

**WELHA CARLOS DA MOTA**

**VARIABILIDADE FENOTÍPICA DE FRUTOS E ATIVIDADE DA ENZIMA  
ENDO- $\beta$ -MANANASE EM SEMENTES DE *Butia capitata* (Mart.) Becc.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Agrárias, concentração em Agroecologia, do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Agrárias.

**Coorientador:** Leonardo Monteiro Ribeiro

**Orientador:** Paulo Sérgio Nascimento Lopes

Montes Claros  
2013

M118v  
2013

Mota, Welha Carlos da.

Variabilidade fenotípica de frutos e atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes de *Butia capitata* (Mart.) Becc. / Welha Carlos da Mota. Montes Claros: ICA/UFMG, 2013.

71 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias, área de concentração em Agroecologia) Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Orientador: Prof. Paulo Sérgio Nascimento Lopes.

Banca examinadora: Marlon Cristian Toledo Pereira, Gevany Paulino Pinho, Flaviano Oliveira Silvério, Leonardo Monteiro Ribeiro, Paulo Sérgio Nascimento Lopes.

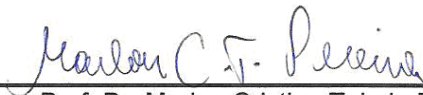
Inclui bibliografia: f. 65-71

1. Variabilidade fenotípica. 2. *Butia capitata*. 3. Endo- $\beta$ -mananase. I. Lopes, Paulo Sérgio Nascimento. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 634.1

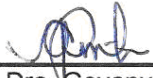
WELHA CARLOS DA MOTA

VARIABILIDADE FENOTÍPICA DE FRUTOS E ATIVIDADE DA ENZIMA  
ENDO- $\beta$ -MANANASE EM SEMENTES DE *Butia capitata* (Mart.) Becc.



---

Prof. Dr. Marlon Cristian Toledo Pereira  
(UNIMONTES)



---

Profa. Dra. Gevany Paulino Pinho  
(ICA/UFMG)



---

Prof. Dr. Flaviano Oliveira Silvério  
(ICA/UFMG)



---

Prof. Dr. Leonardo Monteiro Ribeiro  
(Coorientador - UNIMONTES)



---

Prof. Dr. Paulo Sérgio Nascimento Lopes  
(Orientador - ICA/UFM)

Aprovada em 28 de dezembro de 2012.

Montes Claros  
2013

Dedico aos meus pais,  
Maria José e Adão Carlos.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por guiar meus caminhos e permitir que eu chegasse até aqui, concluindo mais uma etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Paulo Sérgio Nascimento Lopes e ao meu coorientador, Leonardo Monteiro Ribeiro, a paciência, a amizade e os ensinamentos durante esses dois anos, que foram fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais - ICA/UFMG, a oportunidade de realização do curso.

Aos meus pais Maria José e Adão Carlos, o carinho e o apoio incondicional. A toda minha família (irmãos, sobrinhos e cunhados) a força e o incentivo.

À João Paulo, o amor, a paciência e o apoio nas horas mais difíceis.

Aos amigos do Grupo de Estudos em Frutíferas Exóticas e Nativas (GEFEN) a colaboração nos trabalhos, as trocas de conhecimento e, acima de tudo, a amizade. Em especial agradeço à Evellyn, à Stephanie, a Lucas e a Diemerson.

Ao Laboratório de Micropropagação de Plantas (LAM) da UNIMONTES, a parceria e aos seus integrantes as trocas de conhecimentos. Em especial, agradeço a Vanessa Sales, a paciência e treinamento referente à cultura de embriões.

À professora Gevany, ao professor Flaviano e à aluna Juliana Mendes a parceria, a dedicação, a eficiência e as contribuições referentes ao desenvolvimento do método para quantificar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes.

À professora Lourdes e ao professor Delacyr, a amizade e os ensinamentos que adquiri como monitora REUNI, em suas disciplinas.

Ao professor Demerson Sanglard, as contribuições referentes às análises estatísticas.

Aos colegas do mestrado, em especial, Daiane e Josy a amizade.

Por fim, a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta pesquisa.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

**Figura 1** - Estrutura química do Galactomanano Locust Bean Gum. .... 20

### CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE DE FRUTOS, DE SEMENTES E DA GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES DE *Butia capitata* (Mart.) Becc. NO NORTE DE MINAS GERAIS

**Figura 1** - Localização geográfica das cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais..... 27

**Gráfico 1** - Distribuição de frequência em relação: (a) ao comprimento, (b) ao diâmetro e (c) à massa fresca dos frutos de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais.....35

**Gráfico 2** - Distribuição de frequência em relação: (a) ao comprimento, (b) ao diâmetro e (c) à massa fresca dos pirênios de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais.....36

**Gráfico 3** - Distribuição de frequência em relação ao peso da polpa dos frutos provenientes de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais.....37

**Gráfico 4** - Componentes principais CPI (39,70%) e CP2 (23,58%) de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais.....45

### CAPÍTULO 3 - UM NOVO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENDO- $\beta$ -MANANASE EM SEMENTES

**Figura 1** - Esquema de um corte longitudinal da semente de coquinho-azedo (*Butia capitata*) mostrando a localização das quatro partes utilizadas para o estudo da atividade da endo- $\beta$ -mananase.....55

**Gráfico 1** - Espectro de absorção na região do visível: a) solução padrão de HAPHB utilizando como branco água destilada, b) produto formado a partir da reação da D-manose com HAPHB utilizando como branco solução de HAPHB.....56

**Gráfico 2** - Massa de endosperma utilizada e o respectivo volume de extrator (solução tampão de acetato de sódio 1 mol L<sup>-1</sup>).....58

<b>Gráfico 3</b> - Efeito da temperatura na atividade enzimática da endo- $\beta$ - mananase presente em extrato de endosperma de coquinho- azedo ( <i>B. capitata</i> ).....	<b>59</b>
<b>Gráfico 4</b> - Avaliação do tempo de aquecimento necessário para formação do produto colorido a partir da reação entre açúcares redutores e HAPHB.....	<b>60</b>
<b>Gráfico 5</b> - Volume de extrato submetido à reação com HAPHB: ■— extrato com produtos de hidrólise do LBG , ◆- - extrato com apenas componentes endógenos da matriz, sem LBG (branco).....	<b>61</b>

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE DE FRUTOS, DE SEMENTES E DA GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES DE *Butia capitata* (Mart.) Becc. NO NORTE DE MINAS GERAIS**

- 1 - Análise físico-química dos solos coletados a 20 cm de profundidade em cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) localizadas no norte de Minas Gerais.....32**
- 2 - Temperatura anual média e precipitação no ano de 2011, para as cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*), localizadas no norte de Minas Gerais .....33**
- 3 - Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação das características biométricas avaliadas nos frutos e nos pirênios de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*), localizadas no norte de Minas Gerais.....34**
- 4 - Características biométricas das sementes de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*), no norte de Minas Gerais..... 39**
- 5 - Valores médios das características biométricas CTE (Comprimento total do embrião), CPC (Comprimento do pecíolo cotiledonar), CH (Comprimento do haustório) e DH (Diâmetro do haustório) avaliadas nos embriões de coquinho-azedo (*Butia capitata*), provenientes das sementes de cinco populações no norte de Minas Gerais..... 40**
- 6 - Valores médios das porcentagens de germinação, raiz primária e de bainha primária dos embriões de coquinho-azedo (*B. capitata*) provenientes das sementes de cinco populações no norte de Minas Gerais.....41**
- 7 - Estimativas de componentes da variância ( $V_f$ ,  $V_g$  e  $V_a$  = Variância fenotípica, genotípica e ambiental, respectivamente), coeficientes de variação fenotípica (CVF), genotípica (CVG) e herdabilidade ( $H^2_a$ ) No sentido amplo para características da semente, embrião e germinação *in vitro* de coquinho-azedo (*Butia capitata*)..... 42**
- 8 - Autovalores da variância e proporção da variação dos três primeiros eixos da análise de componentes principais (ACPs) de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais ..... 44**



### **CAPÍTULO 3 - UM NOVO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENDO- $\beta$ -MANANASE EM SEMENTES**

- 1 - Parâmetros de otimização do método da atividade enzimática ..... 54**
- 2 - Precisão do método proposto em termos de repetitividade e precisão intermediária..... 62**
- 3 - Atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em diferentes partes das sementes de coquinho-azedo (*B. capitata*), após 11 dias de germinação.....63**

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 - REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>16</b>
3.1 Biometria de frutos, sementes e variabilidade fenotípica .....	<b>16</b>
3.2 Fatores que influenciam a variabilidade germinativa e o vigor de plântulas .....	<b>17</b>
3.3 Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes .....	<b>19</b>
<b>CAPÍTULO 2- VARIABILIDADE DE FRUTOS, DE SEMENTES E DA GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>Butia capitata</i> (Mart.) Becc. NO NORTE DE MINAS GERAIS</b> .....	<b>22</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>22</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>23</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
2.1 Áreas de estudo .....	<b>27</b>
2.2 Coleta de dados do clima e do solo .....	<b>28</b>
2.3 Biometria de frutos, de pirênios, de sementes e de embriões .....	<b>28</b>
2.4 Cultivo <i>in vitro</i> .....	<b>29</b>
2.5 Análises estatísticas .....	<b>30</b>
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>31</b>
3.1 Características do clima e do solo .....	<b>31</b>
3.2 Variabilidade fenotípica de frutos, de pirênios, de sementes e de embriões de coquinho-azedo ( <i>B. capitata</i> ) .....	<b>33</b>
3.3 Variabilidade na germinação e no vigor de plântulas .....	<b>40</b>
3.4 Análise genética .....	<b>42</b>
3.5 Análise de componentes principais.....	<b>43</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>

<b>CAPÍTULO 3 - UM NOVO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENDO-<math>\beta</math>-MANANASE EM SEMENTES.....</b>	<b>47</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>47</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>48</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>49</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
2.1 Solução padrão.....	51
2.2 Obtenção da semente.....	51
2.3 Teste de germinação.....	51
2.4 Equipamento.....	52
2.5 Quantificação de açúcar redutor.....	52
2.6 Atividade enzimática do padrão de endo- $\beta$ -mananase.....	53
2.7 Otimização do método da atividade enzimática.....	53
2.8 Validação do método.....	54
2.9 Localização da atividade enzimática em sementes de coquinho-azedo ( <i>Butia capitata</i> ).....	54
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
3.1 Análises espectrofotométricas.....	56
3.2 Otimização do método da atividade enzimática.....	57
3.3 Validação do Método.....	61
3.4 Localização da atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes de coquinho-azedo ( <i>B. capitata</i> ).....	62
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>65</b>

## CAPÍTULO 1 – REFERENCIAL TEÓRICO

### 1 INTRODUÇÃO

A espécie *Butia capitata* (Mart.) Becc., conhecida popularmente como coquinho-azedo, é uma palmeira da família Arecaceae. Essa espécie é endêmica do bioma Cerrado e ocorre geralmente à margem de rios, onde o solo é mais fértil (LORENZI *et al.*, 2010). É uma planta monoica, possui caule do tipo estipe simples atingindo até 4 metros de altura e uma gema apical envolvida por bainhas (ALVES; DEMATTE, 1987; LIMA *et al.*, 2003; SILVA, 1998). As suas folhas são do tipo pinadas e arqueadas, apresentando folíolos lineares de ápice acuminado (LORENZI *et al.*, 2010). As inflorescências são do tipo paniculado, formado pelo pedúnculo (ráquis), espigas (ráquias) e flores amarelas, protegidas por brácteas que se abrem naturalmente (SILVA, 1998). As flores são unissexuadas na mesma ráquila, apresentando flores femininas no seu terço inicial e no restante da mesma, predominam as flores masculinas (FONSECA, 2006). Nessa espécie, ocorre dicogamia do tipo protandria, uma vez que a antese das flores masculinas ocorre antes da maturação das flores femininas (ROSA *et al.*, 1998).

O fruto é do tipo drupa oval e comestível, formado por epicarpo amarelado ou avermelhado, com 2,5 a 4,0 cm de comprimento; possui mesocarpo carnoso e fibroso e endocarpo duro e denso, contendo de uma a três sementes (LIMA *et al.* 2003; LORENZI *et al.*, 2010). A maturação dos frutos ocorre no período de dezembro a março, com um pico no mês de novembro (MOURA, 2008). As sementes possuem formato alongado e apresentam um tecido de reserva denso e rígido, denominado endosperma ou albúmen, que possui coloração esbranquiçada e ocupa quase toda a cavidade da semente (MAGALHÃES *et al.*, 2012). Quando a semente está aderida ao endocarpo, uma estrutura densa e lignificada com células esclerenficadas, é denominada diásporo, pirênio ou putâmen (AGUIAR; MENDONÇA, 2003). O embrião é basal, está inserido na região dorsal da semente e possui um cotilédone com formato cônico. O embrião apresenta duas regiões distintas, sendo uma extremidade distal afilada, a qual possui

coloração branca e brilhante, que corresponde ao haustório, estrutura responsável pela absorção das reservas do endosperma. E uma região proximal, que possui coloração amarela e corresponde ao pecíolo cotiledonar, onde se localiza o eixo embrionário (MAGALHÃES *et al.*, 2012).

O coquinho-azedo encontra-se distribuído pelos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais (LORENZI *et al.*, 2010). Essa palmeira destaca-se pela sua importância socioeconômica, sendo a planta utilizada como ornamental e as folhas como matéria prima para o artesanato e construção de telhados rústicos. Os frutos são muito explorados pelas comunidades rurais do norte de Minas Gerais para a comercialização e consumo “*in natura*” ou beneficiados pelas indústrias caseiras para a fabricação de polpas, de sucos e de sorvetes, gerando renda e emprego aos extrativistas. Além disso, os frutos também possuem uma grande importância ecológica, sendo utilizados como fonte de alimento para a fauna silvestre (FARIA *et al.*, 2008; MERCADANTE-SIMÕES *et al.*, 2006; SILVA, 2012).

No entanto as espécies do gênero *Butia* encontram-se ameaçadas, quanto à conservação de suas populações naturais, em função do intenso extrativismo dos frutos, do desmatamento e da ampliação das atividades agropecuárias nas suas regiões de ocorrência (MERCADANTE-SIMÕES *et al.*, 2006; RIVAS; BARILANI, 2004). Essas atividades podem gerar grandes perdas de plantas com genótipos superiores, ou seja, aquelas que produzem frutos de alto valor econômico e nutricional, conferindo, assim, erosão de material genético (MOURA, 2008).

A descrição das características biométricas de frutos e sementes de palmeiras tem auxiliado em estudos que visam à conservação, à domesticação ao uso sustentável das espécies, a partir do conhecimento da variabilidade fenotípica intra-específica existente entre populações distintas (AHMED *et al.*, 2011; NASCENTE *et al.*, 2000; RIVAS; BARILANI, 2004; SCHWARTZ *et al.*, 2010) e da influência de fatores ambientais, genéticos e morfológicos sobre a germinação e o vigor de plântulas (MARTINS-CORDER; OLIVEIRA *et al.*, 2009; SALDANHA, 2006; SILVA *et al.*, 2009). Entretanto, para *Butia capitata*, trabalhos com essas abordagens são escassos, necessitando de mais estudos, nesse sentido.

O coquinho-azedo (*B. capitata*) possui dormência em suas sementes, levando a uma germinação lenta, desuniforme e em baixas porcentagens (FERNANDES, 2008; LOPES *et al.*, 2011; MOURA, 2008). Segundo Fior *et al.* (2011), a dormência das sementes é atribuída à interferência mecânica do tegumento opercular que, após remoção, promove 90% de germinação. Outra forma de superar a dormência é o cultivo *in vitro* de embriões isolados de coquinho-azedo, resultando em uma taxa de germinação semelhante à remoção do tegumento opercular da semente (MAGALHÃES *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Em algumas espécies, a dormência também pode estar associada à dureza do endosperma, devido à constituição das paredes celulares por carboidratos do grupo dos galactomnanos. Além de serem utilizados como fonte de reservas durante a germinação, esses carboidratos também agem como uma barreira física ao crescimento do embrião, dificultando a protrusão radicular (DA SILVA *et al.*, 2007; GONG *et al.*, 2005; IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). Assim, para que ocorra a germinação, é necessário o enfraquecimento do endosperma, principalmente na região micropilar, adjacente à radícula, que ocorre devido à ação de hidrolases, como a enzima endo- $\beta$ -mananase (GONG *et al.*, 2005; FERREIRA; BORGHETTI, 2004).

A atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes tem sido determinada por vários métodos. O método modificado Somogyi–Nelson (KLYOSOV *et al.*, 2012; NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952) e o método DNS (dinitrosalicílico) de Miller (KATROLIA *et al.*, 2012; MILLER, 1959) baseiam-se na produção de açúcar redutor e na determinação colorimétrica. No entanto componentes endógenos presentes nas amostras (glicose, frutose, manose, etc.) têm apresentado interferência nos resultados.

O método mais utilizado na literatura para determinar a atividade da mananase é por difusão em gel, em que se utiliza o galactomanano *Locust Bean Gum* (LBG) como substrato (DA SILVA *et al.*, 2007; DOWNIE *et al.*, 1994). Entretanto esse método é laborioso e requer quantidade expressiva de amostra de sementes para extrair a endo- $\beta$ -mananase e hidrolisar o padrão de LBG (DINIZ *et al.*, 2009).

Outro método que também tem sido utilizado para determinar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase baseia-se na análise espectrofotométrica (IGLESIAS-FERNÁNDEZ; MATILLA, 2009; IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). Entretanto esse método apresenta limitações: o elevado custo do padrão de AZCL-galactomanano e a utilização de dois substratos diferentes, AZCL-galactomanano e o LBG, para determinar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase, que pode comprometer a eficácia do método. Diante do exposto, o desenvolvimento de um método mais eficiente, de elevada sensibilidade, baixo custo e de fácil execução, poderá contribuir para estudos futuros relativos à atividade da mananase em sementes.

## 2 OBJETIVOS

Verificar se há variabilidade fenotípica entre populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) em relação às características do fruto, da semente, do embrião, da germinação e do vigor de plântulas.

Determinar qual é o principal componente da variância fenotípica para as características da semente, da germinação e do vigor de plântulas.

Verificar quais as características morfológicas da semente e do embrião que apresentam maior variação entre as populações estudadas.

Desenvolver um novo método espectrofotométrico mais eficiente, de elevada sensibilidade, baixo custo e de fácil execução para determinar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes.

Aplicar o método espectrofotométrico otimizado em amostras de coquinho-azedo (*Butia capitata*), para determinar a localização da atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase, em diferentes partes das sementes.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Biometria de frutos, sementes e variabilidade fenotípica

A descrição das características biométricas de frutos e sementes fornece informações que podem auxiliar na distinção de espécies do mesmo gênero, em estudos de dispersão, no estabelecimento de plântulas, na identificação de sucessão vegetal e na determinação do potencial produtivo em plantas (BASKIN; BASKIN, 1998; CRUZ *et al.*, 2001; GUSMÃO *et al.*, 2006; MATHEUS; LOPES, 2007; MOURA *et al.*, 2012). Além disso, o conhecimento dessas características permite identificar a variabilidade fenotípica existente dentro e entre populações de uma mesma espécie (LAMIEN *et al.*, 2007; MUNTHALI *et al.*, 2012).

Em populações de ocorrência natural a variabilidade fenotípica é atribuída às diferenças entre ambientes, genótipos e à interação genótipo ambiente (RAMALHO *et al.*, 1990). A heterogeneidade de fatores ambientais como precipitação, temperatura e nutrientes no solo, pode atuar como uma importante fonte geradora de variabilidade morfológica entre genótipos de uma mesma espécie (LUZ *et al.*, 2011). Segundo Alonso-Blanco *et al.* (2009), as variações fenotípicas intra-específicas podem ser causadas por mutações espontâneas que têm sido mantidas na natureza, por meio de processos evolutivos, incluindo, entre outros, a seleção artificial ou natural. Assim, o conhecimento dessa variabilidade no processo de manejo de uma espécie permite, a curto prazo, manter o nível adequado da diversidade genética para a sua sobrevivência e, a longo prazo, o potencial evolutivo (BUI TEVELD *et al.*, 2007).

As variações das características biométricas dos frutos e das sementes podem ser diferentes entre áreas, entre plantas e até mesmo dentro de uma mesma planta (VERA *et al.*, 2005). Alguns estudos têm investigado a variabilidade fenotípica de frutos e sementes de espécies oriundas de regiões distintas (LOHA *et al.*, 2006; MUNTHALI *et al.*, 2012; SHAKAR; SYNREM, 2012; SILVA JUNIOR *et al.*, 2012), relatando a ocorrência de grande variabilidade entre populações. Em conformidade com alguns autores, a

variabilidade existente nas características como o peso e tamanho de frutos é comum em plantas nativas oriundas de regiões distintas, indicando que o peso possui uma maior variação e é controlado pelo ambiente, enquanto que as dimensões são menos variáveis e são controladas geneticamente (MUNTHALI *et al.*, 2012; SHAKAR; SYNREM, 2012). Quanto às sementes, trabalhos demonstram que o comprimento e o peso também são as principais características que influenciam essa variabilidade (FOGLIATTO *et al.*, 2011; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2012).

Em palmeiras, estudos realizados com a espécie *Butia odorata* mostraram a existência de variações entre populações em relação ao peso e às dimensões dos frutos, dos endocarpos e das sementes (RIVAS; BARILANI, 2004; SCHWARTZ *et al.*, 2010). Ahmed *et al.* (2011), estudando cultivares de *Phoenix dactylifera* provenientes de diferentes procedências, observaram que o tamanho dos frutos e das sementes dessa palmeira, foram responsáveis pela grande proporção da variabilidade existente dentro da espécie. Um estudo com a palmeira *Syagrus oleraceae* mostrou que, apesar dessa espécie ser semidomesticada, a grande variabilidade encontrada no peso das sementes ainda indica que essa se encontra em estado selvagem (NASCENTE *et al.*, 2000).

### 3.2 Fatores que influenciam a variabilidade germinativa e o vigor de plântulas

Muitas plantas apresentam variações intra-específicas relativas à germinação das sementes que, possivelmente, podem estar associadas às adaptações aos diferentes ambientes (ALONSO-BLANCO *et al.*, 2009). Estudos com espécies distintas têm demonstrado que sementes de diferentes procedências, oriundas de áreas de ocorrências naturais ou cultivadas, apresentam grande variabilidade em relação à germinação. Essa variabilidade pode ser influenciada por fatores ambientais (LOHA *et al.*, 2006; MANO *et al.*, 2006); genéticos (LOHA *et al.*, 2006; FOGLIATTO *et al.*, 2011) ou por características morfológicas das sementes como o tamanho e o peso (BASKIN; BASKIN, 1998).

Em relação a palmeiras, estudos mostram o controle genético sobre a germinação. Oliveira *et al.* (2009) observaram que as sementes de uma população de meio-irmãos de *Euterpe oleracea* apresentaram variações no vigor referentes ao início e ao tempo médio de emergência das plântulas. As variações no vigor de plântulas entre genótipos dentro de uma mesma população também foram detetadas para *Euterpe edulis* (MARTINS-CORDER; SALDANHA, 2006). Já Silva *et al.* (2009) observaram que sementes de progênies de *Oenocarpus mapora* e *Oenocarpus distichus*, oriundas de diferentes populações, também apresentam grande variabilidade quanto aos caracteres germinativos, tais como: percentagem e tempo médio de emergência, e taxa de crescimento absoluto da altura e diâmetro de plântulas.

A influência de características morfológicas das sementes na variabilidade germinativa em palmeiras também tem sido investigada. Sobre uma população de *Euterpe espirosantensis*, autores admitem que, quanto maior o peso e o tamanho das sementes, maior é a velocidade de germinação (MARTINS *et al.*, 2000). Ledo *et al.* (2002) constataram que sementes de *Bactris gasipaes* classificadas como grandes e médias proporcionaram maior porcentagem e velocidade de emergência das plântulas. Isso se deve à hipótese de que sementes maiores possivelmente receberam uma maior quantidade de assimilados durante o seu desenvolvimento, possuem embriões bem formados e com uma maior quantidade de reservas, o que irá resultar em uma plântula vigorosa (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Entretanto para as espécies *Archontophoenix cunninghamii* (PIVETTA *et al.*, 2008) e *Copernicia Hospita* (OLIVEIRA *et al.*, 2009), o tamanho e peso das sementes não influenciaram a germinação e o vigor de plântulas. Segundo Pereira *et al.* (2011), a influência das características morfológicas das sementes na germinação e vigor parece variar entre espécies e regiões distintas.

### 3.3 Atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes

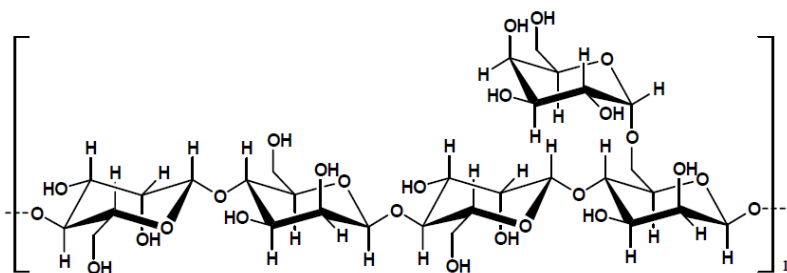
Em sementes de algumas espécies, as células do endosperma possuem paredes celulares espessas, constituídas de galactomananos, que além de possuírem a função de reserva, também conferem restrições mecânicas a germinação dificultando a protrusão radicular (GONG *et al.*, 2005). Os galactomananos são polissacarídeos compostos por uma cadeia principal de manose ligada  $\beta 1 \rightarrow 4$ , à qual se unem unidades de galactose, por meio de ligações glicosídicas do tipo  $\alpha 1 \rightarrow 6$  (FERREIRA; BORGUETTI, 2004).

Para que ocorra a degradação do galactomanano, é necessária a atuação de hidrolases; dentre elas, a endo- $\beta$ -mananase, que atua especificamente nas ligações  $\beta 1 \rightarrow 4$  desse carboidrato (IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). Há hipóteses de que essa enzima possui duas funções durante o processo germinativo. A primeira está relacionada a degradação do endosperma, permitindo a protrusão radicular e a segunda, à mobilização de reservas, como observado para as sementes de *Sesbania virgata* (LISBOA *et al.*, 2006). A síntese dessa enzima ocorre especialmente durante o período de germinação (IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010), processo de crescimento ou senescência da semente (SCHRODER *et al.*, 2009).

Alguns trabalhos têm investigado a atividade da endo- $\beta$ -mananase em diferentes partes das sementes. Da Silva *et al.* (2007) observaram que em sementes de *Annona crassiflora* a atividade da endo- $\beta$ -mananase foi detectada inicialmente no endosperma micropilar, em torno do embrião, difundindo-se para o endosperma lateral. Em sementes de *Coffea arabica*, foi detectada atividade da endo- $\beta$ -mananase no embrião, apenas após a protrusão da radícula, sendo inexistente a atividade dessa enzima no endosperma (GIORGINI; COMOLI, 1996). Em sementes de *Phoenix dactylifera*, após 9 dias de embebição, foi detectada atividade da endo- $\beta$ -mananase somente no embrião. Após a conclusão da germinação, a atividade enzimática foi intensa no embrião e no endosperma micropilar, não sendo detectada atividade no endosperma lateral (GONG *et al.*, 2005).

A atividade da enzima endo- $\beta$ -mananase em sementes tem sido determinada pelo método modificado Somogyi–Nelson (KLYOSOV *et al.*, 2012; NELSON, 1944; SOMOGYI, 1952;) e pelo método DNS (dinitrosalicílico) de Miller (KATROLIA *et al.*, 2012; MILLER, 1959). Esses métodos baseiam-se na produção de açúcar redutor e na determinação colorimétrica. Entretanto, componentes endógenos presentes nas amostras (glicose, frutose, manose, etc.) têm apresentado interferência nos resultados.

Atualmente, o principal método utilizado para determinar a atividade da mananase é por difusão em gel, em que se utiliza o galactomanano *Locust Bean Gum* (LBG) como substrato (DA SILVA *et al.*, 2007; DINIZ *et al.*, 2009; DOWNIE *et al.*, 1994). Na FIG. 1, é apresentado um fragmento deste polissacarídeo, o qual é formado por unidades lineares de  $\beta(1\rightarrow4)$ -D-manopiranosil e ramificações de  $\alpha(1\rightarrow6)$ -D-galactopiranosil, ligadas randomicamente.



**FIGURA 1** - Estrutura química do galactomanano *Locust Bean Gum*

Fonte: KAWAMURA, 2008.

O LBG apresenta uma razão de unidades de monossacarídeos manose: galactose de 4:1, e a enzima endo- $\beta$ -mananase hidrolisa apenas as ligações glicosídicas envolvendo a manose, formando os oligossacarídeos redutores manotetrose, manotriose e manbiose como produtos de hidrólise (BLIBECH *et al.*, 2011). Embora o método tenha apresentado resultados satisfatórios, é considerado laborioso, requer quantidades expressivas de amostra de sementes para extrair a endo- $\beta$ -mananase e hidrolisar o padrão de LBG (DINIZ *et al.*, 2009) e demanda muito tempo de análises, superior a 16 horas.

Outro método que também tem sido utilizado para determinar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase baseia-se na análise espectrofotométrica (IGLESIAS-FERNÁNDEZ; MATILLA, 2009; IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). Esse método consiste em extrair a enzima da semente e colocá-la em contato com o polissacarídeo sintético AZCL-galactomanano, que possui grupos carboxilatos, zircônio e amônio ligados à estrutura do galactomanano, formando um composto colorido. A hidrólise do substrato sintético diminui a absorbância em 590 nm e, assim, determina-se a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase. Essa técnica é baseada na quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de açúcar redutor equivalente a D-manose por unidade de tempo em condições experimentais estabelecidas, utilizando, para isso, dados obtidos a partir da hidrólise do LBG por padrão de mananase e quantificados pelo método espectrofotométrico proposto por Lever (1972). Entretanto esse método apresenta limitações, relacionadas ao elevado custo do padrão de AZCL-galactomanano e à utilização de dois substratos diferentes: AZCL-galactomanano e o LBG, para determinar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase, o que pode comprometer a eficácia do método.

## **CAPÍTULO 2 – VARIABILIDADE DE FRUTOS, DE SEMENTES E DA GERMINAÇÃO DE EMBRIÕES DE *Butia capitata* (Mart.) Becc. NO NORTE DE MINAS GERAIS**

### **RESUMO**

Esta pesquisa teve como objetivos analisar as diferenças fenotípicas entre populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) em relação às características biométricas do fruto, da semente, do embrião, da germinação e do vigor de plântulas; verificar qual é o principal componente da variância fenotípica para as características da semente, da germinação e do vigor de plântulas e quais as características da semente e do embrião que apresentam maior variação entre as populações. Os frutos de coquinho-azedo (*B. capitata*) foram obtidos de cinco populações localizadas no norte de Minas Gerais. Em amostras de 1000 frutos, de cada população, avaliaram-se o comprimento, o diâmetro e a massa fresca dos frutos e dos pirênios (endocarpo+sementes). O rendimento em polpa foi obtido por meio da subtração do peso dos frutos pelo peso dos pirênios. Em amostras de 200 sementes, de cada população, também avaliaram-se o comprimento, o diâmetro e a massa fresca. Os embriões foram excisados das sementes para a avaliação do comprimento total, do comprimento e do diâmetro do pecíolo cotiledonar e o comprimento e o diâmetro do haustório. Os embriões foram cultivados *in vitro* e avaliados após 30 dias, quanto à germinação, emissão de raízes e bainhas. Observou-se variabilidade considerável entre populações de coquinho-azedo (*B. capitata*) para as características do fruto, do pirênio, da semente, da germinação e do vigor de plântulas. A variabilidade genotípica é a principal responsável pela variabilidade fenotípica para as características da semente, do embrião, da germinação e do vigor de plântulas, e as dimensões do embrião e a massa da semente são as principais características que discriminam as populações.

**Palavras-chave:** Coquinho-azedo. Populações. Biometria. Cultivo *in vitro*.

## CHAPTER 2 - VARIABILITY OF FRUITS, SEED AND GERMINATING EMBRYO OF *Butia capitata* (Mart.) Becc. IN NORTH OF MINAS GERAIS

### ABSTRACT

This research aimed to analyze the phenotypic differences among populations of coquinho-azedo (*Butia capitata*) regarding biometric characteristics of the fruit, of the seed, of the embryo, of the germination and of the seedling vigor; verify what is the main component of the phenotypic variance for the characteristics of the seed, of the germination and of the seedling vigor and what are the characteristics of the seed and of the embryo that present greatest variation among populations. The fruits of coquinho-azedo (*B. capitata*) were obtained from five populations located in north of Minas Gerais. In samples of 1000 fruits from each population were evaluated the length, diameter and fresh mass of the fruits and of the pyrene (endocarp + seed). The yield in pulp was obtained by subtracting of the fruit weight by the seeds weight. In samples of 200 seeds from each population were evaluated also the length, the diameter and the fresh mass. The embryos were excised of the seeds for evaluation of the total length, of the length and of the diameter of the cotyledon petiole and the length and the diameter of the haustoria. The embryos were cultured in vitro and evaluated after 30 days as for germination, emission of roots and sheaths. It was observed considerable variability among populations of coquinho-azedo (*B. capitata*) for fruit characteristics, of the pyrene, of the seed germination and of the seedling vigor. The genotypic variability is the main responsible for the phenotypic variability for the characteristics of the seed, of the embryo, of the germination and of the seedling vigor, and the dimensions of the embryo and seed mass are the main features that discriminate the populations.

**Keywords:** Coquinho-azedo. Populations. Biometrics. In vitro cultivation.



## 1 INTRODUÇÃO

O coquinho-azedo [*Butia capitata* (Mart.) Becc] é uma palmeira endêmica do Cerrado, ocorrendo nos estados da Bahia, Goiás e Minas Gerais, geralmente à margem de rios, onde o solo é mais fértil (LORENZI *et al.*, 2010). Essa palmeira apresenta uma elevada importância socioeconômica e ecológica, uma vez que apresenta um potencial ornamental e seus frutos possuem grande demanda para o mercado de fruta “*in natura*” ou na indústria para a fabricação de polpas, de sucos e de sorvetes, além de ser uma relevante fonte de alimento para a fauna (FARIA *et al.*, 2008; MERCADANTE-SIMÕES *et al.*, 2006).

Entretanto as espécies do gênero *Butia* encontram-se ameaçadas quanto à conservação de suas populações naturais, em função do intenso extrativismo dos frutos, do desmatamento e da ampliação das atividades agropecuárias nas suas regiões de ocorrência (LIMA, 2011; MERCADANTE-SIMÕES *et al.*, 2006; RIVAS; BARILANI, 2004; SCHWARTZ *et al.*, 2010; SILVA, 2012).

A conservação e a domesticação de uma espécie dependem do conhecimento sobre a variação intra-específica (LOHA *et al.*, 2006). Em populações de plantas de ocorrência natural essa variação é atribuída às diferenças ambientais, às diferenças entre genótipos e à interação genótipo ambiente (RAMALHO *et al.*, 1990). O conhecimento dessa variação, no processo de manejo da espécie, permite, a curto prazo, manter o nível adequado de diversidade genética para a sobrevivência e, a longo prazo, o potencial evolutivo (BUITEVELD *et al.*, 2007), bem como proporcionar o desenvolvimento de estratégias de melhoramento de plantas (AHMED *et al.*, 2011; MUNTHALI *et al.*, 2012).

Estudos sobre a variabilidade fenotípica em coquinho-azedo (*B. capitata*) têm sido realizados, principalmente em relação às características biométricas de caules, de folhas e de flores (FONSECA *et al.*, 2007; MERCADANTE-SIMÕES *et al.*, 2006; SILVA, 2012). Trabalhos que investigam a variabilidade fenotípica de frutos e sementes são restritos (MOURA *et al.*, 2010), principalmente aqueles que comparam essa

variabilidade entre populações. Estudos nesse sentido são de extrema importância porque podem auxiliar na definição de estratégias para programas de melhoramento genético da espécie e também ser utilizados como base para trabalhos de modelagem do crescimento e do desenvolvimento das plantas.

A população de origem da semente pode influenciar a sua qualidade fisiológica e, conseqüentemente, a sua germinação. Vários estudos com diferentes espécies têm demonstrado que frutos e sementes de diferentes procedências, oriundas de áreas de ocorrência natural ou cultivadas, apresentam grande variabilidade (FOGLIATTO *et al.*, 2011; LOHA *et al.*, 2006; MUNTHALI *et al.*, 2012; SHANKAR; SYNREN, 2012; SILVA JUNIOR *et al.*, 2012). Apesar da maior parte dessa variabilidade ser atribuída ao efeito do ambiente, uma parte significativa também é devida ao genótipo, principalmente para as características da semente, da germinação e do vigor de plântula (FOGLIATTO *et al.*, 2011; LOHA *et al.*, 2006; LOHA *et al.*, 2008; MUNTHALI *et al.*, 2012).

Outro aspecto que pode influenciar na variabilidade intra-específica referente à germinação das sementes é o efeito da sua morfologia (MARTINS *et al.*, 2000; LEDO *et al.*, 2002). De forma geral, sementes maiores possuem embriões bem formados e com uma quantidade de reservas elevada, refletindo numa germinação mais rápida e plântulas vigorosas, além de maior chance de sobrevivência em condições ambientais adversas, como estress hídrico, escassez de nutrientes no solo e intensidades luminosas desfavoráveis (OLIVEIRA *et al.*, 2009; SILVA; CARVALHO, 2008).

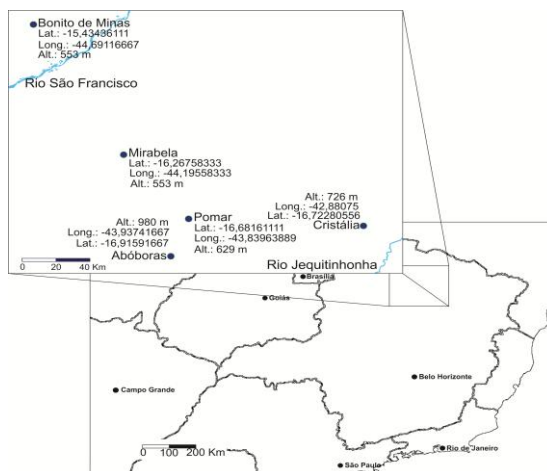
O coquinho-azedo (*B. capitata*) possui dormência em suas sementes, sendo essa atribuída à interferência do tegumento opercular, que após remoção permite 90% de germinação (FIOR *et al.*, 2011). Alguns autores observaram que o cultivo *in vitro* de embriões isolados de coquinho-azedo também promove uma elevada germinação para a espécie (MAGALHÃES *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2011). Dessa forma, a técnica do cultivo de *in vitro*, além de superar a dormência, também permite observar o efeito isolado do embrião sobre a germinação e o vigor de plântulas, sendo apropriada para estudos de morfometria do embrião.

Assim, esta pesquisa teve como objetivo responder os seguintes questionamentos: há diferenças fenotípicas entre populações de coquinho-azedo (*B. capitata*) em relação às características do fruto, da semente, do embrião, da germinação e do vigor de plântulas? Qual é o principal componente da variância fenotípica para as características da semente, da germinação e do vigor de plântulas? Quais são as características da semente e do embrião que apresentam maior variação entre as populações de coquinho-azedo (*B. capitata*)?

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Áreas de estudo

Os frutos de coquinho-azedo (*B. capitata*) foram coletados em dezembro de 2011, em cinco populações localizadas em quatro municípios no Norte de Minas Gerais (FIG. 1). Duas populações situam-se no município de Montes Claros, sendo uma natural e a outra cultivada. A população natural localiza-se em uma comunidade rural denominada Abóboras, onde a vegetação predominante é o cerrado *sensu strictu* e a espécie está sujeita ao extrativismo dos frutos. A população cultivada localiza-se no Instituto de Ciências Agrárias da UFMG, em um pomar experimental. As plantas estão com sete anos de idade e foram obtidas de sementes oriundas de diferentes regiões do norte de Minas Gerais. O pomar foi implantado no espaçamento 3,0 x 2,5 m e conta com um sistema de irrigação por microaspersão. As outras populações estão localizadas nos municípios de Mirabela, Cristália e Bonito de Minas, sendo que a vegetação predominante nessas populações também é o cerrado *sensu strictu*. Em Mirabela, os frutos de coquinho-azedo (*B. capitata*) são explorados por meio do extrativismo, enquanto que nas outras duas populações não há atividade extrativista considerável.



**FIGURA 1** - Localização geográfica das cinco populações de coquinho - azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais

Fonte: FERREIRA JÚNIOR, 2012.

## 2.2 Coleta de dados do clima e do solo

A precipitação e temperatura anual média foram calculadas para o ano de 2011, com os dados disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET). Para as populações Abóboras e Pomar, os dados foram obtidos da Estação Meteorológica de Montes Claros, onde as populações estão localizadas. Para as demais populações, as estações mais próximas a elas foram escolhidas para representá-las, sendo a população de Mirabela caracterizada pela estação de Montes Claros; a população Bonito de Minas, pela estação de Januária e Cristália, pela estação de Grão Mogol.

Em cada população coletaram-se três amostras de solo distantes umas das outras, a uma profundidade de 20 cm. Posteriormente, foram agrupadas, totalizando uma amostra composta para cada população. As análises físico-químicas foram realizadas pelo Laboratório de Solos do Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, campus de Montes Claros – MG.

## 2.3 Biometria de frutos, de pirênios, de sementes e de embriões

Em cada população, selecionaram-se 10 plantas que apresentavam cachos com frutos maduros de coloração totalmente amarela. Em cada planta, coletou-se um cacho e, para a avaliação das características dos frutos, foram utilizadas cinco repetições de vinte frutos de cada cacho, com um total de 1000 frutos por população, descartando aqueles que apresentavam lesão ou injúria. Em cada parcela foram determinadas as médias das seguintes características: comprimento, diâmetro e massa fresca dos frutos e dos pirênios (endocarpo + semente). Os comprimentos e diâmetros foram determinados com o auxílio de um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm. Os dados de massa fresca foram mensurados utilizando-se balança eletrônica, com precisão de 0,1g. Os pirênios foram obtidos pelo despulpamento dos frutos em liquidificador de baixa rotação. O rendimento em polpa foi calculado por meio da subtração do peso dos frutos pelo peso dos pirênios.

Para a obtenção das sementes, os pirênios foram seccionados com o auxílio de um torno manual de bancada. Para avaliar as características biométricas, foram selecionadas aleatoriamente quatro amostras de cinco sementes de cada planta, totalizando 200 sementes por população. O comprimento e o diâmetro foram mensurados, conforme descrito acima e a massa fresca foi determinada em balança eletrônica, com precisão de 0,001g.

Os embriões foram isolados da semente com o auxílio de um estilete em condições assépticas em câmara de fluxo laminar e colocados em placas de Petri. A fim de caracterizar a biometria dos mesmos, esses foram fotografados, utilizando-se câmera digital, com resolução de 8,1 megapixels. Como as pequenas dimensões dos embriões não permitem medições diretas, as imagens obtidas foram analisadas pelo software Corel DRAW, sendo realizadas mensurações do comprimento e diâmetro do haustório e do pecíolo cotiledonar, além do comprimento total do embrião.

Para a biometria das sementes e dos embriões, utilizou-se o delineamento em blocos casualizados, com cinco tratamentos (populações) e quatro repetições de cinco sementes/embriões.

#### 2.4 Cultivo *in vitro*

Após fotografar os embriões, esse foram imersos em solução de ácido ascórbico  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e, posteriormente, desinfetados em solução de hipoclorito de sódio 0,5% por 10 minutos, seguida de tríplex lavagem com água destilada e esterilizada (RIBEIRO *et al.*, 2011). Após a desinfecção, os embriões foram inoculados em tubos de ensaio com dimensões de 12x1 cm com 2 mL do meio de cultura previamente esterilizado a  $125^{\circ}\text{C}$ , por 20 minutos, contendo sais MS em 75% de sua concentração original, suplementado com  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de tiamina,  $1 \text{ mg L}^{-1}$  piridoxina,  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido nicotínico,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de mio-inositol,  $0,5 \text{ g L}^{-1}$  de caseína hidrolisada,  $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarose,  $3 \text{ g L}^{-1}$  de carvão ativado e  $6 \text{ g L}^{-1}$  de agar, com o pH ajustado para 5,7. Os embriões foram incubados durante 30 dias, em câmara de germinação, à temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ , na ausência de luz. Após 30 dias, os

seguintes parâmetros foram avaliados: germinação (considerando-se o alongamento de 50% do pecíolo cotiledonar), a porcentagem de plântulas com emissão de raízes e bainhas, de embriões sem desenvolvimento, oxidados e contaminados (RIBEIRO *et al.*, 2011).

Este experimento foi realizado em blocos casualizados, com cinco tratamentos (populações) e quatro repetições de cinco embriões. Os dados foram tomados por contagem dos embriões ou plântulas apresentando o evento e convertidos em percentual, seguida de transformação em arco seno  $(x/100)^{0,5}$ .

## 2.5 Análises estatísticas

Os dados biométricos dos frutos, dos pirênios e do rendimento em polpa por não apresentarem distribuição normal, foram analisados por meio da estatística descritiva e distribuição de frequência. As análises foram realizadas no Microsoft office Excel.

Os dados biométricos das sementes, dos embriões e do cultivo *in vitro* foram submetidos à análise de variância e para aqueles em que foram significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE, 1997).

Esses dados também foram submetidos a uma análise genética, utilizando-se o aplicativo computacional Genes-UFV (CRUZ, 1997). Foram estimados os seguintes parâmetros: variância fenotípica ( $V_f$ ), variância genotípica ( $V_g$ ), coeficientes de variação fenotípica (CVF), coeficiente de variação genotípica (CVG) e herdabilidade ( $H^2_a$ ).

Realizou-se também uma análise de componente principal, a fim de estabelecer uma relação entre as características avaliadas nas sementes, nos embriões e no cultivo *in vitro* e as populações de coquinho-azedo. O programa SAS (SAS INSTITUTE, 1997) foi utilizado para executar a análise.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Características do clima e do solo

Conforme a classificação textural, os solos das populações de Abóboras, Pomar, Mirabela e Cristália foram considerados de textura média, enquanto o solo de Bonito de Minas foi considerado como arenoso (TAB. 1). Todas as populações apresentaram solos com pH ácido e quantidades muito baixas de fósforo (TAB. 1). As populações de Abóboras e do Pomar apresentaram solos com uma maior capacidade de troca de cátions, bem como maiores concentrações de cálcio e magnésio, além de uma maior quantidade de matéria orgânica, silte e argila (TAB. 1). Quanto à saturação de alumínio observou-se que o solo da população de Abóboras foi o que apresentou maior porcentagem (TAB. 1). No geral, os solos das populações do Pomar, Abóboras, Mirabela e Bonito de Minas apresentaram uma boa fertilidade, enquanto o de Cristália, uma baixa fertilidade.



**TABELA 1**

Análise físico-química dos solos coletados a 20cm de profundidade em cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) localizadas no norte de Minas Gerais

<b>Atributos do solo</b>	<b>Abóboras</b>	<b>Pomar</b>	<b>Mirabela</b>	<b>Cristália</b>	<b>Bonito de Minas</b>
Mat. Org. (dag kg <sup>-1</sup> )	2,93	4,06	2	1,88	1,66
Areia grossa (dag kg <sup>-1</sup> )	15,6	9,6	26,7	43,4	13,7
Areia fina (dag kg <sup>-1</sup> )	32,4	18,4	45,3	28,6	64,3
Silte (dag kg <sup>-1</sup> )	24	46	10	10	10
Argila (dag kg <sup>-1</sup> )	28	26	18	18	12
<b>Classificação</b>	média	média	média	média	Arenosa
pH em água	6,6	6,7	5,7	4,4	5,8
P (mg dm <sup>-3</sup> )	6,24	0,97	0,31	0,31	0,39
Ca ( cmol dm <sup>-3</sup> )	3,6	6,8	1,2	0,5	1,1
Mg ( cmol dm <sup>-3</sup> )	1,5	2,2	0,5	0,2	0,5
Al ( cmol dm <sup>-3</sup> )	0	0	0,1	0,9	1,1
SB (cmol dm <sup>-3</sup> )	5,1	9	1,7	0,7	1,6
t ( cmol dm <sup>-3</sup> )	5,1	9	1,8	1,6	1,7
m (%)	0	0	6	56	6
T ( cmol dm <sup>-3</sup> )	6,15	9,66	2,97	2,73	2,61
V (%)	83	93	57	26	61

Notas: P = Concentração de fósforo ; Ca= concentração de cálcio; MG= concentração de magnésio; Al= concentração de alumínio; H+Al= concentração de alumínio + hidrogênio ; SB= soma de bases; t= CTC efetiva; m = saturação por alumínio; T= CTC em pH 7; V(%)= saturação por bases

Fonte: Da autora.

Quanto aos dados climáticos, observou-se que, no ano de 2011, a população de Bonito de Minas apresentou uma temperatura média anual mais elevada e uma maior precipitação, enquanto que a de Cristália apresentou os menores valores. Já as demais populações apresentaram temperatura anual média e precipitação semelhantes (TAB. 2).

**TABELA 2**

Temperatura anual média e precipitação no ano de 2011, para as cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*), localizadas no norte de Minas Gerais

<b>Populações</b>	<b>Temperatura anual média (°C)</b>	<b>Precipitação total (mm)</b>
Abóboras	23,51	1.137,60
Pomar	23,51	1.137,60
Mirabela	23,51	1.137,60
Cristália	22,10	1.061,10
Bonito de Minas	24,47	1.179,00

Fonte: INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2012.

### 3.2 Variabilidade fenotípica de frutos, de pirênios, de sementes e de embriões de coquinho-azedo (*B. capitata*)

Os valores médios das dimensões dos frutos e dos pirênios, bem como da massa fresca e do peso da polpa encontram-se na TAB. 3. Foi observada variabilidade entre populações para as características avaliadas.

**TABELA 3**

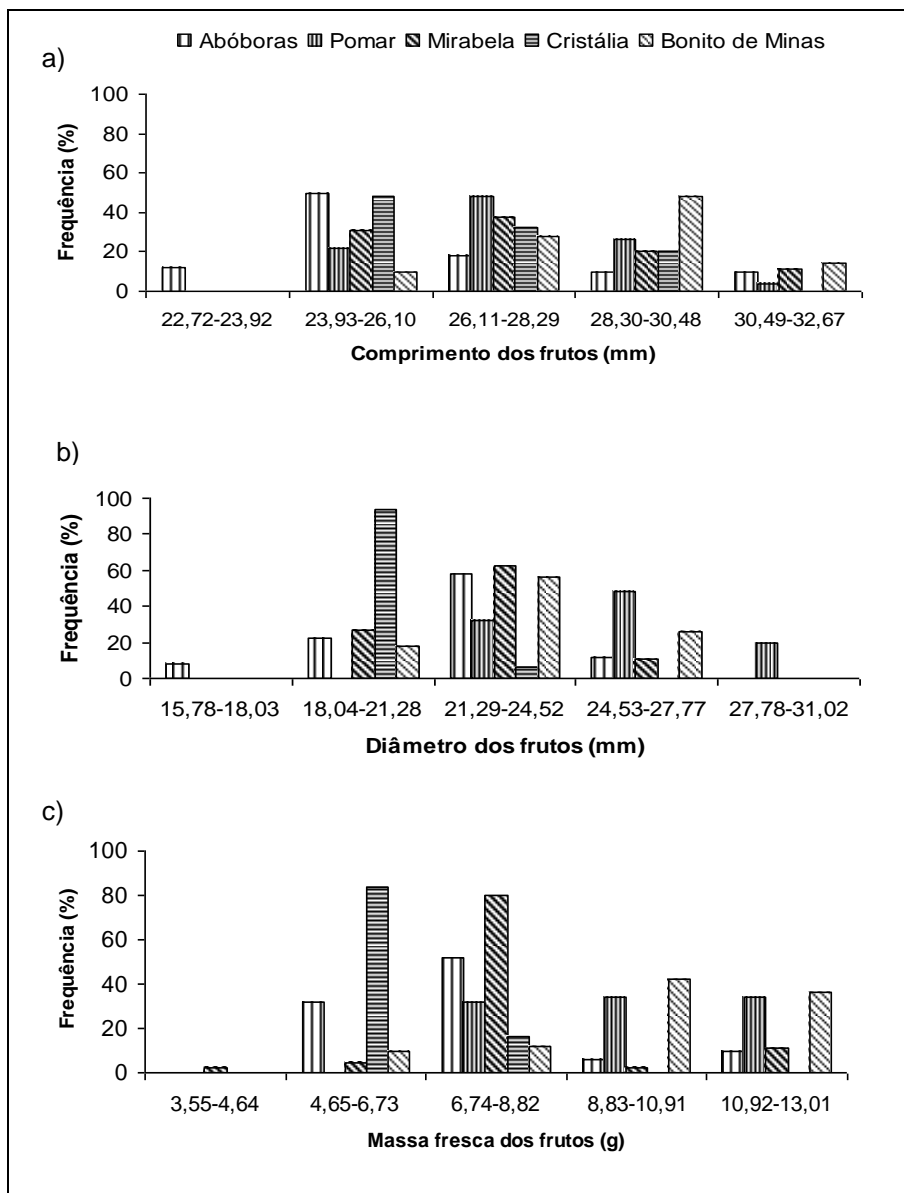
Valores médios, desvio padrão e coeficiente de variação das características biométricas avaliadas nos frutos e nos pirênios de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*), localizadas no norte de Minas Gerais

Populações	Características Biométricas	Média	Desvio padrão	Coeficiente de variação (%)
<b>Abóboras</b>	CF (mm)	26,26	2,51	9,55
	DF (mm)	22,24	2,16	9,71
	PF (g)	7,71	1,89	24,51
	CP (mm)	19,7	1,98	10,05
	DP (mm)	10,92	0,67	6,13
	PP (g)	1,46	0,19	13,01
	PPOL (g)	6,24	1,76	28,2
<b>Pomar</b>	CF (mm)	27,41	1,59	5,8
	DF (mm)	25,35	2,43	9,58
	PF (g)	9,83	1,88	19,12
	CP (mm)	20,08	0,99	4,93
	DP (mm)	11,12	0,52	4,67
	PP (g)	1,54	0,19	12,33
	PPOL (g)	8,28	1,8	21,73
<b>Mirabela</b>	CF (mm)	27,41	2,3	8,39
	DF (mm)	22,43	1,56	6,95
	PF (g)	7,97	1,81	22,73
	CP (mm)	20,17	1,69	8,37
	DP (mm)	11,3	0,67	5,92
	PP (g)	1,57	0,29	18,47
	PPOL (g)	6,39	1,61	25,19
<b>Cristália</b>	CF (mm)	26,65	1,51	5,66
	DF (mm)	19,49	1,02	5,23
	PF (g)	5,87	0,76	12,94
	CP (mm)	19,55	0,77	3,93
	DP (mm)	10,83	0,47	4,33
	PP (g)	1,32	0,12	9,09
	PPOL (g)	4,55	0,74	16,26
<b>Bonito de Minas</b>	CF (mm)	28,86	1,67	5,78
	DF (mm)	23,15	1,89	8,16
	PF (g)	9,86	1,76	17,84
	CP (mm)	22,53	1,18	5,23
	DP (mm)	11,71	0,79	6,74
	PP (g)	1,83	0,26	14,2
	PPOL (g)	8,02	1,68	20,94

Notas: CF (comp.-frutos); DF (diâmetro-frutos); PP (peso-frutos); CP (comp.- pirênios); DP (diâmetro-pirênios); PP (peso-pirênios) e PPOL (peso-polpa)

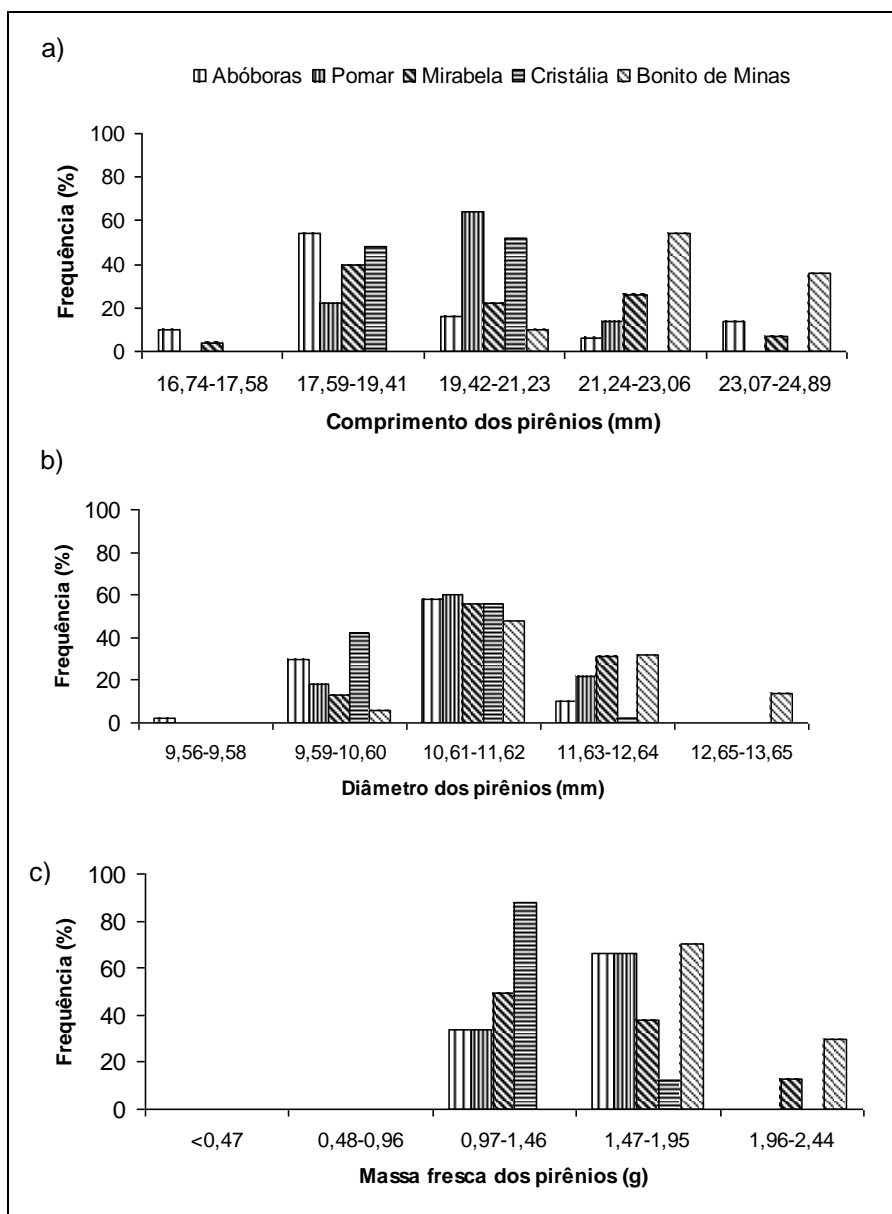
Fonte: Da autora.

As populações de coquinho-zedo (*B. capitata*) apresentaram distribuição de frequência assimétrica para o comprimento, diâmetro e massa fresca dos frutos e dos pirênios e para o rendimento em polpa (GRAF.1, 2 e 3).



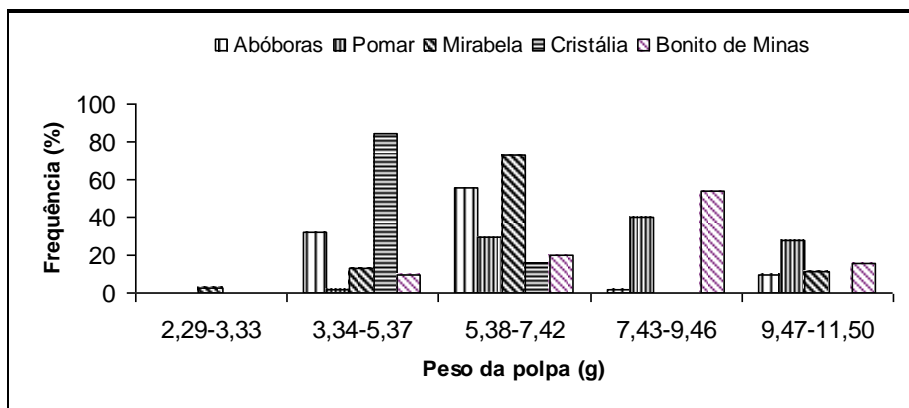
**GRÁFICO 1** - Distribuição de frequência em relação: (a) ao comprimento, (b) ao diâmetro e (c) à massa fresca dos frutos de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais

Fonte: Da autora.



**GRÁFICO 2** - Distribuição de frequência em relação: (a) ao comprimento, (b) ao diâmetro e (c) à massa fresca dos pirênios de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais

Fonte: Da autora.



**GRÁFICO 3** - Distribuição de frequência em relação ao peso da polpa dos frutos provenientes de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais

Fonte: Da autora.

O comprimento dos frutos variou de 22,72 a 32,67 mm (GRAF. 1) sendo que as classes mais representativas foram observadas para a população de Bonito de Minas com uma frequência de 48% dos frutos de comprimento entre 28,30 e 30,48mm. As menores classes para essa característica foram observadas para a população de Abóboras com frequência de 48% dos frutos de comprimento entre 23,93mm e 26,10mm.

O diâmetro dos frutos variou de 15,78 a 31,02 mm (GRAF. 1) e a população do Pomar foi a que apresentou os frutos de maiores diâmetros, com uma frequência de 48% entre as classes de 24,53 e 27,77 mm, enquanto que a população de Cristália apresentou os frutos de menores diâmetros, com uma frequência de 94% entre 18,04 e 21,28 mm.

O peso dos frutos variou de 3,55 a 13,01 g (GRAF. 1) sendo que a população de Bonito de Minas apresentou os frutos mais pesados, com uma frequência de 42% entre as classes de 8,83 e 10,91g e de Cristália apresentou os de menor peso, sendo 84% entre as classes de 4,65 e 6,73 g.

Em relação às características avaliadas nos pirênios, observou-se que o peso variou de 16,74 a 24,89 mm (GRAF. 2) e as classes mais representativas foram verificadas para a população de Bonito de Minas, com frequência de 54% entre as classes de 21,24 e 23,06mm, e as menores para os pirênios da população de Abóboras, com frequência de 54% entre as

classes de 17,59 e 19,41 mm. Quanto ao diâmetro, não houve muita variação, uma vez que todas as populações apresentaram maiores porcentagens desses entre as classes de 10,61 e 11,62 mm (GRAF. 2).

Já a massa fresca dos pirênios variou de 0,97 a 2,44 g (GRAF. 2) e a população de Bonito de Minas apresentou os mais pesados, com frequência de 70% desses compreendidos entre as classes de 1,47 e 1,95g, enquanto que a população de Cristália apresentou os pirênios de menor peso, com frequência de 88% entre as classes de 0,97 e 1,46g.

Em relação ao peso da polpa, foi observada uma variação de 2,29 a 11,50g (GRAF. 3), sendo que as classes mais representativas foram verificadas para os frutos das populações de Bonito de Minas, com frequência de 54% entre 7,43g e 9,46g. Já os frutos da população de Cristália apresentaram os menores valores para o peso da polpa, sendo 88% entre as classes de 0,97g e 1,46g. Em relação à população de Mirabela, essa apresentou valores intermediários para todas as características biométricas avaliadas.

Os dados obtidos nesta pesquisa mostraram que há uma variabilidade fenotípica considerável entre as populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) para as características biométricas avaliadas, como também foi constatado por Rivas e Barilani (2004) e Schwartz *et al.* (2010), para diferentes populações da palmeira *Butia odorata*.

Dentre as populações estudadas a de Bonito de Minas apresentou melhores resultados quanto ao comprimento, ao peso dos frutos e dos pirênios e á maior quantidade de polpa, enquanto a população de Cristália apresentou os piores resultados para essas características (TAB. 3). As diferenças fenotípicas observadas nessas duas populações podem está associadas à heterogeneidade das condições edafo-climáticas de cada local (temperatura, pluviosidade e nutrientes no solo) (TAB. 1 e 2), como também foi constatado para outras espécies do cerrado (LUZ *et al.*, 2011).

Em relação à população do Pomar, esperava-se que essa apresentasse pouca variação quanto às características avaliadas, pelo fato de ser uma população cultivada e estar submetida a uma maior homogeneidade de condições ambientais. Entretanto a variabilidade

fenotípica observada nessa população provavelmente teve uma grande contribuição do componente genotípico.

Observou-se, também, que as medidas de massa apresentaram uma maior variação entre as populações do que as medidas de tamanho (TAB. 3). Segundo Shakar e Synrem (2012), esse tipo de comportamento é comum em plantas oriundas de regiões distintas, evidenciando que a massa possui uma maior variação e é controlada pelas condições ambientais, enquanto que as dimensões são menos variáveis e são controladas geneticamente.

Em relação às sementes, também verificaram-se diferenças entre populações de coquinho-azedo para as características biométricas avaliadas, sendo que a população de Bonito de Minas destacou-se, por apresentar sementes de maior comprimento e massa fresca (TAB. 4). Esse resultado corrobora com alguns trabalhos no qual também foram observadas diferenças nas características morfológicas das sementes de uma mesma espécie oriundas de regiões distintas (FOGLIATTO *et al.*, 2011; SHANKAR e SYNREN, 2012; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2012).

**TABELA 4**

Características biométricas das sementes de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*), no norte de Minas Gerais

Populações	Comprimento das sementes (mm)	Diâmetro das sementes (mm)	Peso das sementes (g)
Bonito de Minas	14,56 ± 0,88 a	6,92 ± 0,59 a	0,36 ± 0,05 a
Pomar	13,03 ± 0,69 b	6,22 ± 0,50 c	0,29 ± 0,03 b
Abóboras	12,49 ± 1,25 bc	6,79 ± 0,55 a	0,28 ± 0,04 bc
Mirabela	12,88 ± 1,02 bc	6,71 ± 0,50 ab	0,30 ± 0,05 b
Cristália	12,34 ± 0,50 c	6,40 ± 0,48 bc	0,26 ± 0,04 c
DMS	0,8250	0,2822	0,2161
CV (%)	6,95	8,04	15,48

Notas: CV (%) = Coeficiente de Variação

DMS= Diferença Mínima Significativa

As médias seguidas de letras iguais nas colunas não se diferem significativamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Da autora.

Observou-se, também, uma maior variabilidade entre populações para o diâmetro e a massa das sementes (TAB. 4), o que pode ter sido



influenciado pelas diferentes condições ambientais de cada local. De acordo com Marcos Filho (2005), a influência do ambiente sobre o desenvolvimento da semente reflete nas variações de tamanho, no peso, na qualidade fisiológica e na sanidade.

Quanto aos embriões, também observaram-se diferenças entre populações para as características biométricas avaliadas (TAB 5). A população de Abóboras foi a que apresentou menores médias para o comprimento do embrião e de suas partes, diferindo estatisticamente das demais populações. Os embriões provenientes das sementes da população de Abóboras e do Pomar apresentaram valores médios maiores para o DH (diâmetro do haustório), e a característica que mais variou entre as populações foi o CH (comprimento do haustório) (TAB. 5).

**TABELA 5**

Valores médios das características biométricas CTE (comprimento total do embrião), CPC (comprimento do pecíolo cotiledonar), CH (comprimento do haustório) e DH (diâmetro do haustório) avaliadas nos embriões de coquinho-azedo (*Butia capitata*) provenientes das sementes de cinco populações no norte de Minas Gerais

<b>Populações</b>	<b>CTE (mm)</b>	<b>CPC (mm)</b>	<b>CH (mm)</b>	<b>DH (mm)</b>
Pomar	3,49 ± 0,26 a	1,92 ± 0,16 a	1,64 ± 0,19 a	0,88 ± 0,10 a
Bonito de				
Minas	3,39 ± 0,36 a	1,80 ± 0,21 ab	1,63 ± 0,22 a	0,80 ± 0,10 b
Mirabela	3,38 ± 0,42 a	1,82 ± 0,22 ab	1,62 ± 0,23 a	0,80 ± 0,09 b
Cristália	3,30 ± 0,31 a	1,78 ± 0,17 b	1,57 ± 0,21 a	0,85 ± 0,10 ab
Abóboras	3,02 ± 0,30 b	1,63 ± 0,18 c	1,43 ± 0,19 b	0,87 ± 0,10 a
DMS	0,1137	0,0377	0,0442	0,0104
CV (%)	10,17	10,86	13,33	12,10

Notas: CV (%) = Coeficiente de Variação

DMS= Diferença Mínima Significativa

As médias seguidas de letras iguais nas colunas não se diferem significativamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Da autora.

### 3.3 Variabilidade na germinação e no vigor de plântulas

Os resultados obtidos no cultivo *in vitro* mostraram variabilidade entre populações para a germinação e o vigor de plântulas. A população de Bonito

de Minas apresentou maior porcentagem média de embriões germinados e de raiz e bainha primária, diferindo-se estatisticamente das populações de Abóboras e de Mirabela, as quais apresentaram menores valores para essas características (TAB. 6).

**TABELA 6**

Valores médios das porcentagens de germinação, de raiz primária e de bainha primária dos embriões de coquinho-azedo (*B. capitata*) provenientes das sementes de cinco populações no norte de Minas Gerais

<b>Populações</b>	<b>Germinação</b>	<b>Raiz Primária</b>	<b>Bainha Primária</b>
Bonito de Minas	88,00a	61,40a	67,54a
Pomar	85,00ab	50,00ab	66,50a
Cristália	82,50ab	51,50ab	51,50ab
Abóboras	70,00b	37,77b	45,50b
Mirabela	69,44b	37,50b	42,22b
CV (%)	24,06	41,48	35,75

Notas: CV (%) = Coeficiente de Variação

As médias seguidas de letras iguais nas colunas não se diferem significativamente entre si, pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

Fonte: Da autora.

A capacidade germinativa de uma espécie pode variar entre e dentro de populações e entre e dentro de indivíduos devido a fatores maternos e ou ambientais. O controle genético da germinação tem sido constatado na literatura para diversas espécies (FOGLIATTO *et al.*, 2010; LOHA *et al.*, 2006; LOHA *et al.* 2008; MANO *et al.*, 2006), como também para algumas palmeiras (MARTINS-CORDER; SALDANHA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2009) evidenciando que a seleção de genótipos superiores podem aumentar consideravelmente a capacidade germinativa e o vigor de plântulas.

Outro fator que pode influenciar na germinação e no vigor de plântulas em palmeiras é a morfologia da semente (LEDO *et al.*, 2002; MARTINS *et al.*, 2000). Assim o melhor desempenho na germinação dos embriões provenientes da população de Bonito de Minas pode estar associado a uma maior dimensão e massa das sementes, que por sua vez, possuem embriões mais desenvolvidos e com uma maior quantidade de reservas energéticas (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

### 3.4 Análise genética

As estimativas dos componentes de variância demonstraram que as variâncias fenotípicas e genotípicas foram próximas umas das outras, principalmente para o comprimento, o diâmetro e a massa das sementes e para o comprimento do embrião e de suas partes. Já os valores da variância ambiental foram relativamente menores do que os valores obtidos para a variância genotípica em todas as características, exceto para o diâmetro do pecíolo cotiledonar (TAB. 7).

Os coeficientes de variação fenotípica e genotípica também foram próximos um do outro para todas as características avaliadas, mas o peso das sementes, a germinação e a presença de raízes e bainhas primárias apresentaram maior CVF e CVG do que as outras variáveis. As estimativas de herdabilidade variaram de 55,31% (raiz primária) a 99,87 (peso da semente) (TAB. 7).

**TABELA 7**

Estimativas de componentes de variância ( $V_f$ ,  $V_g$  e  $V_a$  = variância fenotípica, genotípica e ambiental, respectivamente), coeficientes de variação fenotípica (CVF), genotípica (CVG) e herdabilidade ( $H_a^2$ ) no sentido amplo para características da semente, embrião e germinação *in vitro* de coquinho-azedo (*Butia capitata*)

<b>Características</b>	<b><math>V_f</math></b>	<b><math>V_g</math></b>	<b><math>V_a</math></b>	<b>CVF</b>	<b>CVG</b>	<b><math>H_a^2</math></b>
Comprimento da semente	1,3792	1,3499	0,0293	8,9857	8,89	97,87
Diâmetro da semente	0,2899	0,2703	0,0197	8,1519	7,87	93,21
Massa da Semente	0,0031	0,0030	0,0001	18,5951	18,36	97,87
Comprimento do embrião	0,1077	0,0974	0,0103	9,9009	9,41	90,43
Comprimento do pecíolo	0,0315	0,0266	0,0049	9,9236	9,12	84,38
Comprimento do haustório	0,0300	0,0266	0,0066	10,9832	9,12	84,38
Diâmetro do pecíolo	0,0037	0,0021	0,0016	6,9288	5,23	56,88
Diâmetro do haustório	0,0059	0,0041	0,0018	9,0955	7,61	69,68
Germinação	0,0253	0,0156	0,0097	16,8193	13,21	61,53
Raiz primária	0,0363	0,0201	0,0162	27,9732	20,80	55,31
Bainha primária	0,0353	0,0209	0,0144	25,0504	19,27	59,18

Fonte: Da autora.

A ocorrência do coquinho-azedo (*B. capitata*) em regiões com condições edafo-climáticas heterogêneas e a inexistência de fluxo genético entre as populações, em função da distância entre elas, dos impedimentos físicos e da própria distribuição agregada da espécie, pode refletir nas diferenças entre populações com relação às características da semente, do embrião, da germinação e do vigor de plântulas. Para estas características, os resultados obtidos mostraram que o componente genotípico é o principal responsável pela variação fenotípica entre as populações. Isso corrobora com alguns trabalhos que descrevem o controle genético do tamanho e do peso das sementes dentro de uma mesma espécie oriunda de diferentes procedências (AHMED *et al.*, 2011; MUNTHALI *et al.*, 2012; SHANKAR; SYNREM, 2012), além da capacidade germinativa e do vigor de plântulas (FOGLIATTO *et al.*, 2011; LOHA *et al.*, 2008). Quanto aos embriões, poucos estudos investigam sua variabilidade fenotípica. Entretanto, os resultados na presente pesquisa evidenciam que as suas dimensões também são muito influenciadas pelo componente genotípico, especialmente as medidas de comprimento.

### 3.5 Análise de componentes principais

Na análise de componentes principais (ACP), observou-se que a porcentagem acumulativa de contribuição da variância dos três primeiros componentes principais (CPs) foi de 85,46%, sendo que o CP1 representou 39,70% da variância; o CP2 explicou 23,58% da variância total e o CP3, 22,18%. O comprimento total do embrião (0,912), o comprimento do pecíolo cotiledonar (0,835) e o comprimento do haustório (0,898) tiveram elevada carga positiva no primeiro componente. No segundo componente, o peso da semente (0,713) e no terceiro o diâmetro do pecíolo cotiledonar (0,864) (TAB. 8).

**TABELA 8**

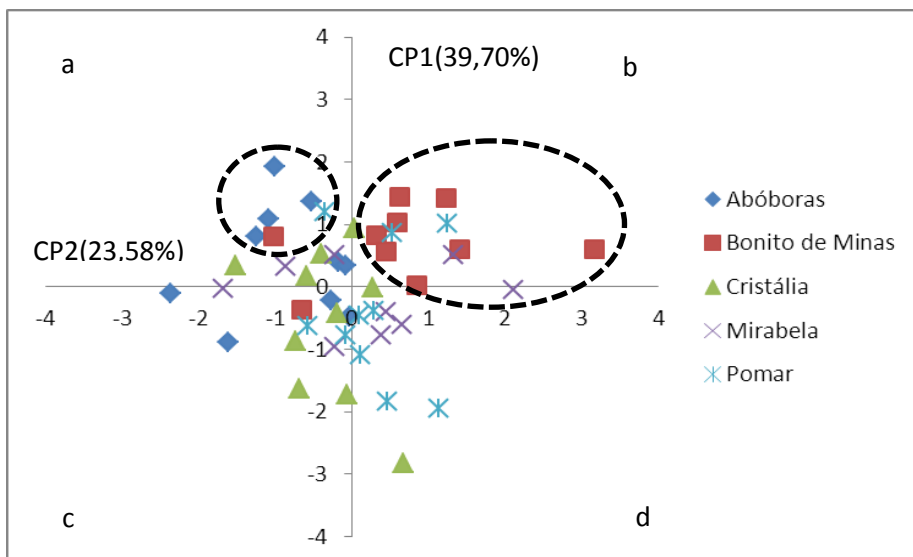
Autovalores da variância e proporção da variação dos três primeiros eixos da Análise de componentes principais (ACPs) de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais

<b>Eixos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
Autovalores da variância	3,18	1,89	1,77
Proporção da variação			
Individual (%)	39,7	23,58	22,18
Acumulativa (%)	39,7	63,28	85,46
	CTE (0,912)	MS (0,713)	DPC (0,864)
	CPC (0,835)		
	CH (0,898)		

Notas: CTE: comprimento total do embrião; CPC: comprimento do pecíolo cotiledonar; CH : comprimento do haustório; DPC: diâmetro do pecíolo cotiledonar e MS: massa da semente

Fonte: Da autora.

A análise dos CPs em duas dimensões, CP1 e CP2, é a que melhor indica a distribuição de cada população (GRAF. 4). No CP1, as plantas da população de Bonito de Minas mostram um deslocamento em uma direção positiva (quadrante b), enquanto que as plantas da população de Abóboras na direção negativa (quadrante a). As demais populações se encontram dispersas no gráfico sem formar agrupamentos nítidos. Portanto, o comprimento do embrião e de suas partes, além da massa da semente, podem contribuir para discriminar populações de coquinho-azedo (*B. capitata*).



**GRÁFICO 4** - Componentes principais CP1 (39,7%) e CP2 (23,58%) de cinco populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) no norte de Minas Gerais

Fonte: Da autora.

#### 4 CONCLUSÃO

Há variabilidade considerável entre populações de coquinho-azedo (*Butia capitata*) para as características biométricas avaliadas nos frutos, nos pirênios e nas sementes, bem como para a germinação e o vigor de plântulas.

A variabilidade genotípica é a principal responsável pela variabilidade fenotípica para as características da semente, embrião, germinação e vigor de plântulas entre as populações de coquinho-azedo (*B. capitata*).

As dimensões do embrião e o peso da semente são as principais características que discriminam as populações.

### CAPÍTULO 3 - UM NOVO MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENDO- $\beta$ -MANANASE EM SEMENTES

#### RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi obter um novo método espectrofotométrico mais eficiente, de elevada sensibilidade, baixo custo e de fácil execução, para determinar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes. O método espectrofotométrico otimizado foi aplicado em amostras de coquinho-azedo (*Butia capitata*), para determinar a localização da atividade da enzima em diferentes partes das sementes. O método consiste em extrair a enzima da semente e utilizá-la para hidrolisar o galactomanano Locust Bean Gum. Os açúcares redutores formados são submetidos a uma reação com a hidrazida ácida p-hidroxibenzóico e quantificados por espectrofotometria na região do visível. O método apresentou baixos limites de quantificação para o açúcar redutor formado e para a atividade enzimática da mananase, com os respectivos valores de 6 $\mu$ g de manose e 1000  $\mu$ U (pico mol de açúcar redutor formado por unidade de tempo). O coeficiente de variação entre as repetições foi satisfatório, com valores inferiores a 10%. Apenas 5 mg de sementes em germinação são necessárias para executar o método. Sementes de coquinho-azedo (*B. capitata*) sem opérculo apresentaram atividade enzimática superior às sementes com o opérculo e, em ambas, a maior atividade enzimática foi detectada na região adjacente ao embrião.

**Palavras-chave:** Germinação. Galactomanano. Açúcar redutor.



### CHAPTER 3 - A NEW SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF THE ACTIVITY OF ENDO- $\beta$ -MANNANASE ON SEEDS

#### ABSTRACT

The objective of this research was getting a new spectrophotometric method more efficient, from low costs and easy execution, to determine the enzymatic activity of the endo- $\beta$ -mannanase in seeds. The optimized spectrophotometric method was applied in samples of coquinho-azedo (*Butia capitata*) to determine the location of enzyme activity in different parts of the seeds. The method consists in extracting the seed enzyme and using it to hydrolyze the galactomannan Locust Bean Gum. The reducing sugars formed are subjected to a reaction with the p-hydroxybenzoic acid hydrazide and quantified by spectrophotometry in the visible region. The method presented low limits of quantification for the reducing sugar formed and for the enzymatic activity of mannanase with the respective values of 6 $\mu$ g of mannose and 1000  $\mu$ U (peak mol of reducing sugar formed per time unit). The coefficient of variation among replicates was satisfactory, with values below 10%. Only 5 mg of seeds in germinating are needed to perform the method. Seeds from *Butia Capitata* without operculum presented upper enzymatic activity to the seeds with the operculum, and in both of them, the higher enzyme activity was detected in the adjacent region to the embryo.

**Keywords:** Germination. Galactomannan. Reducing sugar.

## 1 INTRODUÇÃO

A dificuldade de germinação em sementes pode estar relacionada, dentre outros fatores, à composição química da parede celular. O endosperma das sementes de algumas espécies, como *Coffea arabica*, *Phoenix dactilifera*, *Annona crassiflora*, *Arabidopsis thaliana*, possuem paredes celulares espessas, constituídas por carboidratos insolúveis na forma de galactomananos, que agem como uma barreira física ao crescimento do embrião, dificultando a protrusão da radícula (DA SILVA *et al.*, 2007; DA SILVA *et al.*, 2004; GONG *et al.*, 2005;; IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

Durante o processo de germinação, os galactomananos presentes nas paredes celulares das sementes são hidrolisados pela enzima endo- $\beta$ -mananase. Essa enzima atua especificamente na hidrólise das ligações  $\beta 1 \rightarrow 4$  do galactomanano presente nas paredes celulares da semente (IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). A síntese dessa enzima ocorre especialmente durante o período de germinação (IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010), processo de crescimento ou senescência da semente (SCHRODER *et al.*, 2009).

A atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes tem sido determinada pelo método modificado Somogyi–Nelson (KLYOSOV, 2012; NELSON, 1942; SOMOGYI, 1954) e pelo método DNS (dinitrosalicílico) de Miller (KATROLIA *et al.*, 2012; MILLER, 1959). Entretanto componentes endógenos presentes nas amostras (glicose, frutose, manose, etc.) têm apresentado interferência nos resultados.

Atualmente, o principal método utilizado para determinar a atividade da mananase é por difusão em gel, em que se utiliza o galactomanano *Locust Bean Gum* (LBG) como substrato (DA SILVA *et al.*, 2004; DOWNIE *et al.*, 1994). O LBG apresenta uma razão de unidades de monossacarídeos manose: galactose de 4:1, e a enzima endo- $\beta$ -mananase hidrolisa apenas as ligações glicosídicas envolvendo a manose, formando os oligossacarídeos redutores manotetrose, manotriose e manobiose como produtos de hidrólise (BLIBECH *et al.*, 2011). Entretanto esse método é laborioso e requer

quantidade expressiva de amostra de sementes para extrair a endo- $\beta$ -mananase e hidrolisar o padrão de LBG (DINIZ *et al.*, 2009). Isso dificulta o estudo de estruturas das sementes que possuem pequenas massas, como embrião e tegumento opercular.

Outro método que também tem sido utilizado para determinar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase baseia-se na análise espectrofotométrica (IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2009). Esse método consiste em extrair a enzima da semente e colocá-la em contato com o polissacarídeo sintético AZCL-galactomanano, que possui grupos carboxilatos, zircônio e amônio ligados à estrutura do galactomanano, formando um composto colorido. A hidrólise do substrato sintético diminui a absorbância em 590 nm e, assim, determina-se a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase.

Porém, esse método apresenta limitações, uma relacionada ao elevado custo do padrão de AZCL-galactomanano e a outra a forma de determinar a atividade enzimática. O uso dessa técnica é baseada na quantidade de enzima necessária para produzir 1  $\mu$ mol de açúcar redutor equivalente a D-manose por unidade de tempo, em condições experimentais estabelecidas, utilizando-se, para isso, dados obtidos a partir da hidrólise do LBG por padrão de mananase e quantificados pelo método espectrofotométrico, proposto por Lever (1972). Nesse sentido, usam-se dois substratos diferentes: AZCL-galactomanano e o *Locust Bean Gum* (LBG), o que pode gerar atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase diferente, comprometendo a eficácia do método.

Portanto, objetivou-se, com esta pesquisa obter um novo método espectrofotométrico eficiente, de baixo custo, elevada sensibilidade e de fácil execução para determinar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes. Com o método espectrofotométrico otimizado, determinou-se a localização da atividade enzimática em diferentes partes das sementes de coquinho-azedo (*Butia capitata*).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Solução padrão

Solução padrão do galactomanano *Locust bean gum* (LBG) 0,25 % (m/v), obtido da Sigma (EUA), foi preparada em solução tampão acetato de sódio  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  com pH 4,7. Solução padrão de hidrazida de ácido p-hidroxibenzóico (HAPHB) (Sigma, EUA) a 5 % (m/v) foi preparada em meio ácido (HCl  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ) e diluída, somente no momento da análise, para 0,5 % (m/v) em meio básico (NaOH  $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ ). Soluções padrão de endo- $\beta$ -mananase (Megazyme, Irlanda) foram preparadas a partir da diluição do padrão da enzima a 500 U de atividade enzimática em suspensão de sulfato de amônio. Já a solução padrão do monossacarídeo D-manose (Sigma, EUA) em diferentes concentrações foi preparada em água destilada.

### 2.2 Obtenção da semente

Frutos de coquinho-azedo (*Butia capitata*) foram obtidos de um pomar experimental ( $16^{\circ} 40' 53,8'' / 43^{\circ} 50' 22,7''$ ), localizado no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros - MG. Os frutos foram despulpados em liquidificador de baixa rotação e, em seguida, os pirênios (endocarpo + semente) foram colocados para secar à sombra. As sementes foram obtidas a partir da remoção do endocarpo, com o auxílio de um torno manual de bancada.

### 2.3 Teste de germinação

Para o teste de germinação foram utilizadas 200 sementes, as quais inicialmente foram desinfetadas, por meio de imersão em álcool 70% (v/v) por um minuto, seguida de tríplice lavagem em água destilada. Posteriormente, foram imersas em solução de hipoclorito de sódio 6% (m/v) por 15 minutos, seguida de tríplice lavagem em água destilada. Após a

desinfecção, retirou-se o tegumento opercular de metade das sementes, com o auxílio de um estilete (FIOR *et al.*, 2011).

Sementes com opérculo e sem opérculo foram colocadas em caixas gerbox contendo substrato areia umedecida com 60% da sua capacidade de campo. As amostras foram mantidas em câmara de germinação a 25 °C, durante 11 dias. As sementes foram consideradas germinadas quando se observou o alongamento de 2mm do pecíolo cotiledonar do embrião (FIOR *et al.*, 2011).

#### 2.4 Equipamentos

As amostras foram homogeneizadas em vortex AP-56 (Phoenix, Brasil) e uma centrífuga (Vision Scientific, Coréia) foi utilizada na etapa de extração da enzima. O banho-maria agitador com movimento recíproco Dubnoff modelo 304 ID (Tecnal, Brasil) foi utilizado na hidrólise enzimática do galactomanano. Um espectrofotômetro (Agilent Cary 60 Uv/Visível, Austrália) foi utilizado para quantificação do açúcar redutor.

#### 2.5 Quantificação de açúcar redutor

Para determinar a quantidade de açúcar redutor, soluções padrão de manose foram preparadas nas concentrações de 10; 15; 20; 25; 30; 35; 40; 50 e 60 mg mL<sup>-1</sup> em água destilada. Em tubo de ensaio, 600 µL de cada solução foram misturados com 3 mL de solução de HAPHB 0,5 % (m/v) em meio básico e aquecido a 95 °C em banho-maria por 5 min. As amostras foram resfriadas e imediatamente foi realizada a leitura no espectrofotômetro UV-Visível. Os ensaios foram realizados em triplicata. Uma curva analítica foi obtida pela regressão linear dos dados de absorbância versus concentração de açúcar redutor.

## 2.6 Atividade enzimática do padrão de endo- $\beta$ -mananase

Em seis tubos de ensaio, foram colocados 900  $\mu\text{L}$  de solução de LBG a 0,25 % (m/v). Em cada um dos tubos, foram adicionados 225  $\mu\text{L}$  de solução padrão da enzima mananase, com as seguintes atividades enzimáticas: 1000, 3000, 5000, 7000, 9000 e 11000  $\mu\text{U}$  (pmol de açúcar redutor por minuto). Os tubos foram incubados a 40 °C, em banho-maria, com agitação por 3 horas. 600  $\mu\text{L}$  do hidrolisado foram misturados com 3 mL de solução de HAPHB 0,5 % (m/v) em meio básico em tubos de ensaio e aquecidos a 95 °C, em banho-maria, por 5 minutos. As amostras foram resfriadas e, imediatamente, foi realizada a leitura no espectrofotômetro UV-Visível. Os ensaios foram realizados em triplicata. Uma curva analítica foi obtida pela regressão linear dos dados absorbância versus atividade enzimática da mananase.

## 2.7 Otimização do método da atividade enzimática

O método para a determinação da atividade da mananase foi baseado em trabalhos anteriores (IGLESIAS-FERNÁNDEZ; MATILLA, 2009; IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010). Experimentos preliminares foram conduzidos para otimizar os principais fatores que afetam a determinação da atividade enzimática na etapa de extração da endo- $\beta$ -mananase da semente, na hidrólise enzimática do padrão de galactomanano e na quantificação dos açúcares redutores formados.

Amostras do endosperma da semente de coquinho-azedo (*B. capitata*) foram transferidas para cápsulas de porcelana e maceradas. Diferentes massas das amostras (TAB. 1) foram medidas em balança analítica de precisão 0,0001g, em tubos eppendorf, em triplicata e homogeneizadas com uma alíquota de solução tampão de acetato de sódio 1 mol L<sup>-1</sup> com pH 4,7 (TAB. 1). Os frascos foram homogeneizados em vortex por um minuto e centrifugados a 16000 g e 4°C por 45 minutos, para extração da enzima.

Em seguida, 225  $\mu\text{L}$  do extrato da endo- $\beta$ -mananase obtido foram misturados com 900  $\mu\text{L}$  do galactomanano LBG a 0,25 % (m/v) em tubos de

ensaio. As amostras foram incubadas em banho-maria com agitação e temperaturas controladas (TAB. 9), por três horas para a hidrólise do galactomanano. O mesmo procedimento foi realizado adicionando-se o extrato da enzima em solução tampão acetato de sódio (pH 4,7), sem adição de LBG, para ser utilizado como branco da amostra.

Uma alíquota dos hidrolisados (TAB. 1) com LBG e sem LBG, foi misturada com 3 mL de solução de HAPHB 0,5 % (m/v) em meio básico em tubo de ensaio. O tubo foi aquecido a 95 °C em banho-maria por determinado período de tempo (TAB. 1). A amostra foi resfriada e, em seguida, foi realizada a leitura no espectrofotômetro UV-Visível.

**TABELA 1**  
Parâmetros de otimização do método da atividade enzimática

Variáveis	Níveis
Massa do endosperma (mg)	5,0;15,0;100,0
Volume tampão acetato de sódio 1 mol L <sup>-1</sup> (μL)	300, 450, 600, 1200
Temperatura do banho-maria (°C)	28, 40, 50, 60, 70
Volume do hidrolisado (μL)	100, 200, 225, 450, 600
Tempo de aquecimento em banho-maria (min)	1, 2, 3, 4, 5

Fonte: Da autora.

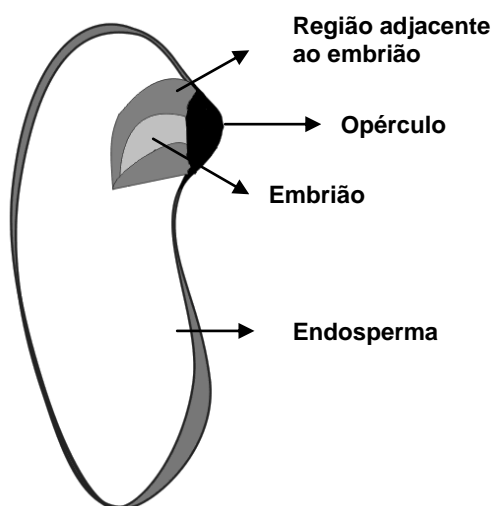
## 2.8 Validação do método

O método otimizado foi validado em relação às principais figuras de mérito: seletividade, limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão e exatidão, conforme sugerido pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade (2007). Os dados foram submetidos à análise estatística descritiva, calculando-se o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV).

## 2.9 Localização da atividade enzimática em sementes de coquinho-azedo (*Butia capitata*)

O método otimizado e validado foi aplicado em diferentes partes da semente de coquinho-azedo após 11 dias de germinação (FIG. 1). Para

assegurar a faixa de linearidade de resposta do espectrofotômetro, a massa de amostra otimizada foi reduzida para apenas 5 mg . A condição otimizada para análises no endosperma foi aplicada de forma idêntica nas outras partes.



**FIGURA 1** - Esquema de um corte longitudinal da semente de coquinho-azedo (*Butia capitata*) mostrando a localização das quatro partes utilizadas para o estudo da atividade da endo- $\beta$ -mananase

Nota: Feito para este trabalho por Juliana Mendes (aluna do curso de Engenharia de Alimentos no Instituto de Ciências Agrárias-UFMG)

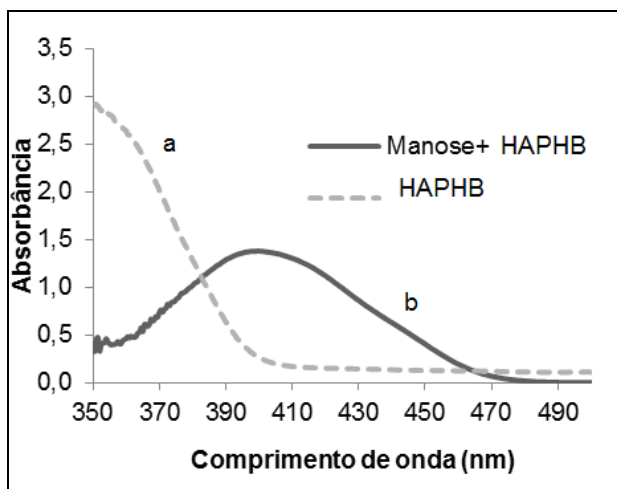
Fonte: COREL CORPORATION, 2004.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Análise espectrofotométrica

O método proposto visa a extrair a endo- $\beta$ -mananase da semente de coquinho-azedo (*B.capitata*) e utilizá-la na hidrólise do padrão de galactomanano LBG. O hidrolisado formado é composto por açúcares redutores que, ao reagirem com HAPHB, formam compostos de coloração amarela, que podem ser quantificados por espectrofotometria na região do visível. O comprimento de onda de máxima absorbância de 398 nm foi determinado a partir da reação entre D-manose e HAPHB (GRAF. 1).



**GRÁFICO 1** – Espectro de absorção na região do visível: a) solução padrão de HAPHB utilizando como branco água destilada, b) produto formado a partir da reação da D-manose com HAPHB utilizando como branco solução de HAPHB

Nota: Feito para este trabalho pela Juliana Mendes (aluna do curso de Engenharia de Alimentos no Instituto de Ciências Agrárias-UFMG) utilizando-se Excel.

Fonte: Da autora.

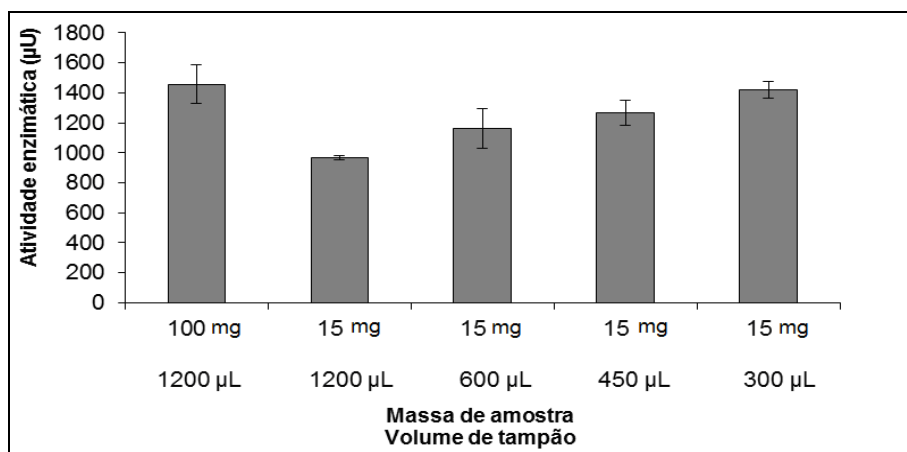
A reação entre o açúcar redutor manose e o reagente HAPHB mostrou-se linear na faixa de concentração 10,0 a 60,0 mL<sup>-1</sup>, cujos dados da calibração obtidos nas análises espectrofotométricas foram  $y = 0,016x - 0,029$ , com coeficiente de determinação 0,99. Para determinar a atividade

enzimática da endo- $\beta$ -mananase, a solução padrão (500 U) foi significativamente diluída para uma faixa de 3000 a 11000  $\mu$ U, para obter linearidade de resposta nas análises espectrofotométrica (398 nm). Os dados de calibração foram  $y = 0,0002x - 0,0993$ , com coeficiente de determinação superior a 0,99.

### 3.2 Otimização do método da atividade enzimática

Os métodos na literatura têm utilizado massas elevadas de amostra (50 a 300 mg) para estudar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes (DA SILVA *et al.*, 2004; IGLESIAS-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010), dificultando investigar a atividade desta enzima em estruturas com pequenas massas como, por exemplo, opérculo ( $\pm 0,45$  mg) e embrião ( $\pm 1,17$  mg) em sementes de coquinho-azedo. Além disso, os métodos são laboriosos e com interferência significativa nos resultados pelos próprios componentes endógenos das sementes. Dessa forma, para eliminar esses interferentes da matriz, amostras de sementes também são utilizadas como branco no desenvolvimento do método.

O endosperma foi utilizado na etapa de otimização do método por constituir a maior porção da semente. Os resultados mostraram que a massa de 100 mg de endosperma favoreceu a formação de maior quantidade de açúcar redutor em relação a massa de 15 mg (GRAF. 2). Isso ocorre porque a quantidade de enzima extraída por 1200  $\mu$ L de solução tampão de acetato de sódio (pH 4,7) é maior nas mesmas condições de análises.



**GRÁFICO 2** - Massa de endosperma utilizada e o respectivo volume de extrator (solução tampão de acetato de sódio 1 mol L<sup>-1</sup>)

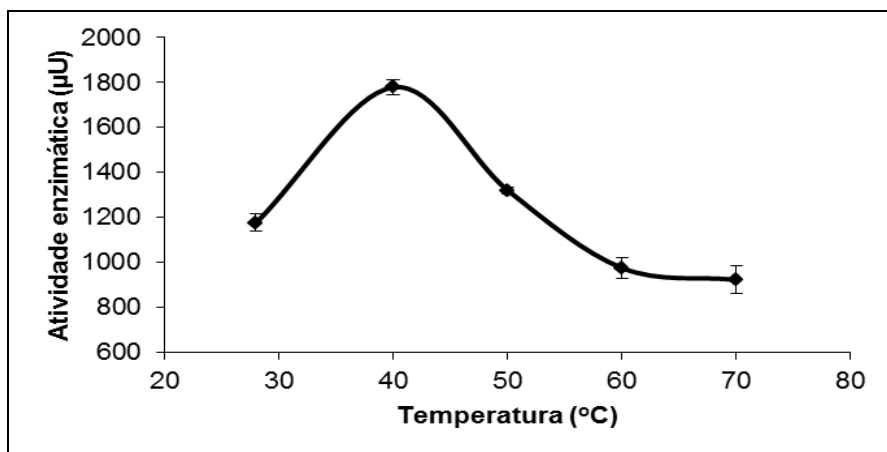
Nota: Feito para este trabalho pela Juliana Mendes (aluna do curso de Engenharia de Alimentos no Instituto de Ciências Agrárias-UFMG) utilizando-se Excel

Fonte: Da autora.

Entretanto observou-se também que atividade enzimática semelhante é obtida quando se utilizam 15 mg de amostra e apenas 300 µL de solução tampão acetato de sódio 1 mol L<sup>-1</sup> (pH 4,7). Nessas condições, provavelmente, a concentração da enzima é semelhante ao extrato obtido com 100 mg de amostra e 1200 µL de extrator. Porém, esse volume de 300 µL de extrato dificulta a retirada da alíquota após a centrifugação, pois partículas da semente também são pipetadas, prejudicando a leitura no espectrofotômetro em etapas posteriores. Assim, o volume de 350 µL de solução tampão de acetato de sódio foi utilizado com resultados satisfatórios. Entretanto com apenas 5 mg de amostras de endosperma, fora do período de germinação, não foi possível determinar a atividade enzimática.

Trabalhos anteriores têm mostrado que a atividade enzimática é maior em valores de pH próximos a 4, por isso foi utilizada a solução tampão de pH 4,7 (BLIBECH *et al.*, 2011; IGLESIAS-FERNÁNDES *et al.*, 2010). Além do pH, a atividade enzimática da mananase também é dependente da temperatura de hidrólise e do tempo de aquecimento. Fixando o tempo de hidrólise em 3 horas, resultados satisfatórios foram alcançados a 40 °C

(GRAF. 3). Resultados semelhantes foram encontrados por Blibech *et al.* (2011).

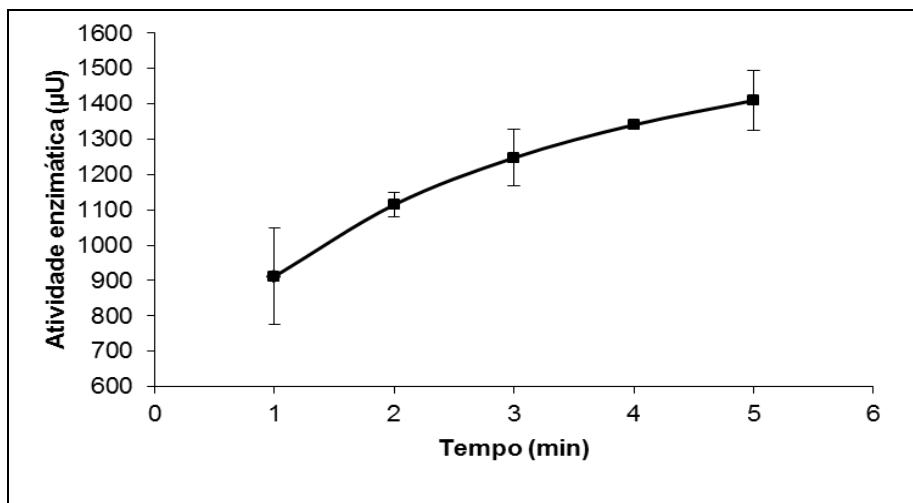


**GRÁFICO 3** - Efeito da temperatura na atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase presente em extrato de endosperma de coquinho azedo (*B. capitata*)

Nota: Feito para este trabalho pela Juliana Mendes (aluna do curso de Engenharia de Alimentos no Instituto de Ciências Agrárias-UFMG) utilizando-se Excel.

Fonte: Da autora.

Os açúcares redutores formados não reagem em condições ambiente com HAPHB em meio básico. Assim somente, em temperaturas elevadas (95 °C) é que são detectados os produtos de coloração amarela. Os resultados apresentados no GRAF. 4 mostram que 5 min de aquecimento são suficientes para assegurar a ocorrência da reação. Além disso, o aquecimento a 95 °C, nesse intervalo de tempo, também encerra a reação de hidrólise do galactomanano pela mananase (BLIBECH *et al.*, 2011).



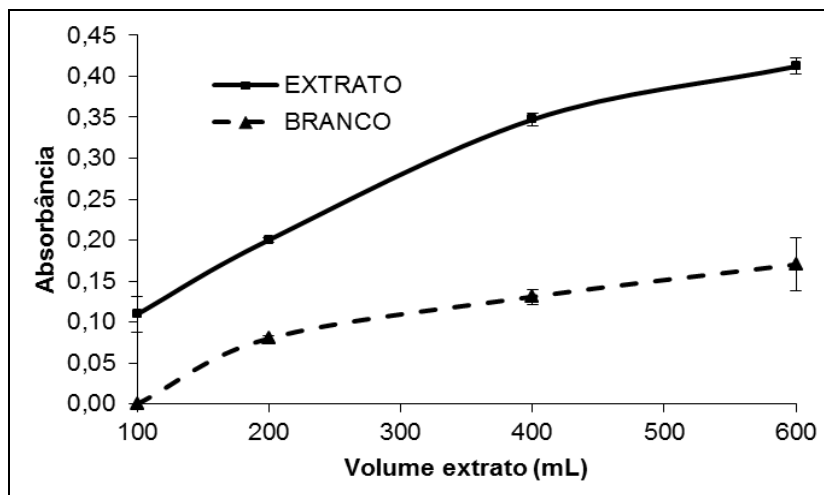
**GRÁFICO 4** - Avaliação do tempo de aquecimento necessário para a formação do produto colorido a partir da reação entre açúcares redutores e HAPHB

Nota: Feito para este trabalho pela Juliana Mendes (aluna do curso de Engenharia de Alimentos no Instituto de Ciências Agrárias-UFMG), utilizando-se Excel  
Fonte: Da autora.

Amostras do padrão de galactomanano também foram submetidas ao aquecimento com o HAPHB, para verificar a hidrólise do polissacarídeo em meio básico, levando à formação de açúcares redutores. No entanto verificou-se que nenhuma modificação ocorreu com o galactomanano com 5, 10 e 15 minutos de aquecimento a 100 °C. Esses resultados estão de acordo com o esperado, pois a ligação éter do acetal formado na ligação glicosídica não é clivada em meio básico. Nesse sentido, a hidrólise básica do galactomanano não interfere nos resultados.

Além do tempo de aquecimento, outro fator que aumenta a detecção do composto colorido na análise espectrofotométrica é a quantidade de hidrolisado que é submetido à reação com o HAPHB. Os resultados apresentados no GRAF. 5 mostram que a adição de volumes crescentes de hidrolisado aumenta a absorvância do produto formado. Observa-se também, na mesma ilustração que, a amostra de endosperma apresenta interferentes, pois compostos presentes naturalmente nos extratos da semente reagem com HAPHB, aumentando a absorvância do branco, à medida que aumenta o volume de extrato.

Trabalhos anteriores têm mostrado que monossacarídeos, como glicose, frutose, galactose, etc., ou dissacarídeos, como sacarose e maltose, potencialmente presentes na semente podem reagir com HAPHB, interferindo nos resultados (LEVER, 1972). Dessa forma, o extrato sem o padrão do galactomanano deve ser utilizado como branco nas análises espectrofotométricas.



**GRÁFICO 5** - Volume de extrato submetido à reação com HAPHB: ■ — extrato com produtos de hidrólise do LBG, ◆ - - - extrato com apenas componentes endógenos da matriz, sem LBG (branco)

Nota: Feito para este trabalho pela Juliana Mendes (aluna do curso de Engenharia de Alimentos no Instituto de Ciências Agrárias-UFMG) utilizando-se Excel

Fonte: Da autora.

### 3.3 Validação do método

A seletividade do método é obtida quando se eliminam todos os interferentes endógenos da matriz, utilizando-se um branco nas análises espectrofotométricas. O branco possui todos os compostos da amostra, exceto o substrato LBG.

Já o limite de quantificação foi considerado quando o extrato apresentou no mínimo 6  $\mu\text{g}$  de manose. Nessas condições, a absorbância

nas análises espectrofotométrica foram superiores a 0,1, correspondendo ao limite inferior de linearidade do aparelho. Resultado semelhante foi encontrado por Lever (1972), na quantificação de glicose, por reação com HAPHB e análise espectrofotométrica, que foi 0,1  $\mu\text{g}$ . O limite de quantificação de atividade enzimática foi considerado de 1000  $\mu\text{U}$  devido ao limite de linearidade do espectrofotômetro, semelhante ao caso da manose. Valores inferiores de atividade enzimática foram considerados apenas na detecção da presença da atividade da endo- $\beta$ -mananase na amostra.

A precisão do método foi avaliada em termos de repetitividade, dentro do mesmo dia. Sete repetições idênticas do método proposto foram realizadas e o coeficiente de variação (CV) das atividades enzimáticas foi inferior a 10 % (TAB. 2). Avaliou-se também a precisão intermediária, ou seja, em três dias diferentes (1, 7 e 30 dias) e também por um analista diferente. Os resultados estão apresentados na TAB. 2.

**TABELA 2**  
Precisão do método proposto em termos de repetitividade e de precisão intermediária

Precisão do método	Atividade enzimática $\mu\text{U}$
1 dia <sup>a</sup>	1831 (1,94%)
7 dias <sup>b</sup>	1656 (8,89%)
30 dias <sup>a</sup>	1239 (1,70%)
Analista diferente <sup>a</sup>	1575 (9,73%)

Notas: <sup>a</sup> três repetições; <sup>b</sup> sete repetições

Os dados expressos em porcentagem, entre parênteses, correspondem ao CV (Coeficiente de Variação)

Fonte: Da autora.

### 3.4 Localização da atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes de coquinho-azedo (*B. capitata*)

O método otimizado e validado foi aplicado em diferentes partes da semente de coquinho-azedo, colocadas para germinar com opérculo e sem o opérculo (TAB. 3). Para assegurar a faixa de linearidade de resposta do

espectrofotômetro, a massa de amostra otimizada foi reduzida para apenas 5 mg .

**TABELA 3**

Atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase, em diferentes partes das sementes de coquinho-azedo (*B. capitata*), após 11 dias de germinação

Semente	Atividade enzimática $\mu\text{U}$			
	Opérculo	Embrião	Região adjacente ao embrião	Endosperma
Com opérculo	1098 (16%)	661 (4,61%)	1387 (8,5%)	1339 (12,0%)
Sem opérculo	-	3918 (33,1%)	4541 (5,8%)	2619 (7,4%)

Nota: Os dados expressos em porcentagem, entre parênteses, correspondem ao CV (Coeficiente de Variação)

Fonte: Da autora.

Após 11 dias de germinação, foi detectada atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase nas sementes com e sem opérculo, em todas as partes estudadas. Nas sementes com o opérculo, o maior valor de atividade enzimática foi detectado na região adjacente ao embrião e o menor valor, no embrião (TAB. 3). Observou-se, também, que a atividade enzimática no opérculo foi maior do que a do embrião. Na semente de coquinho-azedo o opérculo funciona como uma barreira mecânica, tornando a germinação lenta e desuniforme (FIOR *et al.*, 2011). Assim, a detecção de uma maior atividade enzimática no opérculo, pode estar relacionada ao início do enfraquecimento dessa estrutura, para permitir o alongamento do embrião.

Nas sementes sem o opérculo, o maior valor de atividade enzimática também foi detectado na região adjacente ao embrião e o menor valor, no endosperma (TAB. 3). Observou-se que as sementes que tiveram o opérculo removido apresentaram elevados valores de atividade enzimática nas partes estudadas. Isso é explicado em função da remoção dessa estrutura que permite a superação da dormência da semente, levando a germinação e conseqüentemente a mobilização das reservas energéticas.



#### 4 CONCLUSÃO

O método desenvolvido mostrou-se simples, preciso, por utilizar análises espectrofotométricas e rápido, com tempo de análises inferiores a 8 horas. Também apresentou custo acessível, em função dos reagentes utilizados.

A principal vantagem do método é a utilização de apenas 5 mg de amostras para quantificar a atividade enzimática da endo- $\beta$ -mananase em sementes germinadas.

As sementes de coquinho-azedo (*Butia capitata*) germinadas sem o opérculo apresentam uma maior atividade enzimática em relação às germinadas com o opérculo. Diferenças nas atividades enzimáticas também foram detectadas entre o opérculo, endosperma, região adjacente ao embrião e embrião.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, M. O.; MENDONÇA, M. S. Morfo-anatomia da semente de *Euterpe precatoria* Mart. (Palmae). **Revista Brasileira de Sementes**, Pelotas, v. 25, n. 1, p. 37-42, jul., 2003.
- AHMED, M. V. O. M.; BOUNA, Z. E. O.; LEMINE, F. M. M.; DJEH, T. K. O.; MOKHTAR, T.; SALEM, A. O. M. Use of multivariate analysis to assess phenotypic diversity of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. **Scientia Horticulturae**, [S.l.], v. 127, p. 367-371, Jan. 2011
- ALONSO-BLANCO, C.; AARTS, M. G. M.; BENTSINK, L.; KEURENTJES, J. J. B.; REYMOND, M.; VREUGDENHIL, D.; KOORNNEEF, M. What has nature taught us about plant development, physiology, and adaptation?. **The Plant Cell**, [S.l.], v. 21, p. 1877-1896, July 2009.
- ALVES, M. R. P.; DEMATTE, C. **Palmeiras**: características botânicas e evolução. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 129 p.
- BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds**: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. San Diego: Academic Press, 1998. 666 p.
- BLIBECH, M.; CHAARI, F.; BHIRI, F.; DAMMAKA, L.; GHORBEL, R. E.; CHAABOUNI, S. E. Production of manno-oligosaccharides from locust bean gum using immobilized *Penicillium occitanis* mannanase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, [S.l.], v. 73, p. 111-115, Dec. 2011.
- BUI TEVELD, J.; VENDRAMIN, G. G.; LEONARDI, S.; KAMER, K.; GEBUREK, T. Genetic diversity and differentiation in European beech (*Fagus sylvatica* L) stands varying in management history. **Forest Ecology and Management**, [S.l.], v. 247, p. 98-106, Aug. 2007.
- CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes**: ciência, tecnologia e produção. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 588 p.
- COREL CORPORATION. CorelDraw. Versão 12. Canadá: Corel Corporation, 2004.
- CRUZ, C. D. **Programa Genes**: aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa: UFV, 1997. 442 p.
- CRUZ, E. D.; MARTINS, F. O.; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e sementes e germinação de jatobá-curuba (*Hymenaea intermedia* Ducke), Leguminosae – Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 161-165, jun. 2001.
- DA SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; VAN AELST, A. C.; HILHORST, H. W. Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap

weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. *Rubi*) seed germination. **Planta**, [S.I.], v. 220, n. 2, p. 251-261, 2004.

DA SILVA, E. A. A.; DE MELO, D. L. B.; DAVID, A. C.; DE BODE, N.; ABREU, G. B.; FARIA, J. M. R.; HILHORST, H. W. M. Germination ecophysiology of *Annona crassiflora* seeds. **Annals of Botany**, [S.I.], v. 99, p. 823-830, Feb. 2007.

DINIZ, K. A.; OLIVEIRA, J. A.; SILVA, P. A.; GUIMARÃES, R.M.; CARVALHO, M. L. M. Qualidade de sementes de alface enriquecidas com micronutrientes e reguladores de crescimento durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 1, p. 228-238, 2009.

DOWNIE, B.; HILHORST, H. W. M.; BEWLEY, J. D. A. A new assay for quantifying endo- $\beta$ -mannanase activity using Congo Red dye. **Phytochemistry**, [S.I.], v. 36, n.1, p. 829-835, 1994.

FARIA, J. P.; ALMEIDA, F.; DA SILVA, L. C. R.; VIEIRA, R. F.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Caracterização da polpa do coquinho-azedo (*Butia capitata* var *capitata*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 30, n. 3, p. 827-829, set. 2008.

FERNANDES, R. C. **Estudos propagativos do coquinho-azedo (*Butia capitata* (Mart.) Becc) Arecaceae**. 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 323 p.

FERREIRA JÚNIOR, O. GPS TrackMaker. Versão 13.8.517. Belo Horizonte: Geo Study Technology Ltda, 2012.

FIOR, C. S.; RODRIGUES, L. R.; LEONHARDT, C.; SCHWARZ, S. F. Superação de dormência em sementes de *Butia capitata*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p.115-1153, jul. 2011.

FOGLIATTO, S.; VIDOTTO, F.; FERRERO, A. Morphological Characterisation of Italian weedy rice (*Oryza sativa*) populations. **Weed Research**, [S.I.], v. 52, p. 60-69, Feb. 2011.

FONSECA, R. S. **Biologia reprodutiva e morfo-anatomia das flores de *Butia capitata* (Mart.) Becc. em uma área de cerrado no norte de Minas Gerais**. 2006. 54 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) – ICB, UNIMONTES, Montes Claros, 2006.

GIORGINI, J.; COMOLI, E. Effect of embryo and exogenous GA<sub>3</sub> on endospermic endo- $\beta$ -mannanase activity of *Coffea arabica* L. during germination and early seedling growth. **Revista Brasileira de Fisiologia**, [S. I.], v. 8, n. 1, p. 43- 49, 1996.

GONG, X.; BASSEL, G. W.; WANG, A.; GREENWOOD, J. S.; BEWLEY, J. D. The emergency of embryos from hard seeds is related to the structure of the cell walls of the micropylar endosperm, and not to endo- $\beta$ -mannanase activity. **Annals of Botany**, [S.l.], v. 96, p. 1165-1173, Sept. 2005.

GUSMÃO, E.; VIEIRA, F. A.; FONSECA, E. M. Biometria de frutos e endocarpos de murici (*Byrsonima verbascifolia* Rich. ex A. Juss.). **Revista Cerne**, Lavras, v.12, n. 1, p. 84-91, jan. 2006.

IGLESIAS-FERNÁNDEZ R.; MATILLA, A. After-ripering alters the gene expression pattern of oxidases involved in the ethylene and gibberellins pathways during early imbibitions of *Sisymbrium officinale* L. seeds. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], v. 60, p. 1645-1661, 2009.

IGLESIAS-FERNÁNDEZ R.; RODRÍGUEZ-GACIO, M. C.; BARRERO-SICILIA, C.; CARBONERO, P.; MATILLA, A. Three endo- $\beta$ -mannanase genes expressed in the micropylar endosperm and in the radicle influence germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. **Planta**, [S.l.], v. 233, p. 25-36, Sept. 2010.

INMET. **Instituto nacional de meteorologia**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/>>. Acesso em: 10 out. 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos analíticos**: documento de caráter orientativo. [S.l.]: INMETRO, 2007.

KATROLIA, P.; ZHOUA, P.; ZHANGA, P.; YANB, Q.; LI, Y.; JIANGA, Z.; XUA, H. High level expression of a novel  $\beta$ -mannanase from *Chaetomium* sp. exhibiting efficient mannan hydrolysis. **Carbohydrate Polymers**, [S.l.], v. 87, p. 480-490, Jan. 2012.

KAWAMURA, YOKO. **Carob bean gum**. Chemical and Technical Assessment (CTA), [S.l.], p. 1-6, 2008.

KLYOSOV, A. A.; DOTSENKO, G. S.; HINZ, S. W.; SINITSYN, A. P. Structural features of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactomannans of plant origin as a probe for  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) mannanase polymeric substrate specificity. **Carbohydrate Research**, [S.l.], v. 352, p. 65-69, May. 2012.

LAMIEN, N.; TIGABU, M.; GUINKO, S.; ODEN, P. C. Variations in dendrometric and fruiting characters of *Vitellaria paradoxa* populations and multivariate models for estimation of fruit yield. **Agroforestry Systems**, [S.l.], v. 69, p.1-11, Nov. 2007.

LEDO, A. S.; MEDEIROS FILHO, S.; LEDO, F. J. S.; ARAÚJO, E. C. Efeito do tamanho da semente, do substrato e pré-tratamento na germinação de

sementes de pupunha. **Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 33, n. 1, p. 29-32, jul. 2002.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates, **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 47, p. 273-279, May 1972.

LIMA, E. S.; FELFILI, J. M.; MARIMON, B. S.; SCARIOT, A. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado *sensu stricto* no Brasil Central - DF. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo. v. 26, n. 3, p. 361-370, jul. /set. 2003.

LIMA, V. V. F. **Estrutura e dinâmica de populações de coquinho-azedo (*Butia capitata* (Mart.) Beccari; Arecaceae) em áreas de extrativismo no Norte de Minas Gerais**. 2011. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2011.

LISBOA, C. G. S.; TONINI, P. P.; TINÉ, M. A. S.; BUCKERIDGE, M. S. Endo- $\beta$ -mannanase from the endosperm of seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. (Leguminosae) : purification, characterization and its dual role in germination and early seedling growth. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v. 18, n. 2, p. 269-280, Apr. / June. 2006.

LOHA, A.; TIGABU, M.; TEKETAY, D.; LUNDKVIST, K.; FRIES, A. Provenance variation in seed morphometric traits, germination, and seedling growth of *Cordia africana* Lam. **New Forests**, [S.l.], v. 32, p. 71-89, July 2006.

LOHA, A.; TIGABU, M.; TEKETAY, D. Variability in seed- and seedling-related traits of *Millettia ferruginea*, a potential agroforestry species. **New Forests**, [S.l.], v. 36, p. 67-78, July 2008.

LOPES, P. S. N.; AQUINO, C. F.; MAGALHÃES, H. M.; SILVA B, J.; BRANDÃO JUNIOR, D. S. Tratamentos Físicos e químicos para superação de dormência em sementes de *Butia capitata* (Martius) Beccari. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 1, p. 120-125, jan. / mar. 2011.

LORENZI, H.; NOBLIK, R. L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae** (palmeiras). Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2010. 163 p.

LUZ, G. R.; RODRIGUES, P. M. S.; MENINO, G. C. O.; COUTINHO, E. S.; NUNES, Y. R. F. Caracterização física de frutos e putâmens e taxa de ataque por *Carmenta* sp. a pequi-seiros (*Caryocar brasiliense* Camb.) no norte de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 3, p. 746-756, set. 2011.

MAGALHÃES, H. M.; LOPES, P. S. N.; RIBEIRO, L. M.; SANT'ANNA-SANTOS, B. F.; OLIVEIRA, D. M. T. Structure of the zygotic embryos and seedlings of *Butia Capitata* (Arecaceae). **Trees**, [S.l.], v. 27, n. 1, p. 273-283, Feb. 2013.

MANO, N.; MIHRETU, M.; FEKADU, M.; TIGABU, M.; TEKETAY, D. Variation in seed and germination characteristics among *Juniperus procera* populations in Ethiopia. **Forest Ecology Management**, [S.l.], v. 225, p. 320–327, Apr. 2006.

MARTINS, C. C.; NAKAGAWA, J.; BOVI, M. L. A.; STANGUERLIM, H. Influência do peso das sementes de palmito-vermelho (*Euterpe espirosantensis* Fernandes) na porcentagem e na velocidade de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, DF, v. 22, n. 1, p. 47-53, abr. 2000.

MARTINS-CORDER, P. M.; SALDANHA, C. W. Germinação de sementes e crescimento de plântulas de diferentes progênies de *Euterpe edulis* Mart. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 30, n. 5, p. 693-699, set. / out. 2006.

MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C., Morfologia de frutos, sementes e plântulas e germinação de sementes de *Erythrina variegata* L. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 29, n. 3, p. 8-15, fev. 2007.

MERCADANTE-SIMÕES, M. O.; FONSECA, R. S.; RIBEIRO, L. M.; NUNES, Y. R. F. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae) em uma área de cerrado no norte de Minas Gerais. **Unimontes Científica**, Montes Claros, v. 8, p.143-149, 2006.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 31, p. 426-428, Mar. 1959.

MOURA, R. C. **Caracterização vegetativa e reprodutiva do coquinho-azedo, *Butia capitata* (Martius) Beccari (Arecaceae), no norte de Minas Gerais**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) – Instituto de Ciências Agrárias, Universidade de Minas Gerais, Montes Claros, 2008.

MOURA, R. C.; LOPES, P. S. N.; BRANDÃO JÚNIOR, D. S.; GOMES, J. G.; PEREIRA, M. B. Biometria de frutos e sementes de *Butia capitata* (Mart.) Beccari (Arecaceae), em vegetação natural no Norte de Minas Gerais, Brasil. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 415-419, 2010.

MUNTHALI, C. R. Y.; CHIRWA, P. W.; AKINNIFESI, F. K. Phenotypic variation in fruit and seed morphology of *Adansonia digitata* L. (baobab) in five selected Wild populations in Malawi. **Agroforest Syst**, [S.l.], v. 85, p. 279-290, Mar. 2012.

NASCENTE, A. S.; PEIXOTO, N.; SANTOS, C. W. F. Peso de sementes e emergência de plântulas de guariroba (*Syagrus oleraceae* Becc). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 30, n. 2, p. 77-79, jul. / dez. 2000.

NELSON, N. J. A photometric adaptation of the somogyi method for the determination of glucose. **Biological Chemistry**, [S.l.], v. 153, p. 375–379, Feb.1944.

OLIVEIRA, A. B.; FILHO, S. M.; BEZERRA, A. M. E.; BRUNO, R. L. A. Emergência de plântulas de *Copernicia hospita* Martius em função do tamanho da semente, do substrato e ambiente. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n.1, p. 281-287, 2009.

PEREIRA, S. R.; GIRALDELLI, G. R.; LAURA, V. A.; SOUZA, A. L. T. Tamanho de frutos e de sementes e sua influência na germinação de jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* var. *stigonocarpa* Mart. ex Hayne, Leguminosae-Caesalpinoideae). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 1, p. 141-148, 2011.

PIVETTA, K. F. L.; SARZI, I.; ESTELLITA, M.; BECKMANN-CAVALCANTE, M. Z. Tamanho do diásporo, substrato e temperatura na germinação de sementes de *Archontophoenix cunninghamii* (Arecaceae). **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 1, p. 126-134, 2008.

RAMALHO, M.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. B. **Genética na agropecuária**. São Paulo: Globo, 1990. 359 p.

RIBEIRO, L. M.; NEVES, S. C.; SILVA, P. O.; ANDRADE, I. G. Germinação de embriões zigóticos e desenvolvimento *in vitro* de coquinho-azedo. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 2, p. 133-139, mar. / abr. 2011.

RIVAS, M.; BARILANI, A. Diversidad, potencial productivo y reproductivo de los palmares de *Butia capitata* (MART.) BECC. de Uruguay. **Agrociência**, Montevideu, v. 8, n. 1, p. 11-20, dez. 2004.

ROSA, L.; CASTELLANI, T. T.; REIS, A. Biologia reprodutiva de *Butia capitata* (Martius) Beccare var *odorata* (Palmae) na restinga do município de Laguna, SC. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 21, n. 3, p. 281-287, dez. 1998.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT software**: changes and enhancements through release 6.12. Cary: [S.n.], 1997. 1116 p.

SCHWARTZ, E.; FACHINELLO, J. C.; BARBIERI, R. L.; DA SILVA, J. B. Avaliação de populações de *Butia capitata* de Santa Vitória do Palmar. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 32, n. 3, p. 736-745, set. 2010.

SCHRODER, R.; ROSS G. A.; REDGWELL. J. R. Re-interpreting the role of endo- $\beta$ -mannanases as mannan endotransglycosylase / hydrolases in the plant cell wall. **Annals of Botany**, [S.l.], v. 104, p.197-204, Aug. 2009.

SHANKAR, U.; SYNREM, I. L. Variation in morphometric traits of fruits and seeds of *Prunus nepaulensis* Steud. In Meghalaya, India. **Tropical Ecology**, [S.l.], v. 53, n. 3, p. 273-286, Sept. 2012.

SILVA, B. M. S.; CARVALHO, N. M. Efeitos do estresse hídrico sobre o desempenho germinativo da semente de faveira (*Clitoria fairchildiana* R.A. Howard. – Fabaceae) de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 30, n. 1, p. 55-65, 2008.

SILVA, D. S. P. **Estado de conservação e modelagem da abundância de populações de coquinho-azedo (*Butia capitata* (Mart.) Becc.) em gradientes ambientais e antrópico**. 2012. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2012.

SILVA JUNIOR, V. T.; LIMA, J. M. G. M.; RODRIGUES, C. W. M. S.; BARBOSA, D. C. A. *Erythrina velutina* Willd. (Leguminosae-papilionoideae) ocorrente em caatinga e brejo de altitude de Pernambuco: biometria, embebição e germinação. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 36, n. 2, p. 247-257, mar. / abr. 2012.

SILVA, R. A. M.; MOTA, M. G. C.; NETO, J. T. F. Emergência e crescimento de plântulas de bacabi (*Oenocarpus mapora* Karsten) e bacaba (*Oenocarpus distichus* Mart.) e estimativas de parâmetros genéticos. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 39, n. 3, p. 601-608, set. 2009.

SILVA, S. R. **Plantas do cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas**. Brasília, DF: FUNATURA, 1998. 109 p.

SOMOGYI, M. Notes on sugar determination. **Biological Chemistry**, [S.l.], v. 195; p. 19-23, Aug.1952.

VERA, R.; NAVES, R. V.; NASCIMENTO, J. L.; CHAVES, L. J.; LEANDRO, W. M.; SOUZA, E. R. B. Característica física de frutos de pequiseiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 2, p. 71-79, mai. / ago. 2005.