

PAULO ROBERTO MAGISTRALI

**AÇÃO DO MERCÚRIO NO COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E
BIOQUÍMICO NO EIXO EMBRIONÁRIO DE *Schizolobium parahyba***

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa

T

M194a
2016

Magistrali, Paulo Roberto, 1987-
Ação do mercúrio no comportamento fisiológico e
bioquímico no eixo embrionário de *Schizolobium parahyba* /
Paulo Roberto Magistrali. – Viçosa, MG, 2016.
x, 84f. : il. ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.50-72.

1. Guapuruvu (Árvore). 2. *Schizolobium parahyba*.
3. Cloreto de mercúrio. 4. Germinação. 5. Metabolismo
energético. 6. Sementes. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Engenharia Florestal. Programa de
Pós-graduação em Ciência Florestal. II. Título.

CDD 22 ed. 634.923232

PAULO ROBERTO MAGISTRALI

**AÇÃO DO MERCÚRIO NO COMPORTAMENTO FISIOLÓGICO E
BIOQUÍMICO NO EIXO EMBRIONÁRIO DE *Schizolobium parahyba***

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

APROVADA: 24 de novembro de 2016.

Glauciana da Mata Ataíde

Glauciana da Mata Ataíde

[Handwritten signature]

José Márcio Rocha Faria

Dimas Mendes Ribeiro

Dimas Mendes Ribeiro

[Handwritten signature]

Juraci Alves de Oliveira
(Coorientador)

Eduardo Euclides de Lima e Borges

Eduardo Euclides de Lima e Borges
(Orientador)

Dedico essa tese a meus pais Moacir Magistrali e Jurema dos Santos, os quais me apoiaram e estiveram comigo ao longo de toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal pela oportunidade de realização do Doutorado.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Laboratório de Sementes Florestais, por disponibilizar a estrutura para a análise do DNA.

Ao professor Dr. Eduardo Euclides de Lima e Borges pela orientação, dedicação, seriedade, competência e profissionalismo.

Aos professores Drs. José Marcio Rocha Faria, Juraci Alves de Oliveira e Helio Garcia Leite pelo auxílio nas análises experimentais.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal Antônio, Marcone, Rodrigo, Luciane, Diogo e Álvaro pela amizade e companheirismo ao longo desta jornada.

Aos funcionários do Laboratório de Sementes do Departamento de Engenharia Florestal Mauro, Leacir, Gilberto, Sebastião, Pedro pela ajuda na realização de incontáveis etapas dos meus experimentos.

Aos amigos pessoais Ezequiel, Túlio, Wilson, Vinicius, Tony, Rafael, Rafaelzinho e Antônio, pelo companheirismo e pelos momentos alegres.

A toda minha família, incluindo tios, tias, primos, primas, avós, mas principalmente aos meus pais Moacir Magistrali e Jurema dos Santos, aos quais, tenho muito orgulho, por serem pessoas integras, com valores morais inabaláveis, e que sempre me apoiaram durante estes 23 anos de estudos.

A minha irmã, Iris Cristiane Magistrali, que mais uma vez, se mostrou forte e firme, demonstrando que está apta a seguir à carreira de docência.

À Janice Ferreira do Nascimento, pelo amor, incentivo, companheirismo e compreensão, durante todos esses anos.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento da pesquisa.

Muito obrigado!

BIOGRAFIA

PAULO ROBERTO MAGISTRALI, filho de Moacir Magistrali e Jurema dos Santos, nasceu na cidade de Xanxerê, Santa Catarina, em 08 de novembro de 1987. Em fevereiro de 2005, ingressou na Universidade Federal de Santa Maria, graduando-se Engenheiro Florestal em dezembro de 2010, com defesa de trabalho de conclusão de curso.

Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós-graduação em Engenharia Florestal, em nível de Mestrado, na Universidade Federal de Lavras, concluindo os requisitos necessários para obter o título de Mestre em Ciências em fevereiro de 2013, com defesa da dissertação.

Em abril de 2013, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, em nível de Doutorado, na Universidade Federal de Viçosa, concluindo os requisitos necessários para obter o título de Doctor Scientiae em novembro de 2016, com defesa da tese.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE QUADROS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo geral.....	4
2.2 Objetivos específicos.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Aquaporinas: transporte de água através das membranas biológicas em plantas.....	5
3.2 Toxicidade do mercúrio e biomarcadores do estresse oxidativo em plantas.....	7
3.3 Características gerais de <i>Schizolobium parahyba</i>	9
4 MATERIAL E MÉTODOS	11
4.1 Caracterização do lote de sementes.....	11
4.2 Inibição e restauração da atividade das aquaporinas	12
4.2.1 Alongamento dos eixos embrionários	12
4.2.2 Mobilização de reservas	14
4.2.3 Produção de espécies reativas de oxigênio.....	15
4.2.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX)	16
4.2.5 Peroxidação de lipídeos e integridade da membrana	17
4.2.6 Integridade do DNA	18
4.3 Delineamento experimental e análise estatística	19
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
5.1 Caracterização do lote de sementes.....	19
5.2 Inibição e restauração da atividade das aquaporinas	20
5.2.1 Alongamento dos eixos embrionários	23
5.2.2 Mobilização de reservas	29
5.2.3 Produção de espécies reativas de oxigênio.....	34
5.2.4 Sistema antioxidante enzimático	38
5.2.5 Integridade de membrana	43
5.2.6 Integridade do DNA	47
6 CONCLUSÕES	49
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXO I	73
ANEXO II	78

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Hidratação dos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição em H₂O (controle - 0 mM) e soluções de HgCl₂ a 0,01; 0,1; 1 e 5 mM. 20
- Figura 2.** Curvas de hidratação dos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Inibição da atividade das aquaporinas; B – Reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂, com significância de 5% de probabilidade..... 22
- Figura 3.** Crescimento dos eixos embrionário de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. (A) H₂O - controle; (B) HgCl₂ (5 mM). 23
- Figura 4.** Comprimento dos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade das aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂, com significância de 5% de probabilidade. 25
- Figura 5.** Atividade da enzima pectina metil esterase (PME) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade. 27
- Figura 6.** Atividade da enzima poligalacturonase (PG) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade. 28
- Figura 7.** Teor de carboidratos solúveis nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade. 30
- Figura 8.** Teor de lipídeos nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade..... 32
- Figura 9.** Teor de proteínas nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade..... 33
- Figura 10.** Produção de ânion superóxido (O₂^{•-}) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade das aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença e

ns representa igualdade das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), ambos com significância de 5% de probabilidade..... 35

Figura 11. Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença e ns representa igualdade das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), ambos com significância de 5% de probabilidade..... 37

Figura 12. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos eixos embrionário de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade das aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂, com significância de 5% de probabilidade. 39

Figura 13. Atividade da enzima catalase (CAT) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença e ns representa igualdade das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂, ambos com significância de 5% de probabilidade. 41

Figura 14. Atividade da enzima peroxidase (POX) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade das aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade. 43

Figura 15. Concentração de malonaldeído (MDA) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade. 45

Figura 16. Condutividade elétrica (CE) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade. 46

Figura 17. Integridade do DNA cromossômico nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante a inibição e reversão inibição da atividade das aquaporinas. Controle positivo 1 (folhas de *Copaiba langsdorffii*); Controle positivo 2 (eixos embrionários mortos, após dois minutos em água a 98 °C). 48

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Modelo de regressão da figura 1.....	73
Quadro 2. Modelos de regressão da figura 2.....	73
Quadro 3. Modelos de regressão da figura 4.....	73
Quadro 4. Modelos de regressão da figura 5.....	74
Quadro 5. Modelos de regressão da figura 6.....	74
Quadro 6. Modelos de regressão da figura 7.....	74
Quadro 7. Modelos de regressão da figura 8.....	75
Quadro 8. Modelos de regressão da figura 9.....	75
Quadro 9. Modelos de regressão da figura 10.....	75
Quadro 10. Modelos de regressão da figura 11.....	76
Quadro 11. Modelos de regressão da figura 12.....	76
Quadro 12. Modelos de regressão da figura 13.....	76
Quadro 13. Modelos de regressão da figura 14.....	77
Quadro 14. Modelos de regressão da figura 15.....	77
Quadro 15. Modelos de regressão da figura 16.....	77
Quadro 16. Análise de variância do modelo da figura 1.....	78
Quadro 17. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 2.....	78
Quadro 18. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 4.....	78
Quadro 19. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 5.....	79
Quadro 20. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 6.....	79
Quadro 21. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 7.....	80
Quadro 22. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 8.....	80
Quadro 23. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 9.....	81
Quadro 24. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 10.....	81
Quadro 25. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 11.....	82
Quadro 26. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 12.....	82
Quadro 27. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 13.....	83
Quadro 28. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 14.....	83
Quadro 29. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 15.....	84
Quadro 30. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 16.....	84

RESUMO

MAGISTRALI, Paulo Roberto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2016. **Ação do mercúrio no comportamento fisiológico e bioquímico no eixo embrionário de *Schizolobium parahyba***. Orientador: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Coorientador: Juraci Alves de Oliveira.

A germinação é um processo fisiológico que se inicia pela hidratação. O transporte de água nas membranas biológicas é realizado por canais específicos conhecidos como aquaporinas. Assim, estas proteínas apresentam um importante papel na regulação do processo de embebição das sementes. Inúmeros estudos têm utilizado o cloreto de mercúrio (HgCl_2) para oxidar tióis nas aquaporinas inibindo o transporte de água durante a germinação. Por outro lado, por ser um metal pesado, o Hg pode induzir o estresse oxidativo interferindo na germinação. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do HgCl_2 na atividade das aquaporinas e no metabolismo de eixos embrionários de *S. parahyba* durante o processo germinativo. Avaliou-se a embebição, a expansão em comprimento, a atividade das enzimas PME e PG, a mobilização das reservas (carboidratos solúveis, lipídeos e proteínas), a produção de espécies reativas de oxigênio ($\text{O}_2^{\cdot-}$ e H_2O_2), a atividade do sistema antioxidante enzimático (SOD, CAT e POX), a integridade da membrana plasmática (produção de MDA e condutividade elétrica) e de ácidos nucleicos (DNA). De modo geral, os eixos embebidos em HgCl_2 apresentaram reduções no ganho de massa, no comprimento, no consumo de reservas, na atividade das enzimas PME, PG, SOD, CAT e POX, na produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e de MDA, na condutividade elétrica e ausência de degradação de DNA durante o período de embebição. A aplicação do DTT reverteu a ação inibitório do mercúrio. Tais resultados indicam que HgCl_2 inibiu a atividade metabólica de maneira reversível nos eixos embrionários de *S. parahyba*.

ABSTRACT

MAGISTRALI, Paulo Roberto, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, November, 2016. **Action of the mercury in the physiological and biochemical behavior in the embryonic axis of *Schizolobium parahyba*.** Adviser: Eduardo Euclides de Lima e Borges. Co-adviser: Juraci Alves de Oliveira.

Germination is a physiological process that begins by the hydration. Specific cell membrane channels known as aquaporins are the responsible for water cell uptake. These proteins have an important role in regulating the imbibition of the seeds. The action of mercuric chloride (HgCl_2) oxidizing thiols in inhibiting aquaporin water transport during germination have been presented on many studies. Moreover, as a heavy metal, Hg can induce oxidative stress in interfering germination. This study aimed to evaluate the effect of HgCl_2 on the activity of aquaporins and metabolism of *S. parahyba* embryonic axes during the germination process. Was evaluated the imbibition, the expansion in length, activity of enzymes PME and PG, mobilization of reserves (soluble carbohydrates, lipids and proteins), production of reactive oxygen species ($\text{O}_2^{\cdot-}$ and H_2O_2), activity of enzymatic antioxidant system (SOD, CAT and POX), integrity of the plasma membrane (MDA production and electrical conductivity) and nucleic acids (DNA). In general, the axes embedded in HgCl_2 showed reductions in the mass, length, mobilization of reserves, the enzyme activity PME, PG, SOD, CAT and POX, the production of $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 and MDA, the electrical conductivity and lack DNA degradation during imbibition period. The implementation of DTT reversed the inhibitory action of mercury. These results indicate that HgCl_2 reversibly inhibited metabolic activity in embryonic axes of *S. parahyba*.

1 INTRODUÇÃO

A água é o componente fundamental para a manutenção da vida em nosso planeta. Nas plantas, é o principal constituinte do protoplasma, equivalendo mais de 90% da massa fresca da maioria dos tecidos em crescimento (Pimentel, 2004), sendo essencial para a manutenção da turgescência e para a expansão celular (Santos et al., 1998).

Nos tecidos vegetais o movimento da água ocorre por três vias denominadas de rota apoplástica, simplástica e transcelular (Steudle e Peterson, 1998; Taiz e Zeiger, 2013). Na rota apoplástica a água percorre os espaços intercelulares por meio dos poros da parede celular. Na rota simplástica o movimento de água ocorre por meio dos plasmodesmos que interligam as membranas de células vizinhas criando pontes citoplasmáticas. Por fim, na rota transcelular ou transmembrana o movimento de água ocorre através da plasmalema e do tonoplasto. Nesta rota o movimento é governado pela diferença no gradiente do potencial osmótico (Aroca et al., 2011) e a água entra nas células por difusão através da bicamada lipídica e por meio de canais de transporte de água conhecidos como aquaporinas (Taiz e Zeiger, 2013).

Em eventos como a germinação a água é fundamental para a ativação do metabolismo das sementes, interferindo diretamente nos processos fisiológicos que precedem a protrusão da radícula. Na semente a água dá início a eventos importantes como a respiração, a multiplicação e o reparo mitocondrial, a síntese e o reparo de DNA e a mobilização de reservas (Bewley et al., 2013).

Em condições ideais, sementes ortodoxas geralmente apresentam padrão trifásico de hidratação que resulta da diferença dos potenciais hídricos entre as células e o meio (Bewley et al., 2013). Durante a Fase I a absorção da água é considerada um processo físico que ocorre devido a diferença entre o potencial hídrico da semente e o meio de hidratação. Durante a Fase II o teor de água das sementes é relativamente constante ocorrendo aumento na atividade metabólica. A protrusão radicular marca o final desta fase ocorrendo novamente a captação de água e o início do consumo das reservas para o estabelecimento da plântula (Nonogaki et al., 2010).

Estudos têm demonstrado que as aquaporinas estão envolvidas na hidratação das sementes durante o processo de germinativo. A expressão gênica de diferentes famílias de aquaporinas durante a germinação já foi demonstrada para sementes de *Mesembryanthemum crystallinum* (Fukuhara et al., 1999), *Brassica napus* (Gao et al.,

1999; Ge et al., 2014), *Pisum sativum* (Schuermans et al., 2003), *Medicago truncatula* (Bouton et al., 2005), *Arabidopsis thaliana* (Willigen et al., 2006; Gattolin et al., 2011), *Oryza sativa* (Takahashi et al., 2004; Liu et al., 2007; 2013; Li et al., 2008), *Spinacia oleracea* (Chen et al., 2013) e *Vicia faba* (Novikova et al., 2014).

Apesar do exposto, estudos sobre a função das aquaporinas durante a germinação têm sido, de certo modo, limitados pela ausência de inibidores específicos ou por dificuldades metodológicas para mensurar a contribuição dessas proteínas para o transporte de água nas sementes (Gaspar, 2011). Neste sentido, estudos têm empregado compostos de mercúrio para inibir a atividade de aquaporinas em sementes (Willigen et al., 2006; Cardoso et al., 2015) e em eixos embrionários (Obroucheva et al., 2012; Novikova et al., 2014).

Devido à sua eficiência em bloquear os canais de água, o cloreto de mercúrio (HgCl_2) tem sido muito utilizado como ferramenta para estimar a contribuição das aquaporinas no transporte de água nos tecidos de plantas (Javot et al., 2002). Em condições fisiológicas, o mercúrio (Hg) interage rapidamente com grupos tióis dos resíduos de cisteína, oxidando-os e bloqueando a atividade das aquaporinas (Aroca et al., 2011). Uma vez bloqueadas, as aquaporinas podem ser reversivelmente desbloqueadas utilizando-se o ditioneitol (DTT) e o 2-mercaptoetanol, que induzem a redução nos grupos sulfidrilas permitindo que as aquaporinas retomem à sua conformação original e funcionalidade (Jain et al., 2008).

Alguns autores levantam dúvidas em relação aos efeitos toxicológicos do mercúrio na inibição da atividade de aquaporinas (Willigen et al., 2006; Yang et al., 2006; Gaspar, 2011; Cardoso et al., 2015), principalmente porque metais pesados estão associados ao estresse oxidativo (Geebelen et al., 2002; García-Fernández et al., 2002; Koivula e Eeva, 2010), que provocam efeitos nocivos para as células, como a oxidação de proteínas, danos a membrana plasmática e ao DNA (Malecka et al., 2001; Macfarlane, 2003; Gajewska e Slodowska, 2008; Ahmad et al., 2010; Gill e Tuteja, 2010).

Espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como, o ânion superóxido e os radicais hidroxilas, quando em excesso, são comumente associadas a estresses celulares (Pastori e Foyer, 2002). O radical hidroxila é o mais reativo, principalmente por apresentar um elétron não emparelhado que tende a oxidar rapidamente as moléculas dos compostos orgânicos (Henzler e Steudle, 2004).

Estudos têm apontado que os radicais hidroxilas podem atuar como sinalizadores celulares desencadeando reações em cascata que levam ao downregulation de

aquaporinas (Boursiac et al., 2008). Supostamente, o efeito dos radicais hidroxilas na regulação das aquaporinas tem sido demonstrado como mais intenso do que os provocados pelo mercúrio podendo reduzir em até 90% a condutividade hidráulica em plantas (Henzler e Steudle, 2004; Maurel et al., 2008; Park et al., 2010).

O mecanismo pelo qual os radicais hidroxilas afetam a atividade da aquaporina ainda não é bem compreendido. Contudo, Henzler e Steudle (2004) elencam duas possíveis explicações: a primeira leva em consideração o baixo peso deste radical que ao acessar os canais de água podem oxidar resíduos de aminoácidos, como as cisteínas, levando ao fechamento do canal devido a mudança de conformação da proteína. A segunda explicação leva em conta a oxidação de lipídeos pelo ataque às ligações C=C formando lipídeos radicais que poderiam, então, atacar diretamente as proteínas no canal resultando no fechamento do mesmo.

Para combater a oxidação dos componentes celulares, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa constituído por mecanismos enzimáticos ou não (Gratão et al., 2005; Gill e Tuteja, 2010; Patel et al., 2016). Desta forma, o bloqueio das aquaporinas em função dos radicais hidroxilas pode ser reversível pela atuação de antioxidantes citoplasmáticos (Foyer e Lelandais, 1993; Foyer et al., 1994; Schützendübel e Polle, 2002). O aumento na atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a peroxidase (POX) constituem-se como um dos principais mecanismos celulares associados ao combate do estresse oxidativo provocado por metais pesados (Salt et al., 2001).

Considerada a primeira linha de defesa contra a oxidação celular no sistema de defesa enzimático, a superóxido dismutase (SOD, EC1.15.1.1) é capaz de realizar a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que posteriormente pode ser eliminado por enzimas como a peroxidase (POX) (Naji e Devaraj et al., 2011), a catalase (CAT) e a ascorbato peroxidase (Gajewska e Slodowska, 2008; Kumar et al., 2012).

Quando a eliminação do H_2O_2 não é eficiente, pode ocorrer o acúmulo desta ERO, levando ao aumento na peroxidação de lipídeos resultando na produção de malonaldeído (MDA) (Xia et al., 2015). Considerado um biomarcador molecular de estresse oxidativo o MDA reflete de maneira direta o grau de dano oxidativo causado em fosfolipídeos de membrana celular e lipídeos circundantes (Banerjee et al., 1999; Yonar e Yonar, 2010).

Além disso, o H_2O_2 pode também reagir com íons metálicos por meio da reação de Fenton levando à formação do radical hidroxila (Ferreira e Matsubara, 1997; Comhair

e Erzurum, 2002). Em situação de estresse oxidativo o radical hidroxila pode oxidar o DNA promovendo danos à cromossomos através da quebra desta macromolécula (Husain et al., 1987; Olszewer, 1995, Silva e Gonçalves, 2010). Em sementes a fragmentação do DNA está associada a morte celular programada (apoptose) e pode ser utilizada como marcador molecular para evidenciar perda de viabilidade (Wang et al., 1998; Faria et al., 2005; Masetto et al., 2008).

Conhecida popularmente como guapuruvu ou fischeira a *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake é uma espécie que ocorre naturalmente no Brasil (Lorenzi, 2008) desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (Carvalho, 2005; Ferreira et al., 2007). Com característica de espécie pioneira e de rápido crescimento (Sereda et al., 2008; Freire et al., 2015), pode ser empregada na arborização urbana (Lorenzi, 2008) e em programas de reflorestamento de áreas degradadas e de preservação permanente (Lima et al., 2000; Mello et al., 2015).

Sua madeira apresenta baixa durabilidade e pode ser utilizada para a produção de brinquedos, salto para calçados (Lorenzi, 2008), lâminas e manufatura de compensados para uso moveleiro, caixotaria em geral (Júnior e Belini, 2002), pequenos barcos e canoas (Freire et al., 2015) e na produção de polpa para papel (Coelho et al., 2006; Nisgoski et al., 2012). Suas sementes apresentam dormência física (Souza et al., 2012) e comportamento ortodoxo em relação a tolerância à dessecação e ao armazenamento (Carvalho, 2005). Após a quebra de dormência as sementes geralmente apresentam germinação acima de 90% (Ferreira et al., 2007).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do $HgCl_2$ na atividade das aquaporinas e no metabolismo de eixos embrionários de *S. parahyba* durante o processo germinativo.

2.2 Objetivos específicos

1. Verificar alterações no ganho de massa durante o processo de embebição;
2. Quantificar alterações no comprimento e na atividade de enzimas envolvidas no enfraquecimento da parede celular (PME e PG);

3. Mensurar alterações no consumo de carboidratos solúveis, lipídeos e proteínas;
4. Avaliar modificações na produção de espécies reativas de oxigênio ($O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2);
5. Quantificar alterações na atividade do sistema antioxidante enzimático (SOD, CAT e POX);
6. Mensurar modificações na peroxidação de lipídeos (MDA) e no extravasamento de eletrólitos (CE);
7. Verificar a integridade/degradação do DNA.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aquaporinas: transporte de água através das membranas biológicas em plantas

A água é essencial para manutenção da osmolaridade e da integridade nas células (Farlora et al., 2016), nesse sentido, é natural que a membrana celular seja facilmente permeável a essas moléculas. Embora as bases biofísicas do transporte de água através da membrana celular tenham sido anunciadas em 1950, apenas em 1992 o mecanismo de transporte através de aquaporinas foi elucidado (Agre, 2004). Desde então, as aquaporinas vêm sendo encontradas em praticamente todos os organismos vivos, assim como é o caso das membranas de eubactérias, arqueobactérias, fungos, animais e plantas (Zardoya e Villalba, 2001).

As aquaporinas são proteínas que formam canais para a circulação seletiva e bidirecional da água (Martínez-Ballesta et al., 2016; Qi et al., 2016) e estão dispostas nas membranas biológicas em arranjos tetraméricos de monômeros funcionais, que unidos, formam os poros/canais para a passagem da água (De Groot e Grubmuller, 2001). Alguns autores sugerem a existência de um quinto poro central que possui a característica de ser insensível aos inibidores comumente testados (Hub e Groot, 2006; Bertl e Kaldenhoff, 2007, Wang et al., 2007).

Pertencente à superfamília denominada Proteínas Intrínsecas Principais (major intrinsic proteins - MIPs), as aquaporinas apresentam grande quantidade de isoformas (Venkatesh et al., 2013). Nas plantas estão distribuídas em até sete subfamílias que são divididas de acordo com similaridade das sequências e a localização sub-celular (Anderberg et al., 2011; 2012), sendo elas: as PIPs (Plasma membrane Intrinsic Proteins), as TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins), as NIPs (NOD26-like Intrinsic Proteins), as SIPs

(Small basic Intrinsic Proteins), as XIPs (X Intrinsic Proteins), as GIPs (GlpF-like Intrinsic Proteins) e as HIPs (Hybrid Intrinsic Proteins).

Maurel et al. (1993) foram os primeiros autores a demonstrar a funcionalidade das aquaporinas em plantas por meio da expressão gênica de diferentes isoformas de TIPs e PIPs na germinação de sementes de *Arabidopsis thaliana*. Atualmente são conhecidas 28 isoformas de aquaporinas no genoma de *Vitis vinifera* (Fouquet et al., 2008), 55 para *Populus trichocarpa* (Gupta et al., 2009), 63 para *Gossypium asiaticum* (Park et al., 2010), 33 para *Brassica juncea* (Srivastava et al., 2010), 41 para *Solanum tuberosum* (Venkatesh et al., 2013) e *Sorghum bicolor* (Reddy et al., 2015) e mais de 30 genes para *Zea mays* (Chaumont et al., 2001), *Arabidopsis thaliana* (Johanson et al., 2001) e *Oryza sativa* (Sakurai et al., 2005). Essa grande diversidade de homólogos de aquaporinas sugere um mecanismo adaptativo que fornece vantagens para o desenvolvimento das plantas em distintas condições ambientais (Chaumont et al., 2005), tornando possível a regulação do transporte de água em diferentes estados fisiológicos (Tyerman et al., 2002).

Nos últimos 20 anos, um conjunto substancial de dados têm sugerido que as aquaporinas interferem em inúmeros processos fisiológicos sendo importantes na regulação do equilíbrio hídrico das plantas (Kaldenhoff et al., 2008), na modulação da condutância hidráulica em raízes e folhas (Lovisol et al., 2007; McElrone et al., 2007; Hachez et al., 2008; Heinen et al., 2009), no movimento estomático (Heinen et al., 2009), no reparo da embolia do xilema (Secchi e Zwieniecki, 2014), na reprodução (Bots et al., 2005), na manutenção da turgescência celular (Martre et al., 2002), no alongamento celular (Besse et al., 2011) e na germinação de sementes (Willigen et al., 2006; Li et al., 2008; Liu et al., 2013).

Em sementes de *Brassica napus* (Gao et al., 1999), *Mesembryanthemum crystallinum* (Fukuhara et al., 1999), *Pisum sativum* (Schuurmans et al., 2003), *Arabidopsis thaliana* (Willigen et al., 2006; Gattolin et al., 2011), *Oryza sativa* (Li et al., 2008; Liu et al., 2007; 2013), *Spinacia oleracea* (Chen et al., 2013) e *Vicia faba* (Novikova et al., 2014) diferentes famílias de aquaporinas já foram expressas durante a germinação.

Por possuir grande afinidade com o enxofre, diversos estudos têm utilizado o Hg para induzir a inibição da atividade de aquaporinas (Martínez-Ballesta et al., 2003). Sob condições fisiológicas o Hg oxida rapidamente os grupos tióis (grupos -SH) promovendo modificações na conformação estrutural das aquaporinas, o que leva ao bloqueio do canal e à inatividade destas proteínas (Aroca et al., 2011).

O cloreto de mercúrio (HgCl_2) tem sido utilizado para inibir a atividade de aquaporinas em plantas, principalmente, na regulação da condutividade hidráulica (Lpr) das raízes de várias espécies. A redução de 32 a 90% na Lpr foi relatada para *Lycopersicon esculentum* (Maggio et al., 1995), *Triticum aestivum* (Carvajal et al., 1996), *Hordeum vulgare* (Tazawa et al., 1997), *Capsicum annuum* (Carvajal et al., 1999), *Beta vulgaris* (Amodeo et al., 1999), *Cucumis melo* (Carvajal et al., 2000) e *Opuntia acathorcarpa* (Martre et al., 2001).

Uma vez bloqueadas por compostos de mercúrio as aquaporinas podem ser reversivelmente desbloqueadas utilizando-se agentes redutores como o ditioneitol (DTT) ou o 2-mercaptoetanol que permitem retorno à conformação original e da funcionalidade das aquaporinas (Jain et al., 2008).

A utilização do HgCl_2 e do DTT para inibir e restaurar, respectivamente, a atividade das aquaporinas durante a germinação, já foi demonstrada para sementes de *Arabidopsis thaliana* (Willigen et al., 2006), *Plathymenia reticulata* (Cardoso et al., 2015) e para eixos embrionários de *Aesculus hippocastanum* (Obroucheva et al., 2012) e *Vicia faba* (Novikova et al., 2014). Além do cloreto de mercúrio alguns autores têm demonstrado que baixas temperaturas, íons de cálcio, espécies reativas de oxigênio, sais de tetráetilamônio, cobre, zinco, prata (Jain et al., 2008; Haddoub et al., 2009) e eventos como a fosforilação, diminuição de pH e heterodimerização também regulam as aquaporinas em plantas (Tyerman et al., 2002; Maurel et al., 2008).

3.2 Toxicidade do mercúrio e biomarcadores do estresse oxidativo em plantas

Os metais e seus derivados são fundamentais para a regulação de inúmeras funções nos seres vivos (Apaydın et al., 2016). Metais como o cálcio (Ca), o magnésio (Mg), o sódio (Na), o potássio (K), o ferro (Fe), o cobre (Cu), o zinco (Zn), o cobalto (Co) e o níquel (Ni), até certas concentrações, são micronutrientes essenciais para o funcionamento da atividade de uma grande quantidade de proteínas envolvidas na manutenção do crescimento e do desenvolvimento das plantas (Hossain et al., 2012).

Em sementes, os metais interferem na germinação de duas maneiras: a primeira, por meio da inibição da absorção da água regulando a atividade de aquaporinas, e a segunda, pelo efeito de toxidez generalista que desencadeia o estresse oxidativo (Kranter et al., 2011). O termo “metal pesado” inclui apenas elementos com densidade específica acima de cinco, mas frequentemente, é utilizado para especificar uma vasta gama de

metais e metaloides tóxicos para plantas, assim como é o caso do manganês (Mn), do cádmio (Cd), do arsênio (As), do Fe, Cu, Zn, Ni, Co, entre outros (Hossain et al., 2012).

O mercúrio (Hg) é um metal pesado não essencial que se enquadra nesta categoria (Kramer et al., 2005) e interfere em vários processos metabólicos das plantas, como na fotossíntese, na respiração, na síntese de proteínas, na atividade de organelas e no funcionamento de enzimas (Ortega-Villasante et al., 2005; Parmar e Chanda, 2005). Por interagir em inúmeros processos celulares, a toxidez do Hg pode afetar a atividade de enzimas que contenham complexos com grupos tióis, regulando o estado redox celular (Ahmad et al., 2012), e induzindo o estresse oxidativo nos tecidos vegetais (Zhang et al., 2007).

A oxidação é parte fundamental do metabolismo aeróbico (Barreiros et al., 2006) e em função disso, espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são sempre gerados. Contudo, sob condições de estresse, a produção destes agentes oxidantes pode ser aumentada e o acúmulo destas moléculas pode levar ao estresse oxidativo nas células (Ahmad et al., 2010; Gill e Tuteja, 2010; Hong et al., 2015).

Em plantas os efeitos toxicológicos dos metais pesados geralmente estão associados ao estresse oxidativo (Geebelen et al., 2002; García-Fernández et al., 2002; Koivula e Eeva, 2010) que resultam na desnaturação de proteínas, inibição da atividade fotossintética, danos à membrana plasmática e ao DNA das células (Malecka et al., 2001; Macfarlane, 2003; Gajewska e Slodowska, 2008; Ahmad et al., 2010; Gill e Tuteja, 2010).

Para combater a oxidação celular, as plantas desenvolveram um complexo sistema de defesa, constituído por mecanismos enzimáticos ou não (Gratão et al., 2005; Gill e Tuteja, 2010; Patel et al., 2016) que regulam e ajudam a neutralizar os danos causados pelas EROs (Noctor et al., 2012). De modo geral, a literatura tem demonstrado que plantas estressadas com metais pesados tendem a aumentar a atividade das enzimas antioxidantes buscando minimizar os danos oxidativos, contudo, isso não é regra, e a resposta destes biomarcadores pode ser diferente entre as espécies (Mustafa e Komatsu, 2016).

Considerada a primeira linha de defesa contra danos oxidativos, a enzima superóxido dismutase é capaz de realizar a dismutação do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em oxigênio (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, posteriormente, pode ser eliminado por enzimas como a peroxidase (Naji e Devaraj et al., 2011), a catalase e a ascorbato peroxidase (Gajewska e Slodowska, 2008; Kumar et al., 2012).

Desta forma, a produção do H₂O₂ é crucial para remover as EROs nas células. Entretanto, quando acumulado, o H₂O₂ pode induzir ao aumento da peroxidação de lipídeos (Xia et al., 2015) desencadeando alterações na permeabilidade e na flexibilidade das membranas celulares (Singh et al., 2007; Nascimento et al., 2011).

Considerado um biomarcador molecular de estresse oxidativo (Esterbauer et al., 1991, Grotto et al., 2009), o malonaldeído (MDA) é obtido através da clivagem de ácidos graxos polinsaturados e reflete, de maneira direta, o grau de dano oxidativo causado em lipídeos circundantes e fosfolipídeos da membrana celular (Banerjee et al., 1999; Yonar e Yonar, 2010; Jacoby et al., 2012). De acordo com Ayala et al. (2014), quando ocorrem altas taxas de peroxidação lipídica, as células induzem a morte celular programada (apoptose).

A degradação do DNA em sementes, também, está associada à morte celular programada e à perda de viabilidade (Wang et al., 1998; Faria et al., 2005; Masetto et al., 2008). Em condições de estresse oxidativo, as EROs ligam-se e clivam as fitas desta macromolécula, tornando-a degradada. Desta forma, a integridade do DNA pode refletir de maneira direta os danos oxidativos nas células (Husain et al., 1987; Olszewer, 1995, Silva e Gonçalves, 2010).

3.3 Características gerais de *Schizolobium parahyba*

Com mais de 19.500 espécies distribuídas em, aproximadamente, 745 gêneros, a família Fabaceae (Leguminosae) representa a terceira maior família de plantas do planeta (Lewis et al., 2005). Pertencente a esta família a espécie *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake ocorre em vários países como, Belize, Bolívia, El Salvador, Equador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Venezuela e Brasil (Missouri Botanical Garden, 2016). Conhecida popularmente, como guapuruvu ou fischeira, esta árvore ocorre naturalmente na Floresta Pluvial da Encosta Atlântica Brasileira (Lorenzi, 2008) desde o estado da Bahia até o Rio Grande do Sul (Carvalho, 2005; Ferreira et al., 2007).

Possui copa densa, em formato de abóboda, tronco liso, com casca cinza e marcas transversais (Duratex, 1989) e pode atingir até 60 cm de diâmetro (Carvalho, 2003). Com crescimento monopodial e fuste reto, esta árvore semicaducifólia pode atingir até 40 m de altura na idade adulta (Carvalho, 2005). Sua madeira apresenta textura grossa, superfície irregular, baixa densidade (0,32 g/cm³), maciez e baixa durabilidade, podendo

ser empregada na produção de brinquedos, salto para calçados (Lorenzi, 2008), lâminas e manufatura de compensados para uso moveleiro, caixotaria em geral (Júnior e Belini, 2002), fabricação de pequenos barcos e canoas (Freire et al., 2015) e na produção de polpa para papel (Coelho et al., 2006; Nisgoski et al., 2012).

Durante o período de floração (a partir de agosto) apresenta características ornamentais, sendo indicada para a arborização de vias urbanas pouco frequentadas (Lorenzi, 2008). Os frutos surgem durante os meses de abril a agosto, são secos e têm o formato de legume drupáceo. Após o período de maturação, abrem-se por meio de duas valvas espatuladas, expondo o endocarpo, que desempenha função de ala para a semente (Pietrobon et al., 2004) que se dispersa por meio anemocórico (Freire et al., 2007), autocórico e barocórico (Carvalho, 2005).

O beneficiamento das sementes é realizado manualmente e contém, aproximadamente, 500 unidades/kg (Lorenzi, 2008). A semente apresenta aspecto liso, formato oblongo-achatado e tegumento marrom brilhante com comportamento ortodoxo, podendo ser armazenada em câmara fria ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com UR 92%) por até 22 anos sem que ocorra perda significativa de viabilidade (Carvalho, 2005).

Por apresentar dormência física (Souza et al., 2012), recomenda-se escarificar parte do tegumento (Azeredo et al., 2003, Coelho et al., 2006, Pereira et al., 2011) ou imergir a semente em água a $99\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 minuto (Matheus e Lopes, 2007) para que o processo germinativo seja facilitado. Após a quebra de dormência, a emergência das plântulas ocorre entre 5 e 15 dias (Lorenzi, 2008), com germinação acima de 90% quando expostas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ em luz constante (Ferreira et al., 2007). As sementes são cotiledonares e apresentam, como principais fontes de reserva, ácidos graxos oleicos, amido e carboidratos solúveis, que são consumidos no decorrer do processo germinativo (Magalhães et al., 2010).

A propagação do guapuruvu é realizada, principalmente, por via sexuada (Ferreira et al., 2007) e suas mudas podem ser produzidas a pleno sol ou sob sombreamento de até 70% (Caron et al., 2010), podendo ser utilizada areia fina, casca de pinus moída e substrato comercial (Martins et al., 2012). Além disso, o guapuruvu é uma espécie não muito exigente em relação à fertilidade do solo, podendo ser plantado em solos com baixo teor de nutrientes (Castro et al., 2014).

Com característica de espécie pioneira e de rápido crescimento (Freire et al., 2007; Sereda et al., 2008; Freire et al., 2015), pode ser empregada em programas de reflorestamento mistos de áreas degradadas e de preservação permanente (Lima et al.,

2000; Lorenzi, 2008; Mello et al., 2015), em locais livres de inundação (Costa et al., 2006), sendo uma boa escolha para a nidificação de pássaros como João-de-Barro (*Furnarius rufus*) (Carvalho, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do lote de sementes

Os frutos de *S. parahyba* foram coletados de 20 árvores localizadas no município de Viçosa (- 20° 45' 14" S - 42° 52' 55" W), Minas Gerais, no mês de setembro de 2015. O beneficiamento foi realizado após a coleta sendo eliminadas sementes predadas e com danos aparentes. Após a homogeneização do lote de sementes caracterizou-se o teor de água e o percentual de germinação.

O teor de água (TA) foi determinado pelo método de estufa a 105 °C (Brasil, 2009) utilizando cinco repetições de 20 sementes inteiras. A pesagem (g) foi realizada em balança de precisão a 0,1 mg. O resultado foi expresso em porcentagem de umidade (base úmida).

O teste de germinação foi realizado em placas de Petri ($\varnothing = 150$ mm), utilizando cinco repetições de 20 sementes. A superação da dormência ocorreu pelo despoje do tegumento (Ferreira et al., 2007). As sementes foram dispostas entre papéis germitest e umedecidas com 8 mL de água destilada. As placas foram incubadas em BOD na temperatura de 25 °C e iluminação constante. A germinação foi contabilizada, diariamente, por 20 dias, utilizando como critério de germinação a protrusão radicular.

4.2 Inibição e restauração da atividade das aquaporinas

As sementes foram presas longitudinalmente em um torno de bancada e com o auxílio de uma serra circular acoplada em uma microretífica (130W MRA 127R AWT-RED), realizaram-se cortes no sentido lateral e transversal do tegumento. A extração dos eixos embrionários foi realizada com auxílio de pinça e aqueles predados ou com danos aparente, foram descartados.

A inibição da atividade das aquaporinas seguiu a metodologia adaptada de Willegen et al. (2006). O decréscimo no ganho de massa fresca (g) em relação aos eixos embebidos em H₂O (controle) foi determinado através da exposição dos eixos embrionários por 72 horas cinco concentrações de HgCl₂ (0,01, 0,10, 1,0 e 5,0 mM). Após esta etapa, selecionou-se a concentração de 5,0 mM para inibir a atividade das aquaporinas. Também se avaliou um tratamento adicional, contendo eixos embrionários embebidos por 72 horas em 5 mM de DTT.

A restauração da atividade das aquaporinas seguiu a metodologia adaptada de Obroucheva et al. (2012) e Novikova et al. (2014). Os eixos foram embebidos por 48 horas em 5 mM de HgCl₂ sendo transferidos para 5 mM de DTT e H₂O. Após 24 horas avaliou-se a retomada no ganho de massa (g) para ambos os tratamentos.

Tanto na inibição quanto na restauração da atividade das aquaporinas as placas de Petri (Ø = 90 mm) apresentavam cinco repetições de 10 eixos embrionários por placa. Os eixos embrionários foram dispostos sobre duas folhas de papel germitest e umedecidos com 2,5 mL de H₂O (controle) e com HgCl₂ e DTT nas respectivas etapas experimentais. Em todas as fases do experimento as placas de Petri foram vedadas com fita crepe e foram incubadas a 25 °C com no escuro em BOD. O ganho de massa fresca (g) dos eixos embrionários foi quantificado em balança digital de precisão de 0,1 mg.

4.2.1 Alongamento dos eixos embrionários

A expansão dos eixos embrionários foi caracterizada pelo seu comprimento e pela atividade de enzimas envolvidas no enfraquecimento da parede celular durante o período de embebição.

4.2.1.1 Expansão longitudinal

O comprimento (cm) dos eixos embrionários foi mensurado através de imagens escalonadas registradas por câmera digital acoplada a estereomicroscópio (Zeiss) e processadas com o auxílio do software AxioVision Rel. 4.8.

4.2.1.2 Atividade da pectina metil esterase (PME) e da poligalacturonase (PG)

A extração da PME foi realizada utilizando-se de 0,1 g de eixos embrionários macerados em 1 mL de solução NaCl (1 M, pH 7,5) e 1 mL de solução PVPP (1 g/ 100 mL) em almofariz gelado. Os microtubos com as amostras foram centrifugadas por 30 minutos a 18900 x g (4 °C) sendo coletado o sobrenadante para determinar a atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis. A reação foi realizada em cubeta adicionando-se 0,1 mL de extrato enzimático à seguinte solução: 1 mL de pectina de citrus a 0,1% (pH 7,5), 0,5 mL de azul de bromotimol a 0,01% diluído em tampão fosfato de sódio 0,003 M (pH 7,5), 0,2 mL de NaCl (0,15 M), 1,2 mL de H₂O destilada. A desmetilação de pectina foi determinada durante 2 minutos de leitura (620 nm) em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA) (Hagerman e Austin, 1986). A atividade da enzima foi calculada utilizando-se o ácido galacturônico como padrão. Uma unidade de PME foi definida como a quantidade de proteína necessária para catalisar a 1 μmol de ácido galacturônico por minuto, por miligrama de proteína (U. min⁻¹. mg⁻¹ proteína).

A extração da PG foi realizada em 0,1 g de eixos embrionários macerados com 1,5 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5) em almofariz sobre gelo. Os microtubos com as amostras foram centrifugadas a 16464 x g por 20 minutos (4 °C), coletando-se o sobrenadante para determinação da atividade enzimática e a concentração de proteínas solúveis. O ensaio-padrão para determinar a atividade da PG foi determinado pela dosagem de açúcar redutor produzido, segundo o método do DNS (3,5 dinitrossalicílico), conforme descrito por Miller (1959), com modificações. A reação foi realizada em tubos de ensaio com 1,5 mL de tampão acetato de sódio (100 mM, pH 5,0), 0,35 mL de ácido poligalacturônico de laranja (0,3%) e 0,1 mL de extrato enzimático. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 40 °C, por uma hora. A reação foi interrompida em gelo adicionando-se 1,0 mL de solução DNS e 2 mL de água destilada. Após essa

etapa, os tubos foram fervidos a 100 °C, por 5 minutos. A leitura da absorbância foi realizada a 540 nm, em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA). Uma curva-padrão, com concentrações de ácido galacturônico, foi utilizada para calcular a atividade da PG. Uma unidade de PG foi definida como a quantidade de proteína necessária para produzir 1 μmol de equivalente de açúcar redutor por minuto por miligrama de proteína ($\text{U. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína).

Os teores de proteínas solúveis, para ambas as análises foram determinados de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando-se o reagente Comassie Blue G-250. As leituras foram realizadas com 5 μL de extrato enzimático em espectrofotômetro, a 595 nm, e comparadas a uma curva-padrão com concentrações conhecidas de soroalbumina bovina (BSA).

4.2.2 Mobilização de reservas

A extração dos açúcares solúveis foi realizada seguindo a metodologia adaptada de Black et al. (1996). Amostras desengorduradas de 0,1 g foram diluídas em 1 mL de álcool 80% e incubadas em banho maria (75 °C), durante 30 minutos. Os microtubos foram centrifugados a 8400 x g (10 °C) durante 5 min. Este procedimento foi repetido por mais 3 vezes. Os sobrenadantes, em cada etapa da extração, foram misturados e secados em estufa a 45 °C, durante 24 horas. Em seguida, as amostras foram diluídas em 2 mL de água ultrapura. Transferiu-se 20 μL dessa diluição para tubos de ensaio, juntamente com 980 μL de água ultrapura, 500 μL de fenol (5%) e 2,5 mL de ácido sulfúrico absoluto. Os tubos de ensaio foram agitados e permaneceram em repouso durante 15 min, até o momento da leitura. A quantificação foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA), no comprimento de onda de 490 nm, a 25 °C, de acordo com Dubois et al. (1956). A quantificação dos carboidratos solúveis foi determinada por meio de curva-padrão de glicose.

Os lipídeos foram extraídos conforme metodologia adaptada de Silva (1990). Amostras, contendo 1 g de eixos embrionários triturados e secos (45 °C por 24 horas), foram acomodadas em cartuchos de papel-filtro, pesadas e transferidas para extratores soxhlet. A extração foi realizada com éter de petróleo, durante 24 horas. Após esta etapa, os cartuchos foram secos em estufa (45 °C por 24 horas) e pesados novamente. O teor de

lipídeos foi calculado através da diferença de peso entre as amostras antes e após o processo de extração.

As proteínas foram quantificadas através do método micro-Kjeldahl (AOAC, 1995). Amostras constituídas de 0,2 g de eixos embrionários foram postas em tubos de ensaio, juntamente com 1 g de uma mistura de sulfato de sódio (120 g), sulfato de cobre (20 g), selênio (0,4 g) e 5 mL de ácido sulfúrico. As amostras foram digeridas em bloco digestor, a 180 °C, por uma hora, seguida de 350 °C, por mais uma hora. Após a digestão, acrescentou-se 10 mL de hidróxido de sódio 0,1 N procedendo-se a destilação. O destilado foi coletado em Erlenmeyer (75 mL) contendo 10 mL de ácido bórico (5%). A titulação foi realizada utilizando-se solução de ácido clorídrico 0,02 N. O teor de proteínas foi estimado através do fator de 6,25.

Os teores de carboidratos solúveis, lipídeos e proteínas foram expressos em mg. g⁻¹ MS.

4.2.3 Produção de espécies reativas de oxigênio

A concentração de O₂^{•-} foi determinada utilizando-se 0,2 g de eixos embrionários segmentados em pequenos pedaços. As amostras foram incubadas em 2 mL de meio de reação constituído de sal dissódico do ácido etilenodiaminotetracético (Na₂EDTA) 100 µM, β-nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) 20 µM e tampão de fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8 (Mohammadi e Karr, 2001), em tubos de “penicilina” hermeticamente fechados. A reação foi iniciada pela introdução de 100 µL de epinefrina 25,2 mM em HCl 0,1 N, com o uso de uma seringa cromatográfica e incubada a 28 °C, sob agitação, por 5 minutos, seguida da leitura da absorbância em comprimento de onda de 480 nm, durante 5 minutos, em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA). A produção de O₂^{•-} foi avaliada pela determinação do adenocromo acumulado (Misra e Fridovich, 1971), utilizando-se o coeficiente de absorvidade molar de 4,0 x 10³ M⁻¹ cm⁻¹ (Boveris, 1984). Os resultados foram expressos em µmol O₂^{•-}. g⁻¹ MF.

Para determinar a concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), amostras de 0,2 g de eixos embrionários foram triturados em nitrogênio líquido e homogeneizadas em 2,0 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH 6,5, contendo hidroxilamina 1 mM, seguido de centrifugação a 10000 x g, por 15 min, 4 °C, coletando o sobrenadante (Kuo

e Kao, 2003). Alíquotas de 20 μL do sobrenadante foram adicionadas em meio de reação constituído de sulfato ferroso amoniacal 250 μM , ácido sulfúrico 25 mM, laranja de xilenol 250 μM e sorbitol 100 mM, em volume final de 2 mL (Gay e Gebicki, 2000), homogeneizadas e mantidas no escuro por 30 min. A determinação da absorbância a 560 nm foi realizada em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA) e a quantificação de H_2O_2 foi realizada com base em curva de calibração, com a utilização de concentrações de peróxido como padrão. Brancos para os reagentes e os extratos vegetais foram preparados em paralelo e subtraídos da amostra. Os resultados foram expressos em μmol de H_2O_2 g^{-1} MF.

4.2.4 Atividade da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POX)

O extrato enzimático bruto foi obtido a partir de 0,1 g de amostra macerada em almofariz gelado em 2,0 mL de meio de extração constituído de tampão fosfato de potássio 0,1 M, pH 6,8, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 0,1 mM, fluoreto de fenilmetilsulfônico (PMSF) 1 mM e polivinilpolipirrolidona (PVPP) 1% (p/v) (Peixoto et al., 1999). Os extratos foram postos em microtubos de 2 mL e centrifugados a 18900 x g por 15 minutos a 4 °C.

O teor de proteínas solúveis foi determinado de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando o reagente Comassie Blue G-250. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro, a 595 nm, e a quantificação foi baseada em uma curva-padrão com concentrações conhecidas de soro-albumina bovina (BSA).

4.2.4.1 Atividade da superóxido dismutase

Uma alíquota de 50 μL do extrato enzimático bruto foi adicionada a 2,95 mL de meio de reação (tampão fosfato de sódio 100 mM, pH 7,8, metionina 50 mM, azul de p-nitro tetrazólio (NBT) 1 mM, EDTA 5 mM e riboflavina 10 mM) (Del Longo et al., 1993). A reação foi conduzida no interior de uma câmara revestida com papel alumínio e iluminada com lâmpadas fluorescentes de 15 W. Após cinco minutos de exposição à luz, a formazana azul produzida pela fotorredução do NBT foi determinada, a 560 nm, em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA) (Giannopolitis e Ries, 1977). O branco foi constituído do valor de absorbância, a 560 nm, de um meio de

reação exatamente igual ao anterior, incubado no escuro pelo mesmo tempo, sendo subtraído da leitura da amostra que recebeu iluminação. Uma unidade de SOD foi definida como a quantidade da enzima necessária para inibir a fotorredução do NBT em 50% (Beauchamp e Fridovich, 1971). A atividade da SOD foi expressa em U. min⁻¹. mg⁻¹ proteína.

4.2.4.2 Atividade da catalase

Adicionaram-se 50 µL do extrato enzimático bruto a 2,95 mL de meio de reação constituído de tampão de fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, e peróxido de hidrogênio 125 mM (Havir e McHale, 1987). O decréscimo na absorbância, a 240 nm, foi mensurado em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA), durante dois minutos, a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada considerando o coeficiente de extinção molar de 36 M⁻¹ cm⁻¹ (Anderson et al., 1995) e os resultados foram expressos em µmol de H₂O₂ min⁻¹. mg⁻¹ proteína.

4.2.4.3 Atividade da peroxidase

Foram adicionados 100 µL do extrato enzimático bruto a 2,9 mL de meio de reação constituído de tampão fosfato de potássio 100 mM e pH 6,8, pirogalol 20 mM e peróxido de hidrogênio 20 mM (Kar e Mishra, 1976). O incremento na absorbância, decorrente da produção de purpurogalina, foi determinado durante dois minutos, a 420 nm, em espectrofotômetro UV-Visível (Thermo Scientific Evolution 60S, USA), a 25 °C. A atividade enzimática foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar de 2,47 mM⁻¹ cm⁻¹ (Chance e Maehly, 1995) e expressa em µmol de H₂O₂ min⁻¹.mg⁻¹ proteína.

4.2.5 Peroxidação de lipídeos e integridade da membrana

A determinação da concentração de malonaldeído (MDA) foi realizada em amostras contendo 0,1 g de eixos. A maceração das amostras foi realizada com 2 mL de TCA 0,1% (p/v) seguida da centrifugação a 10000 x g, por 5 min. Uma alíquota de 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL de TBA 0,5% (p/v), em TCA 20%. A mistura foi incubada em água fervente por 35 min e a reação foi interrompida em banho

de gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 8400 x g durante 5 min. A leitura da absorbância foi realizada a 532 nm e 600 nm. Foi utilizado o coeficiente de extinção molar de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ para quantificar a concentração dos peróxidos de lipídeos, sendo os resultados expressos em $\text{nmol g}^{-1} \text{ MF}$ (Heath e Packer, 1968).

A condutividade elétrica (CE) foi mensurada através da metodologia adaptada de Gaspar e Nakagawa (2002). Os eixos embrionários foram encubados em copos plásticos contendo 75 mL de água deionizada. Os copos foram selados e mantidos a 25 °C, por 24 horas. Após este período a condutividade elétrica foi determinada em um condutivímetro MICRONAL - B 330 com eletrodo em constante de 1,0 sendo o resultado expresso em $\mu\text{S. cm}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

4.2.6 Integridade do DNA

A integridade do DNA cromossômico foi avaliada utilizando-se três repetições de 10 eixos embrionários. Para validar a integridade do DNA, dois controles positivos foram utilizados para simular DNAs íntegros (folhas frescas de *Copaiba langsdorffii*) e degradados (eixos embrionários de *S. parahyba* mantidos em H₂O fervente, por dois minutos).

A extração dos DNAs seguiu o protocolo CTAB, adaptado de Doyle e Doyle (1990). As amostras foram trituradas em nitrogênio líquido e transferidas para microtubos de 2 mL. Adicionou-se 700 μL do tampão CTAB 2x, pré-aquecido a 65 °C, sendo os microtubos incubados na mesma temperatura, durante uma hora. A cada 10 minutos, os microtubos foram invertidos, buscando homogeneizar as amostras. Em seguida, 600 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi adicionado aos microtubos, invertendo-os durante 5 minutos. Após esta etapa, centrifugou-se os microtubos a 12000 x g, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Transferiu-se 600 μL do sobrenadante para outro microtubo e adicionou-se 450 μL de isopropanol gelado. Os tubos foram mantidos a -20 °C, durante 12 horas. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 x g, a 4 °C, durante 10 minutos, e o sobrenadante foi descartado. A fim de remover resíduos do CTAB, lavaram-se duas vezes o pellet com 1 mL de etanol a 70%, durante 5 minutos, seguido da lavagem, por 3 minutos, em 1 mL de etanol 95%. Os microtubos foram invertidos em filtro de papel, para secar o sedimento, que foi dissolvido em 50 μL de TE,

pH 8,0 (10 mM de Tris-HCl e 1 mM de EDTA). As amostras de DNA foram aplicadas em gel de agarose a 1%, com 0,01% de GelRedTM, e sujeitas à eletroforese adaptada de acordo com Faria et al. (2005).

4.3 Delineamento experimental e análise estatística

Em todas as etapas experimentais utilizaram-se 5 repetições no delineamento inteiramente casualizado (DIC). As avaliações experimentais foram realizadas em intervalos de 24 horas por 72 horas. Os resultados foram submetidos à ANOVA, seguidos da análise de regressão. A escolha dos modelos levou em consideração a tendência biológica dos dados. Testou-se à similaridade entre os modelos ($p \leq 0,05$) por meio do teste de identidade de modelos (Regazzi, 1993). Todas as análises estatísticas foram realizadas no software R. 2. 10. 1. As figuras foram editadas no software SigmaPlot 11.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do lote de sementes

Após o beneficiamento o teor de água (TA) das sementes foi de 9,2%. Ao caracterizar o TA inicial de dois lotes de sementes de *S. parahyba* Ferreira et al. (2007) encontraram valores de 8,2 e 7,8%. Valores de 8,2, 6,3 e 7,1% foram descritos por Cherobini et al. (2010) ao caracterizar a umidade de três lotes de sementes desta espécie.

Ao categorizar a tolerância a dessecação e ao armazenamento de sementes Roberts (1973) afirma que sementes ortodoxas toleram conteúdos de água abaixo de 10% e baixas temperaturas no armazenamento. Por apresentar este comportamento, sementes de *S. parahyba* podem ser armazenadas por mais de 20 anos sem que ocorra perda de viabilidade (Carvalho, 2005). Segundo Davide (2003), sementes florestais nativas devem apresentar elevada viabilidade e quando possível tolerar o armazenamento para que possam ser utilizadas ao longo do tempo em programas de restauração e de produção florestal.

Estudos têm demonstrado que as sementes *S. parahyba* apresentam alta viabilidade após a dispersão, atingindo percentuais de germinação acima de 85% quando superada a dormência (Coelho et al., 2006; Ferreira et al., 2007; Magalhães et al., 2010).

No presente estudo as sementes apresentaram 95% de germinação após a escarificação mecânica, iniciando a protrusão radicular a partir do sétimo dia.

5.2 Inibição e restauração da atividade das aquaporinas

Eixos embrionários excisados e mantidos durante 72 horas em H₂O (controle) apresentaram massa fresca 5,51 vezes maior do que a observada antes da embebição (figura 1). Ao expor os eixos a 0,01, 0,1 e 1 mM de HgCl₂, constatou-se ao longo da embebição, ganhos de massa fresca análogos ao tratamento controle (figura 1). Tais resultados indicam, que para estas concentrações, o HgCl₂ foi ineficiente em bloquear as aquaporinas. Por outro lado, evidências da inibição da atividade das aquaporinas foram obtidas ao expor os eixos embrionários a 5 mM de HgCl₂ (figura 1).

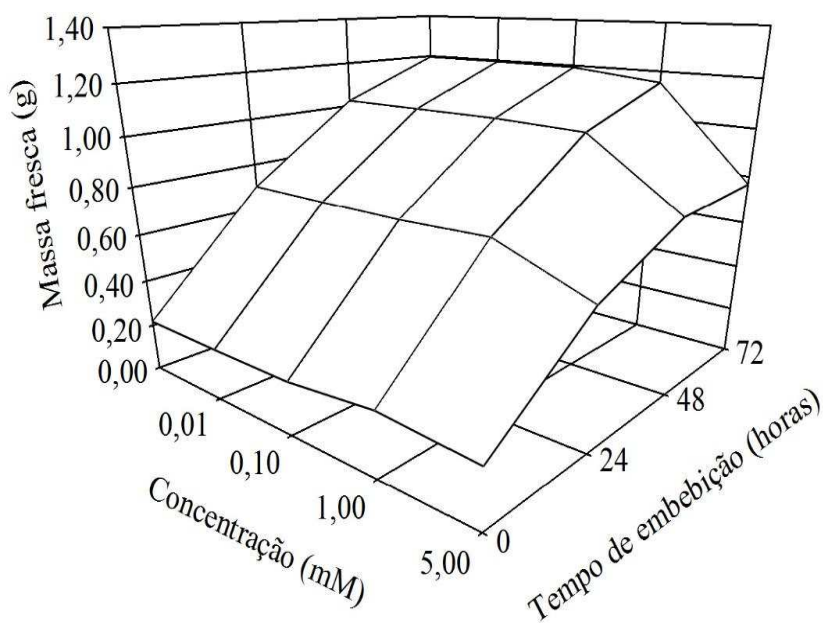


Figura 1. Hidratação dos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição em H₂O (controle - 0 mM) e soluções de HgCl₂ a 0,01; 0,1; 1 e 5 mM.

Estudos demonstram que o tempo de embebição e a concentração de HgCl₂ para inibir a atividade de aquaporinas durante o processo germinativo são variáveis entre as espécies. Por exemplo, em sementes de *Solanum esculentum*, menores valores de

embebição foram obtidos após 12 horas de exposição em 10, 20 e 30 μM de HgCl_2 (Jain et al., 2008). Em sementes de *Arabidopsis thaliana* a hidratação durante o processo germinativo foi reduzida após 3 horas de embebição em 5 μM de HgCl_2 (Willigen et al., 2006).

Em *Plathymenia reticulata* as sementes apresentaram menor ganho de massa após 6 horas de exposição a 1 mM de HgCl_2 (Cardoso et al., 2015). Em eixos embrionários de *Aesculus hippocastanum* (Obroucheva et al., 2012) e *Vicia faba* (Novikova et al., 2014) a hidratação foi reduzida após 15 horas de embebição em 0,75 e 0,5 mM de HgCl_2 , respectivamente.

Para eixos embrionários de *S. parahyba*, atrasos no ganho de massa foram evidenciados após 6 horas de embebição em 5 mM de HgCl_2 se estendendo por 72 horas (figura 2a). Tais resultados indicam que o transporte de água através das aquaporinas foi regulado durante a fase I de embebição.

Resultados semelhantes foram obtidos em sementes de *Arabidopsis thaliana* (Willigen et al., 2006), *Solanum esculentum* (Jain et al., 2008), *Plathymenia reticulata* (Cardoso et al., 2015) e eixos embrionários de *Aesculus hippocastanum* (Obroucheva et al., 2012) e *Vicia faba* (Novikova et al., 2014), onde a cinética de hidratação foi inibida pelo HgCl_2 nas primeiras horas de embebição.

Por promover a oxidação de grupos tióis, íons de mercúrio têm sido utilizados para modificar a conformação tridimensional de aquaporinas e promover a redução no transporte de água (Daniels et al., 1996; Tyerman et al., 1999; Savage et al., 2007; Aroca et al., 2011). O restabelecimento da funcionalidade, destas proteínas, pode ser obtido através de agentes redutores, como é o caso do DTT, que promove a redução dos grupos sulfidrilas, permitindo que o transporte de água seja retomado (Maurel et al., 1993; Javot et al., 2002; Jain et al., 2008).

Ao embeber os eixos embrionários em 5 mM de DTT, constatou-se ganho de massa fresca similar ao observado para o tratamento controle, de modo que o uso isolado do DTT não interfere negativamente na hidratação dos eixos durante o processo de embebição (figura 2a).

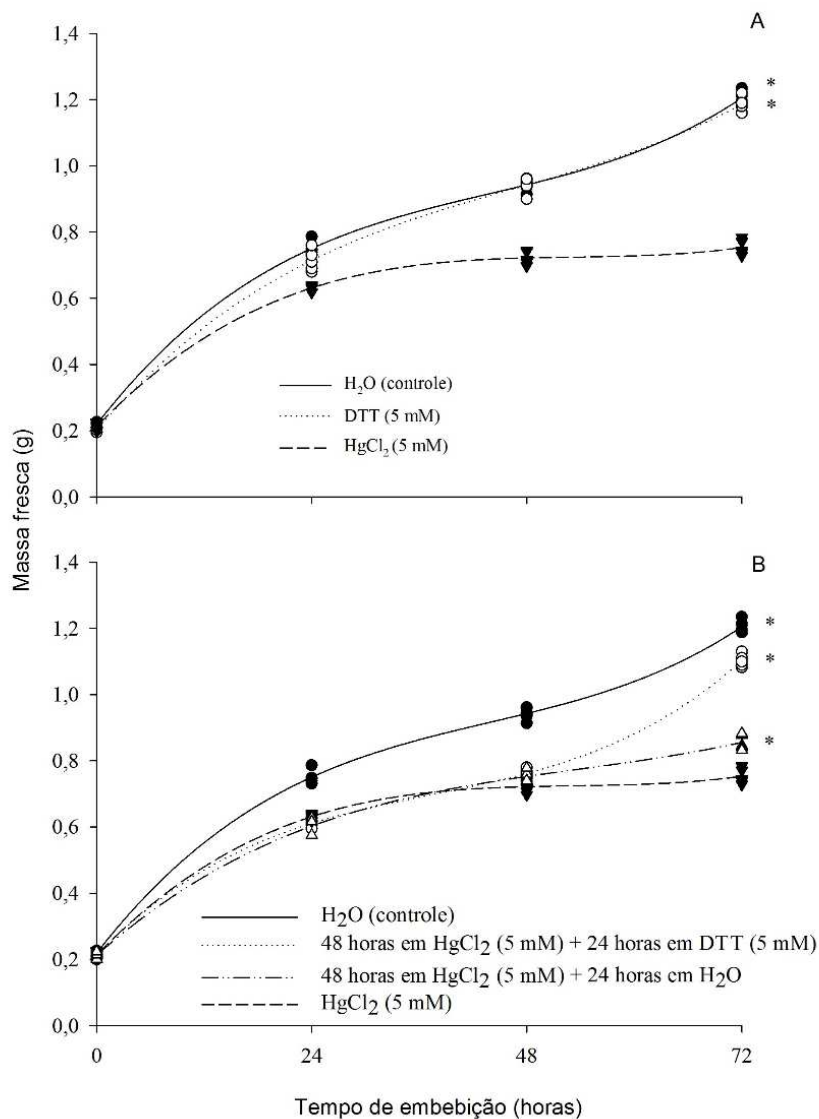


Figura 2. Curvas de hidratação dos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Inibição da atividade das aquaporinas; B – Reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂, com significância de 5% de probabilidade.

A restauração da atividade das aquaporinas nos eixos embrionários embebidos por 48 horas em HgCl₂ (5 mM), seguida da exposição por 24 horas ao DTT (5 mM), fica demonstrada pela retomada na embebição (figura 2b). Desta forma, eixos embrionários transferidos para o DTT e H₂O apresentaram massa 47 e 14% maior do que a massa fresca observada para os eixos que permaneceram embebidos no HgCl₂.

O uso do DTT para desbloquear aquaporinas inibidas pelo HgCl₂ durante o processo germinativo já foi demonstrado para várias espécies. Em *Aesculus*

hippocastanum, a retomada da hidratação de eixos embrionários embebidos por 30 horas em HgCl_2 (0,5 mM) foi obtida após 15 horas de exposição em 10 mM de DTT (Obroucheva et al., 2012). Em eixos embrionários de *Vicia faba*, embebidos em HgCl_2 (0,75 mM), por 30 horas, a restauração da atividade das aquaporinas foi evidenciada após 15 horas de embebição em solução de DTT a 10 mM (Novikova et al., 2014).

O restabelecimento da embebição de sementes de *Pisum sativum* embebidas um organomercúrio (CPMB a 5 μM) também foi obtido através da exposição ao DTT (Veselova e Veselovsky, 2006). Em sementes de *Plathymenia reticulata*, a utilização conjunta do DTT com HgCl_2 (ambos 1 mM) promoveu efeito nulo na inibição da atividade de aquaporinas durante o processo germinativo (Cardoso et al., 2015). Desta forma, os resultados indicam que o DTT foi capaz de reestabelecer a atividade das aquaporinas nos eixos embrionários de *S. Parahyba* durante o processo germinativo.

5.2.1 Alongamento dos eixos embrionários

Outra característica influenciada ao expor os eixos embrionários ao HgCl_2 foi a expansão dos eixos em relação ao tratamento controle (figura 3).

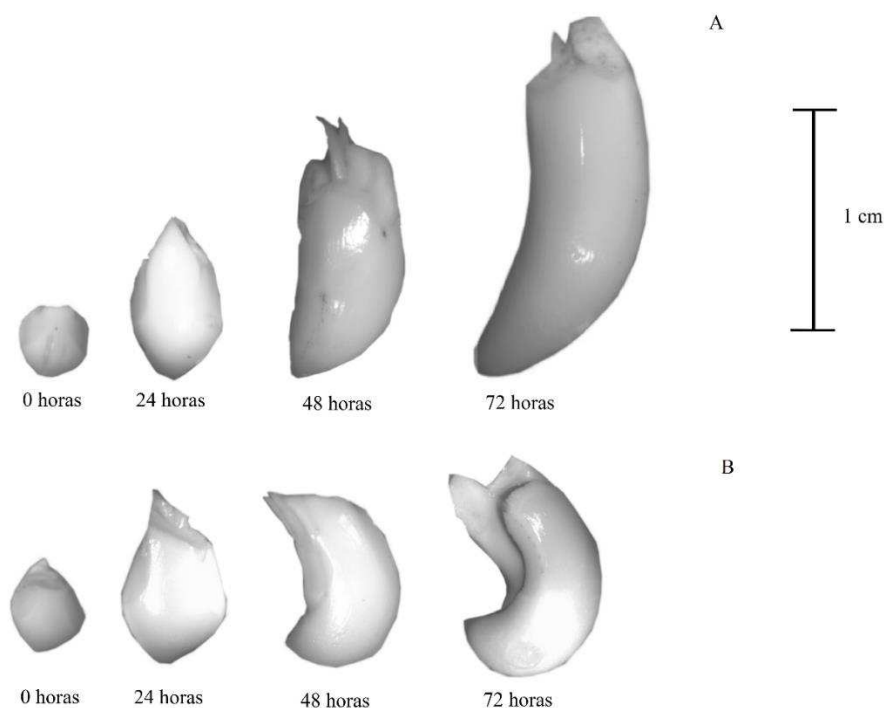


Figura 3. Crescimento dos eixos embrionário de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. (A) H_2O - controle; (B) HgCl_2 (5 mM).

Em sementes ortodoxas a cinética de hidratação é dividida em três fases de embebição, e o alongamento do embrião acontece ao final da fase II, com o início da fase III (Bewley et al., 2013). Nesta mudança de fase, a expansão celular é facilitada pela combinação do aumento no turgor celular, devido à retomada na absorção de água e da redução das forças de retenção nas paredes das células (Nonogaki et al., 2010).

Por estarem envolvidas no transporte de água durante o processo germinativo, acredita-se que as aquaporinas apresentem, também, papel crucial para a expansão celular na fase III de embebição. Um estudo a respeito do papel das aquaporinas no processo germinativo das sementes de *Arabidopsis thaliana* sugere que aquaporinas do tipo PIP são mais expressas na fase III de embebição (Willigen et al., 2006). Além disso os autores demonstram que o alongamento do embrião durante o processo germinativo foi menor ao embeber as sementes em HgCl_2 (5 μM) quando comparado as sementes embebidas em água.

Para os eixos embrionários de *S. parahyba*, a embebição em 5 mM de HgCl_2 , durante 72 horas, também promoveu menor alongamento (figura 4a). Em *Vigna radiata* (Jagatheeswari e Ranganathan, 2012), *Platanus occidentalis*, *Pinus echinata* e *Pinus taeda* (Jean-Philippe et al., 2012) e *Linum usitatissimum* (Jain, 2013), *Plathymenia reticulata* (Cardoso, et al., 2015) a protrusão radicular também apresentou regulação negativa ao expor as sementes a compostos de mercúrio durante o processo germinativo.

Em sementes de *Aesculus hippocastanum* (Obroucheva et al., 2012) e *Vicia faba* (Novikova et al., 2014) a embebição em 0,5 e 0,75 mM de HgCl_2 , não interferiu no alongamento dos eixos embrionários, contudo, promoveu atrasos reversíveis no crescimento inicial dos eixos embrionários após a protrusão radicular.

Ao transferir os eixos embebidos em solução de HgCl_2 , para solução de DTT e H_2O , observou-se a retomada significativa no alongamento dos eixos embrionários (figura 4b). Após 24 horas de exposição, o comprimento dos eixos embebidos aumentou respectivamente 44 e 9% em relação aos eixos que permaneceram embebidos em HgCl_2 .

Tais resultados indicam que a retomada na absorção de água em decorrência da restauração da atividade das aquaporinas foi suficiente para modificar o turgor celular e promover a expansão dos eixos embrionários.

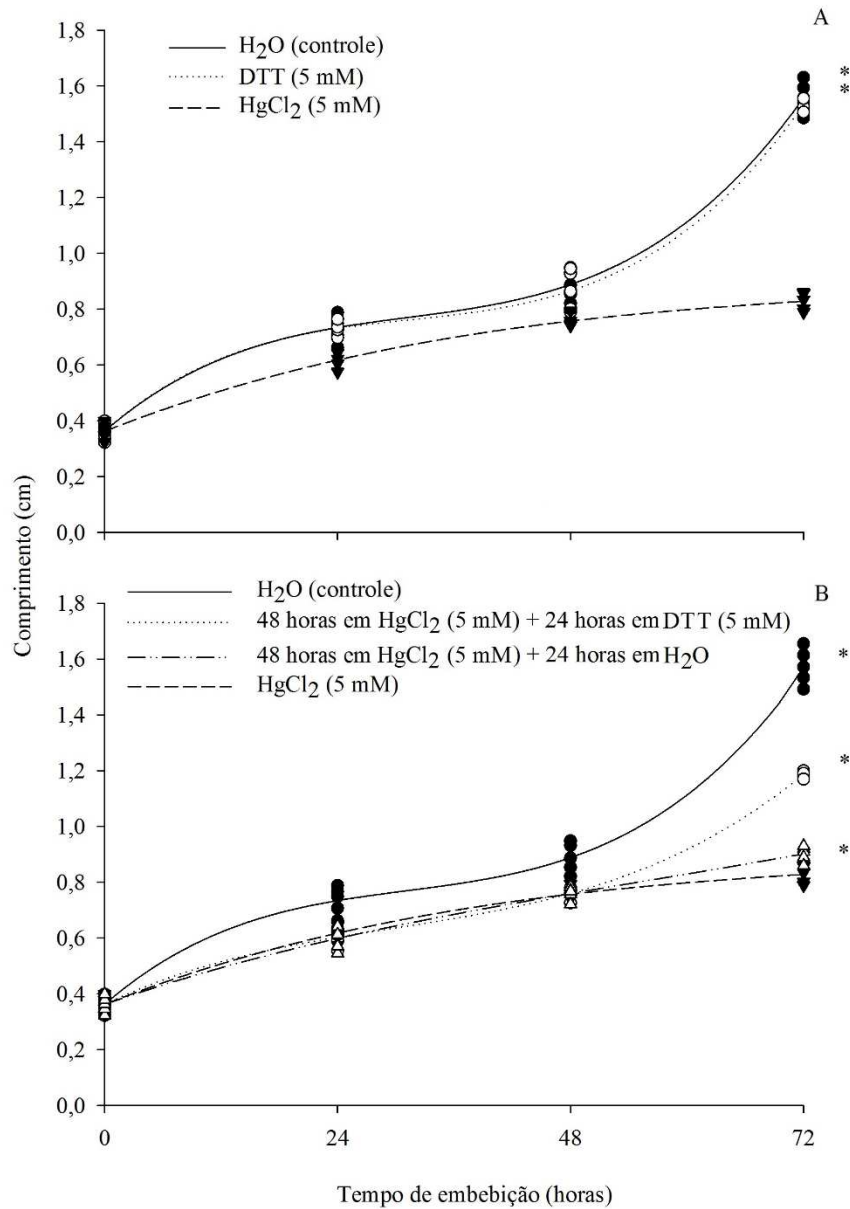


Figura 4. Comprimento dos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade das aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂, com significância de 5% de probabilidade.

Além da embebição adequada, outro fator que auxilia a expansão do embrião durante o processo germinativo é o afrouxamento das paredes celulares promovido pelas enzimas celulases, expansinas e hidrolases (Nonogaki et al., 2010).

As pectinases são uma classe de enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas degradando componentes da parede celular (Uenojo et al., 2007). Nesta classe estão as

enzimas pectina metil esterase (PME) e a poligalacturonase (PG) que atuam no enfraquecimento da parede celular reduzindo as forças de coesão/adesão.

A PME desesterifica grupos carboxílicos através da desmetilação do C₆ em resíduos de galactosil. Uma vez desesterificados, a PG catalisa a hidrólise das ligações α ,1-4 entre os resíduos do ácido galacturônico (Fischer e Bennett, 1991; Swain et al., 2011). Desta forma, para que a hidrólise da pectina seja realizada, estas enzimas devem atuar de maneira conjunta no enfraquecimento das paredes celulares.

Em sementes estudos têm demonstrado que a PME e PG degradam a pectina no tegumento facilitando a expansão dos eixos embrionários (Kanai et al., 2010, Borges et al., 2015). Este evento já foi relatado no endosperma micropilar de sementes de *Lycopersicon esculentum* (Sitrit et al., 1999) e *Lepidium sativum* (Scheler et al., 2015).

Além disso, atividade da PG associada a protrusão radicular já foi relada em eixos embrionários de *Chamaecyparis nootkatensis* (Ren et al., 2000), *Melanoxylon brauna* (Borges et al., 2015), *Dalbergia nigra* (Pontes, 2008; Ataíde et al., 2013) e *S. parahyba* (Magalhães et al., 2009), indicando que esta enzima está envolvida na expansão celular durante o processo germinativo de sementes.

Ao avaliar a atuação da PME na expansão dos eixos embrionários constatou-se aumento na atividade desta enzima com a hidratação (figura 5a). Após 72 horas de embebição, os eixos embrionários apresentaram atividade enzimática oito vezes maior do que a observada antes da embebição. Tendências similares de atividade enzimática foram observadas ao embeber os eixos embrionários em 5 mM de DTT (figura 5a).

Ao embeber os eixos embrionários em HgCl₂ (5 mM) notou-se menor atividade da PME (figura 5a). Após 24 horas de embebição, a atividade enzimática reduziu significativamente em relação à observada para os eixos embrionários embebidos em H₂O. Ao remover os eixos embrionários do HgCl₂, e transferi-los para o DTT e H₂O, observou-se retomada significativa na atividade enzimática, sendo 52 e 15%, respectivamente, maior do que a dos eixos que permaneceram no HgCl₂.

Tais resultado indicam que o HgCl₂ foi capaz de inibir a atividade da PME no apoplasto induzindo menor desesterificação dos grupos carboxílicos nas paredes celulares dos eixos embrionários e que o DTT foi capaz de reverter significativamente essa ação tóxica do Hg (figura 5b).

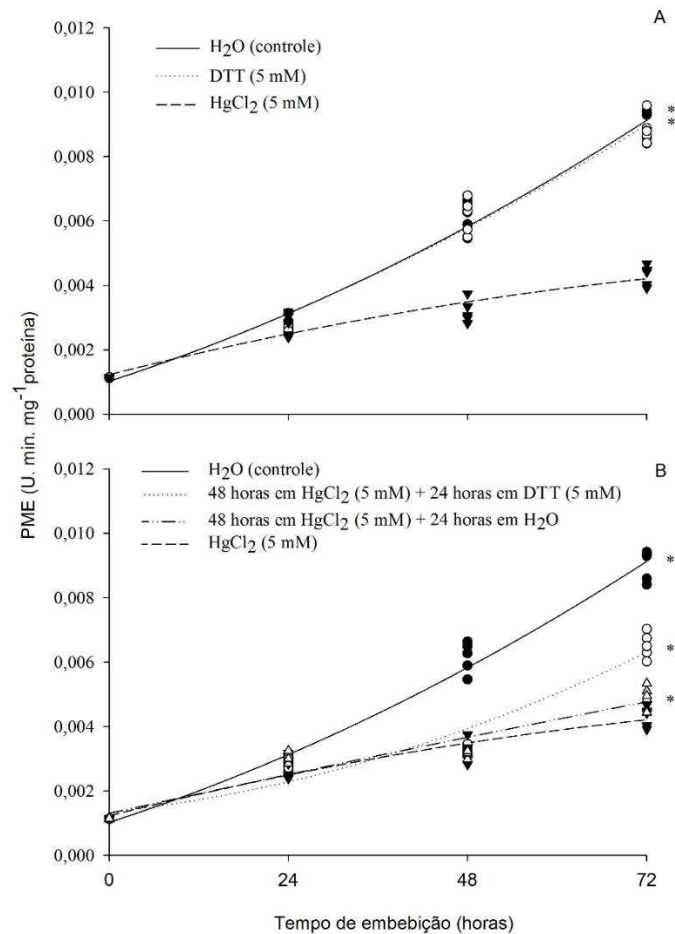


Figura 5. Atividade da enzima pectina metil esterase (PME) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade.

Ao caracterizar a atuação da PG no processo de expansão dos eixos embrionários constatou-se o aumento progressivo na atividade enzimática à medida em que os eixos absorveram H₂O (figura 6a). A atividade da PG foi 7,1 vezes maior em 72 horas de embebição do que a observada nos eixos não embebidos. Tendências similares de atividade foram obtidas ao avaliar eixos embrionários embebidos pelo mesmo período em 5 mM de DTT (figura 6a).

Por outro lado, ao embeber os eixos embrionário de *S. parahyba* em HgCl₂ (5 mM) observou-se menor atividade da PG (figura 6a). Com exceção das primeiras 24 horas, a atividade enzimática da PG foi significativamente menor do que a observada para

os eixos embrionários embebidos em H₂O. Ao realizar o desbloqueio das aquaporinas constatou-se aumento significativo na atividade da PG após 24 horas de embebição (figura 6b). Eixos embrionários transferidos para o DTT e H₂O apresentaram atividade 60 e 18%, respectivamente, maior do que a observada para os eixos que permaneceram no HgCl₂.

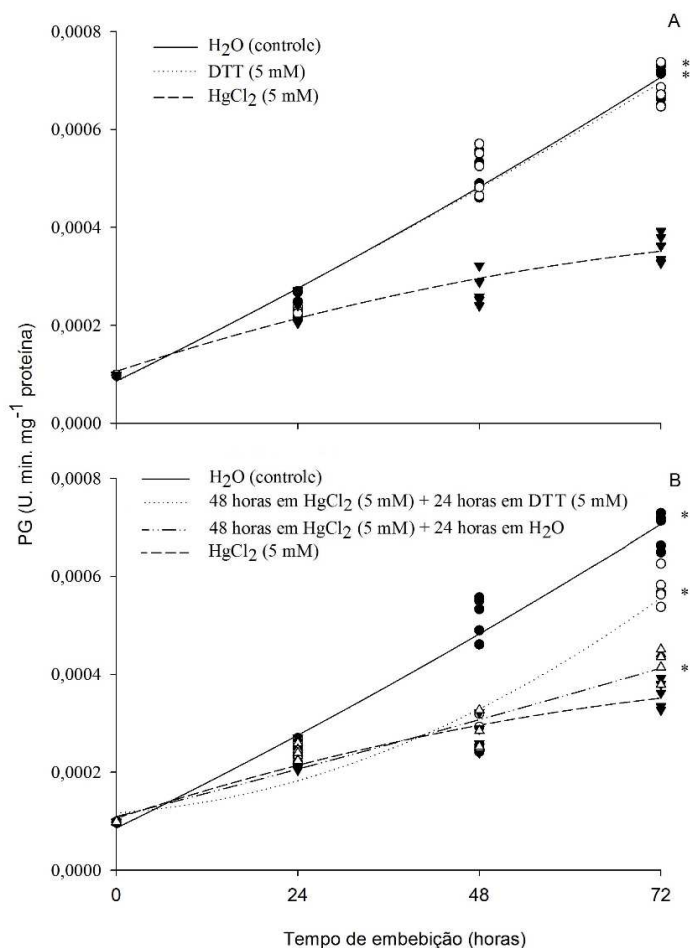


Figura 6. Atividade da enzima poligalacturonase (PG) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade.

Por preceder a atividade da PG na desmetilação da pectina, a enzima PME está diretamente ligada a atuação da PG (Bicalho, 1998). Desta forma acredita-se que o HgCl₂

pode ter interferido de maneira indireta na atividade da PG, uma vez que, modulou negativamente a atividade da PME induzindo a menor expansão dos eixos embrionário.

Por estar presente na lamela média, as substâncias pécticas atuam como protopectinas de elevado peso molecular, enrijecendo a parede celular primária (Antunes et al., 2006). Por ser insolúvel em água, as protopectinas necessitam da ação enzimática para que sejam degradadas. Desta forma, as pectinases (hidrolases e liases) promovem a hidrólise conjunta da pectina diminuindo a força de coesão das paredes celulares.

Em tecidos vegetais a degradação de substâncias pectínicas depende da atuação de uma série de enzimas além da PME e PG, no entanto, por atuar de maneira direta no afrouxamento da parede celular estas enzimas são amplamente estudadas (Silva et al., 2009).

5.2.2 Mobilização de reservas

Durante o processo germinativo as reservas apresentam importante papel ao fornecer estruturas para a síntese de novas moléculas e energia para o embrião (Carvalho e Nakagawa, 2000). Em sementes não endospermáticas, as reservas são depositadas, principalmente, no embrião (conjunto eixo embrionário e cotilédones), assim como é o caso das sementes de *S. parahyba* (Magalhães et al., 2010).

Com a entrada da água e com a ação de enzimas hidrolíticas, os componentes de reservas são transformados em metabólitos solúveis que são facilmente degradados (Bradford, 1995). Carboidratos solúveis, como monossacarídeos (glicose e frutose), dissacarídeos (sacarose) e oligossacarídeos (verbascose, estaquiose e rafinose) são comumente encontrados em tecidos de embriões e cotilédones (Kigel e Galili, 1995) e são utilizados como substrato para a produção de energia em vias respiratórias como a das pentoses-fosfato, da glicólise e do ciclo de Krebs (Bewley et al., 2013).

Ao avaliar o teor de carboidratos solúveis nos eixos embrionários de *S. parahyba* constatou-se o consumo desta reserva à medida em que a H₂O foi absorvida (figura 7a). Com 72 horas de embebição, os eixos apresentaram teor de carboidratos 78% menor do que o observado antes da embebição. Teores de consumo similares foram observados para eixos embrionários embebidos pelo mesmo período em 5 mM de DTT (figura 7a).

Ao embeber os eixos embrionários em HgCl₂ constatou-se consumo de carboidratos significativamente menor do que o observado para os eixos embebidos em

H₂O (figura 7a). A retomada no consumo dos carboidratos solúveis foi verificada ao trocar os eixos pré-embebidos em HgCl₂, por 48 horas, para a H₂O e DTT (figura 7b). O teor de carboidratos foi 18% menor para H₂O e 26% para o DTT, ambos em relação aos eixos que permaneceram em HgCl₂. Tais resultados indicam que o HgCl₂ foi capaz de interferir negativamente no metabolismo dos carboidratos.

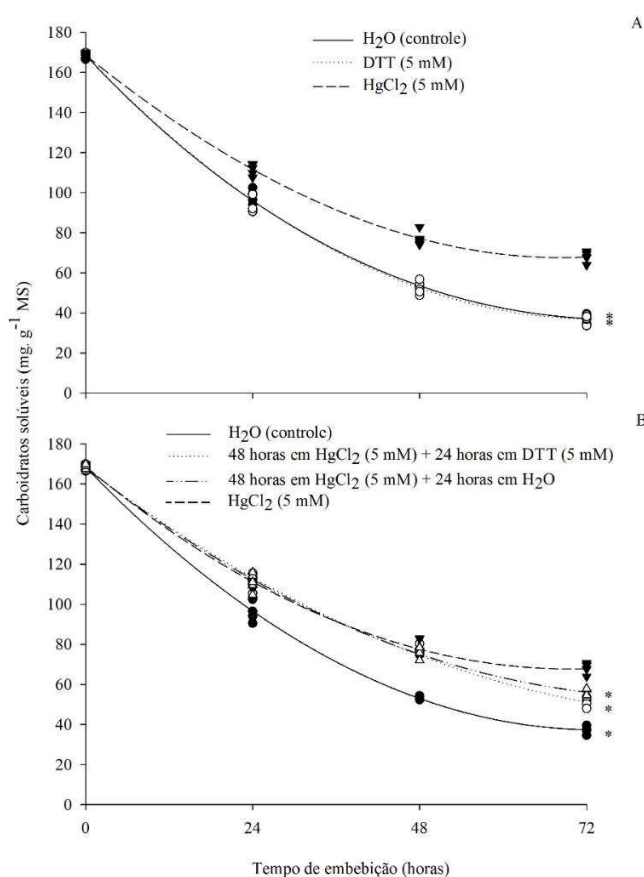


Figura 7. Teor de carboidratos solúveis nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade.

Em sementes, os carboidratos são comumente armazenados na forma de amido, entretanto, polímeros de mananas presentes na parede celular secundária também podem ser utilizados para produção energética durante o processo germinativo (Bewley et al., 2013). Nas células, a produção de energia através de carboidratos é realizada, principalmente, em mitocôndrias, por meio da fosforilação oxidativa, entretanto, também

é realizada no citosol, por meio da glicólise e da via das pentoses-fosfato (Taiz e Zeiger, 2013).

Em condições normais de embebição, o consumo dos carboidratos aumenta à medida em que ocorre a ativação do metabolismo das sementes (Bewley et al., 2013). Este evento já foi demonstrado em sementes de várias espécies, tais como *Brassica oleracea* (Qouta et al., 1991), *Copaifera langsdorfii* (Buckeridge et al., 1992), *Euphorbia heterophylla* (Suda e Giorgini, 2000), *Senna macranthera* (Borges et al., 2002), *Apuleia leiocarpa* (Pontes et al., 2002), *Caesalpinia peltophoroides* (Corte et al., 2006), *Erythrina speciosa* e *Caesalpinia echinata* (Mello et al., 2010), *Schizolobium parahyba* (Magalhães et al., 2010) e *Jatropha curcas* (Lopes et al., 2013).

Além dos carboidratos, moléculas como lipídeos também são utilizadas como fonte de energia durante o processo germinativo (Bewley et al., 2013; Taiz e Zeiger, 2013). Ao avaliar o metabolismo dos lipídeos nos eixos embrionários embebidos em H₂O observou-se decréscimo no teor dos lipídeos durante o período de embebição (figura 8a). Eixos embebidos em DTT (5mM) apresentaram tendência de consumo similar a observada para o tratamento controle (figura 8a).

Por outro lado, eixos embrionários embebidos em HgCl₂ (5mM) apresentaram menor consumo de lipídeos durante a embebição, diferindo significativamente em relação ao tratamento controle (figura 8a). A retomada no consumo de lipídeos foi verificada ao trocar os eixos pré-embebidos, por 48 horas em HgCl₂, para a H₂O e DTT (figura 8b). O acréscimo na retomada do consumo de lipídeos foi de 8,3% 14,3% para eixos embrionários transferidos para H₂O e para o DTT, respectivamente, quando comparados ao tratamento com HgCl₂. Tais resultados indicam que o HgCl₂ foi capaz de atrasar o metabolismo dos lipídeos de maneira reversível, uma vez que, o DTT foi capaz de restabelecer o consumo desta reserva energética.

Nas sementes, os lipídeos são constituídos de triacilgliceróis e são armazenados em corpos lipídicos conhecidos como oleossomos (Bewley et al., 2013). Presente, principalmente, em sementes oleaginosas tais como *Carapa guianensis*, *Carapa procera* (Ferraz e Sampaio, 1996), *Jatropha curcas* (Goldfarb et al., 2010), *Gossypium hirsutum*, *Ricinus communis*, *Helianthus* spp., *Arachis hypogaea*, *Glycine max*, *Piper nigrum* (Almeida et al., 2010) os lipídeos possuem poder energético maior do que o dos carboidratos, sendo metabolizados através da β-oxidação e do ciclo de Krebs, mas, também, nos glioxissomos através do ciclo do glioxilato (Taiz e Zeiger, 2013).

Em plantas, os triacilgliceróis (TAGs) apresentam mais de 300 formas conhecidas e são distribuídos, principalmente, em ácidos oleico, esteárico, palmítico, linoleico, capríco e mirístico (Bewley et al., 2013). O consumo destes TAGs durante o processo germinativo já foi relatado para sementes de *S. parahyba* (Magalhães et al., 2010), *I. balsamina* L., *I. capensis*, *I. ballida* (Nozzolillo e Thie, 1984), *Cucumis sativus* (Matsui et al., 1999), *Euphorbia heterophylla* (Suda e Giorgini, 2000) e *Caesalpinia peltophoroides* (Corte et al., 2006) onde o teor de lipídeos decresceu à medida em que as sementes foram embebidas em água.

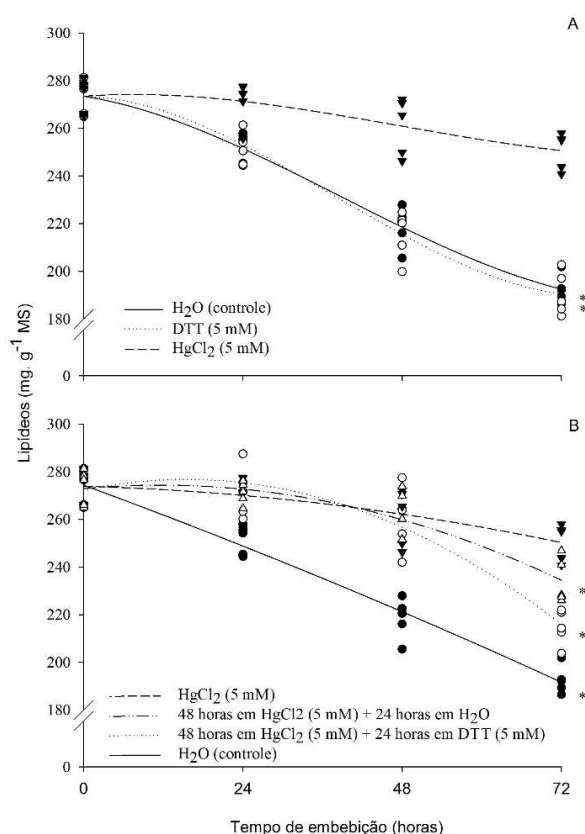


Figura 8. Teor de lipídeos nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade.

Outra reserva importante que atua durante e após a germinação são as proteínas. Segundo Bewley et al. (2013), nas sementes elas servem, principalmente, como fonte de aminoácidos para a síntese de novas proteínas ou como fonte de esqueleto de carbono para síntese de energia nas mitocôndrias. Ao avaliar o consumo de proteínas nos eixos

embrionários embebidos em H₂O constatou-se aumento na produção desta reserva, com pequeno consumo após 48 horas de embebição (figura 9a). Teores proteicos similares foram observados ao embeber pelo mesmo período os eixos embrionários em 5 mM de DTT (figura 9a). Em contraste, ao embeber os eixos embrionários em HgCl₂ (5mM) constatou-se teores de proteínas significativamente maiores do que os valores observados para o tratamento controle. Ao trocar os eixos pré-embebidos, por 48 horas em HgCl₂, para a H₂O (figura 9b) não se observou consumo significativo em relação aos eixos que permaneceram em HgCl₂. Entretanto, a retomada significativa (5,4%) no consumo de proteínas foi verificada ao transferir os eixos para o DTT (5mM) quando comparada aos eixos que permaneceram em HgCl₂ (figura 9b). Tais resultados sugerem o HgCl₂ foi capaz de atrasar o metabolismo das proteínas e o DTT promoveu a retomada deste consumo.

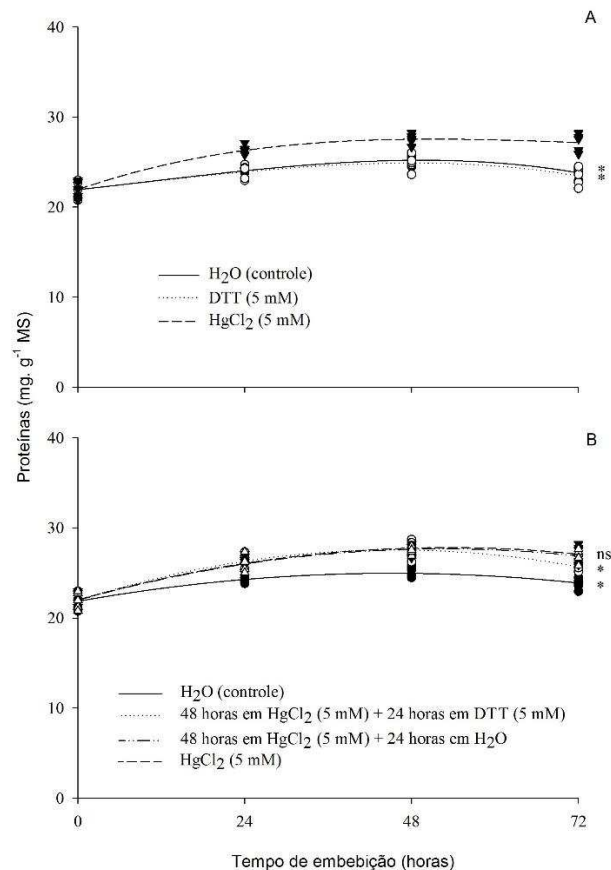


Figura 9. Teor de proteínas nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade.

Nas células este metabolismo inicia através da clivagem proteolítica, que libera aminoácidos para a síntese de novas moléculas no citosol ou para a produção de energia em vias respiratórias como a glicólise, ciclo de Krebs e das pentoses-fosfato (Bewley et al., 2013). Em sementes as proteínas são armazenadas em vacúolos especializados e são distribuídas, principalmente, como albuminas, globulinas e prolaminas (Bewley et al., 2013).

O consumo de proteínas durante o processo germinativo é um evento que ocorre, geralmente, após a protrusão radicular e já foi evidenciado em tecidos de reserva e eixos embrionários de espécies como *Cucumis sativus* (Yamaguchi et al., 1996; Matsui et al., 1999), *Erythrina velutina* (Oliveira et al., 1998), *Euphorbia heterophylla* (Suda e Giorgini, 2000), *Vicia sativa* (Schlereth et al., 2000), *Caesalpinia peltophoroides* (Borges et al., 2005; Corte et al., 2006), *Schizolobium parahyba* (Magalhães et al., 2010) e *Jatropha curcas* (Lopes et al., 2013).

5.2.3 Produção de espécies reativas de oxigênio

Ao avaliar a produção de $O_2^{\cdot-}$ nos eixos embrionários mantidos em H_2O observou-se até 48 horas de embebição um aumento no teor de $O_2^{\cdot-}$ seguido de ligeira queda após este período (figura 10a). Eixos embebidos em DTT apresentaram tendência de produção de $O_2^{\cdot-}$ similar à observada para os eixos embebidos em H_2O (figura 10a). Eixos embrionários embebidos em $HgCl_2$ também apresentaram tendência de produção de $O_2^{\cdot-}$ menor após 48 horas de embebição (figura 10a), contudo, ao serem comparados ao tratamento controle apresentaram produção significativamente menor.

A manutenção dos eixos em água, após a pré-embebição em solução de $HgCl_2$, não resultou na redução significativa no teor de $O_2^{\cdot-}$ em relação aos eixos que permaneceram na solução de mercúrio (figura 10b). Eixos transferidos para o DTT também apresentaram aumento na produção desta ERO (50%), sendo diferentes significativamente em relação aos eixos que permaneceram em $HgCl_2$ (figura 10b). Tais resultados sugerem que o $HgCl_2$ promoveu atrasos no metabolismo oxidativo, interferindo reversivelmente na funcionalidade das organelas produtoras de EROs.

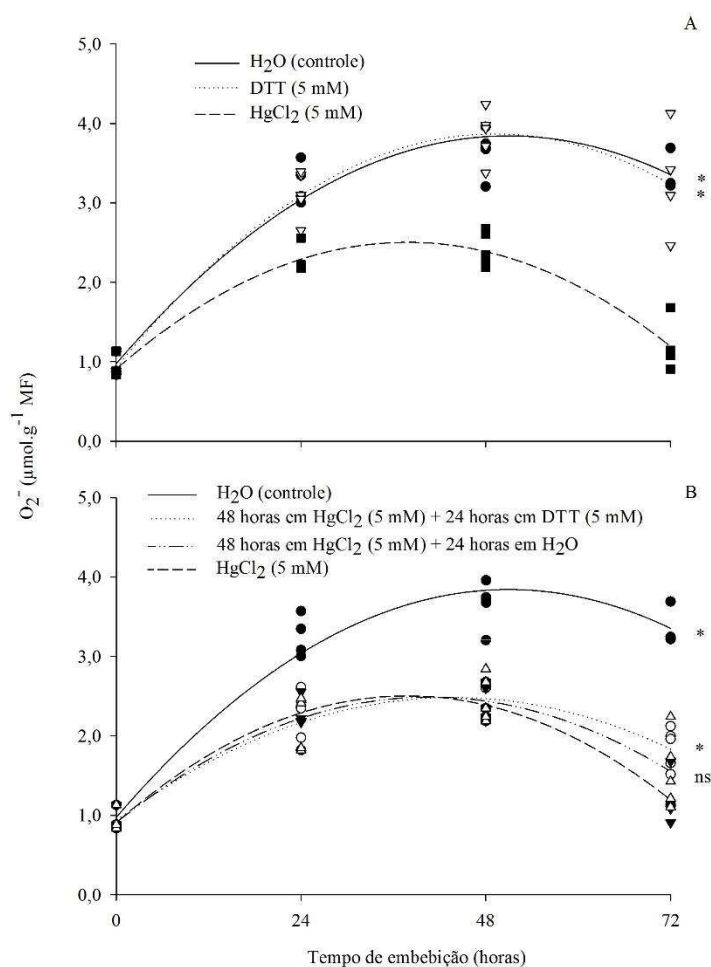


Figura 10. Produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade das aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença e ns representa igualdade das equações em relação aos eixos embebidos em $HgCl_2$ (5mM), ambos com significância de 5% de probabilidade.

Em plantas a produção de EROs pode acontecer em peroxissomos (catabolismo de purinas), cloroplastos (transferência de elétrons nos fotossistemas) (Breusegem et al., 2001; Kranner et al., 2010), em glioxissomos (catabolismo dos lipídeos), no citosol (citocromo P450), na membrana plasmática (NADPH oxidase) e na parede celular (peroxidase) (Apel e Hirt, 2004; Vranová et al., 2002). Entretanto, EROs como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são sintetizadas, principalmente, através do metabolismo oxidativo (Ribeiro et al., 2005).

Em sementes, a entrada de água durante o processo germinativo promove a ativação deste metabolismo (Bewley et al., 2013), intensificando processos como a respiração, o reparo e a multiplicação mitocondrial (Nonogaki et al., 2010). Após a quebra das ligações covalentes da glicose, no citosol, as mitocôndrias realizam a produção de energia para as células através da redução do oxigênio (Taiz e Zeiger, 2013). Durante esse processo, o $O_2^{\cdot -}$ é sintetizado nos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons (Møller 2001; Sweetlove e Foyer 2004), tornando-se o principal substrato para a produção do H_2O_2 (Silva et al., 2014; Ribeiro et al., 2005).

Ao avaliar o teor do H_2O_2 observou-se aumento na produção nos eixos embrionários embebidos em água, sendo 3,1 vezes maior do que nos eixos sem embebição, após 72 horas (Figura 11a). Tendências similares de produção de H_2O_2 , ao longo das 72 horas de embebição, também foram constatadas para os eixos mantidos no DTT (figura 11a). Ao embeber os eixos embrionários em $HgCl_2$, notou-se aumento na tendência da produção de H_2O_2 durante as 72 horas de embebição. Contudo, o incremento na produção foi significativamente menor (41%) do que os valores observados para os eixos embebidos em H_2O (figura 11a).

Ao trocar os eixos pré-embebidos em $HgCl_2$ para meio contendo H_2O não se constatou aumento significativo na produção de H_2O_2 (figura 11b). Entretanto, quando a transferência se deu para a solução contendo DTT notou-se a retomada significativa na produção do peróxido. O aumento na produção de H_2O_2 foi de 28% em relação ao valor produzido para os eixos que permaneceram no $HgCl_2$ (figura 11b). Tais resultados corroboram com a afirmação de que o $HgCl_2$ promoveu atraso no metabolismo oxidativo induzindo menor atividade, provavelmente, na cadeia de transporte de elétrons.

Estudos têm demonstrado que o efeito toxicológico dos metais pesados, durante a germinação, está associado ao estresse oxidativo (Schützendübel e Polle, 2002; Sharma e Dietz, 2009). Por desestabilizar inúmeros componentes celulares, as EROs são consideradas tóxicas para as células, afetando a funcionalidade da parede celular, da membrana plasmática, do apoplasto, de peroxissomos, de cloroplastos e das próprias mitocôndrias, quando em excesso (Mittler, 2011). Em todo caso, o tempo de embebição e a concentração de $HgCl_2$ (5 mM), utilizados nos eixos embrionário, não foram suficientes para induzir tal evento. Com base nos resultados do consumo de reserva e na produção das EROs acredita-se que o $HgCl_2$ promoveu inibição no metabolismo basal (primário) durante o processo germinativo.

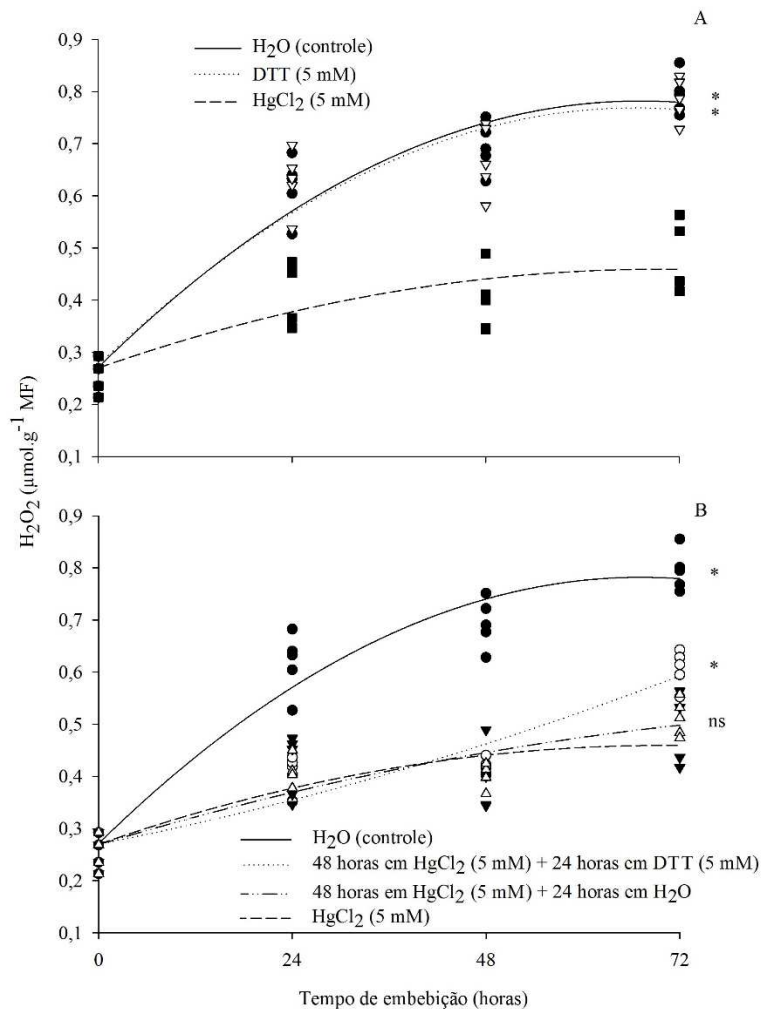


Figura 11. Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença e ns representa igualdade das equações em relação aos eixos embebidos em $HgCl_2$ (5mM), ambos com significância de 5% de probabilidade.

Atualmente, sabe-se, que além da toxidez, as EROs possuem um duplo papel nas células, sinalizando diferentes processos biológicos (Suzuki, 2015) tais como: ciclo celular, crescimento, síntese hormonal, morte celular programada e respostas a estresses biótico e abiótico (Mittler et al., 2004; Foyer e Noctor, 2005; Fujita et al., 2006). Em condições adequadas para a germinação, a produção de EROs em sementes é baixa (Bailly, 2004) e contínua durante a embebição, auxiliando a germinação de várias

espécies (Gidrol et al., 1994; Caro, 1999; Schopfer et al., 2001; Morohashi, 2002; Sarath et al., 2007).

Este mecanismo é definido por Bailly et al. (2008) como “janela oxidativa” e postula que a produção de EROs, até um certo limite, promove a germinação através da sinalização de hormônios, da expressão gênica e da modificação do estado redox celular. Desta forma, quando a produção de EROs está abaixo (menor sinalização) ou acima (estresse oxidativo), deste limite crítico, imposto pelo metabolismo celular, o processo germinativo pode ser regulado negativamente. Assim, por induzir a menor produção de O_2^- e H_2O_2 nos eixos embrionários, o $HgCl_2$ pode ter influenciado este mecanismo, que em conjunto com a menor atividade das aquaporinas, pode ter promovido a menor expansão dos eixos embrionários, interferindo no processo de protrusão radicular.

5.2.4 Sistema antioxidante enzimático

A oxidação é um evento que ocorre de maneira contínua em metabolismos ativos (Taiz e Zeiger, 2013; Gupta et al., 2015). Em sementes, a intensificação do sistema antioxidante enzimático está inteiramente relacionada a ativação do metabolismo oxidativo (Bailly, 2004; Chen e Arora, 2011). Desta forma, enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e as peroxidases (POX), atuam de forma conjunta para manter os níveis adequados das EROs durante o processo germinativo (Mittler, 2002).

Ao avaliar a atuação da SOD nos eixos embrionários notou-se aumento na atividade desta enzima no decorrer do processo de embebição. Com 72 horas de embebição a atividade da SOD foi 3,11 vezes maior do que a observada para os eixos não hidratados (figura 12a). Eixos embrionários embebidos em DTT apresentaram tendência de atividade enzimática similar à observada para os eixos embebidos em H_2O (figura 12a). A atividade da SOD também aumentou à medida que os eixos embrionários foram embebidos em $HgCl_2$, contudo, foi significativamente menor do que a observada para os eixos embebidos em H_2O e em DTT (figura 12a). Ao transferir os eixos embrionários embebidos por 48 horas em $HgCl_2$ (5 mM) para placas contendo DTT e H_2O , notou-se aumento na atividade da SOD, para ambos os tratamentos em relação aos eixos que permaneceram no $HgCl_2$ (figura 12 b).

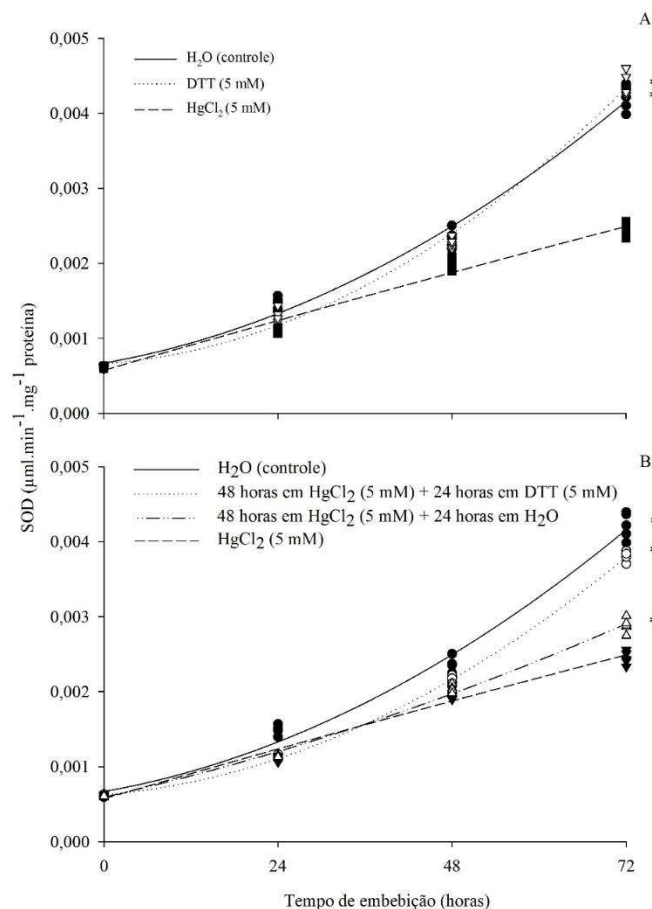


Figura 12. Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) nos eixos embrionário de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade das aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂, com significância de 5% de probabilidade.

Nas plantas, as SODs são consideradas a primeira linha de defesa contra EROs e podem ser agrupadas em SOD Fe (cloroplastos), SOD Mn (mitocôndrias e peroxissomos) SOD Zn-Cu (cloroplastos, citosol, peroxissomos e espaço extracelular) (Mittler, 2002; Alscher et al., 2002; Chen et al., 2010). Na mitocôndria, a SOD age dismutando o ânion superóxido (O₂^{•-}) em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e oxigênio (O₂). Após esta etapa, o H₂O₂ é transportado através da membrana mitocondrial para o citosol onde é eliminado em H₂O e O₂, através da atividade de peroxidases, da catalase nos peroxissomos e glioxissomos ou através do ciclo da ascorbato glutationa (Scandalios, 2005; Corpas et al., 2015). Por apresentarem papel importante no controle oxidativo, o acréscimo na atividade destas enzimas já foram detectadas durante a germinação de *Medicago sativa* (Cakmak

et al., 2010), *Hordeum vulgare* L. (Mei e Song 2010), *Jatropha curcas* (Cai et al., 2011), *Vigna unguiculata* (Deuner et al., 2011), *Zea mays* (Marini et al., 2013) e *Melanoxylon brauna* (Flores et al., 2014).

Estudos têm demonstrado que plantas expostas a metais pesados apresentam produção excessiva de EROs. Desta forma, é natural que enzimas antioxidantes realizem ajustes na atividade para tentar combater o estresse oxidativo (Farid et al., 2013). No caso da SOD, dependendo da concentração e do tipo de metal, pode ocorrer resposta bifásica, assim, baixas concentrações de metal podem induzir maior atividade enzimática e altas concentrações podem inibir a sua atividade (Štolfa et al., 2015).

Em sementes de *Plathymenia reticulata*, a utilização de 1 mM de HgCl_2 para induzir o bloqueio de aquaporinas em eixos embrionários durante o processo germinativo não causou aumento na atividade da SOD (Cardoso et al., 2015). Por não ter induzido o estresse oxidativo nos eixos embrionários de *S. parahyba* acredita-se que o HgCl_2 possa ter regulado a atividade da SOD em função da menor produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ e não em função do excesso de EROs.

Ao avaliar a atuação da CAT observou-se aumento de atividade enzimática nos eixos embrionários embebidos em H_2O . Com 72 horas de embebição em H_2O a atividade enzimática foi 12,5 vezes maior do que a atividade observada para os eixos não hidratados (figura 13a). Eixos embrionários embebidos em DTT apresentaram atividade enzimática similar a observada para o tratamento controle (figura 13a).

Ao embeber os eixos embrionários em HgCl_2 notou-se aumento na atividade da CAT (figura 13a), contudo, a tendência de atividade foi significativamente menor do que a observada para os eixos embebidos em H_2O . Ao realizar a transferência dos eixos pré-embebidos em HgCl_2 para as placas contendo H_2O notou-se pequeno aumento (5,5%) na atividade da enzima CAT, no entanto, esta diferença não foi significativa em relação aos eixos que permaneceram embebidos em HgCl_2 (figura 13b). Por outro lado, eixos transferidos para o DTT apresentaram incremento significativo na atividade enzimática, sendo 16% maior do que a atividade observada nos os eixos mantidos ao HgCl_2 (figura 13b).

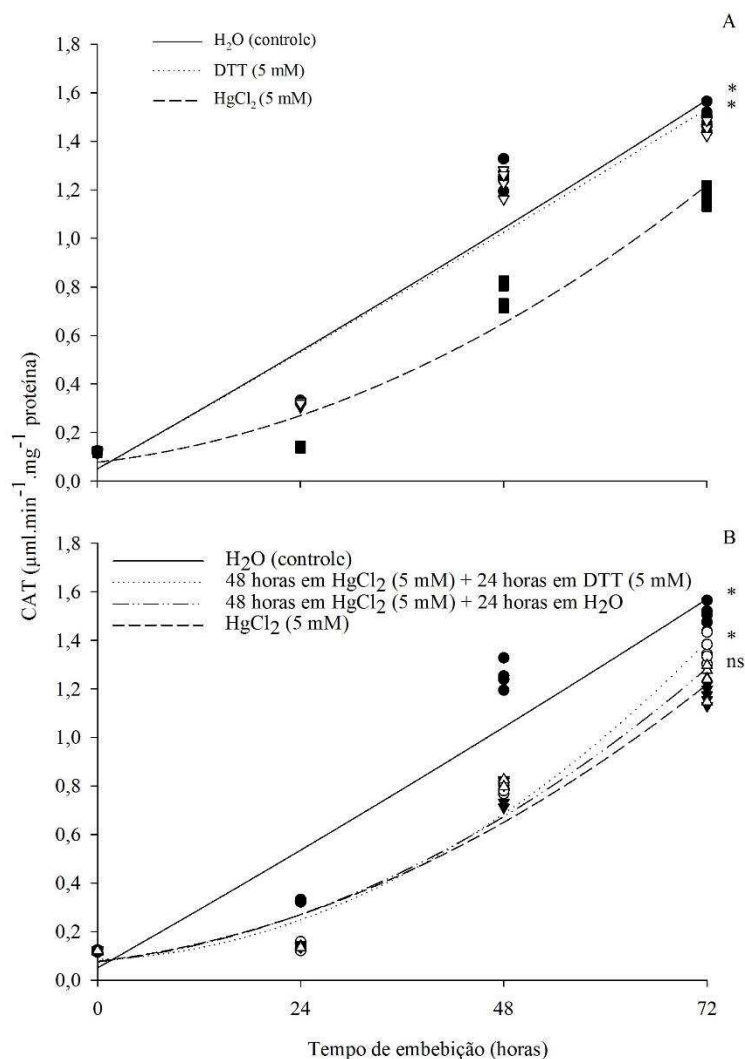


Figura 13. Atividade da enzima catalase (CAT) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença e ns representa igualdade das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂, ambos com significância de 5% de probabilidade.

Embora outras enzimas possam metabolizar o H₂O₂, a CAT atua de maneira direta na eliminação do excesso dessa molécula (peroxissomos e glioxissomos) em condições de estresse oxidativo (Štolfa et al., 2015). Por necessitar de duas moléculas de H₂O₂ no sítio ativo, a CAT consegue remover de maneira mais eficiente estas EROs em comparação a outras enzimas, como as peroxidases (Willkenes et al., 1997).

Desta forma, esta enzima apresenta papel central na manutenção do estado redox celular (Corpas et al., 2001). Assim como na SOD, a resposta bifásica também pode ser

observada na atividade da CAT quando ocorre estresse oxidativo por metais pesados (Štolfa et al., 2015). A produção de EROs pode modular atividade da CAT de maneira positiva ou negativa em função da concentração e do tipo de metal utilizado (Cardoso et al., 2005). Em sementes de *Plathymenia reticulata* o HgCl_2 não promoveu o aumento na atividade da CAT durante o processo germinativo indicando ausência de estresse oxidativo (Cardoso et al., 2015). Por induzir a menor produção de H_2O_2 nos eixos embrionário de *S. parahyba* os resultados sugerem que HgCl_2 interferiu na atividade da CAT em função da menor disponibilidade substrato e não devido ao estresse oxidativo.

Ao avaliar a atividade da POX durante a embebição dos eixos embrionários constatou-se aumento na atividade enzimática durante a hidratação (figura 14a). Com 72 horas de embebição os eixos embebidos em H_2O apresentaram atividade enzimática 73,5 vezes maior do que a observada para os eixos não embebidos. Atividades enzimáticas similares foram evidenciadas para eixos mantidos em DTT ao durante as 72 horas de embebição (figura 14a).

Ao embeber os eixos embrionários em HgCl_2 durante 72 horas ocorreu o aumento da atividade da POX, contudo, com tendência significativamente menor do que a observada para o tratamento controle (figura 14a). Ao trocar os eixos pré-embebidos em HgCl_2 para as placas contendo DTT e H_2O notou-se aumento significativo na atividade da POX, 90,2 e 66,3%, respectivamente, para ambos os tratamentos após 24 horas de exposição (figura 14b).

Nas células a atuação das POX está associada ao controle de baixos níveis de peróxido de hidrogênio ajustando o estado redox celular de maneira sutil. Em condição de estresse oxidativo estas enzimas também podem ter uma resposta bifásica em função da concentração e do tipo de metal utilizado (Štolfa et al., 2015). Em sementes de *Plathymenia reticulata* o HgCl_2 não promoveu o aumento na atividade da SOD durante o processo germinativo (Cardoso et al., 2015). Desta forma, acredita-se que a regulação negativa da atividade da POX nos eixos embebidos em HgCl_2 se deu em função da menor disponibilidade de H_2O_2 no citosol e não em função do aumento da oxidação.

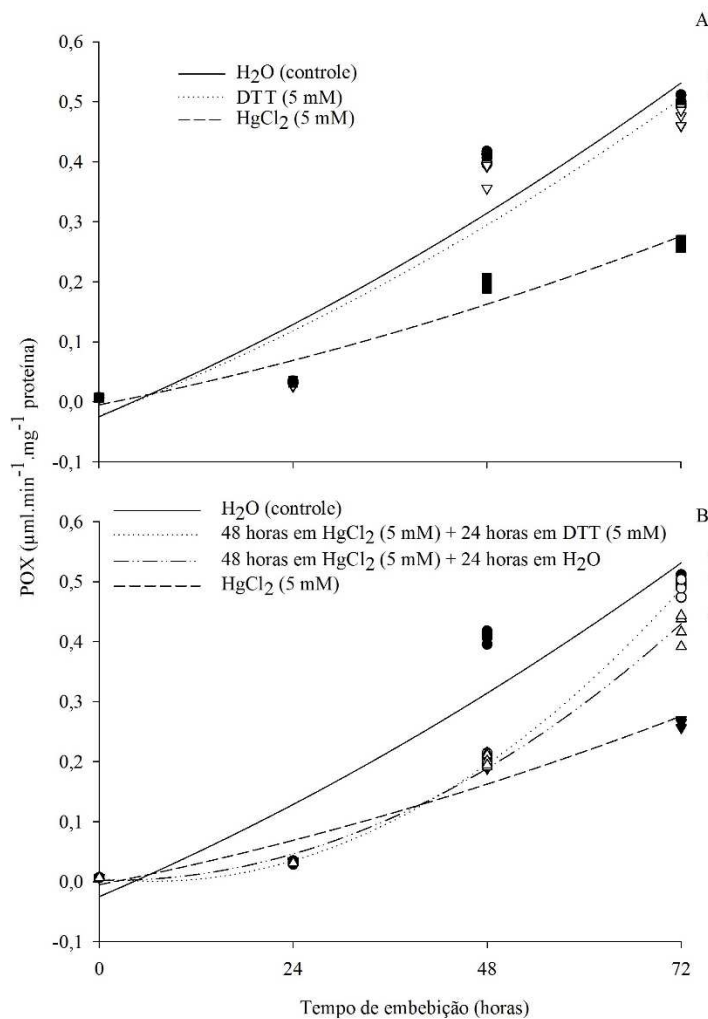


Figura 14. Atividade da enzima peroxidase (POX) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade das aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade das aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade.

5.2.5 Integridade de membrana

Em sementes, a peroxidação de lipídeos é um mecanismo utilizado para caracterizar a perda da seletividade de membranas durante o processo germinativo (Bewley et al., 2013) e está relacionada à baixa eficiência das enzimas antioxidantes (Syta et al., 2013). Em condições de estresse oxidativo, a produção excessiva de EROs pode induzir a quebra de lipídeos de membrana produzindo aldeídos reativos que são utilizados para quantificar este evento. O malonaldeído (MDA) é um subproduto desta

reação e indica, de maneira direta, a intensidade da quebra dos lipídeos da membrana (Kerksick e Willoughby, 2005; Singh et al., 2010).

Ao avaliar a peroxidação de lipídeos notou-se redução na tendência da produção do MDA à medida em que os eixos embrionários foram embebidos em H₂O. Em 72 horas de embebição a produção de MDA foi 4,7 vezes menor do que a observada para os eixos não embebidos (figura 15a). Eixos embebidos em DTT apresentaram tendência de produção de MDA similar a observada para os eixos embebidos no tratamento controle (figura 15a).

A peroxidação de lipídeos para eixos embebidos em HgCl₂ também decresceu durante as 72 horas de embebição. Em relação aos eixos embebidos em H₂O a tendência de produção de MDA diferiu significativamente sendo 62,7% menor para os eixos embebidos em HgCl₂ (figura 15a). Ao realizar a troca de solução para H₂O e DTT notou-se que os eixos pré-embebidos por 48 h em HgCl₂ retomaram a produção de MDA. Em relação aos eixos que permaneceram embebidos em HgCl₂ esse aumento foi de 24 e 241% para os eixos mantidos em H₂O e DTT, respectivamente (figura 15b). Desta forma, acredita-se que a menor produção de MDA observada para os eixos embebidos em HgCl₂ ocorreu devido a menor produção de H₂O₂, uma vez que, o metabolismo basal foi afetado negativamente na presença do mercúrio.

Em sementes o excesso na peroxidação de lipídeos é um evento que está associado à morte celular programada (Hendry et al., 1992; Chaitanya e Naithani, 1994; Tammela et al., 2005; Pukacka e Ratajczak, 2007). Em de *Triticum* spp. (Li et al., 2007), *Vigna unguiculata* (Eriyarnremu et al., 2007), *Arabidopsis thaliana* (Cho e Seo, 2005), *Vicia faba* e *Allium sativum* (Unyayar et al., 2006) a exposição a metais pesados durante o processo germinativo promoveu o aumento na produção MDA causando a perda de viabilidade das sementes.

Nas plantas, a principal função da membrana plasmática (plasmalema) é delimitar e separar o conteúdo celular do ambiente externo. Constituída por proteínas (integrais, periféricas ou ancoradas) e uma dupla camada fosfolipídica, a membrana plasmática é fluida, e seletivamente permeável, e deve manter-se íntegra para que as células fiquem estáveis (Taiz e Zeiger, 2013). Em sementes ortodoxas, a membrana plasmática, muitas vezes, encontra-se menos fluída (estado de gel) no início do processo germinativo devido à secagem de maturação. Assim o extravasamento de solutos durante o processo germinativo torna-se contínuo até que a membrana plasmática retorne ao estado cristalino (Bewley et al., 2013).

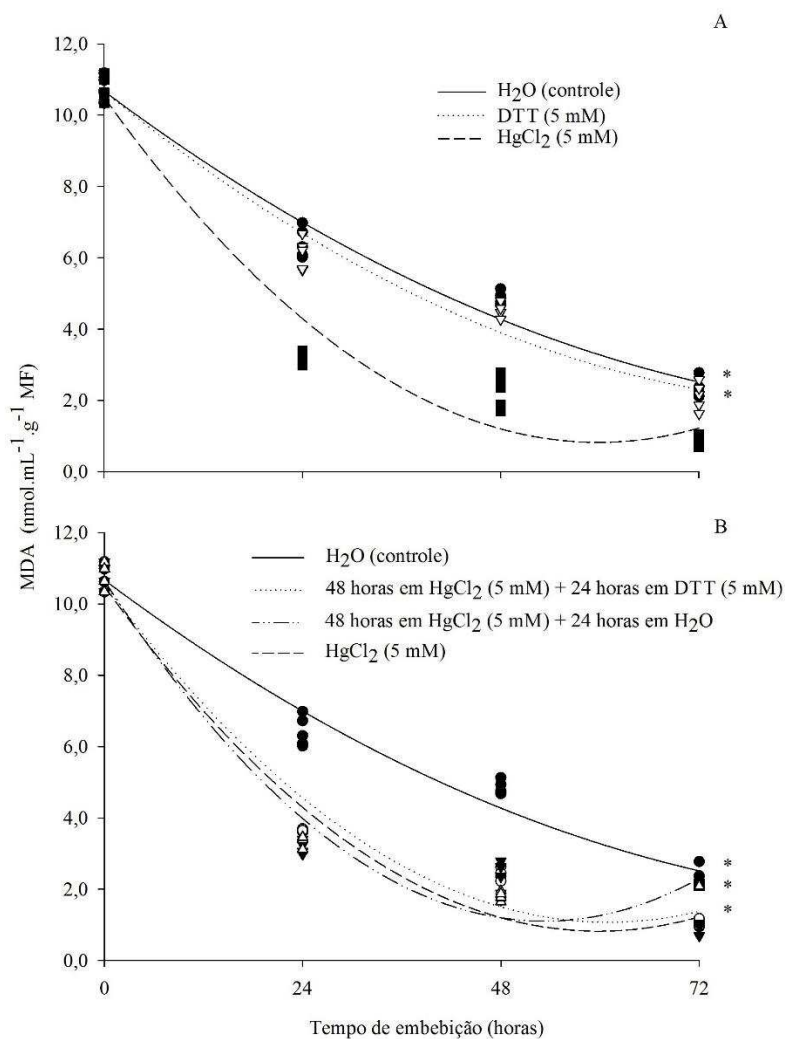


Figura 15. Concentração de malonaldeído (MDA) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl₂ (5mM), com significância de 5% de probabilidade.

Ao avaliar o extravasamento de eletrólitos nos eixos embrionários embebidos em H₂O observou-se aumento na condutividade elétrica (CE) ao longo das 72 horas de embebição. Eixos embebidos em H₂O apresentaram CE 2,1 vezes maior do que a observada para os eixos não embebidos (figura 16a). Extravasamentos de eletrólitos similares foram observados ao embeber os eixos em DTT durante 72 horas (figura 16a).

Por outro lado, o extravasamento de eletrólitos nos eixos embebidos em 5 mM de HgCl_2 apresentou tendência significativamente menor do que a observada para os eixos embebidos em H_2O (figura 16a). Ao transferir os eixos pré-embebidos por 48 horas em HgCl_2 para as placas com H_2O e DTT notou-se tendências maiores de extravasamento de eletrólitos. Esta retomada na CE diferiu significativamente em relação aos eixos que permaneceram em HgCl_2 (figura 16b). Tais resultados corroboram com a hipótese de que eixos embrionários embebidos em HgCl_2 apresentaram menores danos de membrana.

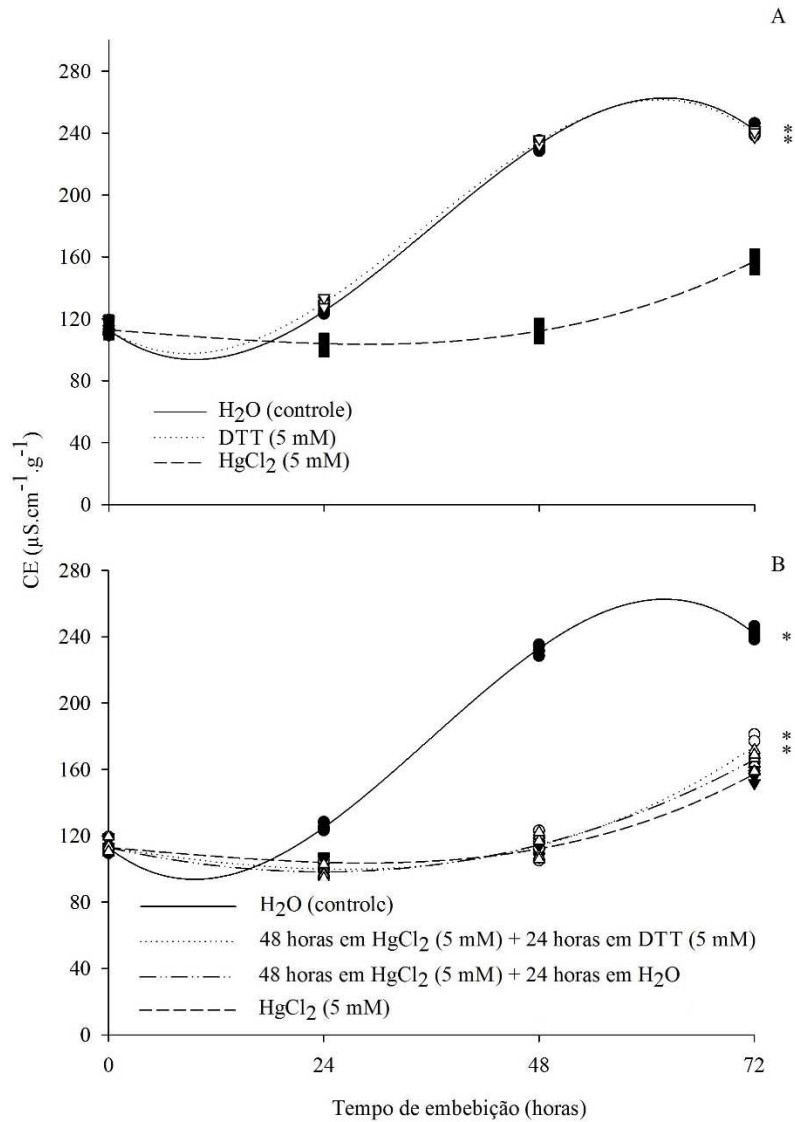


Figura 16. Condutividade elétrica (CE) nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante 72 horas de embebição. A – Indução da inibição da atividade de aquaporinas; B – Indução da reversão da inibição da atividade de aquaporinas. * representa diferença das equações em relação aos eixos embebidos em HgCl_2 (5mM), com significância de 5% de probabilidade.

Por ocorrer naturalmente durante a germinação, o extravasamento de eletrólitos já foi caracterizado em sementes de *Glycine max* (Dias e Marcos Filho, 1996; Vieira et al., 2002; Fessel et al., 2010), *Allium cepa* (Dias et al., 2006), *Vigna unguiculata* (Dutra et al., 2006), *Dictyoloma vandellianum* (Flavio e Paula, 2010), *Vigna radiata* (Araujo et al., 2011), *Jatropha curcas* (Araujo et al., 2011), *Pterogyne nitens* (Ataíde et al., 2012), *Dalbergia nigra* (Marques et al., 2002; Matos et al., 2015) e *Bixa Orellan* (Ferreira, 2015) e quando em excesso pode ser utilizado como indicativo de dano as membranas celulares (Bewley et al., 2013).

5.2.6 Integridade do DNA

Durante o processo germinativo o reparo e a síntese do DNA são eventos cruciais para que ocorra a protrusão radicular (Nonogaki et al., 2010), assim, estes processos ocorrem, tanto no DNA nuclear quanto no mitocondrial (Bewley et al., 2013).

Em condições estressantes, o metabolismo celular, induz a superprodução de EROs que podem promover a clivagem do DNA levando a morte celular programada (Štolfa et al., 2015). Desta forma, metais pesados podem induzir direta e indiretamente danos aos ácidos nucleicos durante o processo germinativo. EROs como o radical hidroxila são produzidas em condições de estresse oxidativo e são altamente prejudiciais ao DNA, uma vez que podem modificar cerca de 10.000 a 100.000 pares de base em uma única célula por dia (Kranter et al., 2011). Além disso, metais pesados podem causar danos pró-mutagênico ligando-se à cadeia de DNA promovendo a despurinação, a quebra e o rearranjo desta macromolécula (Briat e Lebrun, 1999).

Metais pesados como, o mercúrio, atuam nos grupos tióis, exercendo efeito clastogênico e mutagênico causando perturbações no fuso mitótico (Patra et al., 2004). Além disso, dependendo da concentração e do composto de mercúrio, efeitos genotóxicos podem ser evidenciados em sementes (Panda et al., 1992; Subhadra e Panda, 1994; Patra et al., 1995; Patra et al., 2004; kranner et al., 2011).

Por ser uma macromolécula fundamental para as células, a integridade/degradação do DNA pode ser utilizada como um marcador biológico para indicar apoptose em sementes. Este evento já foi caracterizado em sementes de *Medicago truncatula* (Buitink et al., 2003; Faria et al., 2005), *Eugenia pleurantha* (Masetto et al., 2008), *Pisum sativum*

(Kranner et al., 2011), *Cedrela fissilis* (Masetto et al.; 2014), *Sesbania virgata* (Masetto et al., 2015), *Campomanesia adamantium* (Dresch et al., 2015).

Ao avaliar a integridade do DNA nos eixos embrionários embebidos em H₂O não se observou degradação no DNA ao longo das 72 horas de embebição (figura 17). Eixos embrionários embebidos em DTT também apresentaram integridade de DNA ao longo da embebição (figura 17). A ausência de degradação de DNA também foi evidenciada nos eixos embebidos durante 72 horas em 5 mM de HgCl₂ (figura 17). Ao realizar a troca de solução dos eixos pré-embebidos em HgCl₂ por 48 horas para placas contendo H₂O e DTT, notou-se após 24 horas de exposição, que a integridade de DNA, também, foi mantida (figura 17). Tais resultados indicam que o tempo de exposição e a concentração de HgCl₂ não foram suficientes para induzir danos ao DNA, corroborando com a hipótese que houve um atraso metabólico generalizado.

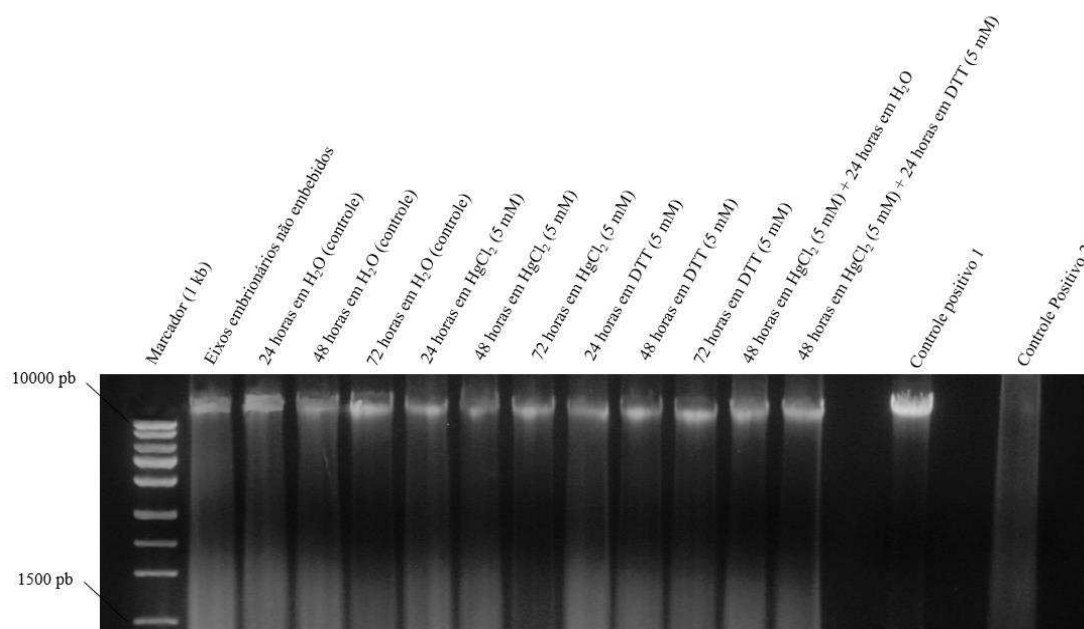


Figura 17. Integridade do DNA cromossômico nos eixos embrionários de *S. parahyba* durante a inibição e reversão inibição da atividade das aquaporinas. Controle positivo 1 (folhas de *Copaiba langsdorffii*); Controle positivo 2 (eixos embrionários mortos, após dois minutos em água a 98 °C).

6 CONCLUSÕES

O HgCl₂ reduzindo o ganho de massa nos eixos embrionários através da regulação da atividade das aquaporinas;

A expansão celular e a atividade das enzimas PME e PG foi menor para eixos embebidos em HgCl₂;

O consumo de reservas foi menor para eixos embebidos em HgCl₂;

A produção de O₂^{•-} e H₂O₂ foi menor nos eixos embebidos no HgCl₂ assim como a atividade das enzimas SOD, CAT e POX.

A produção de MDA e a condutividade elétrica foram menores para os eixos embebidos em HgCl₂, não havendo degradação de DNA.

A aplicação do DTT reverteu a ação inibitória do mercúrio, promovendo a entrada de água e a retomada da atividade metabólica nos eixos embrionários.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE, P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, p. 4278 - 4290, 2004.

AHMAD, I.; MOHMOOD, I.; COELHO, J. P.; PACHECO, M.; SANTOS, M. A.; DUARTE, A. C.; PEREIRA E. Role of non-enzymatic antioxidants on the bivalves' adaptation to environmental mercury: Organ-specificities and age effect in *Scrobicularia plana* inhabiting a contaminated lagoon. **Environmental Pollution (Barking Essex, 1987)**, v. 163, p. 218 - 25, 2012.

AHMAD, P.; JALEEL, A. C.; SALEM, A. M.; NABI, G.; SHARMA, S. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, p. 161 - 175, 2010.

ALMEIDA, F. A. C.; JERÔNIMO, E. S.; ALVES, N. M. C.; GOMES, J. P.; SILVA, A. S. Estudo de técnicas para o armazenamento de cinco oleaginosas em condições ambientais e criogênicas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, p. 189 - 202, 2010.

ALSCHER, R. G.; ERTURK, N.; HEATH, L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1331 - 1341, 2002.

AMODEO, G.; DORR, R.; VALLEJO, A.; SUTKA, M.; PARISI, M. Radial and axial water transport in the sugar beet storage root. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 509 - 516, 1999.

ANDERBERG, H. I.; DANIELSON, J. Å. JOHANSON, U. Algal MIPs, high diversity and conserved motifs. **BMC Evolutionary Biology**, v. 11, p. 110 - 125, 2011.

ANDERBERG, H. I.; KJELLBOM, P.; JOHANSON, U. Annotation of *Selaginella moellendorffii* major intrinsic proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. **Frontiers Plant Science**, v. 3, p. 0 - 14, 2012.

ANDERSON, M. D.; PRASAD, T. K.; STEWART, C. R. Changes in isozyme profiles of catalase, peroxidase, and glutathione reductase during acclimation to chilling in mesocotylus of maize seedlings. **Plant Physiology**, v. 109, p. 1247 - 1257, 1995.

ANTUNES, L. E. C.; GONÇALVES, E. D.; TREVISAN, R. Alterações da atividade da poligalacturonase e pectinametilesterase em amora-preta (*Rubus* spp.) durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, p. 63 - 66, 2006.

AOAC. **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists** - Arlington: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

APAYDIN, F. G. BAS, H.; KALENDER, S.; KALENDERA, Y. Subacute effects of low dose lead nitrate and mercury chloride exposure on kidney of rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 41, p. 219 - 224, 2016.

APEL, K.; HIRT, H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction, **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, p. 373 - 399, 2004.

ARAUJO, R. F.; ZONTA, J. B.; ARAUJO, E. F.; DONZELES, S. M. L.; COSTA, G. M. Teste de condutividade elétrica para sementes de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.). **IDESIA**, v. 29, p. 79 - 86, 2011.

ARAUJO, R. F.; ZONTA, J. B.; ARAUJO, E. F.; HEBERLE, E.; ZONTA, F. M. G. Teste de condutividade elétrica para sementes de feijão-mungo-verde. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 23 - 130, 2011.

AROCA, R.; PORCEL, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Regulation of root water uptake under abiotic stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, p. 43 - 57, 2011.

ATAÍDE, G. M.; BORGES, E. E. L.; GONÇALVES, J. F. C.; GUIMARÃES, V. M.; BICALHO, E. M. FLORES, A. V. Activities of α -galactosidase and polygalacturonase during hydration of *Dalbergia nigra* ((Vell.) Fr All. ex Benth.) seeds at different temperatures. **Journal of Seed Science**, v. 35, p. 92 - 98, 2013.

ATAÍDE, G. M.; FLÔRES, A. V.; BORGES, E. E. L.; RESENDE, R. T. Adequação da metodologia do teste de condutividade elétrica para sementes de *Pterogyne nitens* Tull. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 7, p. 635 - 640, 2012.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, p. 1 - 31, 2014.

AZEREDO, G. A.; BRUNO, R. L. A.; ANDRADE, L. A.; CUNHA, A. O. Germinação em sementes de espécies florestais da mata atlântica (Leguminosae) sob condições de casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, p. 11 - 16, 2003.

BAILLY, C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, v. 14, p. 93 - 107, 2004.

BAILLY, C., MAAROUF-BOUTEAU, H., CORBINEAU, F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, p. 806 - 814, 2008.

BANERJEE, B. D.; SETH, V.; BHATTACHARYA, A. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. **Toxicology Letters**, v. 107, p. 33 - 47, 1999.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, p. 113 - 123, 2006.

BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, p. 276 - 287, 1971.

BERTL, A.; KALDENHOFF, R. Function of a separate NH₃-pore in aquaporin TIP2;2 from wheat. **FEBS Letters**, v. 581, p. 5413 - 5417, 2007.

BESSE, M.; KNIPFER, T.; MILLER, A. J.; VERDEIL, J. L.; JAHN, T. P.; FRICKE, W. Developmental pattern of aquaporin expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, p. 4127 - 4142, 2011.

BEWLEY, J. D.; BRADFORD, K. J.; HILHORST, H. W. M.; NONOGAKI, H. Germination. In: **Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy**. 3rd Edition. London: Springer New York Heidelberg Dordrecht London. 2013, 392p.

BICALHO, U. O. Vida útil pós-colheita de mamão submetido a tratamento com cálcio e filme de PVC. Lavras, 1998, 145p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras.

BLACK, M.; CORBINEAU, F.; GRZESIK, M.; GUY, P.; CÔME, D. Carbohydrate metabolism in the developing and maturing wheat embryo in relation to its desiccation tolerance. **Journal Experiment of Botany**, v. 47, p. 161 - 69, 1996.

BORGES, E. E. L.; ATAÍDE, G. M. MATOS, A. C. B. Micropilar and embryonic events during hydration of *Melanoxylon brauna* Schott seeds. **Journal of Seed Science**, v. 37, p. 192 - 201, 2015.

BORGES, E. E. L.; BORGES, G. R. C.; SOARES, B. C. P.; PEREZ, J. G.; ANDRADE, S. C. Crescimento e mobilização de carboidrato em embrião de sementes de fedegoso (*Senna macranthera* Irwin et Barneby) durante a germinação. **Cerne**, v. 8, p. 69 - 76, 2002.

BORGES, E. E. L.; REZENDE, S. T.; BORGES, R. C. G.; PEREZ, S. C. J. G. A. Caracterização de Alfagalactosidase e sua relação com a germinação das sementes de *Caesalpinia peltophoroides* (Leguminosae Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v. 29, p. 525 - 533, 2005.

BOTS, M.; VERGELDT, F.; WOLTERS-ARTS, M.; WETERINGS, K.; VAN AS, H.; MARIANI, C. Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. **Plant Physiology**, v. 137, p. 1049 - 1056, 2005.

BOURSIAC, Y.; PRAK, S.; BOUDET, J.; POSTAIRE, O.; LUU, D. T.; TOURNAIRE-ROUX, C.; SANTONI, V.; MAUREL, C. The response of *Arabidopsis* root water transport to a challenging environment implicates reactive oxygen species and phosphorylation-dependant internalization of aquaporins. **Plant Signaling and Behavior**, v. 3, p. 1096 - 1098, 2008.

BOUTON, S.; VIAU, L.; LELIEVRE, E.; LIMAMI, A. M. A gene encoding a protein with a proline-rich domain (*Mtpprd1*), revealed by suppressive subtractive hybridization (SSH), is specifically expressed in the *Medicago truncatula* embryo axis during germination. **Journal of Experimental Botany**, v. 413, p. 825 - 832, 2005.

BOVERIS, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 429 - 435, 1984.

BRADFORD, K. J. Water relations in seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, J. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 351 - 396.

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

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 398 p.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J. F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405 - 414, 2001.

BRIAT, J. F.; LEBRUN, M. Plant responses to metal toxicity. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, v. 322, p. 43 - 54, 1999.

BUCKERIDGE, M. S.; ROCHA, D. C.; GRANT REID, J. S.; DIETRICH, S. M. C. Xiloglucan structure and post-germinative metabolism in seeds of *Copaifera langsdorfi* from savanna and forest populations. **Physiologia Plantarum**, v. 86, p. 145 - 151, 1992.

BUITINK, J.; VU, B. L.; SATOUR, P.; LEPRINCE, O. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated radicles of *Medicago truncatula* Gaertn. seeds. **Seed Science Research**, v. 13, p. 273 - 286, 2003.

CAI, F.; LAN-JU, M.; XIAO-LONG, A.; SHUN, G.; LIN, T.; FANG, C. Lipid peroxidation and antioxidant responses during seed germination of *Jatropha curcas*. **Journal of Agriculture and Biology**, v. 13, p. 25 - 30, 2011.

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

CARDOSO, A. A.; BORGES, E. E. L.; SOUZA, G. A.; SILVA, C. J.; PIRES, R. M. O.; DIAS, D. C. F. S. Seed imbibition and germination of *Plathymenia reticulata* Benth. (Fabaceae) affected by mercury: possible role of aquaporins. **Acta Botanica Brasilica**, v. 29, p. 285 - 291, 2015.

CARDOSO, P. F.; GRATÃO, P. L.; GOMES-JUNIOR, R. A.; MEDICI, L. O.; AZEVEDO, R. A. Response of *Crotalaria juncea* to nickel exposure. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 7, p. 267 - 272, 2005.

CARO, A.; PUNTARULO, S. Nitric oxide generation by soybean embryonic axes. Possible effect on mitochondrial function. **Free Radical Research**, v. 31, p. 205 - 212, 1999.

CARON, B. O.; SOUZA, V. Q.; CANTARELLI, E. B.; MANFRON, P. A.; BEHLING, A. ELOY, E. Crescimento em viveiro de mudas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S. F. Blake. submetidas a níveis de sombreamento. **Ciência Florestal**, v. 20, p. 683 - 689, 2010.

CARVAJAL, M.; CERDA, A.; MARTINEZ, V. Does calcium ameliorate the negative effect of NaCl on melon root water transport by regulating aquaporin activity? **New Phytologist**, v. 145, p. 439 - 447, 2000.

CARVAJAL, M.; COOKE, D. T.; CLARKSON, D. T. Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function. **Planta**, v. 199, p. 372 - 381, 1996.

CARVAJAL, M.; MARTINEZ, V.; ALCARAZ, C. F. Physiological function of water channels as affected by salinity in roots of paprika pepper. **Physiologia Plantarum**, v. 105, p. 95 - 101, 1999.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2000, 588p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003, v.1, 1039 p.

CARVALHO, P. E. R. **Guapuruvu**. Curitiba: Embrapa Florestas, 2005. 10 p. (Circular Técnica 104).

CASTRO, L. H. S.; FREITAS, C. H.; SANTOS, D. R.; SILVA, J. F. Composição do substrato e parâmetros fisiológicos de crescimento de mudas de guapuruvú (*Schizolobium parahyba* vell. Blake). **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 4, p. 70 - 75, 2014.

CHAITANYA, K. S. K.; NAITHANI, S. C. Role of superoxide, lipid peroxidation and superoxide dismutase in membrane perturbation during loss of viability in seeds of *Shorea robusta* Gaertn. f. **New Phytologist**, v. 126, p. 623 - 627, 1994.

CHANCE, B.; MAEHLEY, A. C. Assay of catalases and peroxidases. **Methods in Enzymology**, v. 2, p. 764 - 775, 1995.

CHAUMONT, F. BARRIEU, F. WOJCIK, E.; CHRISPEELS, M. J.; JUNG, R. Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1206 - 1215, 2001.

CHAUMONT, F.; MOSHELION, M.; DANIELS, M. J. Regulation of plant aquaporin Activity. **Biology of the Cell**, v. 97, p. 749 - 764, 2005.

CHEN, K.; ARORA, R. Dynamics of the antioxidant system during seed osmopriming, post-priming germination, and seedling establishment in Spinach (*Spinacia oleracea*). **Plant Science**, v. 180, p. 212 - 220, 2011.

CHEN, K.; FESSEHAIE, B.; ARORA, R. Aquaporin expression during seed osmopriming and post-priming germination in spinach. **Biologia Plantarum**, v. 57, p. 193 - 198, 2013.

CHEN, Q.; ZHANG, M.; SHEN, S. Effect of salt on malondialdehyde and antioxidant enzymes in seedling roots of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 33, p. 273 - 278, 2010.

CHEROBINI, E. A. I.; LAZAROTTO, M.; MUNIZ, M. F. B.; GIRARDI, L.; LIPPERT, D. B.; MACIEL, C. G. Qualidade de sementes e mudas de *Schizolobium parahyba* procedentes do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. **Cernea**, v. 16, p. 407 - 413, 2010.

CHO, U. H.; SEO, N. H. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. **Plant Science**, v. 168, p. 113 - 120, 2005.

COELHO, R. R. P.; SILVA, M. T. C.; BRUNO, R. L. A.; SANTANA, J. A. S. Influência de substratos na formação de mudas de guapuruvu (*Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake). **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p. 149 - 152, 2006.

COMHAIR, S. A. A.; ERZURUM, S.C. Antioxidant responses to oxidant-mediated lung diseases. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 283, p. 246 - 255, 2002.

CORPAS, F. J.; BARROSO, J. B.; DEL RÍO, L. A. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. **Trends Plant Science**, v. 6, p. 145 - 150, 2001.

CORPAS, F. J.; GUPTA, D. K.; PALMA, J. M. Production Sites of Reactive Oxygen Species (ROS) in Organelles from Plant Cells. In: GUPTA, D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. **Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress**. Springer, 2015, 373 p.

CORTE, V. B.; BORGES, E. E. L.; PONTES, C. A.; LEITE, I. T. A.; VENTRELLA, M. C.; MATHIAS, A. A. Mobilização de reservas durante a germinação das sementes e crescimento das plântulas de *Caesalpinia peltophoroides* Benth. (Leguminosae-Caesalpinioideae). **Revista Árvore**, v. 30, p. 941 - 949, 2006.

COSTA, Â. M.; GOBBI, E. L.; DEMUNER, V. G.; HEBLING, S. A. O efeito da inundação do solo sobre o crescimento inicial de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake, guapuruvu. **Natureza on line**, v. 4, p. 7 - 13, 2006.

DANIELS, M. J.; CHAUMONT, F.; MIRKOV, T. E.; CHRISPPEELS, M. J. Characterization of a new vacuolar membrane aquaporin sensitive to mercury at a unique site. **The Plant Cell**, v. 8, p. 587 - 599, 1996.

DAVIDE, A. C.; CARVALHO, L. R.; CARVALHO, M. L. M.; GUIMARÃES, R. M. Classificação fisiológica de sementes de espécies florestais pertencentes à família Lauraceae quanto à capacidade de armazenamento. **Cernea**, v. 9, p. 29 - 35, 2003.

DE GROOT, B. L.; GRUBMULLER, H. Water permeation across biological membranes: mechanism and dynamics of aquaporin-1 and GlpF. **Science**, v. 294, p. 2353 - 2357, 2001.

DEL LONGO, O. T.; GONZÁLEZ, A.; PASTORI, G. M.; TRIPPI, V. S. Antioxidant defenses under hyperoxygenic and hyperosmotic conditions in leaves of two lines of maize with differential sensitivity to drought. **Plant and Cell Physiology**, v. 34, p. 1023 - 1028, 1993.

DEUNER, C.; MAIA, M. S.; DEUNER, S.; ALMEIDA, A.; MENEGHELLO, G. E. Viabilidade e atividade antioxidante de sementes de genótipos de feijão-miúdo submetidos ao estresse salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, p. 711 - 720, 2011.

DIAS, D. C. F. S.; BHERING, M. C.; TOKUHISA, D.; HILST, P. C. Teste de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de cebola. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, p. 154 - 162, 2006.

DIAS, D. C. F. S.; MARCOS FILHO, J. Testes de condutividade elétrica para avaliação do vigor de sementes de soja (*Glycine max* (L.) Merrill). **Scientia Agricola**, v. 53, p. 31 - 42, 1996.

DOYLE, J. J.; DOYLE J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13 - 15, 1990.

DRESCH, D.; MASETTO, T. E.; SCALON, S. P.Q. *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg seed desiccation: influence on vigor and nucleic acids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 2217 - 2228, 2015.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350 - 356, 1956.

DURATEX. **Árvores no Brasil**. São Paulo: Duratex, Prêmio Editorial, 1989.

DUTRA, A. S.; FILHO, S. M.; TEÓFILO, E. M. Condutividade elétrica em sementes de feijão caupi. **Revista Ciência Agronômica**, v. 37, p. 166 - 170, 2006.

ERIYARNREMU, G. E.; ASAGBA, S. O.; ATOE, K. Lipid peroxidation, superoxide dismutase and mitochondria ATPases in the radicle of germinating beans (*Vigna unguiculata*) exposed to different doses of cadmium and lead. **Plant Archives**, v. 7, p. 39 - 45, 2007.

ESTERBAUER, H.; SCHAUR, R. J.; ZOLLNER, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 11, p. 81 - 128, 1991.

FARIA, J. M. R.; BUITINK, J.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; HILHORST, H. W. M. Changes in DNA and microtubules during loss and re-establishment of desiccation-tolerance in germinating *Medicago truncatula* seeds. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2119 - 2130, 2005.

FARID, M.; SHAKOOR, M. B.; EHSAN, S.; ALI, S.; ZUBAIR, M.; HANIF, M. A. Morphological, physiological and biochemical responses of different plant species to Cd

stress. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, v. 3, p. 53 - 60, 2013.

FARLORA, R.; VALENZUELA-MUÑOZ, V.; CHÁVEZ-MARDONES, J.; GALLARDO-ESCÁRATE, C. Aquaporin family genes exhibit developmentally-regulated and host-dependent transcription patterns in the sea louse *Caligus rogercresseyi*. **Gene**, v. 585, p. 119 - 127, 2016.

FERRAZ, I. D. K.; SAMPAIO, P. T. B. Método simples de armazenamento das sementes de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D. C. – Meliaceae). **Acta Amazônica**, v. 26, p. 137 - 144, 1996.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, p. 61 - 68, 1997.

FERREIRA, R. A.; OLIVEIRA, L. M.; TONETTI, O. A. O.; DAVIDE, A. C. Comparação da viabilidade de sementes de *Schizolobium parahyba* (vell.) Blake – Leguminosae Caesalpinioideae, pelos testes de germinação e tetrazólio. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, p. 73 - 79, 2007.

FERREIRA, R. L. Teste de condutividade elétrica para estimar o vigor de sementes de urucum. **Multi-Science Journal**, v. 1, p. 3 - 10, 2015.

FESSEL, S. A.; PANOBIANCO, M.; SOUZA, C. R.; VIEIRA, R. D. Teste de condutividade elétrica em sementes de soja armazenadas sob diferentes temperaturas. **Bragantia**, v. 69, p. 207 - 214, 2010.

FISCHER, R. L.; BENNETT, A. B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. **Annual Review Physiology Plant Molecular Biology**, v. 42, p. 675 - 703, 1991.

FLAVIO, J. J. P.; PAULA, R. C. Testes de envelhecimento acelerado e de condutividade elétrica em sementes de *Dictyoloma vandellianum* A. Juss. **Scientia Forestalis**, v. 38, p. 391 - 399, 2010.

FLORES, A. V.; BORGES, E. E. L.; GUIMARÃES, V. M.; GONÇALVES, J. F. C.; ATAÍDE, G. M.; BARROS, D. P. Atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott sob diferentes temperaturas. **Cerne**, v. 20, p. 401 - 408, 2014.

FOUQUET, R.; LÉON, C.; OLLAT, N.; BARRIEU, F. Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. **Plant Cell Reports**, v. 27, p. 1541 - 1550, 2008.

FOYER, C. H.; DESCOURVIÈRES, P.; KUNERT, K. J. Protection against oxygen radicals: an important defense mechanism studied in transgenic plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 17, p. 507 - 523, 1994.

FOYER, C. H.; LELANDAIS, M. The roles of ascorbate in the regulation of photosynthesis. In: **Photosynthetic Responses to the Environment**. ed. H. Y.

Yamamoto, pp. 88 - 101. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, USA. 1993.

FOYER, CH.; NOCTOR, G. Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. **Plant Cell**, v. 17, p. 1866 - 1875, 2005.

FREIRE, J. M., PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; SANTOS, A. L. F. PEREIRA, M. B. Intra- and inter-population variation in seed size and dormancy in *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake in the Atlantic Forest. **Ciência Florestal**, v. 25, p. 897 - 907, 2015.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y.; TAKAHASHI, F.; NARUSAKA, Y.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Currents Opinion Plant Biology**, v. 9, p. 436 - 442, 2006.

FUKUHARA, T.; KIRCH, H. H.; BOHNERT, H. J. Expression of Vp1 and water channel proteins during seed germination. **Plant, Cell & Environment**, v. 22, p. 417 - 424, 1999.

GAJEWSKA, E.; SKLODOWSKA, M. Differential biochemical responses of wheat shoots and roots to nickel stress: antioxidative reactions and proline accumulation. **Plant Growth Regulation**, v. 54, p. 179 - 188, 2008.

GAO, Y. P.; YOUNG, L.; BONHAM-SMITH, P.; GUSTA, L. V. Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions. **Plant Molecular Biology**, v. 40, p. 635 - 644, 1999.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. J.; BAYOUMI, A. E.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; MOTAS, M.; REGUERA, R. M.; ORDÓÑEZ, C.; BALAÑA-FOUCE, R.; ORDÓÑEZ, D. Alterations of the glutathioneredox balance induced by metals in CHO-K1 cells. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 132, p. 365 - 373, 2002.

GASPAR, C. M.; NAKAGAWA, J. Teste de condutividade elétrica em função do número de sementes e da quantidade de água para sementes de milho. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, p. 70 - 76, 2002.

GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Revista Brasil de Botânica**, v. 34, p. 481 - 491, 2011.

GATTOLIN, S.; SORIEUL, M.; FRIGERIO, L. Mapping of tonoplast intrinsic proteins in maturing and germinating *Arabidopsis* seeds reveals dual localization of embryonic TIPs to the tonoplast and plasma membrane. **Molecular Plant**, v. 4, p. 180 - 189, 2011.

GAY, C.; GEBICKI, J. M. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferricyxlenol orange hydroperoxide assay. **Analytical Biochemistry**, v. 284, p. 217 - 220, 2000.

GE, F. W.; TAO, P.; ZHANG, Y.; WANG, J. B. Characterization of AQP gene expressions in *Brassica napus* during seed germination and in response to abiotic stresses. **Biologia Plantarum**, v. 58, p. 274 - 282, 2014.

GEEBELEN, W.; VANGRONSVELD, J.; ADRIANO, D. C.; VAN POUCKE, L. C.; CLIJSTERS, H. Effects of PbEDTA and EDTA on oxidative stress reactions and mineral uptake in *Phaseolus vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, v. 115, p. 377 - 384, 2002.

GIANNOPOLITIS, C. N.; RIES, S. K. Superoxide dismutases. **Plant Physiology**, v. 59, p. 309 - 314, 1977.

GIDROL, X.; LIN, W. S.; DEGOUSEE, N.; YIP, S. F.; KUSH, A. Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. **European Journal Biochemistry**, v. 15, p. 8 - 21, 1994.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 909 - 930, 2010.

GOLDFARB, M.; DUARTE, M. E. M.; MATA, M. E. R. M. C.; PIMENTEL, L. W.; SEVERINO, L. S. Cinética de congelamento criogênico de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). **Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal**, v. 7, p. 195 - 203, 2010.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, v. 32, p. 481 - 494, 2005.

GROTTO, D.; MARIA, L. S.; VALENTINI, J.; PANIZ, C.; SCHMITT, G.; GARCIA, S. C. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. **Química Nova**, v. 32, p. 169 - 174, 2009.

GUPTA, A. B. SANKARARAMAKRISHNAN, R. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. **BMC Plant Biology**, v. 9, p. 1 - 28, 2009.

GUPTA, D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. **Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress**. Springer, 2015, 373 p.

HACHEZ, C.; HEINEN, R. B.; DRAYE, X.; CHAUMONT, F. The expression of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. **Plant Molecular Biology**, v. 68, p. 337 - 353, 2008.

HADDOUB, R.; RÜTZLER, M.; ROBIN, A.; FLITSCH, S. L. Design, synthesis and assaying of potential aquaporin inhibitors. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 190, p. 385 - 402, 2009.

HAGERMAN, A. E.; AUSTIN, P. J. Continuous spectrophotometric assay for plant pectinmethylesterase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 440 - 444, 1986.

HAVIR, E. A.; McHALE, N. A. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. **Plant Physiology**, v. 84, p. 450 - 455, 1987.

HEATH, R. L.; PACKER, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast.I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. **Archieve Biochemystry and Byophysics**, v. 125, p. 189 - 198, 1968.

HEINEN, R. H.; YE, Q.; CHAUMONT, F. Role of aquaporins in leaf physiology. **Journal of Experimental Botany**, v. 11, p. 2971 - 2985, 2009.

HENDRY, G. A. F.; FINCH-SAVAGE, W. E.; THORPE, P. C.; ATHERTON, N. M.; BUCKLAND, S. M.; NILSSON, K. A.; SEEL, W. E. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. **New Phytologist**, v. 122, p. 273 - 279, 1992.

HENZLER, T.; YE, Q.; STEUDLE, E. Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. **Plant Cell Environ**, v. 27, p. 1184 - 1195, 2004.

HONG, S.; SOWNDHARARAJAN, K.; JOO, T.; LIM, C.; CHO, H.; KIM, S.; KIM, G.; JHOO, J. Ethanol and supercritical fluid extracts of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) increase gene expression of antioxidant enzymes in HepG2 cells. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 4 p. 147 - 152, 2015.

HOSSAIN, M. A.; PIYATIDA, P.; DA SILVA, J. A. T.; FUJITA, M. Molecular Mechanism of Heavy Metal Toxicity and Tolerance in Plants: Central Role of Glutathione in Detoxification of Reactive Oxygen Species and Methylglyoxal and in Heavy Metal Chelation. **Journal of Botany**, v. 1, p. 1 - 37, 2012.

HUB, J. S.; GROOT, B. L. Does CO₂ permeate through Aquaporin-1? **Biophysical Journal**, v. 91, p. 842 - 848, 2006.

HUSAIN, S., R.; CILURD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phyrochemistry**, v. 26, p. 2489 - 2491, 1987.

JACOBY, R. P.; LI, L.; HUANG, S.; LEE, C. P.; MILLAR, A. H.; TAYLOR, N. L. Mitochondrial composition, function and stress response in plants. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 54, p. 887 - 906, 2012.

JAGATHEESWARI, D.; RANGANATHAN, P. Influence of Mercuric Chloride on Seed Germination, Seedling Growth and Biochemical Analysis of Green Gram (*Vigna radiata* (L.) Wilczek. Var. Vamban-3). **International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives**, v. 3, p. 291 - 295, 2012.

JAIN, N.; ASCOUGH, G. D.; STADEN, J. V. A smoke-derived butenolide alleviates HgCl₂ and ZnCl₂ inhibition of water uptake during germination and subsequent growth of tomato - Possible involvement of aquaporins. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1422 - 1427, 2008.

JAIN, R. K. Study of heavy metals effect in response to linum seed germination. **African Journal of Plant Science**, v. 7, p. 93 - 109, 2013.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in root water uptake. **Annals of Botany**, v. 90, p. 301 - 313, 2002.

JEAN-PHILIPPE, S. R.; LABBÉ, N.; DAMAY, J.; FRANKLIN, J. A.; HUGHES, K. Effect of Mercuric Compounds on Pine and Sycamore Germination and Early Survival. **American Journal of Plant Sciences**, v. 3, p. 150 - 158, 2012.

JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; JOHANSSON, I.; GUSTAVSSON, S.; SJÖVALL, S.; FRAYSSE, L.; WEIG, A. R.; KJELLBOM, P. The Complete Set of Genes Encoding Major Intrinsic Proteins in Arabidopsis Provides a Framework for a New Nomenclature for Major Intrinsic Proteins in Plants. **Plant Physiology**, v. 126, p. 1358 - 1369, 2001.

JÚNIOR G. B.; BELINI, U. L. Produção de lâminas e manufatura de compensados a partir da madeira de guapuruvu (*Schizolobium parayba blake.*) proveniente de um plantio misto de espécies nativas. **Cerne**, v. 8, p. 1 - 16, 2002.

KALDENHOFF, R.; RIBAS-CARBO, M.; FLEXAS, J.; LOVISOLO, C.; HECKWOLF, M.; UEHLEIN, N. Aquaporins and plant water balance. **Plant, Cell & Environment**, v. 31, p. 658 - 666, 2008.

KANAI, M.; NISHIMURA, M.; AYHASHI, M. A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5. **Plant Journal**, v. 62, p. 936 - 947, 2010.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, p. 315 - 319, 1976.

KERKSICK, C.; WILLOUGHBY, D. The antioxidant role of glutathione and n-acetylcysteine supplements and exercise induced oxidative stress. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 2, p. 38 - 44, 2005.

KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995.

KOIVULA, M. J.; EEVA, T. Metal-related oxidative stress in birds. **Environmental Pollution (Barking Essex, 1987)**, v. 158, p. 2359 - 2370, 2010.

KRAMER, U.; CLEMENS, S. Molecular biology of metal homeostasis and detoxification. In: TAMÁS, M. J.; MARTINOIA, E. **Topics in current genetics**. pp. 216 - 271, 2005.

KRANNER, I., COLVILLE, L. Metals and seeds: Biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 72, p. 93 - 105, 2011.

KRANNER, I.; CHEN, H.; PRITCHARD, H. W.; PEARCE, S. R.; BIRTIC, S. Internucleosomal DNA fragmentation and loss of RNA integrity during seed ageing. **Plant Growth Regulation**, v. 63, p. 63 - 72, 2011.

KRANNER, I.; ROACH, T.; BECKETT, R. P.; WHITAKER, C.; MINIBAYEVA, F. V. Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 805 - 811, 2010.

KUMAR, A.; PRASAD, M. N. V.; SYTAR, O. Lead toxicity, defense strategies and associated indicative biomarkers in *Talinum triangulare* grown hydroponically. **Chemosphere**, v. 89, p. 1056 - 1165, 2012.

KUO, M. C.; KAO, C. H. Aluminum effects on lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in rice leaves. **Biologia Plantarum**, v. 46, p. 149 - 152, 2003.

LEWIS, G.; SCHRIRE, B., MACKINDER, B., LOCK, M. **Legumes of the World**. The Royal Botanical Gardens, Kew, 2005.

LI, C. X.; FENG, S. L.; SHAO, Y.; JIANG, L. N.; LU, X. Y.; HOU, X. L. Effects of arsenic on seed germination and physiological activities of wheat seedlings. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, p. 725 - 732, 2007.

LI, G. W.; PENG, Y. H.; YU, X.; ZHANG, M. H.; CAI, W. M.; SUN, W. N.; SU, W. A. Transport functions and expression analysis of vacuolar membrane aquaporins in response to various stresses in rice. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 1879 - 1888, 2008.

LIMA, J. P. C.; FILHO, J. A. M.; FREIRE, L. R.; VIEIRA, F. Absorção de nitrogênio para *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, em fase de viveiro em três ambientes. **Floresta e Ambiente**, v. 7, p. 11 - 18, 2000.

LIU, C.; FUKUMOTO, T.; MATSUMOTO, T.; GENA, P.; FRASCARIA, D.; KANEKO, T.; KATSUHARA, M.; ZHONG, S.; SUN, X.; ZHU, Y.; IWASAKI, I.; DING, X.; CALAMITA, G.; KITAGAWA, Y. Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 151 - 158, 2013.

LIU, H. Y.; YU, X.; CUI, D. Y.; SUN, M. H.; SUN, W. N.; TANG, Z. C.; SU, W. A. The role of water channel proteins and nitric oxide signaling in rice seed germination. **Cell Research**, v. 17, p. 638 - 649, 2007.

LOPES, L. S.; GALLÃO, M. I.; BERTINI, C. H. C. M. Mobilisation of reserves during germination of *Jatropha* seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, p. 371 - 378, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 2008, 384p.

LOVISOLO, C.; SECCHI, F.; NARDINI, A.; SALLEO, S.; BUFFA, R.; SCHUBERT, A. Expression of PIP1 and PIP2 aquaporins is enhanced in olive dwarf genotypes and is

related to root and leaf hydraulic conductance. **Physiologia Plantarum**, v. 130, p. 543 - 551, 2007.

MACFARLANE, G. R. Chlorophyll a fluorescence as a potential biomarker of zinc stress in the grey mangrove, *Avicennia marina*. Bull. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**, v. 70, p. 90 - 96, 2003.

MAGALHÃES, S. R.; BORGES, E. E. L.; BERGER, A. P. A. Alterações nas atividades das enzimas alfa-galactosidase e poligalacturonase e nas reservas de carboidratos de sementes de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (guapuruvú) durante a germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, p. 253 - 261, 2009.

MAGALHÃES, S. R.; BORGES, E. E. L.; BERGER, A. P. A. Mobilização de reservas no eixo embrionário e nos cotilédones de sementes de *Schizolobium parahyba* (vell.) S. F. Blake durante a germinação. **Ciência Florestal**, v. 20, p. 589 - 595, 2010.

MAGGIO, A.; JOLY, R. J. Effects of mercuric chloride on the hydraulic conductivity of tomato root systems (evidence for a channel-mediated water pathway). **Plant Physiology**, v. 109, p. 331 - 335, 1995.

MALECKA, A.; JARMUSZKIEWICZ, W.; TOMASZEWSKA, B. Antioxidant defense to lead stress in subcellular compartments of pea root cells. **Acta Biochimica Polonica**, v. 48, p. 687 - 698, 2001.

MARINI, P.; BANDEIRA, J. M.; BORBA, I. C. G.; MARTINS, A. B. N.; MORAES, D. M.; AMARANTE, L.; VILLELA, F. A. Antioxidant activity of corn seeds after thermal stress. **Ciência Rural**, v. 43, p. 951 - 956, 2013.

MARQUES, M. A.; PAULA, R. C.; RODRIGUES, T. J. D. Adequação do teste de condutividade elétrica para determinar a qualidade fisiológica de sementes de jacarandá-bahia (*Dalbergia nigra* (VELL.) Fr.All. ex Benth.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 24, p. 271 - 278, 2002.

MARTÍNEZ-BALLESTA, M. C.; DIAZ, R.; MARTÍNEZ, V.; CARVAJAL, M. Different blocking effects of HgCl₂ and NaCl on aquaporins of pepper plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 160, p. 1487 - 1492, 2003.

MARTÍNEZ-BALLESTAA, M. C.; PÉREZ-SÁNCHEZ, H.; MORENO, D. A.; CARVAJAL, M. Plant plasma membrane aquaporins in natural vesicles as potential stabilizers and carriers of glucosinolates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 318 - 326, 2016.

MARTINS, C. C.; BORGES, A. S.; PEREIRA, M. R. R.; LOPES, M. T. G. Posição da semente na semeadura e tipo de substrato sobre a emergência e crescimento de plântulas de *Schizolobium parahyba* (Vell.) S.F. Blake. **Ciência Florestal**, v. 22, p. 845 - 852, 2012.

MARTRE, P.; MORILLON, R.; BARRIEU, F.; NORTH, G. B.; NOBEL, P. S.; CHRISPEELS, M. J. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. **Plant Physiology**, v. 130, p. 2101 - 2110, 2002.

MARTRE, P.; NORTH, G. B.; NOBEL, P. S. Hydraulic Conductance and Mercury-Sensitive Water Transport for Roots of *Opuntia acanthocarpa* in Relation to Soil Drying and Rewetting. **Plant Physiology**, v. 126, p. 352 - 362, 2001.

MASETTO, T. E.; FARIA, J. M. R.; DAVIDE, A. C.; SILVA, E. A. A. Tolerância à dessecação e integridade do DNA em sementes de *Eugenia pleurantha* O. Berg. (mytaceae). **Revista brasileira de Sementes**, v. 30, p. 175 - 180, 2008.

MASETTO, T. E.; FARIA, J. M. R.; FRAIZ, A. C. R. Loss and re-establishment of desiccation tolerance in the germinated seeds of *Sesbania virgata* (Cav.) (Pers.). **Acta Scientiarum**, v. 37, p. 313 - 320, 2015.

MASETTO, T. E.; FARIA, J. M.; FRAIZ, A. C. R. Re-induction of desiccation tolerance after germination of *Cedrela fissilis* Vell. Seeds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 1273 - 1285, 2014.

MATHEUS, M. T.; LOPES, J. C. Termoterapia em Sementes de Guapuruvú (*Schyzolobium parahyba* (Vell.) Blake). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 330 - 332, 2007.

MATOS, A. C. B.; BORGES, E. E. L.; SILVA, L. J. Fisiologia da germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. sob diferentes temperaturas e tempos de exposição. **Revista Árvore**, v. 39, p. 115 - 125, 2015.

MATSUI, K.; HIJIYA, K.; TABUCHI, Y.; KAJIWARA, T. Cucumber Cotyledon Lipoxygenase during Postgerminative Growth. Its Expression and Action on Lipid Bodies. **Plant Physiology**, v. 119, p. 1279 - 1287, 1999.

MAUREL, C.; REIZER, J.; SCHROEDER, J. I.; CHRISPEELS, M. J. MAUREL, C.; REIZER, J.; SCHROEDER, J. I.; CHRISPEELS, M. J. The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. **EMBO Journal**, v. 12, p. 2241 - 2247, 1993.

MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.; SANTONI, V. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. **Annual Review Plant Biology**, v. 59, p. 595 - 624, 2008.

McELRONE, A. J.; BICHLER, J.; POCKMAN, W. T.; ADDINGTON, R. N.; LINDER, C. R.; JACKSON, R. B. Aquaporin-mediated changes in hydraulic conductivity of deep tree roots accessed via caves. **Plant, Cell & Environment**, v. 30, p. 1411 - 1421, 2007.

MEI, Y.; SONG, S. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. **Journal of Zhejiang University SCIENCE B Biomedicine & Biotechnology**, v. 11, p. 965 - 972, 2010.

MELLO, J. I. O.; BARBEDO, C. J.; SALATINO, A.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L. Reserve carbohydrates and lipids from the seeds of four tropical tree species with different sensitivity to desiccation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, p. 889 - 899, 2010.

MELLO, L. M.; COSTA, L. S.; SERROTE, C. M. L.; REINIGE, L. R. Isolamento de DNA genômico utilizando sementes de *Erythrina cris-ta-galli* L. (Corticeira-dobanhado) e *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Guapuruvu). **Revista Thema**, v. 12, p. 49 - 60, 2015.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426 - 428, 1959.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 246, p. 6886 - 6890, 1971.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Boletim Técnico do Instituto Agrônômico do Norte**. Tropicos.org. Saint Louis, Missouri. Disponível em: <<http://www.tropicos.org/Name/13006414?tab=distribution>>. Acesso em: 18 nov. 2016.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 7, p. 405 - 409, 2002.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; GOLLERY, M.; VAN BREUSEGEM, F. Reactive oxygen gene network of plants. **Trends Plant Science**, v. 9, p. 490 - 498, 2004.

MITTLER, R.; VANDERAUWERA, S.; SUZUKI, N.; MILLER, G.; TOGNETTI, V. B.; VANDEPOELE, K.; GOLLERY, M.; SHULAEV, V.; VAN BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? **Trends Plant Science**, v. 16, p. 300 - 309, 2011.

MOHAMMADI, M.; KARR, A. L. Superoxide anion generation in effective and ineffective soybean root nodules. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, p. 1023 - 1029, 2001.

MØLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 561 - 591, 2001.

MOROHASHI, Y. Peroxidase activity develops in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle protrusion. **Journal Experimental Botany**, v. 53, p. 1643 - 1650, 2002.

MUSTAFA, G.; KOMATSU, S. Toxicity of heavy metals and metal-containing nanoparticles on plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1864, p. 932 - 944, 2016.

NAJI, K. M.; DEVARAJ, V. R. Antioxidant and other biochemical defense responses of *Macrotyloma uniflorum* (Lam.) Verdc. (Horse gram) induced by high temperature and salt stress. **Brazilian society of plant physiology**, v. 23, p. 187 - 195, 2011.

NASCIMENTO, K. J. T.; OLIVEIRA, J. A.; CAMBRAIA, J.; OLIVA, M. A. Alterações do sistema de defesa antioxidativo em plântulas de *Stizolobium aterrimum* e *Canavalia*

ensiformis expostas ao arsênio. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 6, p. 37- 42, 2011.

NISGOSKI, S.; MUÑIZ, G. I. B.; TRIANOSKI, R. MATOS, J. L. M. VENSON, I. Características anatômicas da madeira e índices de resistência do papel de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake proveniente de plantio experimental. **Scientia forestalis**, Piracicaba, v. 40, p. 203 - 211, 2012.

NOCTOR, G., MHAMDI, A., CHAOUCH, S., HAN, Y., NEUKERMANS, J., MARQUEZ-GARCIA, B., QUEVAL, G. Glutathione in plants: An integrated overview. **Plant. Cell and Environment**, v. 35, p. 454 - 484, 2012.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Germination - Still a mystery. **Plant Science**, v. 179, p. 574 - 581, 2010.

NONOGAKI, H.; BASSEL, G. W.; BEWLEY, J. D. Gene expression during germination. **Plant Science**, v. 179, p. 574 - 581, 2010.

NOVIKOVA, G. V.; TOURNAIRE-ROUXB, C.; SINKEVICH, I. A.; LITYAGINAA, S. V.; MAUREL, C.; OBROUCHEVAA, N. Vacuolar biogenesis and aquaporin expression at early germination of broad bean seeds. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 82, p. 123 - 132, 2014.

NOZZOLILLO, C.; THIE, I. A comparative study of mobilization of lipid and carbohydrate reserves during germination of seeds of three species of *Impatiens* (Balsaminaceae): *I. balsamina* L., *I. capensis* Meerb. and *I. ballida* Nutt. **Torrey Botanical Club**, v. 111, p. 200 - 208, 1984.

OBROUCHEVA, N. V.; LITYAGINA, S. V.; NOVIKOVA, G. V.; SINKEVICH, I. A. Vacuolar status and water relations in embryonic axes of recalcitrant *Aesculus hippocastanum* seeds during stratification and early germination. **AoB Plants**, v. 8, p. 1 - 14, 2012.

OLIVEIRA, J. T. A.; MORAES, S. M. D.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; VASCONCELOS, I. M. Protein and lecithin mobilization during *Erythrina velutina* forma *Aurantiaca* seed germination and seedling growth in the dark. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 10, p. 25 - 30, 1998.

OLSZEWER, E. **Radicais livres em medicina**. São Paulo: BYK, 1995. 204p.

ORTEGA-VILLASANTE, C.; RELLÁN-ALVAREZ, R.; DEL CAMPO, F. F.; CARPENA-RUIZ, R. O.; HERNÁNDEZ, L. E. Cellular damage induced by cadmium and mercury in *Medicago sativa*. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, p. 2239 - 2251, 2005.

PANDA, K. K.; LENKA, M.; PANDA, B. B. Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. II. Plant-availability, tissue-concentration and genotoxicity of mercury from agricultural soil contaminated with solid waste assessed in barley (*Hordeum vulgare* L.). **Environmental Pollution (Barking Essex, 1987)**, v. 76, p. 33 - 42, 1992.

PARK, W.; SCHEFFLER, B. E.; BAUER, P. J.; CAMPBELL, B. T. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC Plant Biology**, v. 10, p. 142, 2010.

PARMAR, G.; CHANDA, V. Effects of mercury and chromium on peroxidase and IAA oxidase enzymes in the seedlings of *Phaseolus vulgaris*. **Turkish Journal of Biology**, v. 29, p. 15 - 21, 2005.

PASTORI, G.; FOYER, C. H. Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress: the central role of 'redox' and abscisic acid mediated controls. **Plant Physiology**, v. 129, p. 460 - 468, 2002.

PATEL, A.; PANDEY, V.; PATRA, D. D. Metal absorption properties of *Mentha spicata* grown under tannery sludge amended soil-its effect on antioxidant system and oil quality. **Chemosphere**, v. 147, p. 67 - 73, 2016.

PATRA, J.; SUBHADRA, A. V.; PANDA, B. B. Cycloheximide and buthionine sulfoximine prevent induction of genotoxic adaptation by cadmium salt against methyl mercuric chloride in embryonic shoot cells of *Hordeum vulgare* L. **Mutation Research**, v. 348, p. 13 - 18, 1995.

PATRA, M.; BHOWMIK, N.; BANDOPADHYAY, B.; SHARMA, A. Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 52, p. 199 - 223, 2004.

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

PEREIRA, M. O.; SOUZA-LEAL, T.; LAGAZZI, G.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Avaliação de métodos de escarificação na superação de dormência de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Fabaceae: Caesalpinioideae). **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 4, p. 119 - 129, 2011.

PIETROBOM, R. C. V.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia e ontogênese do pericarpo de *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake (Fabaceae, Caesalpinioideae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, p. 767 - 779, 2004.

PIMENTEL, C. **A relação da planta com a água**. Seropédica: Edur, 2004. 191p.

PONTES, C. A. Influência das enzimas α -galactosidase e poligalacturonase na germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (leguminosae-Papilionoidea). 2008. 55 f. Tese (Doutorado em Ciências Florestais) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

PONTES, C. A.; BORGES, E. E. L.; BORGES, R. C. G.; SOARES, C. P. B. Mobilização de reservas em sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vogel) J. F. Macbr. (Garapa) durante a embebição. **Revista Árvore**, v. 26, p. 593 - 601, 2002.

PUKACKA, S.; RATAJCZAK, E. Age-related biochemical changes during storage of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. **Seed Science Research**, v. 17, p. 45 - 53, 2007.

QI, S.; WANG, R.; CHAITRA, G. K. M.; TORRES, J.; HU, X.; FANE, A. G. Aquaporin-based biomimetic reverse osmosis membranes: Stability and long term performance. **Journal of Membrane Science**, v. 508, p. 94 - 103, 2016.

QOUTA, L. A. WALDRON, K. W.; BAYDOUN, E. A. H.; BRETT, C. T. Changes in seed reserves and cell wall composition of component organs during germination of cabbage (*Brassica oleracea*) seeds. **Journal of Plant Physiology**, v. 138, p. 700 - 707, 1991.

REDDY, P. S.; RAO, T. S. R. B.; SHARMA, K. K.; VADEZ, V. Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.) **Plant Gene**, v. 1, p. 18 - 28, 2015.

REGAZZI, A. J. Teste para verificar a identidade de modelos de regressão e a igualdade de alguns parâmetros num modelo polinomial ortogonal. **Revista Ceres**, v. 40, p. 176 - 195, 1993.

REN, C.; KERMODE, A. An Increase in Pectin Methyl Esterase Activity Accompanies Dormancy Breakage and Germination of Yellow Cedar Seeds. **Plant Physiology**, v. 124, p. 231 - 242, 2000.

RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; PELÚZO, M. C. G.; COSTA, NEUSA, M. B.; MATTA, S. L. P.; QUEIROZ, M. E. L. R. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, p. 133 - 145, 2005.

ROBERTS, E. H. Predicting the storage life of seeds. **Seed Science and Technology**, v. 1, p. 499 - 514, 1973.

SAKURAI, J.; ISHIKAWA, F.; YAMAGUCHI, T.; UEMURA, M.; MAESHIMA, M. Identification of 33 Rice Aquaporin Genes and Analysis of Their Expression and Function. **Plant, Cell & Physiology**, v. 46, p. 1568 - 1577, 2005.

SALT, D. Responses and adaptations of plants to metal stress. In: HAWKESFORD, M. J. (Ed.). **Molecular Analysis of Plant Adaptations to the Environment**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 159-179, 2001.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, p. 287 - 294, 1998.

SARATH, G.; HOU, G.; BAIRD, L. M.; MITCHELL, R. B. Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C (4)-grasses. **Planta**, v. 226, p. 697 - 708, 2007.

SAVAGE, D. F.; STROUD, R. M. Structural basis of aquaporin inhibition by mercury. **Journal of Molecular Biology**, v. 368, p. 607 - 617, 2007.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 995 - 1014, 2005.

SCHELER, C.; WEITBRECHT, K.; PEARCE, S. P.; HAMPSTEAD, A.; BÜTTNER-MAINIK, A.; LEE, K. J. D.; VOEGELE, A.; ORACZ, K.; DEKKERS, B. J. W.; WANG, X.; WOOD, A. T. A.; BENTSINK, L.; KING, J. R.; KNOX, J. P.; HOLDSWORTH, M. J.; MÜLLER, K.; LEUBNERMETZGER, G. Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases. **Plant Physiology**, v. 167, p. 200 - 215, 2015.

SCHLERETH, A.; BECKER, C.; HORSTMANN, C.; TIEDEMANN, J.; MÜNTZ, K. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedlings growing of vetch (*Vicia sativa* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, p. 1423 - 1433, 2000.

SCHOPFER, P.; PLACHY, C.; FRAHRY, G. Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1591 - 1602, 2001.

SCHÜTZENDÜBEL, A.; POLLE, A. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1351 - 1365, 2002.

SCHUURMANS, J. A.; VAN DONGEN, J. T.; RUTJENS, B. P.; BOONMAN, A.; PIETERSE, C. M.; BORSTLAP, A. C. Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies. **Plant Molecular Biology**, v. 53, p. 633 - 645, 2003.

SECCHI, F.; ZWIENIECKI, M. A. Down-regulation of plasma intrinsic protein1 aquaporin in poplar trees is detrimental to recovery from embolism. **Plant Physiology**, v. 164, p. 1789 - 1799, 2014.

SEREDA, F.; REISSMANN, C. B.; MARQUES, R.; BRITTEZ, R. M. Nutritional aspects of seeds and plantule of guapuruvu developed in two substrates. **Scientia Agraria**, v. 9, p. 575 - 579, 2008.

SHARMA, S. S.; DIETZ, K. J. The relationship between metal toxicity and cellular redox imbalance. **Trends Plant Science**, v. 14, p. 43 - 50, 2009.

SILVA, A.; A. GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. **Ciência Rural**, v. 40, p. 994 - 1002, 2010.

SILVA, C. T.; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, p. 38 - 42, 2014.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos** - métodos químicos e biológicos. Viçosa, UFV, 1990, 165 p.

SILVA, P. A.; ABREU, C. M. P.; CORRÊA, A. D.; ASMAR, S. A. Modificações nas atividades da poligalacturonase e pectinametilesterase em morangos armazenados a temperatura ambiente. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 1953 - 1958, 2009.

SINGH, H. P.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K.; ARORA, K. Arsenic-induced root growth inhibition in mung bean (*Phaseolus aureus* Roxb.) is due to oxidative stress resulting from enhanced lipid peroxidation. **Plant Growth Regulation**, v. 53, p. 65 - 73, 2007.

SINGH, N.; RAJ, A.; KHARE, P. B.; TRIPATHI, R. D.; JAMIL, S. Arsenic accumulation pattern in 12 Indian ferns and assessing the potential of *Adiantum capillsveneris*, in comparison to *Pteris vittata*, as arsenic hyperaccumulator. **Bioresour Technol**, v. 101, p. 8960 - 8968, 2010.

SITRIT, Y.; HADFIELD, K. A.; BENNETT, A. B.; BRADFORD, K.J.; DOWNIE, A. B. Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. **Plant Physiology**, v. 121, p. 419 - 428, 1999.

SOUZA, T. V.; VOLTOLINI, C. H.; SANTOS, M. PAULILO, M. T. S. Water absorption and dormancy-breaking requirements of physically dormant seeds of *Schizolobium parahyba* (Fabaceae – Caesalpinioideae). **Seed Science Research**, v. 22, p. 169 - 176, 2012.

SRIVASTAVA, A. K.; RAMASWAMY, N. K.; SUPRASANNA P.; D'SOUZA S. F. Genome-wide analysis of thiourea-modulated salinity stress-responsive transcripts in seeds of *Brassica juncea*: identification of signalling and effector components of stress tolerance. **Annals of Botany**, v. 106, p. 663 - 674, 2010.

STEUDLE, E.; PETERSON, C. A. How does water get through roots? **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 775 - 788, 1998.

ŠTOLFA, I.; PFEIFFER, T. Ž.; ŠPOLJARIĆ, D.; TEKLIĆ, T.; LONČARIĆ, Z. Heavy Metal-Induced Oxidative Stress in Plants: Response of the Antioxidative System. In: GUPTA. D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. **Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress**. Springer, 2015, 373 p.

SUBHADRA, A. V.; PANDA, B. B. Metal-induced genotoxic adaptation in Barley (*Hordeum vulgare* L.) to maleic hydrazide and methyl mercuric chloride. **Mutation Research**, v. 321, p. 93 - 102, 1994.

SUDA, C. N. K.; GIORGINI, J. F. Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 12, p. 226 - 245, 2000.

SUZUKI, N. ROS as Key Players of Abiotic Stress Responses in Plants. In: GUPTA. D. K.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J. **Reactive Oxygen Species and Oxidative Damage in Plants Under Stress**. Springer, 2015, 373 p.

SWAIN, S.; KAY, P.; OGAWA, M. Preventing unwanted breakups: using polygalacturonases to regulate cell separation. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, p. 93 - 97, 2011.

SWEETLOVE, L. J.; FOYER, C. H. Roles for reactive oxygen species and antioxidants in plant mitochondria. In: DAY, D. A.; MILLAR, A. H.; WHELAN, J. **Plant mitochondria: from genome to function**, v. 1, Advances in photosynthesis and respiration. Kluwer Academic, Dordrecht, 2004.

SYTAR, O.; KUMAR, A.; LATOWSKI, D.; KUCZYNSKA, P.; STRZALKA, K.; PRASAD, M. N. V. Heavy metal-induced oxidative damage, defense reactions, and detoxification mechanisms in plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, p. 985 - 999, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5^a ed. Porto Alegre, Artmed, 2013. 918 p.

TAKAHASHI, H.; RAI, M.; KITAGAWA, T.; MORITA, S.; MASUMURA, T.; TANAKA, K. Differential localization of tonoplast intrinsic proteins on the membrane of protein body type II and aleurone grain in rice seeds. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 68, p. 1728 - 1736, 2004.

TAMMELA, P.; SALO-VÄÄNÄNEN, P.; LAAKSO, I.; HOPIA, A.; VUORELA, H.; NYGREN, M. Tocopherols, tocotrienols and fatty acids as indicators of natural ageing in *Pinus sylvestris* seeds. **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 20, p. 378 - 384, 2005.

TAZAWA, M.; OHKUMA, E.; SHIBASAKA, M.; NAKASHIMA, S. Mercurial sensitive water transport in barley roots. **Journal of Plant Research**, v. 110, p. 435 - 442, 1997.

TYERMAN, S. D.; BOHNERT, H. J.; MAUREL, C.; STEUDLE, E.; SMITH, J. A. C.; Plant aquaporins: their molecular biology, biophysics and significance for plant water relations. **Journal of Experimental Botany**, v. 50, p. 1055 - 1071, 1999.

TYERMAN, S. D.; NIEMIETZ, C. M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **The Journal of Plant Physiology**, v. 25, p. 173 - 194, 2002.

UENOJO, M.; PASTORE, G. M. Pectinases: aplicações industriais e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, p. 388 - 394, 2007.

UNYAYAR, S.; CELIK, A.; CEKIC, F. O.; GOZEL, A. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutagenesis**, v. 21, p. 77 - 81, 2006.

VENKATESH, J.; YU, J.; PARK, S. W. Genome-wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 392 - 404, 2013.

VESELOVA, T. V.; VESELOVSKY, V. A. Possible involvement of aquaporins in water uptake by pea seeds differing in quality. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 53, p. 96 - 101, 2006.

VIEIRA, R. D.; PENARIOL, A. L.; PERECIN, D.; PANOBIANCO, M. Condutividade elétrica e teor de água inicial das sementes de soja. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 37, p. 1333 - 1338, 2002.

VRANOVÁ, E.; INZÉ, D. VAN BREUSEGEM, F. Signal transduction during oxidative stress, **Journal of Experimental Botany**, v. 53, p. 1227 - 1236, 2002.

WANG, M.; OPPEDIJK, B. J.; CASPERS, M. P. M.; LAMERS, G. E. M.; BOOT, M. J.; GEERLINGS, D. N. G.; BAKHUIZEN, B.; MEIJER, A. H.; VAN DUIJN, B. Spatial and temporal regulation of DNA fragmentation in the aleurone of germination barley. **Journal of Experimental Botany**, v. 49, p. 1293 - 1301, 1998.

WANG, Y.; COHEN, J.; BORON, W. F.; SCHULTEN, K.; TAJKHORSHID, E. Exploring gas permeability of cellular membranes and membrane channels with molecular dynamics. **Journal of Structural Biology**, v. 157, p. 534 - 544, 2007.

WILLIGEN, C. V.; POSTAIRE, O.; TOURNAIRE-ROUX, C.; BOURSIAC, Y.; MAUREL, C. Expression and inhibition of aquaporins in germinating Arabidopsis seeds. **Plant Cell Physiology**, v. 47, p. 1241 - 1250, 2006.

WILLKENES, H.; CHAMNONGPOL, S.; DAVEY, M.; SCHRAUDNER, M.; LANGEBARTELS, C.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D.; VAN CAMP, W. Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C3 plants. **EMBO Journal**, v. 16, p. 4806 - 4816, 1997.

XIA, F.; WANG X.; LI, M.; MAO, P. Mitochondrial structural and antioxidant system responses to aging in oat (*Avena sativa* L.) seeds with different moisture contents. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 94, p. 122 - 129, 2015.

YAMAGUHCI, Y.; SUGIMOTO, T.; SUEYOSHI, K.; OJI, Y. Emergence of proteases in germinating cucumber cotyledons and their roles in the two-step degradation of storage protein. **Plant Cell Physiology**, v. 37, p. 279 - 284, 1996.

YANG, B.; KIM, J. K.; VERKMAN, A. S. Comparative efficacy of HgCl₂ with candidate aquaporin-1 inhibitors DMSO, gold, TEA⁺ and acetazolamide. **FEBS Letters**, v. 580, p. 6679 - 6684, 2006.

YONAR, M. E., YONAR, S. M. Changes in selected immunological parameters and antioxidant status of rainbow trout exposed to malachite green (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 97, p. 19 - 23, 2010.

ZARDOYA, R.; VILLALBA, S. A phylogenetic framework for the aquaporin family in eukaryotes. **Journal of Molecular Evolution**, v. 52, p. 391 - 404, 2001.

ZHANG, F. Q.; WANG, Y. S.; LOU, Z. P.; DONG, J. D. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza*). **Chemosphere**, v. 67, p. 44 - 50, 2007.

ANEXO I

Quadro 1. Modelo de regressão da figura 1.

Tratamento	Equação	R ²
Concentração x tempo de embebição	$y = 0,21682607 + 0,058717699x - 0,010870488x^2 + 0,023228822z - 0,000134085z^2 - 0,001249629xz$	0,98

Quadro 2. Modelos de regressão da figura 2.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = 0,0000049363x^3 - 0,0006500174x^2 + 0,0349087500x + 0,2188000000$	0,99
DTT (5 mM)	$y = 0,0000036150x^3 - 0,0005066667x^2 + 0,0314044444x + 0,2021600000$	0,99
HgCl ₂ (5 mM)	$y = 0,0000032453x^3 - 0,0005183854x^2 + 0,0280111111x + 0,2125600000$	0,99
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0000052599x^3 - 0,0005928993x^2 + 0,0277815278x + 0,2125600000$	0,99
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = 0,0000023224x^3 - 0,0003754583x^2 + 0,0239216528x + 0,2125600000$	0,99

Quadro 3. Modelos de regressão da figura 4.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = 0,0000088354x^3 - 0,0008252094x^2 + 0,0302158510x + 0,3624000000$	0,99
DTT (5 mM)	$y = 0,0000092412x^3 - 0,0008683146x^2 + 0,0308666446x + 0,3624000000$	0,99
HgCl ₂ (5 mM)	$y = 0,000005666x^3 - 0,0001413194x^2 + 0,0137069444x + 0,3624000000$	0,98
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0000042402x^3 - 0,0003775174x^2 + 0,0166388889x + 0,3624000000$	0,99
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = 0,000006788x^3 - 0,0001141493x^2 + 0,0121944444x + 0,3624000000$	0,98

Quadro 4. Modelos de regressão da figura 5.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = 0,0000005172x^2 + 0,0000752684x + 0,0010237242$	0,98
DTT (5 mM)	$y = 0,0000004740x^2 + 0,0000767820x + 0,0010060739$	0,98
HgCl ₂ (5 mM)	$y = -0,0000002367x^2 + 0,0000584170x + 0,0012279229$	0,91
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0000006211x^2 + 0,0000241625x + 0,0013432343$	0,93
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = -0,0000000457x^2 + 0,0000513855x + 0,0013023119$	0,90

Quadro 5. Modelos de regressão da figura 6.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = 0,0000000150x^2 + 0,0000075385x + 0,0000860377$	0,97
DTT (5 mM)	$y = 0,0000000114x^2 + 0,0000076721x + 0,0000847755$	0,97
HgCl ₂ (5 mM)	$y = -0,0000000230x^2 + 0,0000050625x + 0,0001058656$	0,91
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0000000701x^2 + 0,0000010526x + 0,0001170111$	0,92
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = 0,0000000036x^2 + 0,0000039525x + 0,0001093589$	0,92

Quadro 6. Modelos de regressão da figura 7.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = 0,0243971703x^2 - 3,5749823458x + 168,3571932978$	0,99
DTT (5 mM)	$y = 0,0247538215x^2 - 3,6090068691x + 168,5292418309$	0,99
HgCl ₂ (5 mM)	$y = 0,0207080596x^2 - 2,8928334510x + 168,6923027541$	0,99
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0135304544x^2 - 2,5947443881x + 167,8089490916$	0,99
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = 0,0159601407x^2 - 2,7046286191x + 168,1119599409$	0,99

Quadro 7. Modelos de regressão da figura 8.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = -0,0017393415x^2 - 1,0233551039x + 274,3279108494$	0,95
DTT (5 mM)	$y = -0,0019613339x^2 - 1,0520978304x + 274,9183169061$	0,93
HgCl ₂ (5 mM)	$y = -0,0034966986x^2 - 0,0769656045x + 273,8537865401$	0,54
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = -0,0190058248x^2 + 0,5871415867x + 272,1936878590$	0,86
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = -0,0108800412x^2 + 0,2483479613x + 272,9216894452$	0,81

Quadro 8. Modelos de regressão da figura 9.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = -0,0015190972x^2 + 0,1375208333x + 21,8548750000$	0,78
DTT (5 mM)	$y = -0,0014811198x^2 + 0,1296822917x + 21,8636250000$	0,61
HgCl ₂ (5 mM)	$y = -0,0020545790x^2 + 0,2184036458x + 22,0110625000$	0,90
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = -0,0027077908x^2 + 0,2466223958x + 21,9489375000$	0,88
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = -0,0020697700x^2 + 0,2172369792x + 21,9743125000$	0,90

Quadro 9. Modelos de regressão da figura 10.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = -0,0011043778x^2 + 0,1125661309x + 0,9747899412$	0,95
DTT (5 mM)	$y = -0,0012166961x^2 + 0,1197481753x + 0,9203934487$	0,91
HgCl ₂ (5 mM)	$y = -0,0011181821x^2 + 0,0844899976x + 0,9069090387$	0,92
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = -0,0008109849x^2 + 0,0708828148x + 0,9342277432$	0,87
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = -0,0009551510x^2 + 0,0777120431x + 0,9083756141$	0,81

Quadro 10. Modelos de regressão da figura 11.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = -0,0001131476x^2 + 0,0152057273x + 0,2710348588$	0,93
DTT (5 mM)	$y = -0,0001110909x^2 + 0,0147969548x + 0,2758656581$	0,90
HgCl ₂ (5 mM)	$y = -0,0000385974x^2 + 0,0054106160x + 0,2697428521$	0,60
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0000197533x^2 + 0,0030603650x + 0,2697334063$	0,89
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = -0,0000207534x^2 + 0,0046780241x + 0,2690120827$	0,82

Quadro 11. Modelos de regressão da figura 12.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = 0,0000006186x^2 + 0,0000064767x + 0,0006622039$	0,99
DTT (5 mM)	$y = 0,0000004357x^2 + 0,0000171222x + 0,0006683966$	0,98
HgCl ₂ (5 mM)	$y = -0,0000000211x^2 + 0,0000281521x + 0,0005728315$	0,97
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0000004982x^2 + 0,0000082131x + 0,0006226633$	0,99
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = 0,0000001409x^2 + 0,0000219574x + 0,0005935114$	0,99

Quadro 12. Modelos de regressão da figura 13.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = 0,0000184331x^2 + 0,0197821179x + 0,0503630940$	0,92
DTT (5 mM)	$y = 0,0000111911x^2 + 0,0197995545x + 0,0485948500$	0,92
HgCl ₂ (5 mM)	$y = 0,0001629150x^2 + 0,0041169819x + 0,0774749120$	0,95
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0002370477x^2 + 0,0011273453x + 0,0849345768$	0,97
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = 0,0001804877x^2 + 0,0038019314x + 0,0756029673$	0,95

Quadro 13. Modelos de regressão da figura 14.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = 0,0000275253x^2 + 0,0057412716x - 0,0248172486$	0,89
DTT (5 mM)	$y = 0,0000297635x^2 + 0,0052004567x - 0,0236803652$	0,89
HgCl ₂ (5 mM)	$y = 0,0000171214x^2 + 0,0026699571x - 0,0049742705$	0,93
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0001138519x^2 - 0,0015002245x + 0,0055629995$	0,99
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = 0,0000855748x^2 - 0,0002227227x + 0,0023324926$	0,99

Quadro 14. Modelos de regressão da figura 15.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = 0,0008330533x^2 - 0,1732459677x + 10,6711290323$	0,97
DTT (5 mM)	$y = 0,0010377464x^2 - 0,1908306452x + 10,6687741935$	0,97
HgCl ₂ (5 mM)	$y = 0,0027077733x^2 - 0,3238306452x + 10,5038709677$	0,95
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0033770161x^2 - 0,3592741935x + 10,6596774194$	0,98
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = 0,0025467630x^2 - 0,3108266129x + 10,5562903226$	0,96

Quadro 15. Modelos de regressão da figura 16.

Tratamento	Equação	R ²
H ₂ O (controle)	$y = -0,0023475839x^3 + 0,2521423611x^2 - 4,1925416667x + 112,8260000000$	0,99
DTT (5 mM)	$y = -0,0022332417x^3 + 0,2358819444x^2 - 3,6429861111x + 112,8260000000$	0,99
HgCl ₂ (5 mM)	$y = 0,0002401138x^3 - 0,0024878472x^2 - 0,4478472222x + 112,8260000000$	0,97
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM)	$y = 0,0002290461x^3 + 0,0068958333x^2 - 0,8352638889x + 112,8260000000$	0,96
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O	$y = 0,0000506366x^3 + 0,0231579861x^2 - 1,1922916667x + 112,8260000000$	0,96

ANEXO II

Quadro 16. Análise de variância do modelo da figura 1.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
Concentração	Regressão	5	12,131067	2,4262134	1184,11229	3,20606e-83
vs tempo de embebição	Resíduo	94	0,1926034	0,0020489	-	-
	Total	99	12,323670	-	-	-

Quadro 17. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 2.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	22,40000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	21,80000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	0,66800	0,1670	-	-
	Resíduo	32	0,00969	0,000242	690,083	3,409e-32
	Total	40	22,40000	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	21,90000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	21,30000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	0,6070	0,1520	-	-
	Resíduo	32	0,0132	0,00033	460,606	2,970e-29
	Total	40	21,90000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	18,70000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	18,40000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	0,31000	0,0775	-	-
	Resíduo	32	0,00806	0,000202	383,663	6,245e-28
	Total	40	18,70000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	16,20000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	16,20000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	0,0304	0,00761	-	-
	Resíduo	32	0,0109	0,000273	27,875	2,203e-10
	Total	40	16,20000	-	-	-

Quadro 18. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 4.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	28,3000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	26,9000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	1,4100	0,3520	-	-
	Resíduo	32	0,0504	0,00126	279,365	1,198e-25
	Total	40	28,3000	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	27,7000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	26,4000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	1,3000	0,325	-	-
	Resíduo	32	0,0399	0,000998	325,651	9,495e-27
	Total	40	27,7000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	21,3000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	20,9000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	0,3210	0,0802	-	-
	Resíduo	32	0,0224	0,000561	142,959	6,603e-21
	Total	40	21,3000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	18,3000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	18,3000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	0,0145	0,00364	-	-
	Resíduo	32	0,0277	0,000693	5,253	0,002528
	Total	40	18,3000	-	-	-

Quadro 19. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 5.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	8,28e-04	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	7,53e-04	-	-	-
	Redução (Ho)	3	7,53e-05	2,51e-05	-	-
	Resíduo	34	5,51e-06	1,38e-07	181,884	4,674e-22
	Total	40	8,34e-04	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	8,13e-04	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	7,42e-04	-	-	-
	Redução (Ho)	3	7,15e-05	2,38e-05	-	-
	Resíduo	34	6,01e-06	1,5e-07	158,667	4,662e-21
	Total	40	8,19e-04	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	4,99e-04	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	4,87e-04	-	-	-
	Redução (Ho)	3	1,16e-05	3,88e-06	-	-
	Resíduo	34	7,69e-06	1,92e-07	20,208	5,69e-08
	Total	40	5,07e-04	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	4,08e-04	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	4,08e-04	-	-	-
	Redução (Ho)	3	8,72e-07	2,91e-07	-	-
	Resíduo	34	5,86e-06	1,47e-07	1,98	0,1516
	Total	40	4,14e-04	-	-	-

Quadro 20. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 6.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	5,42e-06	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	5,00e-06	-	-	-
	Redução (Ho)	3	4,13e-07	1,38e-07	-	-
	Resíduo	34	4,52e-08	1,13e-09	122,124	3,599e-19
	Total	40	5,46e-06	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	5,33e-06	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	4,93e-06	-	-	-
	Redução (Ho)	3	3,92e-07	1,31e-07	-	-
	Resíduo	34	4,87e-08	1,22e-09	107,377	2,945e-18
	Total	40	5,37e-06	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	3,66e-06	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	3,55e-06	-	-	-
	Redução (Ho)	3	1,10e-07	3,68e-08	-	-
	Resíduo	34	6,44e-08	1,61e-09	22,857	1,361e-08
	Total	40	3,73e-06	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	2,94e-06	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	2,93e-06	-	-	-
	Redução (Ho)	3	9,89e-09	3,3e-09	-	-
	Resíduo	34	3,88e-08	9,69e-10	3,406	0,03026
	Total	40	2,97e-06	-	-	-

Quadro 21. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 7.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	467000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	462000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	4340	1450	-	-
	Resíduo	34	218	5,45	266,055	7,03e-25
	Total	40	467000	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	466000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	461000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	4520	1510	-	-
	Resíduo	34	254	6,34	238,17	4,722e-24
	Total	40	466000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	503000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	502000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	729	243	-	-
	Resíduo	34	275	6,87	35,371	5,282e-11
	Total	40	503000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	506000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	505000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	359	120	-	-
	Resíduo	34	263	6,59	18,209	1,814e-07
	Total	40	506000	-	-	-

Quadro 22. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 8.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	2510000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	2500000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	13900	4630	-	-
	Resíduo	34	2250	56,3	82,238	2,104e-16
	Total	40	2510000	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	2500000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	2490000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	15000	4990	-	-
	Resíduo	34	2710	67,7	73,708	1,167e-15
	Total	40	2510000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	2710000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	2700000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	3090	1030	-	-
	Resíduo	34	3140	78,4	13,138	5,02e-06
	Total	40	2710000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	2750000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	2750000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	656	219	-	-
	Resíduo	34	2490	62,3	3,515	0,02682
	Total	40	2750000	-	-	-

Quadro 23. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 9.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	24600,0	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	24600,0	-	-	-
	Redução (Ho)	3	53,4	17,8	-	-
	Resíduo	34	17,7	0,442	40,271	8,9e-12
	Total	40	24700,0	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	2500000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	2490000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	15000	4990	-	-
	Resíduo	34	2710	67,7	73,708	1,167e-15
	Total	40	2510000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	26300,00	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	26300,00	-	-	-
	Redução (Ho)	3	5,28	1,76	-	-
	Resíduo	34	21,90	0,546	3,223	0,03709
	Total	40	26300,00	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	2,66e+04	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	2,66e+04	-	-	-
	Redução (Ho)	3	1,57e-01	0,0524	-	-
	Resíduo	34	2,03e+01	0,508	0,103	0,5751
	Total	40	2,66e+04	-	-	-

Quadro 24. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 10.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	10,900	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	10,300	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,574	0,191	-	-
	Resíduo	34	0,127	0,00318	60,063	2,679e-14
	Total	40	11,000	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	10,700	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	10,100	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,534	0,178	-	-
	Resíduo	34	0,154	0,00386	46,114	1,309e-12
	Total	40	10,800	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	6,9200	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	6,8700	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,0469	0,0156	-	-
	Resíduo	34	0,1080	0,0027	5,778	0,002493
	Total	40	7,0200	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	6,38000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	6,38000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,00404	0,00135	-	-
	Resíduo	34	0,10300	0,00258	0,523	0,6649
	Total	40	6,48000	-	-	-

Quadro 25. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 11.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	1600,0	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	1550,0	-	-	-
	Redução (Ho)	3	46,1	15,4	-	-
	Resíduo	34	19,8	0,494	31,174	2,831e-10
	Total	40	1620,0	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	1550,0	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	1520,0	-	-	-
	Redução (Ho)	3	35,6	11,9	-	-
	Resíduo	34	20,2	0,505	23,564	9,464e-09
	Total	40	1570,0	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	1340,00	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	1340,00	-	-	-
	Redução (Ho)	3	3,18	1,06	-	-
	Resíduo	34	19,20	0,48	2,208	0,1169
	Total	40	1360,00	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	1340,000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	1340,000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,484	0,161	-	-
	Resíduo	34	24,400	0,611	0,264	0,7109
	Total	40	1370,000	-	-	-

Quadro 26. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 12.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	28,200	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	26,800	-	-	-
	Redução (Ho)	3	1,350	0,45	-	-
	Resíduo	34	0,185	0,00463	97,192	1,473e-17
	Total	40	28,300	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	27,500	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	26,300	-	-	-
	Redução (Ho)	3	1,240	0,412	-	-
	Resíduo	34	0,187	0,00468	88,034	7,16e-17
	Total	40	27,700	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	21,2000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	20,9000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,3090	0,103	-	-
	Resíduo	34	0,0539	0,00135	76,296	6,821e-16
	Total	40	21,3000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	18,3000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	18,3000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,0145	0,00484	-	-
	Resíduo	34	0,0291	0,000727	6,657	0,001059
	Total	40	18,3000	-	-	-

Quadro 27. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 13.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	29,100	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	28,300	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,872	0,291	-	-
	Resíduo	34	0,706	0,0176	16,534	5,088e-07
	Total	40	29,800	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	28,300	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	27,600	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,768	0,256	-	-
	Resíduo	34	0,725	0,0181	14,144	2,472e-06
	Total	40	29,100	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	22,4000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	22,3000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,0822	0,0274	-	-
	Resíduo	34	0,3360	0,00841	3,258	0,03567
	Total	40	22,7000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	20,9000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	20,8000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,0125	0,00415	-	-
	Resíduo	34	0,4120	0,0103	0,403	0,7045
	Total	40	21,3000	-	-	-

Quadro 28. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 14.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	2,530	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	2,300	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,230	0,0767	-	-
	Resíduo	34	0,115	0,00289	26,54	2,21e-09
	Total	40	2,640	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	2,320	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	2,140	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,182	0,0605	-	-
	Resíduo	34	0,110	0,00275	22,00	2,136e-08
	Total	40	2,430	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	1,9200	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	1,8100	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,1180	0,0393	-	-
	Resíduo	34	0,0156	0,00039	100,769	8,23e-18
	Total	40	1,9400	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	1,6500	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	1,5900	-	-	-
	Redução (Ho)	3	0,0623	0,0208	-	-
	Resíduo	34	0,0188	0,000471	44,161	2,43e-12
	Total	40	1,6700	-	-	-

Quadro 29. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 15.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	1020000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	979000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	43400	14500	-	-
	Resíduo	34	10200	256	56,641	6,453e-14
	Total	40	1030000	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	1030000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	985000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	44900	15000	-	-
	Resíduo	34	9280	232	64,655	8,772e-15
	Total	40	1040000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	631000	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	631000	-	-	-
	Redução (Ho)	3	615	205	-	-
	Resíduo	34	949	23,7	8,65	0,0001729
	Total	40	632000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	6	642000,0	-	-	-
	Parâmetro (r)	3	642000,0	-	-	-
	Redução (Ho)	3	89,4	29,8	-	-
	Resíduo	34	1010,0	25,4	1,173	0,371
	Total	40	643000,0	-	-	-

Quadro 30. Análise de variância do teste de identidade de modelos da figura 16.

Teste	F. V	G. L.	S.Q.	Q. M	F. C.	P. Valor
H ₂ O (controle) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	1010000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	954000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	55400	13900	-	-
	Resíduo	32	412	10,3	1349,515	4,215e-37
	Total	40	1010000	-	-	-
DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	1020000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	959000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	56200	14000	-	-
	Resíduo	32	369	9,22	1518,438	5,744e-38
	Total	40	1020000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em DTT (5 mM) vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	631000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	631000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	616	154	-	-
	Resíduo	32	773	19,3	7,979	0,0001325
	Total	40	632000	-	-	-
48 horas em HgCl ₂ (5 mM) + 24 horas em H ₂ O vs HgCl ₂ (5 mM)	Parâmetro (c)	8	619000	-	-	-
	Parâmetro (r)	4	619000	-	-	-
	Redução (Ho)	4	282	70,5	-	-
	Resíduo	32	678	17	4,147	0,009579
	Total	40	620000	-	-	-