de enzimas hidrolíticas durante o armazenamento da semente podem permitir a identificação de marcadores bioquímicos de qualidade. Além de corroborar testes tradicionalmente utilizados para avaliar o potencial fisiológico das sementes, como os testes de germinação, tetrazólio e condutividade elétrica (MARCOS FILHO, 2005), estes marcadores podem auxiliar no diagnóstico precoce da perda da qualidade.

### **1.3 - *Moringa oleifera* Lam.**

*Moringa oleifera* Lam. é uma espécie pertencente à família Moringaceae e nativa da Ásia, amplamente distribuída em locais de clima tropical e subtropical, ocorrendo na África, América Central e América do Sul (STOHS e HARTMAN, 2015). Possui porte arbóreo, podendo chegar até 10 m de altura, sendo tolerante a altas temperaturas e precipitação anual entre 200 a 3000 mm (MUHAMMAD et al., 2016).

*M. oleifera* apresenta uma raiz principal tuberosa, a qual pode explicar a sua tolerância à seca. Apresenta uma copa em formato de guarda-chuva e as folhas ocupam o topo dos ramos de forma bastante densa. Conforme o clima, as folhas são sempre verdes ou decíduas. As flores são brancas, com panículas caídas com 10-30 cm de comprimento, polinizadas principalmente por

insetos. As flores e frutos podem ser produzidos duas vezes por ano, embora em alguns lugares estes sejam produzidos durante todo o ano. Os frutos apresentam inicialmente coloração verde clara, com aspecto fino e macio, atingindo a coloração verde escura e aspecto rígido quando maduros, podendo apresentar formato retangular ou triangular. As sementes são aladas quando maduras (BICHI, 2013).

A moringa apresenta elevado valor econômico devido ao fato de que todas as partes da planta, incluindo folhas, flores, frutos e sementes apresentam valor nutritivo (TESFAY et al., 2015). As folhas da moringa têm sido caracterizadas pelo seu elevado balanço nutricional, contendo vitaminas, minerais, aminoácidos e ácidos graxos essenciais (MOYO et al., 2011; RAZIS et al., 2014). Além disso, as folhas também apresentam diferentes compostos fenólicos e vários extratos da moringa são usados devido a suas propriedades anti-inflamatória, diurética, antimicrobiana, antioxidante, antidiabética, entre outras (STOHS e HARTMAN, 2015).

Os frutos da moringa são fibrosos e são utilizados no tratamento de infecções intestinais, enquanto que as flores são utilizadas no tratamento de infecções da garganta (FAHEY et al, 2005; GOPALAKRISHNAN et al., 2016). As sementes de moringa são conhecidas por produzirem diferentes variedades de compostos fenólicos e ácidos graxos (TESFAY et al., 2011). Além disso, as sementes de moringa podem ser usadas como coagulantes naturais e seu uso para purificação da água tem ganhado bastante notoriedade em pesquisas recentes, as quais buscam caracterizar os componentes ativos (KANSAL e KUMARI, 2014).

O óleo da semente de moringa é rico em ácidos graxos insaturados (cerca de 70%), sendo o ácido oleico o maior componente (TESFAY et al, 2015). O óleo é considerado um cosmético natural devido à sua propriedade tátil e praticamente ausência de cor e odor (AYERZA, 2011). Recentemente, algumas pesquisas ilustraram o potencial do óleo de moringa para a produção de biocombustíveis (MOFIJUR et al., 2014; FOTOUO-M., 2016). Diante da importância econômica da moringa, é de grande valia elucidar o envolvimento das reações hidrolíticas durante o armazenamento, uma vez que pouco se sabe sobre o papel destas reações na perda da qualidade de sementes.

## 2. OBJETIVOS

### Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é investigar o papel das reações hidrolíticas envolvidas na perda da qualidade das sementes durante o armazenamento sob condições controladas (em câmara de crescimento e em refrigerador doméstico).

### Objetivos específicos

- Determinar o potencial fisiológico das sementes de moringa ao longo do armazenamento;
- Verificar alterações no conteúdo de reservas e produtos de hidrólise;
- Caracterizar alterações nas atividades de enzimas hidrolíticas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - Obtenção das sementes**

As sementes de moringa foram coletadas em diferentes localidades do Estado do Rio Grande do Norte, a partir de vinte árvores matrizes. Estas sementes foram beneficiadas manualmente, incluindo a abertura dos frutos, a retirada das sementes e a eliminação das alas. Em seguida, as sementes foram reunidas em um único lote, do qual foram retiradas duas subamostras para serem armazenadas nos ambientes utilizados no estudo.

#### **3.2 - Condições de armazenamento**

As sementes foram acondicionadas em sacos plásticos semipermeáveis e armazenadas em câmara de crescimento ( $27 \pm 2$  °C e 65% de UR) e em refrigerador doméstico ( $4 \pm 2$  °C e 25% de UR) durante 18 meses. Antes do armazenamento e de três em três meses, foram realizadas as coletas para a determinação do teor de água das sementes e para realizar testes fisiológicos e análises bioquímicas.

#### **3.3 - Determinações Físicas**

**3.3.1- Teor de água** – O teor de água foi determinado pelo método da estufa a  $105 \pm 3$  °C/24 h, segundo recomendação das Regras para Análises de Sementes (RAS) (BRASIL, 2009). Quatro amostras de 25 sementes foram obtidas por ambiente de armazenamento em cada coleta e pesadas com precisão de 0,001 g para determinação de massa fresca (MF). Cada amostra foi acondicionada em cápsula de alumínio e mantida em estufa a  $105 \pm 3$  °C durante 24 h. Logo depois, cada amostra foi pesada novamente para obtenção da massa seca (MS) e o teor de água foi calculado a partir dos resultados obtidos para MF e MS (NAKAGAWA, 1999).

#### **3.4 - Determinações Fisiológicas**

**3.4.1 - Germinação (%G)** - As sementes foram desinfetadas com detergente comercial diluído

(1:500) por 30 s e enxaguadas em água corrente. Posteriormente, foram imersas em etanol 70% (v/v) por 30 s, seguido de hipoclorito de sódio 0,25% (m/v) por mais 3 min, lavadas três vezes e embebidas por 6 h em água destilada. As sementes foram distribuídas em papel toalha (Germitest®) confeccionado em forma de rolo, umedecido na proporção de 2,5 vezes a massa do papel em volume de água destilada (BRASIL, 2009), com quatro repetições de 25 sementes por tratamento. As sementes foram incubadas em câmara de crescimento sob condições controladas (radiação fotossinteticamente ativa de  $80 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12 h e temperatura de  $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ ) por dez dias. O número de sementes germinadas foi avaliado diariamente, adotando-se como critério de germinação a emergência das estruturas essenciais de uma plântula normal (BRASIL, 2013).

**3.4.2 Tempo médio de germinação (TMG)** – O TMG foi determinado de acordo com a fórmula apresentada por EDMOND e DRAPALA (1958).

**3.4.3 - Comprimento de plântula** - As plântulas normais de cada repetição, originadas do teste de germinação, foram medidas com o auxílio de uma régua graduada em milímetros e os resultados expressos em  $\text{mm plântula}^{-1}$ .

**3.4.4 - Massa seca de plântula** - As plântulas normais de cada repetição, obtidas no teste de germinação, foram acondicionadas em sacos de papel previamente identificados e levadas à estufa de ventilação forçada, regulada a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ , durante 72 h. Após este período, as plântulas foram retiradas da estufa e pesadas em balança analítica, com precisão de 0,001 g, sendo os resultados expressos em  $\text{mg plântula}^{-1}$  (NAKAGAWA, 1999).

### **3.5 - Determinações bioquímicas**

**3.5.1 - Obtenção dos embriões** – Os embriões utilizados para as determinações bioquímicas foram obtidos a partir da retirada manual da testa das sementes.

**3.5.2 - Lipídios neutros (LN)** – Os LN foram quantificados pelo método gravimétrico

(SOXHLET, 1879). Amostras de embriões com aproximadamente 200 mg de MS foram maceradas e os LN foram extraídos com 8 mL de n-hexano a 60 °C, sob agitação eventual, durante 5 h. Logo depois, o sobrenadante foi coletado em tubos plásticos de massa conhecida. Após a evaporação do n-hexano, o conteúdo de LN foi determinado pela diferença entre a massa final e inicial dos tubos e foi expresso em mg de LN parte<sup>-1</sup>.

**3.5.3 - Açúcares solúveis totais (AST), açúcares não redutores (ANR) e aminoácidos livres totais (AALT)** – Os compostos solúveis de baixa massa molecular (incluindo AST, ANR e AALT) foram extraídos de amostras de embriões com cerca de 200 mg de MF, usando 5 mL de etanol 80% (v/v) a 60 °C por 30 min. Depois da coleta dos sobrenadantes, os resíduos foram re-extraídos com 5 mL de etanol 80% (v/v) nas mesmas condições. Os sobrenadantes foram reunidos no final dos procedimentos, rendendo 10 mL de extrato por amostra, enquanto que os resíduos foram empregados na quantificação do amido. Os AST foram determinados pelo método do fenol-sulfúrico (DUBOIS et al., 1956), baseado em uma curva padrão de D-glicose. Os ANR foram quantificados pelo método da antrona (MORRIS, 1948; VAN HANDEL, 1968), utilizando sacarose como padrão. Os AALT foram estimados pelo método da ninidrina (PEOPLES, 1989), tendo como base uma curva padrão de L-glutamina. Para os AST, ANR e AALT, os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS.

**3.5.4 - Amido** – O amido foi extraído a partir dos resíduos obtidos após a extração dos compostos solúveis de baixa massa molecular. Para tanto, estes resíduos foram macerados com 1,5 mL de ácido perclórico 30% (v/v) e centrifugados a 10.000 xg por 10 min. Os sobrenadantes foram reservados e os precipitados foram re-extraídos duas vezes com 1 mL de ácido perclórico 30% (v/v). No final dos procedimentos, os sobrenadantes foram reunidos perfazendo 3,5 mL de extrato por amostra. Todos os procedimentos foram realizados a 4 °C. O amido foi quantificado pelo método da antrona (MORRIS, 1948; YEMM e WILLIS, 1954), utilizando D-glicose como padrão. Os valores obtidos foram multiplicados pelo fator 0,9 para conversão em amido (McCREADY et al., 1950) e os resultados foram expressos em mg de amido parte<sup>-1</sup>.

**3.5.5 - Proteínas solúveis (PS)** – As PS foram extraídas de amostras de embriões com 200 mg

de MF por maceração em 1,5 mL de tampão Tris-HCl 100 mM pH 7,0 contendo NaCl 500 mM e 2-mercaptoetanol 2 mM. Depois de centrifugação a 10.000  $xg$  por 10 min, os sobrenadantes foram reservados e os precipitados foram re-extraídos duas vezes com 1 mL do tampão de extração. Os sobrenadantes foram reunidos no final dos procedimentos, perfazendo 3,5 mL de extrato por amostra. Estes procedimentos foram conduzidos a 4 °C. O conteúdo de PS foi determinado pelo ensaio do corante de Coomassie (BRADFORD, 1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão e foi expresso em mg de PS parte<sup>-1</sup>.

### **3.5.6 - Atividades enzimáticas**

**3.5.6.1 - Lipases** – As lipases foram extraídas de amostras de embriões com 200 mg de MF maceradas em 1,5 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5 suplementado com 2-mercaptoetanol 0,01% (v/v). Após centrifugação a 10.000  $xg$  por 20 min, os sobrenadantes foram coletados e utilizados como extratos enzimáticos. Estes procedimentos foram realizados a 4 °C. A atividade de lipases foi estimada pela hidrólise de 4-nitrofenil-palmitato, liberando 4-nitrofenol no meio de reação (MARRIOTT e NORTHCOTE, 1975). A atividade foi calculada com base em uma curva padrão de 4-nitrofenol e expressa em  $\mu\text{mol}$  4-nitrofenol  $\text{g}^{-1}$  MS  $\text{min}^{-1}$ .

**3.5.6.2 - Amilases** – As amilases foram extraídas de amostras de embriões com 200 mg de MF por maceração com 1,5 mL de tampão acetato de potássio 100 mM pH 6,0 contendo  $\text{CaCl}_2$  5 mM. As amostras foram centrifugadas a 10.000  $xg$  por 20 min e os sobrenadantes foram coletados e empregados como extratos enzimáticos. Todos os procedimentos foram realizados a 4 °C. A atividade das amilases foi estimada pela liberação de açúcares redutores (AR) no meio de reação, utilizando amido solúvel como substrato (ELARBI et al., 2009). A concentração de AR foi determinada pelo método do 3,5-dinitro-salicilato (DNS) (MILLER, 1959), usando D-glicose como padrão e a atividade de amilases foi expressa em  $\mu\text{mol}$  AR  $\text{g}^{-1}$  MS  $\text{min}^{-1}$ .

**3.5.6.3 - Proteases ácidas** – As proteases ácidas foram extraídas de amostras de embriões com 200 mg de MF, as quais foram maceradas com 1,5 mL de tampão tris-HCl 50 mM pH 7,2 contendo 2-mercaptoetanol 2 mM. As amostras foram centrifugadas a 10.000  $xg$  por 20 min e



os sobrenadantes foram utilizados como extratos enzimáticos. Estes procedimentos foram conduzidos a 4 °C. A atividade de proteases foi estimada pela produção de aminoácidos livres (AAL) a partir de caseína como substrato (BEEVERS, 1968). A concentração de AAL foi acessada pelo método da ninidrina (PEOPLES, 1989), empregando L-glutamina como padrão, e a atividade enzimática foi expressa em  $\mu\text{mol AAL g}^{-1} \text{MS min}^{-1}$ .

### **3.6 - Delineamento experimental**

Durante as coletas, as amostras foram retiradas ao acaso dos lotes de sementes submetidos ao armazenamento em câmara de crescimento e em refrigerador doméstico. As determinações físicas e bioquímicas foram conduzidas com cinco repetições e as quantificações fisiológicas foram realizadas com quatro repetições de 25 sementes por tratamento e momento de coleta. Os resultados foram submetidos à análise de regressão pelo programa ASSISTAT versão 7.7 beta.

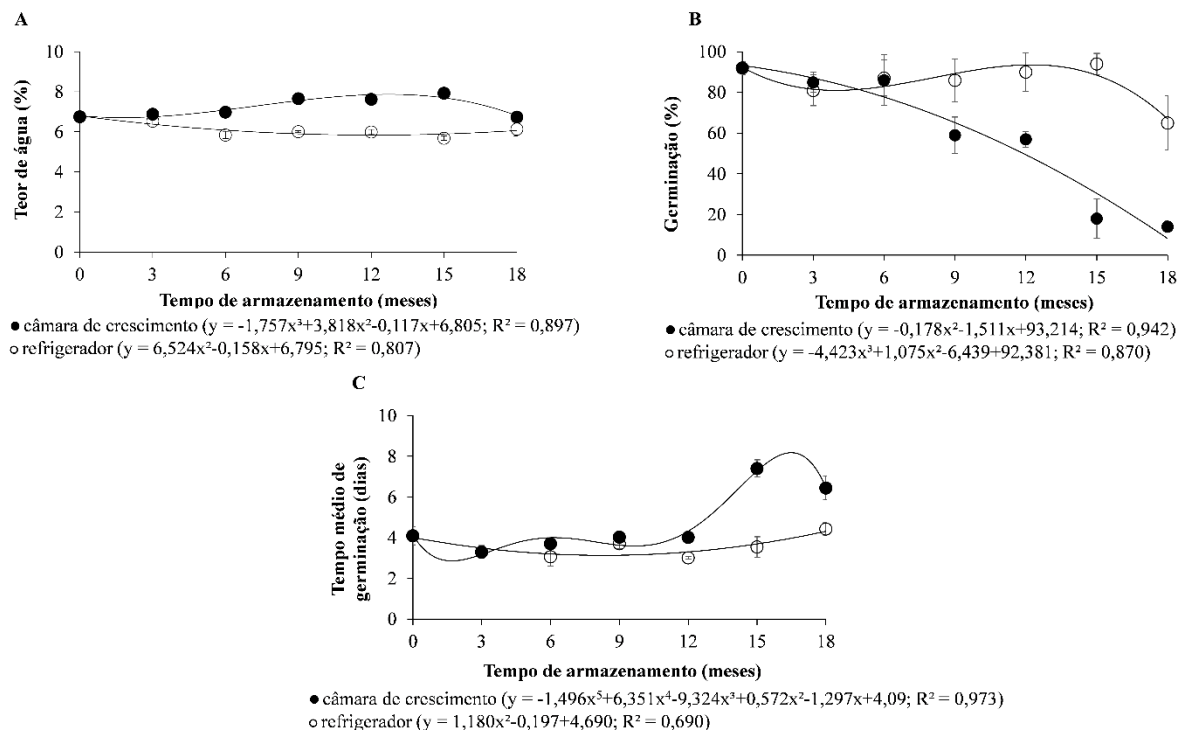
#### 4. RESULTADOS

Ao longo do armazenamento sob condições controladas, a diminuição da viabilidade e do vigor das sementes de moringa foi acompanhada pela degradação das reservas nutritivas majoritárias (lipídios e proteínas) e pelo aumento da atividade de enzimas hidrolíticas, embora não tenha havido acumulação de metabólitos solúveis (açúcares e aminoácidos). Estas alterações fisiológicas e bioquímicas ocorreram em paralelo com variações no teor de água durante o armazenamento das sementes. Em sementes recém coletadas, o teor de água foi de 6,7%, reduzindo para 5,6% nas sementes mantidas em refrigerador e aumentando para 7,9% nas sementes mantidas em câmara de crescimento, após 15 meses de armazenamento (Figura 1A). Dos 15 aos 18 meses, o teor de água se manteve inalterado nas sementes armazenadas em refrigerador e diminuiu para 6,7% naquelas armazenadas em câmara de crescimento.

A diminuição da viabilidade durante o período de armazenamento foi evidenciada pelo declínio da %G, o qual foi mais acentuado nas sementes conservadas em câmara de crescimento. Logo após a coleta, as sementes apresentaram 92% de germinação (Figura 1B). Nas sementes mantidas em refrigerador, a %G não foi alterada ao longo de 15 meses, decaindo para 65% aos 18 meses. Em comparação, a %G diminuiu progressivamente durante o armazenamento das sementes em câmara de crescimento, atingindo 14% ao final de 18 meses.

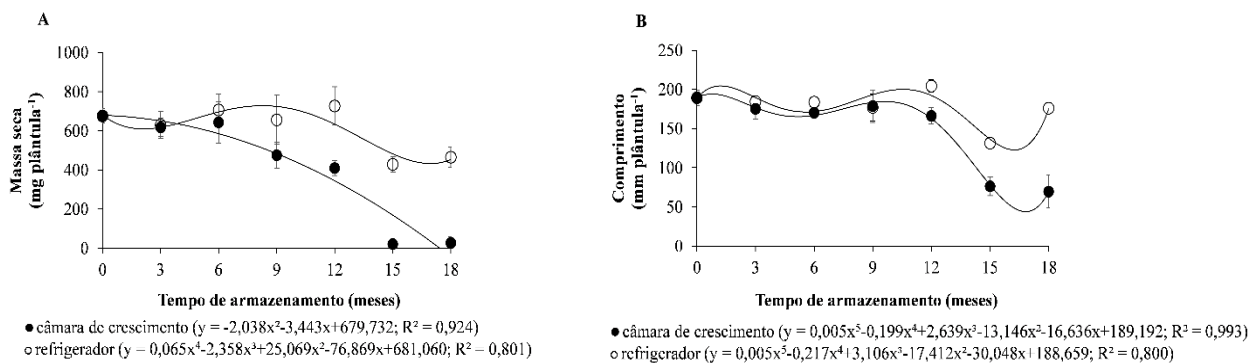
Como esperado, a diminuição da viabilidade foi acompanhada pela redução do vigor, a qual foi verificada pelo aumento do TMG em paralelo com a diminuição da MS e do comprimento das plântulas obtidas a partir das sementes armazenadas no decorrer de 18 meses. Novamente, as sementes armazenadas em câmara de crescimento apresentaram redução mais acentuada do vigor em relação às armazenadas em geladeira. Para as sementes recém coletadas, o TMG foi de 4 dias (Figura 1C), mantendo-se praticamente inalterado após 12 meses, independente do ambiente de armazenamento. No entanto, o TMG aumentou para 4,5 e 6,4 dias, depois de 18 meses, nas sementes armazenadas em refrigerador e câmara de crescimento, respectivamente.

**FIGURA 1** – Teor de água (A), porcentagem de germinação (B) e tempo médio de germinação (C) para sementes de moringa armazenadas em refrigerador doméstico ( $4 \pm 2$  °C e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2$  °C e 65% de UR, círculo fechado). Os pontos representam a média e as barras verticais representam o desvio padrão na análise de regressão, de acordo com o modelo polinomial ajustado para cada variável.



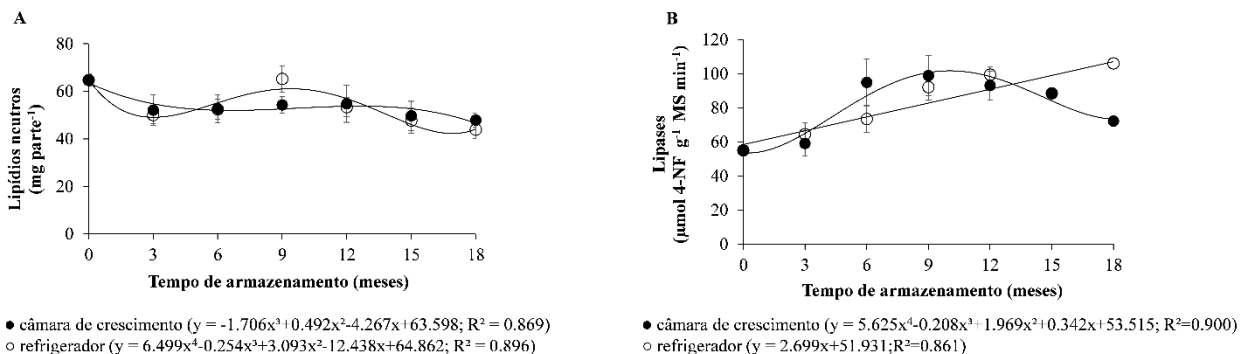
Ao final do teste de germinação, as plântulas obtidas a partir das sementes recém coletadas apresentaram 700 mg de MS (Figura 2A) e 190 mm de comprimento (Figura 2B). Para as plântulas oriundas de sementes mantidas em refrigerador, tanto o conteúdo de MS quanto o comprimento não apresentaram alteração durante 12 meses de armazenamento, decaindo para 465 mg de MS e 176 mm de comprimento aos 18 meses. Para as plântulas originadas a partir de sementes mantidas em câmara de crescimento, o conteúdo de MS diminuiu gradativamente ao longo do tempo, decaindo para 27 mg (Figura 2A) aos 18 meses; o comprimento se manteve inalterado até 12 meses de armazenamento, diminuindo para 69 mm (Figura 2B) após 18 meses.

**FIGURA 2** - Massa seca (A) e comprimento (B) de plântulas oriundas de sementes de moringa ao longo do armazenamento em refrigerador doméstico ( $4 \pm 2$  °C e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2$  °C e 65% de UR, círculo fechado). Os pontos representam a média e as barras verticais representam o desvio padrão na análise de regressão, de acordo com o modelo polinomial ajustado para cada variável.



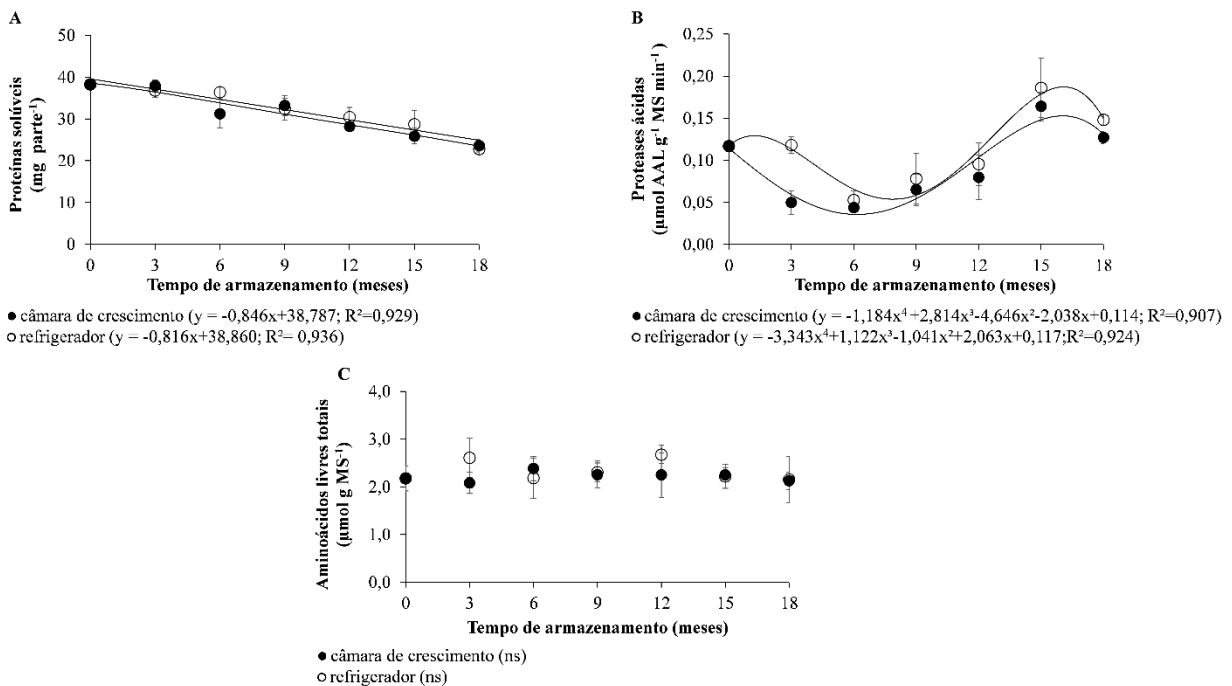
Em paralelo com a diminuição da viabilidade e do vigor, houve degradação dos lipídios e proteínas de reserva e aumento da atividade de enzimas hidrolíticas nas sementes com o avanço do tempo de armazenamento. Logo após a coleta, o conteúdo de LN foi de 64 mg 2 parte<sup>-1</sup>, o qual diminuiu para 43 e 47 mg 2 parte<sup>-1</sup> para as sementes mantidas em refrigerador e câmara de crescimento, respectivamente, após 18 meses (Figura 3A). Em concordância, a atividade de lipases aumentou 90% nas sementes mantidas em refrigerador e 69% naquelas mantidas em câmara de crescimento após 12 meses, em comparação com a atividade verificada nas sementes recém coletadas (Figura 3B). Dos 12 aos 18 meses de armazenamento, a atividade de lipases se manteve inalterada nas sementes armazenadas em refrigerador e diminuiu 23% naquelas mantidas em câmara de crescimento.

**FIGURA 3** - Conteúdo de lipídios neutros (A) e atividade de lipases (B) em embriões provenientes de sementes de moringa armazenadas em refrigerador doméstico ( $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  e 65% de UR, círculo fechado). Os pontos representam a média e as barras verticais representam o desvio padrão na análise de regressão, de acordo com o modelo polinomial ajustado para cada variável.



O conteúdo de PS foi de  $38 \text{ mg } 2 \text{ parte}^{-1}$  em sementes recém coletadas e diminuiu gradativamente nas sementes armazenadas em ambos os ambientes, atingindo  $23 \text{ mg } 2 \text{ parte}^{-1}$  até o final do experimento (Figura 4A). A atividade de proteases ácidas decaiu 55% nas sementes mantidas sob refrigeração e 63% naquelas mantidas em câmara de crescimento após 6 meses, em comparação com a atividade detectada nas sementes imediatamente após a coleta. Dos 6 aos 18 meses de armazenamento, a atividade destas enzimas aumentou cerca de 3,6 vezes em ambos os ambientes testados (Figura 4B), coincidindo com a diminuição do conteúdo de PS (Figura 4A). Curiosamente, a despeito das alterações verificadas no conteúdo de PS e na atividade de proteases ácidas, o conteúdo de AALT permaneceu inalterado ao longo do período experimental, independente do ambiente de armazenamento (Figura 4C).

**FIGURA 4** - Conteúdo de proteínas solúveis totais (A), atividade de proteases ácidas (B) e conteúdo de aminoácidos livres totais (C) em embriões provenientes de sementes de moringa armazenadas em refrigerador doméstico ( $4 \pm 2$  °C e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2$  °C e 65% de UR, círculo fechado). Os pontos representam a média e as barras verticais representam o desvio padrão na análise de regressão, de acordo com o modelo polinomial ajustado para cada variável; ns (não significativo).

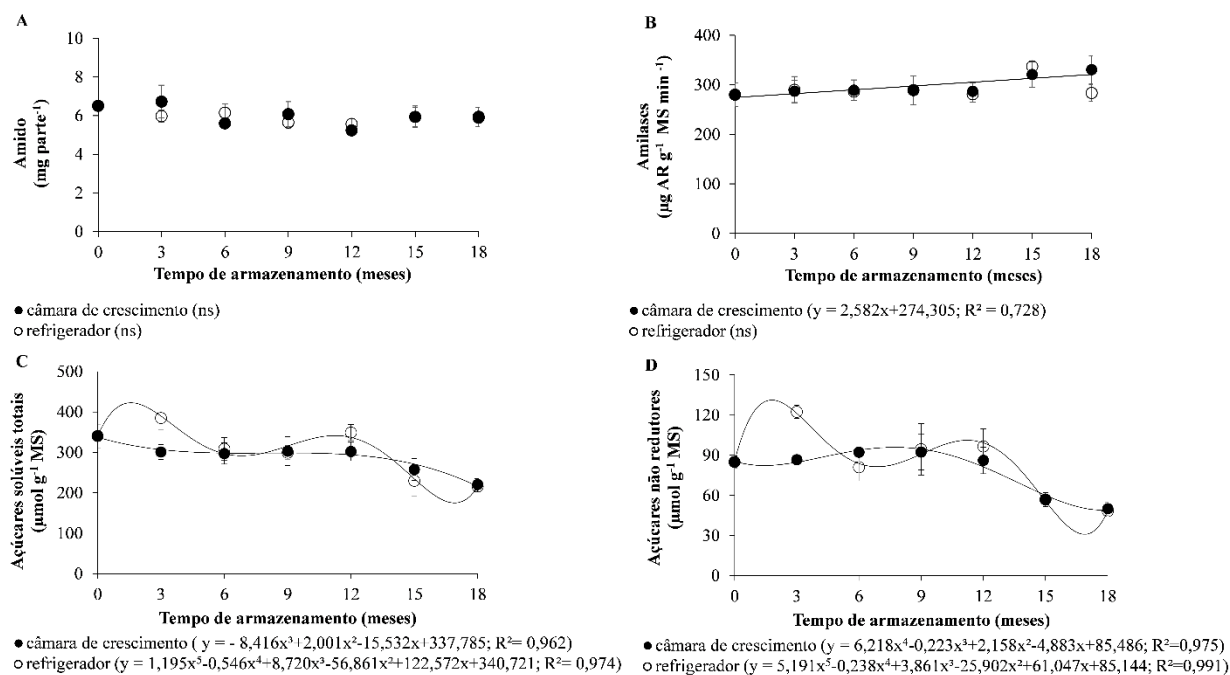


Em contraponto à degradação dos lipídios e proteínas de reserva, o conteúdo de amido das sementes não sofreu alterações significativas ao longo do tempo (Figura 5A), independente do ambiente de armazenamento. Nas sementes conservadas sob refrigeração, não foram verificadas modificações na atividade de amilases durante todo o período experimental (Figura 5B). No entanto, nas sementes conservadas em câmara de crescimento, a atividade destas enzimas aumentou 15% dos 12 aos 18 meses de armazenamento.

O conteúdo de açúcares das sementes apresentou variações no decorrer do experimento, em ambos os ambientes testados. Em sementes recém armazenadas, o conteúdo de AST (Figura 5C) e ANR (Figura 5D) foi de 340 e 85  $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MS}$ , respectivamente. Dentre as variações observadas durante o armazenamento, destaca-se a diminuição do conteúdo de AST e ANR a partir dos 12 meses, tanto nas sementes mantidas em refrigerador, quanto nas mantidas em câmara de crescimento. De fato, o conteúdo de AST e ANR diminuiu

para aproximadamente 218 e 49  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MS, nesta ordem, após 18 meses de armazenamento em ambos os ambientes.

**FIGURA 5** - Conteúdo de amido (A), atividade de amilases (B), conteúdo de açúcares solúveis totais (C) e açúcares não redutores (D) em embriões provenientes de sementes de moringa armazenadas em refrigerador doméstico ( $4 \pm 2$  °C e 25% de UR, círculo aberto) e em câmara de crescimento ( $27 \pm 2$  °C e 65% de UR, círculo fechado). Os pontos representam a média e as barras verticais representam o desvio padrão na análise de regressão, de acordo com o modelo polinomial ajustado para cada variável; ns (não significativo).



## 5. DISCUSSÃO

O presente trabalho aborda o envolvimento das reações hidrolíticas na deterioração das sementes de moringa durante o armazenamento sob condições controladas. As alterações no conteúdo de reservas nutritivas e metabólitos solúveis, bem como na atividade de enzimas hidrolíticas, são investigadas em paralelo com a diminuição da viabilidade e do vigor ao longo do tempo. Os resultados apresentados evidenciam que a deterioração das sementes de moringa se deve, pelo menos em parte, a reações hidrolíticas que devem ocorrer ao longo do armazenamento, mesmo sob condições mais indicadas para a preservação da qualidade das sementes.

O aumento do teor de água durante o armazenamento pode desencadear a deterioração das sementes, promovendo reações não enzimáticas, reativação do metabolismo e/ou crescimento de microrganismos (BLACK et al., 2006). O teor de água das sementes de moringa diminui levemente durante 18 meses de armazenamento em refrigerador ( $4 \pm 2^\circ\text{C}$  e 25% de UR), mas aumenta ao longo de 15 meses de conservação em câmara de crescimento ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$  e 65% de UR) (Figura 1A). Em outras sementes florestais armazenadas sob condições similares, incluindo *Amburana cearensis* (GUEDES et al., 2010), *Handroanthus umbellatus* (MARTINS e PINTO, 2014), *Jatropha curcas* (MONCALEANO-ESCANDON et al., 2013), *Melanoxylon brauna* (BORGES et al., 2015) e *Tabebuia serratifolia* (SILVA et al., 2011), são encontrados resultados comparáveis àqueles obtidos neste estudo. Neste sentido, o armazenamento das sementes de moringa em refrigerador se mostra mais adequado para evitar o aumento do teor de água ao longo do tempo.

A %G é amplamente utilizada como uma variável indicadora da viabilidade de sementes (BEWLEY et al., 2013). Em moringa, a %G se mantém inalterada por 15 meses quando as sementes são conservadas em refrigerador e diminui progressivamente naquelas mantidas em câmara de crescimento no decorrer de 18 meses (Figura 1B). Estes resultados estão em concordância com aqueles encontrados previamente (BEZERRA et al., 2004), segundo os quais as sementes de moringa armazenadas em câmara fria ( $10^\circ\text{C}$  e 55% de UR) mantêm a %G durante 18 meses, havendo redução desta variável nas sementes armazenadas em ambiente não controlado no mesmo prazo. Este desempenho germinativo é frequentemente encontrado em outras sementes florestais, quando são testados os ambientes refrigerado e não controlado, incluindo *H. umbellatus* (MARTINS e PINTO, 2014), *J. curcas* (MONCALEANO-ESCANDON et al., 2013; DIAS et al., 2016), *Pyrus betulaefolia* (BAO et al., 2011) e *T. serratifolia* (SILVA et al., 2011). Desta forma, constata-se que as sementes de moringa conservadas sob condições de refrigeração mantêm elevada viabilidade, desejável para fins de plantio, por um prazo de 15 meses.

Diversas variáveis têm sido consideradas para avaliar o vigor das sementes ao longo do armazenamento, incluindo o TMG, a MS e o comprimento das plântulas obtidas durante os testes de germinação (BLACK et al., 2006). Assim como a viabilidade, o vigor das sementes de moringa também diminui com o envelhecimento natural. Nos primeiros 12 meses de armazenamento, o TMG (Figura 1C) e o comprimento das plântulas (Figura 2B) não são



significativamente alterados nas sementes mantidas em câmara de crescimento e em refrigerador. No entanto, o vigor é drasticamente afetado a partir dos 15 meses, especialmente nas sementes mantidas em câmara de crescimento, em termos de TMG, MS (Figura 2A) e comprimento das plântulas. Estes resultados corroboram aqueles encontrados anteriormente para sementes de moringa armazenadas em câmara fria e em ambiente não controlado (BEZERRA et al., 2004). Em concordância com os resultados apresentados, ocorre aumento do TMG para as sementes de *Acca sellowiana* armazenadas em temperatura ambiente por dois anos (DONAZZOLO et al., 2015), bem como há diminuição da MS e do comprimento das plântulas obtidas a partir de sementes de *A. cearenses* conservadas em ambiente não controlado durante 9 meses (GUEDES et al., 2010). Desta maneira, o armazenamento em refrigerador se mostra mais adequado para manter o vigor das sementes de moringa por pelo menos 12 meses.

É notável que os lipídios (Figura 3A) e proteínas de reserva (Figura 4A) estocados nas sementes de moringa são degradados de forma mais intensa a partir dos 12 meses de armazenamento em câmara de crescimento e em refrigerador, coincidindo com a diminuição da viabilidade (Figura 1B) e do vigor das sementes (Figuras 1C e 2). Em um trabalho anterior, é demonstrado que o conteúdo de lipídios diminui drasticamente em sementes de moringa armazenadas a 20°C em embalagem de papel e a 30°C em embalagem de alumínio após 24 meses (FOTOUO-M. et al., 2016). A degradação dos lipídios de reserva também é verificada em sementes de *M. brauna* (CORTE et al., 2010) e *T. roseoalba* (ABBADE e TAKAKI, 2014) ao longo do armazenamento, concordando com os resultados apresentados neste trabalho. Além disso, a degradação das proteínas de reserva acompanha a diminuição da viabilidade e do vigor em sementes de *J. curcas* (MONCALEANO-ESCANDON, 2013) e *T. roseoalba* (ABBADE e TAKAKI, 2014) mantidas sob condições controladas. Assim, é possível sugerir que a deterioração das sementes de moringa durante o armazenamento pode estar relacionada com a degradação de suas principais reservas.

Curiosamente, a degradação dos lipídios (Figura 3A) e proteínas de reserva (Figura 4A) coincide com um aumento da atividade de lipases (Figura 3B) e de proteases ácidas (Figura 4B) nas sementes armazenadas em ambos os ambientes após 12 meses. As lipases catalisam as etapas iniciais da mobilização dos lipídios de reserva na superfície dos corpos lipídicos (GRAHAM, 2008), enquanto que as proteases ácidas iniciam a hidrólise das

proteínas de reserva nos VEPs (MÜNTZ, 2007) após a germinação das sementes. Considerando que o teor de água das sementes de moringa permanece abaixo de 8% ao longo do experimento (Figura 1A), independente do ambiente de armazenamento, é pouco provável que a degradação dos lipídios e das proteínas de reserva seja promovida pela ação de enzimas hidrolíticas. O teor de água das sementes de moringa encontrado neste estudo corresponde ao nível de hidratação II, no qual as moléculas de água estão ligadas apenas a superfícies hidrofílicas e iônicas e os fluidos intracelulares se encontram em estado vítreo, isto é, um fluido de extrema viscosidade. Como consequência da baixa mobilidade molecular, as reações enzimáticas são quase inoperantes, mas reações não enzimáticas podem ocorrer (BEWLEY et al., 2013).

O aumento das atividades de lipases (Figura 3B) e de proteases ácidas (Figura 4B) nas sementes de moringa é intrigante. Este aumento não pode ser atribuído à síntese *de novo* das proteínas devido ao baixo teor de água, como mencionado anteriormente. Além disso, uma vez que as atividades de lipases e proteases ácidas foram executadas *in vitro*, os resultados mostrados neste trabalho podem não necessariamente refletir a atividade destas enzimas *in vivo* (BEWLEY et al., 2013). Adicionalmente, os ensaios empregados para quantificar as atividades enzimáticas não são específicos para enzimas hidrolíticas responsáveis pela degradação das reservas, sugerindo que a atividade destas enzimas pode estar relacionada a outros processos metabólicos. Pelo menos para as proteases, sabe-se que algumas delas são depositadas juntamente com as proteínas de reserva durante a maturação das sementes. Antes da germinação, estas enzimas são mantidas sob a forma inativa através de diferentes mecanismos, incluindo a atuação de inibidores específicos. Desta forma, o aumento da atividade de proteases ácidas nas sementes de moringa ao final do experimento (Figura 4B) pode estar relacionado à degradação de inibidores de proteases (TAN-WILSON e WILSON, 2012; BEWLEY et al., 2013).

Tendo em vista que a degradação dos lipídios (Figura 3A) e das proteínas de reserva (Figura 4A) não pode ser atribuída à atividade das lipases (Figura 3B) e das proteases ácidas (Figura 4B) nas sementes de moringa ao longo do armazenamento, o processo de deterioração das sementes possivelmente envolve reações não enzimáticas. Os lipídios de reserva são susceptíveis a reações de peroxidação e de desesterificação ao longo do tempo (BLACK et al., 2006). A peroxidação lipídica ocorre através da auto-oxidação das cadeias

insaturadas de ácidos graxos (DEMIDCHICK, 2015) e a desesterificação não enzimática dos TAGs pode ser mediada por EROs (OLIVER et al., 2002). Em outro estudo realizado em paralelo a este experimento, foi verificado que a peroxidação lipídica, estimada em termos de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, permanece inalterada durante o armazenamento de sementes de moringa sob as mesmas condições experimentais (dados não mostrados). Estudos complementares são necessários para elucidar a contribuição da desesterificação mediada por EROs na deterioração dos lipídios de reserva.

As proteínas de reserva estão propensas a diferentes modificações estruturais ao longo do envelhecimento das sementes, como reações de carbonilação e glicação (POPOVA et al., 2010; CABISCOL et al., 2013). A glicação das proteínas através das reações de Maillard tem sido reconhecida como uma das principais causas da deterioração das sementes (MURTHY et al., 2003). Nestas reações, as bases de Schiff derivadas das ligações entre açúcares redutores e proteínas sofrem uma série de reações complexas, formando os produtos de Amadori e os AGEs (POPOVA et al., 2010). As modificações nas proteínas através das reações de Maillard podem diminuir a sensibilidade do ensaio do Coomassie (BRADFORD, 1976), especialmente devido a alterações nos resíduos de arginina e lisina, subestimando o conteúdo de proteínas (CASTELLIÓN et al., 2010). Assim, o decréscimo gradual do conteúdo de proteínas solúveis nas sementes de moringa ao longo do experimento pode estar relacionado à deterioração das proteínas de reserva através das reações de Maillard.

A despeito de que não há degradação de amido nas sementes de moringa ao longo do experimento (Figura 5A), ocorre diminuição do conteúdo de AST (Figura 5C) e ANR (Figura 5D) após 15 meses de armazenamento em câmara de crescimento e em refrigerador. O conteúdo de AST e ANR também é reduzido ao longo do tempo em sementes de soja mantidas em ambiente não controlado (SHARMA et al., 2011). Em sementes de *J. curcas*, o conteúdo de AST aumenta no decorrer de 6 meses de armazenamento nos ambientes refrigerado (4 °C e 42,5% de UR) e não controlado, decaindo até 12 meses em ambos os ambientes (MONCALEANO-ESCANDON et al., 2013). Em contraponto, o conteúdo de AR aumenta durante a deterioração das sementes de *Vigna radiata* sob condições controladas, de acordo com o aumento da UR (MURTHY et al., 2003). É razoável presumir que a diminuição do conteúdo de AST e ANR em sementes

de moringa ao longo do armazenamento pode ser atribuída à hidrólise não enzimática destes metabólitos, de acordo com o teor de água encontrado nas sementes de moringa descrito anteriormente. Com efeito, a hidrólise não enzimática dos OSRs está associada ao processo deterioração das sementes de ervilha, pepino e trigo sarraceno armazenadas à temperatura ambiente (VESELOVSKY e VESELOVA, 2012; VESELOVA et al., 2015).

Tomando os resultados deste trabalho em conjunto, recomenda-se o armazenamento das sementes de moringa em refrigerador por um prazo máximo de 12 meses, tendo em vista que a viabilidade, o vigor e o conteúdo de lipídios de reserva, amido, açúcares e aminoácidos não são significativamente reduzidos durante este período. Estes resultados indicam que as sementes de moringa armazenadas sob refrigeração por até 12 meses parecem aptas para plantio. O monitoramento do conteúdo de reservas e metabólitos e da atividade de hidrolases auxilia no diagnóstico da perda da qualidade, uma vez que, aos 15 meses de armazenamento sob refrigeração, mesmo que não tenham sido verificadas alterações significativas no teor de água, na %G e no TMG, ocorre a diminuição do conteúdo de lipídios e proteínas de reserva, AST e ANR em paralelo com o aumento da atividade de lipases e proteases ácidas.

A utilização das sementes de moringa para fins diferentes do plantio, após o armazenamento em refrigerador, requer estudos complementares sobre a preservação das reservas nutritivas em termos qualitativos. Em um trabalho anterior, o estudo quantitativo e qualitativo do óleo extraído a partir de sementes de moringa armazenadas sob diferentes condições indica que estas sementes devem ser conservadas por até 12 meses sob refrigeração para manter a qualidade do óleo como matéria-prima para produção de biodiesel (FOTOUO-M. et al., 2016). No presente trabalho, demonstra-se que as proteínas de reserva sofrem deterioração progressiva ao longo do armazenamento, mesmo sob refrigeração, sugerindo que as sementes de moringa devem ser utilizadas o mais breve possível para o melhor aproveitamento destas reservas.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que as sementes de moringa armazenadas em refrigerador mantêm a viabilidade e o vigor por até 12 meses. A deterioração das sementes após este período está associada à degradação dos lipídios e proteínas de reserva e dos açúcares solúveis. Pode haver o envolvimento da hidrólise não enzimática na deterioração das sementes, devido ao baixo teor de água encontrado nas sementes ao longo do experimento. Estudos complementares são necessários para esclarecer quais tipos de mecanismos não enzimáticos estão envolvidos na degradação das sementes de moringa durante o armazenamento.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBADE, L.C.; TAKAKI, M. Biochemical and physiological changes of *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith (Bignoniaceae) seeds under storage. **Journal of Seed Science**, v.36, p.100-107, 2014.
- AYERZA, R. Seed yield components, oil content, and fatty acid composition of two cultivars of moringa (*Moringa oleifera* Lam.) growing in the Arid Chaco of Argentina. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 389-394, 2011.
- BAO, J.; SHA, S.; ZHANG, S. Changes in germinability, lipid peroxidation, and antioxidant enzyme activities in pear stock (*Pyrus betulaefolia* Bge.) seeds during room- and low-temperature storage. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 2035-2040, 2011.
- BEEVERS, L. Protein degradation and proteolytic activity in the cotyledons of germinating pea seeds (*Pisum sativum*). **Phytochemistry**, v.7, p.1837-1844, 1968.
- BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.; HILHORST, H.; NONOGAKI, H. Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy. **Springer**, 3 ed., p. 392, 2013.
- BEZERRA, A.M.E.; MOMENTÉ, V.G.; MEDEIROS FILHO, S. Germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas de moringa (*Moringa oleifera* Lam.) em função do peso da semente e do tipo de substrato. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v.22, n.2, p. 295-299, 2004.
- BICHI, M. H. A review of the applications of *Moringa oleifera* seeds extract in water treatment. **Civil and Environmental Research**, v. 3, p. 1-11, 2013.
- BILAL, M. S.; ABIDI, A. B. Physiological and biochemical changes during seed deterioration: a review. **International Journal of Rescent Scientific Research**, v. 6, p. 3416-3422, 2015.
- BLACK, M.; BEWLEY, J.D.; HALMER, P. **The encyclopedia of seeds: science, technology**

and uses. United Kingdom, CABI, 2006.

BORGES, E.E.L.; FLORES, A. V.; ATAÍDE, G.M.; MATOS, A.C.B. Alterações fisiológicas e atividade enzimática em sementes armazenadas de *Melanoxylon brauna* Schott. **Cerne**, v.21, n.1, p. 75-81, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 2009. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instruções para análise de sementes de espécies florestais**. Brasília: 2013, 98p.

BUCKERIDGE, M. S.; AIDAR, M. P. M.; SANTOS, H. P.; TINÉ; M. A. S. Mobilização de Reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**, Porto Alegre: Artmed, 2004.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Proteomics, specificity and relevance to aging. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 33, p. 21-48, 2013.

CASTELLIÓN, M.; MATIACEVICH, S.; BUERA, P.; MALDONADO, S. Protein deterioration and longevity of quinoa seeds during long-term storage. **Food Chemistry**, v. 121, p. 952-958, 2010.

CORTE, V.B.; BORGES, E.E.L.; LEITE, H.G.; LEITE, I.T.A. Qualidade fisiológica de sementes de *Melanoxylon brauna* envelhecidas natural e artificialmente. **Scientia Forestalis**, v. 38, p.181-189, 2010.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v.32, p.776-792, 2009.

DEMIDCHICK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 212-228, 2015.

DIAS, D.C.F.S.; OLIVEIRA, G.L.; VALLORY, G.G.; SILVA, L.J.; SOARES, M.M. Physiological changes in *Jatropha curcas* L. seeds during storage. **Journal of Seed Science**, v. 38, n.1, p. 41-49, 2016.

DI ADDEZIO, F.; YORIYAZ, E. J.; CANTARELLA, M.; VITOLO, M. Sucrose hydrolysis by invertase using a membrane reactor: effect of membrane cut-off on enzyme performance. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, p. 1-4, 2014.

DONAZZOLO, J.; ORNELLAS, T. S.; BIZZOCHI, L.; VILPERTE, V.; NODARI, R. O. O armazenamento refrigerado prolonga a viabilidade de sementes de goiabeira-serrana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 748-754, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v.28, p.248-254, 1956.

EASTMOND, P.J.; GRAHAM, I.A. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. **Plant Science**, v.6, p.72-77, 2001.

EDMOND, J.B.; DRAPALA, W.L. The effects of temperature, sand and soil, and acetone on germination of okra seed. **Proc. Am. Soc. Hortic. Sci.**, v. 71, p. 428-34, 1958.

ELARBI, M.B.; KHEMIRI, H.; JRIDI, T.; Hamida, J.B. Purification and characterization of  $\alpha$ -amylase from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) germinating seeds. **Comptes Rendus Biologies**, v.332, p.426-432, 2009.



FAHEY, J. W. *Moringa oleifera*: a review of the medical evidence for its nutritional, therapeutic, and prophylactic properties. Part 1. **Trees for Life Journal**, v. 1, p. 1-15, 2005.

FOTOUO-M, H.; DU TOIT, E. S.; ROBBERTSE, P. Effect of storage conditions on *Moringa oleifera* seed oil: Biodiesel feedstock quality. **Industrial Crops and Products**, n.84, p.80-86, 2016.

GOPALAKRISHNAN, L.; DORIYA, K.; KUMAR, D. S. *Moringa oleifera*: A review on nutritive importance and its medicinal application. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, p. 49-56, 2016.

GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 115-142, 2008.

GUEDES, R. S.; ALVES, E.U.; GONÇALVES, E.P.; VIANA, J.S.; FRANÇA, P.R.C.; SANTOS, S.S. Qualidade fisiológica de sementes de *Amburana cearenses* (Allemão) A.C. Smith. **Ciências Agrárias**, Londrina, v.31, n.12, p. 331-342, 2010.

HIL, S. L.; TAN, J. S.; LING, T. C.; ARIFF, A. B. Pullulanase: Role in starch hydrolysis and potential industrial applications. **Enzyme Research**, v. 2012, p. 1-15, 2012.

KANSAL, S. K.; KUMARI, A. Potential of *M. oleifera* for the treatment of water and wastewater. **Chemical Reviews**, v. 114, p. 4993-5010, 2014.

KERMODE, A. R. Plant storage products (carbohydrates, oils and proteins). **Plant Science**, p. 1-20, 2011.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005.

MARRIOT, K. M.; NORTHCOTE, D. H. The induction of enzyme activity in the endosperm of germinating castor-bean seeds. **Biochemical Journal**, v. 152, p. 65-70, 1975.

MARTINS, C. C.; PINTO, M. A. D. S. C. Armazenamento de sementes de ipê-amarelo-do-brejo (*Handroanthus umbellatus* (Sond.) Mattos. Bignoniaceae). **Ciência Florestal**, v.24, p.533-539, 2014.

McCREADY, R.M., GUGGOLZ, J., SILVIERA, V.; OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. **Analytical Chemistry**, v.22, p.1156-1158, 1950.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, n. 31, p.426, 1959.

MOHAMMADI, H.; SOLTANI, A.; SADEGHIPOUR, H. R.; ZEINALI, E. Effects of seed aging on subsequent seed reserve utilization and seedling growth in soybean. **International Journal of Plant Production**, v. 5, p. 65-70, 2011.

MOFIJUR, M.; MASJUKI, H. H.; KALAM, M. A.; ATABANI, A. E.; ARBAB, M. I.; CHENG, S. F.; GOUK, S. W. Properties and use of *Moringa oleifera* biodiesel and diesel fuel blends in a multi-cylinder diesel engine. **Energy Conversion and Management**, v. 82, p. 169-176, 2014.

MONCALEANO-ESCANDON, J.; SILVA, B. C. F.; SILVA, S. R. S.; GRANJA, J. A. A. Germination responses on *Jatropha curcas* L. seeds to storage and aging. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 684-690, 2013.

MORRIS, D.L. Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. **Science**, v.107, p.111-114, 1948.

MOYO, B.; MASIKA, P. J.; HUGO, A.; MUCHENJE. Nutritional characterization of Moringa (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 12925-12933, 2011.

MUHAMMAD, H. I.; ASMAWI, M. Z.; KHAN, N. A. K. A review on promising phytochemical, nutritional and glycemic control studies on *Moringa oleifera* Lam. in tropical and sub-tropical regions. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, p. 896-902, 2016.

MÜNTZ, K. Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 2391-2407, 2007.

MURTHY, U. M. N.; KUMAR, P. P.; SUN, W. Q. Mechanisms of seed ageing under different storage conditions for *Vigna radiata* (L.) Wilczek: lipid peroxidation, sugar hydrolysis, Maillard reactions and their relationship to glass state transition. **Journal of Experimental Botany**, v.54, p. 1057-1067, 2003.

NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho das plântulas. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: ABRATES, 1999. cap.2, p.1-24.

NEDIĆ, O.; RATTAN, S. I .S.; GRUNE, T.; TROUGAKOS, I. P. Molecular effects of advanced glycation end products on cell signalling pathways, ageing and pathophysiology. **Free Radical Research**, v. 47, p. 28-38, 2013.

OLIVER, A. E.; HINCHA, D. K.; CROWE, J. H. Looking beyond sugars: the role of amphiphilic solutes in preventing adventitious reactions in anhydrobiotes at low water content. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 131, p. 515-525, 2002.

PEOPLES, M. B.; FAIZAH, A. W.; REAKASEN, B.; HARRIDGE, D. F. **Methods for evaluating nitrogen fixation by nodulated legumes in the field**. Caberra: Australian Centre for International Agricultural Research, 1989.

POPOVA, E. A.; MIRONOVA, R. S.; ODJAKOVA, M. K.; Non-enzymatic glycosilation and deglycating enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**. v. 24, p. 1928-1935, 2010.

QUETTIER, A. L.; EASTMOND, P.J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 485-490, 2009.

RATAJCZAK, E.; KALEMBA, E. W.; PUKACKA, S. Age-related changes in protein metabolism of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds during alleviation of dormancy and in the early stage of germination. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 114-121, 2015.

RAZIS, A. F. A.; IBRAHIM, M. D.; KNTAYYA, S. B. Health benefits of *Moringa oleifera*. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, p. 8571-8576, 2014.

REIS, R.C.R.; PELACANI, C.R.; ANTUNES, C.G.C.; DANTAS, B.F.; CASTRO, R.D. Physiological quality of *gliricidia sepium* (Jacq.) Steud. (leguminosae - papilionoideae) seeds subjected to different storage conditions. **Revista Árvore**, v. 36, p.229-235, 2012.

SZALKA, M.; LUBCZACK, J.; NARÓG, D.; LASKOWSKI, M.; KACZMARSKI, K. The Maillard reaction of bisoprolol fumarate with various reducing carbohydrates. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 59, p. 1-11, 2014.

SENA, C. M. **Sementes Florestais: Colheita, Beneficiamento e Armazenamento**. MMA: Secretaria de Biodiversidade e Florestas. Departamento de Florestas. Programa Nacional de Florestas. Unidade de Apoio do PNF no Nordeste, 2008.

SHABAN, M. Review on physiological aspects of seed deterioration. **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**. v. 6, p. 627 – 631, 2013.

SHABAN, M. MOTLAGH, Z. H. Physiology of plants affected by ageing. **International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research**, v. 2, p. 2301-2305, 2014.

SHARMA, S.; KAUR, A.; B, A.; GILL, B. S. Positional effects on soybean seed composition during storage. **J Food Sci Technol**, v. 50, p. 353-359, 2011.

- SILVA, D.G.; CARVALHO, M.L.M.; NERY, M.C.; OLIVEIRA, L.M.; CALDEIRA, C.M. Alterações fisiológicas e bioquímicas durante o armazenamento de sementes de *Tabebuia serratifolia*. **Cerne**, v. 17, p. 1-7, 2011.
- SOXHLET, F. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. **Dingler's Polytechnisches Journal**. Vol. 232, p. 461-465, 1879.
- STOHS, S. J.; HARTMAN, M. J. Review of the Safety and Efficacy of *Moringa oleifera*. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 796-804, 2015.
- TAN-WILSON, A.; WILSON, K. A. Mobilization of seed protein reserves. **Physiologia Plantarum**, v. 145, p. 140-153, 2012.
- TESFAY, S. Z.; BERTLING, I.; ODINDO, A. O.; WORKNEH, T. S.; MATHABA, N. Levels of anti-oxidants in different parts of moringa (*Moringa oleifera*) seedling. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, p. 5123-5132, 2011.
- TESFAY, S. Z.; MODI, A. T.; MOHAMMED, F. The effect of temperature in moringa seed phytochemical compounds and carbohydrate mobilization. **South African Journal of Botany**, v. 102, p. 190-196, 2015.
- THEODOULOU, F. L.; EASTOMOND, P. J. Seed storage oil catabolism: a story of give and take. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, p. 322-328, 2012.
- VAN HANDEL, E. Direct microdetermination of sucrose. **Analytical Biochemistry**. 22: 280-283, 1968.
- VESELOVA, T. V.; VESELOVSKY, V. A.; OBROUCHEVA, N. V. Deterioration mechanisms in air-dry pea seed during early aging. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 87, p. 133-139, 2015.
- VESELOVSKY, V. A.; VESELOVA, T. V. Lipid peroxidation, carbohydrate hydrolysis, and

Amadori-Maillard reaction at early stages of dry seed aging. **Russian Journal of Plant Biology**, v. 59, p. 763-770, 2012.

VRIET, C.; EDWARDS, A.; SMITH, A. M.; WANG, T. L. Sucrose and starch metabolism. **The Lotus japonicus Genome**, p. 97-115, 2014.

YEMM, E.W.; WILLIS, A.J. The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, v.57, p.508-514, 1954.