

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BOTÂNICA)

SHEYLLA FONTES PINTO

**USO DAS RESERVAS SEMINAIS NAS SEMENTES E O EFEITO DA PODA NO
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE MUDAS DE *Bertholletia excelsa* BONPL.**

Manaus, Amazonas

Dezembro, 2023

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BOTÂNICA)

SHEYLLA FONTES PINTO

**USO DAS RESERVAS SEMINAIS NAS SEMENTES E O EFEITO DA PODA NO
DESENVOLVIMENTO INICIAL DE MUDAS DE *Bertholletia excelsa* BONPL.**

Orientadora: Dra. Isolde Dorothea Kossmann Ferraz

Co-orientadores: Dra. Angela Maria da Silva Mendes

Dr. Sergio Duvoisin Junior

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Botânica.

Manaus, Amazonas

Dezembro, 2023

Relação da Banca Julgadora

Dra. Yeda Maria Boaventura Correa Arruda
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Dra. Maria da Glória Gonçalves de Melo
Universidade do Estado do Amazonas – UEA

Dr. Geangelo Petene Calvi
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA

P659u

Pinto, Sheylla Fontes

Uso das reservas seminais nas sementes e o efeito da poda no desenvolvimento inicial de mudas de *Bertholletia excelsa* Bonpl./ Sheylla Fontes; orientadora Isolde Dorothea Kossmann Ferraz; coorientadores Angela Maria da Silva Mendes, Sergio Duvoisin Junior – Manaus: [s.l.], 2023.

2,29 MB

65p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Botânica – Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2024.

1. Efeito da poda em mudas. 2. Quantificação das reservas lipídicas. 3. Caracterização das modificações anatômicas. I. Ferraz, Isolde Dorothea Kossmann. II. Mendes, Angela Maria da Silva. III. Duvoisin Junior, Sergio. IV. Título

CDD580




Sinopse:

Este estudo avaliou o esgotamento das reservas lipídicas das sementes no desenvolvimento das mudas de *B. excelsa*, o efeito da poda na produção de biomassa, na anatomia do desenvolvimento dos feixes vasculares na estrutura basal da planta (hipocótilo) e na quantificação das reservas lipídicas.

Palavras-chave: semente, hipocótilo, lipídios, biomassa, tecido vascular, germinação bipolar.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BOTÂNICA) DO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ATA DE DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

No dia vinte um de dezembro de dois mil e vinte três, às 09:00 horas, horário Manaus-AM, a discente **Sheylla Fontes Pinto**, sob orientação da Dra. Isolde Dorothea Kossmann Ferraz do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (INPA) e coorientação do Dr. Sergio Duvoisin Junior da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e a Dra. Angela Maria da Silva Mendes da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), defendeu publicamente sua Dissertação de Mestrado intitulada **Uso das reservas seminais na semente e o efeito da poda no desenvolvimento inicial de mudas de Bertholletia excelsa**. A banca examinadora foi composta pela Dra. Yeda Maria Boaventura Correa Arruda da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Dra. Maria da Glória Gonçalves de Melo da Universidade do Estado do Amazonas (UEA) e o Dr. Geangelo Petene Calvi do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (INPA), tendo como suplente: Dr. Roberval Monteiro Bezerra de Lima da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) e a Dra. Lydiane Bastos da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A defesa foi presidida pela orientadora, após a exposição pública do trabalho, a discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, que emitiram seus pareceres conforme indicado abaixo:


Examinador	Parecer	Assinatura
Yeda Maria Boaventura Correa Arruda	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	 Documento assinado digitalmente YEDA MARIA BOAVENTURA CORREA ARRUDA Data: 03/01/2024 17:26:36-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Maria da Glória Gonçalves de Melo	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	
Geangelo Petene Calvi	<input checked="" type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	 Documento assinado digitalmente GEANGELO PETENE CALVI Data: 08/01/2024 10:49:18-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br
Roberval Monteiro Bezerra de Lima	<input type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	
Lydiane Lucia de Sousa Bastos	<input type="checkbox"/> Aprovado <input type="checkbox"/> Reprovado	

Manaus (AM), 21 de dezembro de 2023.

OBS: Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que foi aprovada e assinada pelos membros da Comissão Examinadora, pelo orientador e pela Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Botânica do INPA.



Isolde Dorothea Kossmann Ferraz
Orientadora


Documento assinado digitalmente
CHARLES EUGENE ZARTMAN
Data: 17/01/2024 12:30:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Coordenador PPGBOT-INPA

Em memória de Tereza Fontes Pinto,
a mulher que me deu a vida e me
ensinou a sempre “dá um jeito” nas
dificuldades da vida.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço ...

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Botânica) pela oportunidade de realizar mais essa etapa acadêmica;

À Capes, pelo apoio financeiro e o incentivo à pesquisa;

À minha orientadora Isolde D. K. Ferraz, por aceitar me orientar, pela oportunidade, sabedoria e aprendizado.

À minha coorientadora Angela M. S. Mendes, pela amizade, aprendizado, incentivo e apoio nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

Ao meu coorientador Sergio Duvoisin Junior, por acreditar na minha capacidade, pela amizade, pelo aprendizado e incentivo.

À equipe do Laboratório de Sementes/INPA, especialmente Dr. Geangelo Petene Calvi, pelo compartilhamento de informações, ajuda em campo e no apoio nas diversas dúvidas iniciais e, aos demais membros que de alguma forma contribuíram ao longo do meu trabalho.

Às químicas Sara Kethleen Soares de Loiola e Aleyde Sales Correa Neta da Central de Análises Químicas – CAQ/UEA, pelo apoio, ensinamentos das técnicas laboratoriais e auxílio nas imensas dúvidas sobre o “mundo da química”.

À Dra. Lúcia Helena Pinheiro Martins do Laboratório de Botânica Agroflorestal/UFAM por disponibilizar as dependências do LABAF, pelo incentivo, carinho e cuidados tão acalentadores, ao técnico Manoel Roberto Pereira Viana, pela amizade, pelos ensinamentos práticos e pelos cortes anatômicos e, ao doutorando Arnaldo Briceno pela ajuda nas descrições anatômicas.

À minha turminha de Mestrado 2/2021, pelos momentos de descontração, pelo apoio e carinho.

À minha amiga irmã Adriana Castro da Conceição, pelo apoio, incentivo e ajuda de longas horas e finais de semana sem dormir e, as “matracas” Maria, Amanda e Rebeca pela torcida e apoio.

Ao meu “menininho” que por vezes ficou sem atenção e aguentou todo o estresse da mãe torta e louca e, a minha irmã Tatyana F. P. Oliveira, que mesmo longe, apoiou e incentivou essa conquista.

A todos, meu muito obrigada.

RESUMO

A semente da castanha-da-amazônia (*Bertholletia excelsa*) apresenta embrião do tipo hipocotilar, rico em reservas nutritivas e lipídicas. As plântulas possuem germinação bipolar, caracterizada pela emergência da parte aérea do lado oposto ao da raiz primária. O hipocótilo de reservas persiste na estrutura basal das plantas, mesmo após o estabelecimento da plântula, quando esta não depende mais das reservas para o desenvolvimento. O tipo de plântula torna *B. excelsa* vulnerável à predação, pois o hipocótilo rico em reserva atrai diversos animais silvestres, principalmente roedores, que destroem o eixo principal da planta na busca de alimento. A Fazenda Agropecuária Aruanã adota a poda da parte aérea e da raiz com sucesso na produção de mudas da castanheira. O presente projeto visou dar fundamentos técnico-científicos para os métodos empíricos aplicados. O estudo avaliou o esgotamento das reservas lipídicas das sementes no desenvolvimento das mudas de *B. excelsa*, o efeito da poda na produção de biomassa e na anatomia do desenvolvimento dos feixes vasculares na estrutura basal da planta (hipocótilo). Foram avaliadas sementes (frutificação 2022) e mudas com um ano (frutificação 2021) e dois anos (frutificação 2020) provenientes da Fazenda Aruanã submetidas a poda e, mudas controle das mesmas frutificações. A prática da poda nas mudas aumentou a matéria seca do eixo caulinar e radicular pelo incremento do diâmetro, contribuiu para o desenvolvimento mais acelerado dos tecidos vasculares e, retardou o consumo das reservas lipídicas durante a recuperação dos danos pós-poda, além de modificar a composição dos ácidos graxos. As alterações anatômicas e metabólicas aumentam a resistência da espécie em plantios definitivos.

Palavras-chave: semente, hipocótilo, lipídios, biomassa, tecido vascular, germinação bipolar.

ABSTRACT

The seed of the Amazon nut (*Bertholletia excelsa*) has a hypocotyl-type embryo, rich in nutritional and lipid reserves. Seedlings have bipolar germination, characterized by the emergence of the aerial part on the opposite side to the primary root. The reserve hypocotyl persists in the basal structure of plants, even after the establishment of the seedling, when it no longer depends on reserves for development. The type of seedling makes *B. excelsa* vulnerable to predation, as the hypocotyl rich in reserve attracts several wild animals, mainly rodents, which destroy the main axis of the plant in search of food. The Aruanã Agricultural Farm adopts aerial and root pruning with success in the production of chestnut seedlings. The present project aimed to provide technical-scientific foundations for the empirical methods applied. The study evaluated the depletion of seed lipid reserves in the development of *B. excelsa* seedlings, the effect of pruning on biomass production and the anatomy of the development of vascular bundles in the plant's basal structure (hypocotyl). Seeds (fruiting 2022) and seedlings aged one year (fruiting 2021) and two years old (fruiting 2020) from Aruanã Farm were evaluated and subjected to pruning, and control seedlings from the same fruiting were evaluated. The practice of pruning in seedlings increased the dry matter of the shoot and root axis by increasing the diameter, contributed to the more accelerated development of vascular tissues and delayed the consumption of lipid reserves during recovery from post-pruning damage, in addition to modifying the composition of fatty acids. Anatomical and metabolic changes increase the species' resistance in permanent plantings.

Keywords: seed, hypocotyl, lipids, biomass, vascular tissue, bipolar germination.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
OBJETIVOS	21
Capítulo I	22
Efeito da poda no desenvolvimento inicial de mudas de <i>Bertholletia excelsa</i> Bonpl.	
Resumo	24
1. Introdução	25
2. Material e Métodos	26
2.1. Procedência das sementes e produção de mudas	26
2.2. Avaliação da produção de matéria seca	28
2.3. Estudos Anatômicos e Histoquímicos	28
2.4. Quantificação da Reserva Lipídica das sementes	29
3. Resultados	31
3.1. Avaliação da produção de matéria seca	31
3.2. Estudos Anatômicos e Histoquímicos	32
3.3. Quantificação da Reserva Lipídica das sementes	34
4. Discussão	36
5. Conclusão	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
FIGURAS	48
TABELAS	63

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração da técnica de poda realizada nas mudas de *B. excelsa* 48
produzidas na Fazenda Aruanã, utilizadas no estudo. A – 1ª poda realizada na fase de plântula; B – 2ª poda realizada após o desenvolvimento por aproximadamente um ano em ambiente de viveiro.
- Figura 2. Boxplot da matéria seca das sementes e dos hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p – valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não. 49
- Figura 3. Boxplot da matéria seca da parte aérea de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p – valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não. 50
- Figura 4. Boxplot da matéria seca (A), da altura (B) e do diâmetro (C) do caule de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p – valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não. 51
- Figura 5. Boxplot da matéria seca (A) e do número de folhas (B) de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p – valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não. 53
- Figura 6. Boxplot da matéria seca (A), do comprimento (B) e do diâmetro (C) das raízes de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p – 55

valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não.

- Figura 7. Anatomia das sementes (A-C) e dos hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, 57
com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade - 1a-0p (D-F); controle com dois anos de idade - 2a-0p (G-H); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda - 1a-1p (J-L); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas - 2a-2p (M-O). A – corte transversal da semente evidenciando as camadas de células distintas; B – detalhe da epiderme do embrião; C – detalhe do anel meristemático; D, G, J, M – corte transversal do hipocótilo em estrutura secundária; E, H, K, N – detalhe da diferenciação do câmbio; F, I, L, O – detalhe dos tecidos vasculares. am – anel meristemático, em – endosperma, ep – epiderme, ca – câmbio, cu – cutícula, fs – floema secundário, pc – parênquima cortical, pm – parênquima medular, rx – raio xilemático, xp – xilema primário, xs – xilema secundário. corante safrabalú.
- Figura 8. Representação categórica dos metabólitos detectados nas sementes e nos hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, 59
com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p), indicando os tecidos celulares onde ocorrem. A – proteína (XP), B – amido (Lugol), C – lipídio (Sudam III), D – compostos fenólicos totais (Cloreto Férrico), E – alcalóides (Reagente de Wagner), F – lignina (Floroglucina ácida).
- Figura 9. Porcentagem do rendimento de óleo das sementes e dos hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, 60
com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p).
- Figura 10. Cromatograma da composição dos ácidos graxos das amostras de óleo das sementes recém-colhidas de *B. excelsa*. Es (esteárico), L (linoleico), Ol (oleico), Oxd (oxiraneundecanóico), P (palmítico). 61
- Figura 11. Cromatogramas da composição de ácidos graxos das amostras de óleo dos hipocótilos de mudas de *B. excelsa* nos seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Ei 62

(eicosanóico), El (elaídico), Es (esteárico), L (linoleico), Ol (oleico), Oxd (oxiraneundecanóico), Oxt (oxiranoctanóico), P (palmítico).

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Descrição dos tratamentos das mudas e sementes de *B. excelsa* 63
utilizados no estudo.
- Tabela 2. Testes histoquímicos para detecção das classes de metabólitos nas 63
sementes e nos hipocótilos das mudas de *B. excelsa*, baseado em
Ventrella *et al.* (2013).
- Tabela 3. Valores médios da matéria seca e da quantificação do óleo das sementes 64
e dos hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos:
controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade
(2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p);
mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p).
- Tabela 4. Valores médios das variáveis avaliadas de mudas de *B. excelsa*, com os 64
seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle
com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas
a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas
podas (2a-2p).
- Tabela 5. Análise de ácidos graxos por espectrometria de massa do óleo de 65
sementes e hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes
tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois
anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma
poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas
(2a-2p).

INTRODUÇÃO GERAL

Bertholletia excelsa Bonpl. (castanha-da-amazônia) é uma espécie arbórea de dossel, podendo atingir até 50 m de altura e 3 m de diâmetro à altura do peito (DAP). É o único representante do gênero *Bertholletia* da família Lecythidaceae. A espécie ocorre em florestas de terra firme da bacia amazônica nos países Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e Brasil (Catenacci *et al.* 2023). No Brasil a espécie é encontrada nos estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Roraima, Amapá, Pará e Maranhão (REFLORA 2023).

A castanha-da-amazônia é um dos principais produtos florestais não madeireiros (PFNM) comercializados na região amazônica. Apresenta grande importância econômica para os povos e comunidades tradicionais por meio da atividade extrativista (IBGE 2022). A safra da castanha-da-amazônia alcançou 38,2 mil toneladas, em 2022, representando R\$ 170,0 milhões e, o Estado do Amazonas segue na liderança nacional, com 14,3 mil toneladas do produto (IBGE 2022).

É uma das espécies nativas indicadas para programas de reflorestamento de áreas degradadas e plantios para produção de frutos (Muller *et al.* 1995). Apresenta excelentes características silviculturais, tais como rusticidade, desrama natural, alta porcentagem de sobrevivência, tolerância a luz, crescimento e estabelecimento rápido (Costa *et al.* 2009), além da ausência de problemas fitossanitários e boa capacidade de rebrotação após perturbações pelo fogo, secagem ou corte (Salomão *et al.* 2014; Scoles *et al.* 2011).

A semente da castanha-da-amazônia apresenta embrião do tipo hipocotilar (Corner 1976), caracterizado pelo eixo hipocótilo-radícula desenvolvido e os cotilédones vestigiais (Camargo *et al.* 2008), formado por tecidos parenquimáticos, delimitados por anel meristemático envolto por camada epidérmica (Camargo *et al.* 2000). Permanece com uma fina camada resquícios de endosperma e o tecido parenquimático apresenta corpos proteicos e gotículas de óleo em abundância (Tsou e Mori 2002).

No embrião hipocotilar da castanha-da-amazônia, quando maduro, encontrou-se 60 a 70% de lipídios, 13 a 18% de proteínas, 2 a 11% de carboidratos e 2 a 8% de fibras (Martins 2015). Essas reservas são consumidas durante a germinação, sendo

posteriormente mobilizadas para diferentes partes da planta, auxiliando o crescimento e sobrevivência da plântula até que se torne autotrófica (Appezzato-da-Gloria e Carmello-Guereiro 2006).

As sementes de *B. excelsa* possuem germinação bipolar, sendo caracterizada pela emergência da parte aérea do lado oposto ao da raiz primária (Camargo *et al.* 2008). As reservas estocadas no hipocótilo persistem por um longo tempo na estrutura basal das plantas, mesmo quando se torna autotrófica e não depende mais das reservas para a nutrição. O hipocótilo, por ser o órgão responsável pela sustentação da parte aérea e a conexão através dos feixes vasculares com as raízes, possibilita a condução de água, sais minerais, açúcares, hormônios e outros metabólitos para todas as partes das plantas (Larcher 2000).

Devido as características germinativas e ao tipo de plântula, *B. excelsa*, torna-se vulnerável à predação, pois a base da planta serve de alimento para diversos animais silvestres, principalmente roedores (Silva *et al.* 2020). O consumo ou danos no hipocótilo, parte integrante do caule, pode comprometer a sobrevivência de mudas nas etapas iniciais de desenvolvimento e causar a morte da plântula (Zuidema 2003).

A mortalidade das plântulas ou mudas em ambiente natural devido aos frequentes casos de predação do eixo hipocotiledonar por animais silvestres foi relatado por vários estudos. Em plantio de enriquecimento de áreas desmatadas após exploração madeireira em floresta tropical úmida no estado do Acre, foi constatado alta mortalidade (83%) no primeiro ano, causada por roedores, que destruíram as mudas de *B. excelsa*, entre 20 a 30 cm de altura (Oliveira 2000).

Em um estudo da dinâmica de plântulas em populações naturais em floresta primária subtropical úmida na região do Pando, no nordeste da Bolívia, foi observado que cutias e outros roedores foram responsáveis pela mortalidade de 60% de mudas de castanha entre 10 a 35 cm de altura (Zuidema e Boot 2002). No mesmo estudo, observou-se mortalidade de 20% no primeiro ano em mudas de *B. excelsa* com altura inferior a 70 cm (Zuidema 2003).

A observação que mudas mais altas apresentam menor porcentagem de mortalidade foi confirmada em estudo de plantios experimentais em sub-bosque na Floresta Nacional do Saracá-Taquera (região do rio Trombetas em Oriximiná/Pará) onde

a mortalidade nas mudas de castanha foi nula em indivíduos juvenis com altura superior a 1 metro (Scoles *et al.* 2011). Desta forma, os autores sugerem o uso de mudas com altura acima de 1 metro em plantios de reflorestamento.

No entanto, nos trabalhos citados, as taxas de mortalidade foram apenas observações de campo e não eram o objetivo principal dos estudos, além disso a mortalidade foi associada com a altura das mudas e não a idade e nem as reservas nos hipocótilos.

Não encontramos na literatura estudos sobre a persistência das reservas no hipocótilo em mudas de *B. excelsa* e nem sobre a duração temporal em que essas reservas são absorvidas durante o desenvolvimento ou sobre as alterações anato-histoquímicas e lipídicas nestes tecidos.

Considerando que *B. excelsa* tem boa capacidade de brotação (Scoles *et al.* 2011), a poda da parte aérea e da raiz na produção de mudas é adotada na Fazenda Agropecuária Aruanã, uma empresa especializada em cultivo de plantas tropicais sediada no Estado do Amazonas. Tal técnica, além de fácil aplicação e baixo custo, aumenta a sobrevivência no campo, após transferência para o plantio final.

Desta forma, pretende-se com esse estudo colaborar com a Fazenda e dar fundamentos técnico-científicos para os métodos empíricos ao avaliar o efeito da poda em mudas de *B. excelsa* de diferentes idades. Para isso, foi analisado quantitativamente as reservas lipídicas e as modificações na morfologia celular durante o desenvolvimento inicial das mudas de *B. excelsa*, além de avaliar o efeito da poda no acúmulo de matéria seca como indicativo da recuperação do crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Appenzato-da-Glória, B; Carmello-Guerreiro, SM. 2006. *Anatomia Vegetal*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 438p.
- Camargo, IP; Castro, EM; Gavilanes, ML 2000. Aspectos da Anatomia e Morfologia de amêndoas e plântulas de castanheira-do-Brasil. *Cerne* 6 (2):11-18.
- Camargo, JLC; Ferraz, IDK; Mesquita, MR; Santos, BA; Brum, HD 2008. *Guia de Propágulos e Plântulas da Amazônia*. INPA, Manaus, 168p.
- Corner, EJH 1976. *The seeds of dicotyledons*. Cambridge University Press, Cambridge, 552p.
- Catenacci, FS; Ribeiro, M; Smith, NP; Cabello, NB. 2023. *Bertholletia excelsa*. Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br>). Acessado em 25 de novembro de 2023.
- Costa, JR; Castro, ABC; Wandelli, EV; Coral, SCT; Souza, SAG 2009. Aspectos silviculturais da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em sistemas agroflorestais na Amazônia Central. *Acta Amazônica* 39(4): 843-850.
- Flora e Funga do Brasil 2023. *Lecythidaceae*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br>). Acessado em 23 de novembro de 2023.
- IBGE 2022. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da extração vegetal e da silvicultura - PEVS 2022, Rio de Janeiro, 36:1-8.
- Larcher, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal*. Editora Rima, São Paulo. 531p
- Martins, M. 2015. Composição da Castanha. In: Kluczkovski, AM; Scussel, VM. *Gerenciamento de Riscos da Castanha-do-Brasil*. Editora Nova Letra, Blumenau, Santa Catarina. pág. 39-52.
- Müller, CH; Figueiredo, FJC; Kato, AK; Carvalho, JEU; Stein, RLB; SILVA, AB 1995. *A cultura da castanha-do-Brasil*. EMBRAPA, coleção Plantar: 23, 65p.
- Oliveira, MVT. 2000. Artificial regeneration in gaps and skidding trails after mechanized

forest exploitation in Acre, Brazil. *Forest Ecology and Management* 127:67-76.

Salomão, R.; Santana, AC; Brienza Junior, S; Rosa, NA; Precinoto, RS 2014. Crescimento de *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanheira) na Amazônia trinta anos após a mineração de bauxita. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi: Ciências naturais* 9:307- 320.

Silva, BIA; Salomão, RP; Santana, AC; Sousa, VG; Hage, ALF. 2020. Predação de mudas de castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em áreas sob restauração florestal na Amazônia. *Braz. J. of Develop* 6 (4): 20667-20689.

Scoles, R; Gribel, R; Klein GN. 2011. Crescimento e sobrevivência de castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em diferentes condições ambientais na região do rio Trombetas, Oriximiná, Pará. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi* 6 (3): 273-293.

Tsou, CH; Mori, AS 2002. Seed coat anatomy and its relationship to seed dispersal in subfamily Lecythidoideae of the Lecythidaceae (The Brazil Nut Family). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol. 43:37-56.

Zuidema, PA. 2003. Ecología y manejo del árbol de castaña (*Bertholletia excelsa*). PROMAB Científica, série 6.

Zuidema, PA; Boot, RGA. 2002. Demography of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) in the Bolivian Amazon: impact of seed extraction on recruitment and population dynamics. *Journal of Tropical Ecology*. 18 (01): 1-31.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar o efeito da poda no esgotamento das reservas das sementes no desenvolvimento das mudas de *B. excelsa* de diferentes idades.

Específicos

1. Avaliar a produção de matéria seca como indicativo da recuperação e realocação da matéria no desenvolvimento das mudas pós poda.
2. Caracterizar as modificações anatômicas e histoquímica celular durante o esgotamento das reservas e formação dos tecidos do sistema vascular.
3. Quantificar as reservas lipídicas das sementes durante o desenvolvimento das mudas de diferentes idades e submetidas à poda.

CAPÍTULO 1

Pinto, SF; Ferraz, IDK; Mendes, AMS; Duvoisin Junior, S. **Efeito da poda no desenvolvimento inicial de mudas de *Bertholletia excelsa* Bonpl.**

Manuscrito* em preparação para a revista Acta Amazônica **

*Resultados versão estendida (apenas para dissertação). Para submissão será reduzido (figuras, tabelas reduzidas)

**Manuscrito ainda não traduzido para versão em inglês.

Efeito da poda no desenvolvimento inicial de mudas de *Bertholletia excelsa* Bonpl.

Sheylla Fontes PINTO¹, Isolde Dorothea Kossmann FERRAZ², Angela Maria da Silva MENDES³, Sergio DUVOISIN JUNIOR⁴.

1 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Programa de Pós-Graduação em Botânica (PPG-BOT), Av. André Araújo 2936, 69067-375, Manaus, Amazonas, Brasil;
sheyllafontes@hotmail.com

2 Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Coordenação de Biodiversidade (COBIO), Av. André Araújo 2936, 69067-375, Manaus, Amazonas, Brasil;
isolde.ferraz@gmail.com

3 Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Departamento de Produção Animal e Vegetal (DPAV), Faculdade de Ciências Agrárias (FCA), Av. General Rodrigo Octávio, 6200, 69080-900, Manaus, Amazonas, Brasil
45amendes@gmail.com

4 Universidade do Estado do Amazonas – UEA, Central de Análises Químicas (CAQ), Escola Superior de Tecnologia (EST), Av. Darcy Vargas 1200, 69050-020, Manaus, Amazonas, Brasil
duvoisin66@hotmail.com

RESUMO

A semente da castanha-da-amazônia (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) apresenta embrião do tipo hipocotilar, rico em reservas nutritivas e lipídicas. As plântulas possuem germinação bipolar, caracterizada pela emergência da parte aérea do lado oposto ao da raiz primária. O hipocótilo, de reservas persiste, na estrutura basal das plantas, mesmo após o estabelecimento da plântula, quando esta não depende mais das reservas para o desenvolvimento. A Fazenda Agropecuária Aruanã adota a poda da parte aérea e da raiz com sucesso na produção de mudas da castanha-da-amazônia. O presente projeto visou dar fundamentos técnico-científicos para os métodos empíricos aplicados. O estudo avaliou o esgotamento das reservas lipídicas das sementes no desenvolvimento das mudas de *B. excelsa*, o efeito da poda na produção de biomassa e na anatomia do desenvolvimento dos feixes vasculares na estrutura basal da planta (hipocótilo). Foram avaliadas sementes (frutificação 2022) e mudas com um ano (frutificação 2021) e dois anos (frutificação 2020) provenientes da Fazenda Aruanã submetidas a poda e, mudas controle das mesmas frutificações. A prática da poda nas mudas aumentou a matéria seca do eixo caulinar e radicular pelo incremento do diâmetro. Contribuiu também para o desenvolvimento mais acelerado dos tecidos vasculares e, retardou o consumo das reservas lipídicas durante a recuperação dos danos pós-poda, além de modificar a composição dos ácidos graxos. As alterações anatômicas e metabólicas aumentam a resistência da espécie em plantios definitivos.

Palavras-chave: semente, hipocótilo, lipídios, biomassa, tecido vascular, germinação bipolar.

1. Introdução

Bertholletia excelsa Bonpl. (castanha-da-amazônia) é uma espécie arbórea de dossel, podendo atingir até 50 m de altura e 3 m de diâmetro à altura do peito (DAP). É o único representante do gênero *Bertholletia* da família Lecythidaceae. A espécie ocorre em florestas de terra firme da bacia amazônica nos países Bolívia, Peru, Colômbia, Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa e Brasil (Catenacci *et al.* 2023). No Brasil a espécie é encontrada nos estados de Rondônia, Acre, Amazonas, Roraima, Amapá, Pará e Maranhão (REFLORA 2023). A castanha-da-amazônia é um dos principais produtos florestais não madeireiros (PFNM) comercializados na região amazônica. Apresenta grande importância econômica para os povos e comunidades tradicionais por meio da atividade extrativista (IBGE 2022).

É uma das espécies nativas indicadas para programas de reflorestamento de áreas degradadas e plantios para produção de frutos (Muller *et al.* 1995), por apresentar excelentes características silviculturais, tais como rusticidade, desrama natural, alta porcentagem de sobrevivência, tolerância a luz, crescimento e estabelecimento rápido (Costa *et al.* 2009), além da ausência de problemas fitossanitários e boa capacidade de rebrotação após perturbações pelo fogo, secagem ou corte (Salomão *et al.* 2014; Scoles *et al.* 2011).

A semente da castanha-da-amazônia apresenta embrião do tipo hipocotilar (Corner 1976). Neste tipo apenas o eixo hipocótilo-radícula desenvolve-se e os cotilédones são vestigiais (Camargo *et al.* 2008), anatomicamente é constituído por tecidos parenquimáticos, delimitados por anel meristemático envoltos por camada epidérmica (Camargo *et al.* 2000), permanecendo uma fina camada de resquícios do endosperma e apresenta corpos proteicos e gotículas de óleo em abundância no tecido parenquimático (Tsou e Mori 2002).

Neste embrião hipocotilar quando maduro, encontrou-se 60 a 70% de lipídios, 13 a 18% de proteínas, 2 a 11% de carboidratos e 2 a 8% de fibras (Martins 2015). Essas reservas são consumidas durante a germinação, sendo posteriormente mobilizadas para diferentes partes da planta, auxiliando o crescimento e sobrevivência da plântula até que se torne autotrófica (Apezato-da-Gloria e Carmello-Guereiro 2006).

A germinação de *B. excelsa* é bipolar, caracterizada pela emergência da parte aérea do lado oposto ao da raiz primária (Camargo *et al.* 2008) e, as reservas estocadas no hipocótilo persistem por um longo tempo na estrutura basal das plantas, mesmo quando se torna autotrófica e não depende mais das reservas para a nutrição. E não encontramos na literatura estudos sobre a persistência das reservas no hipocótilo em mudas de *B. excelsa* e nem sobre a duração temporal em que essas reservas são absorvidas durante o desenvolvimento ou sobre as alterações anato-histoquímicas e lipídicas nestes tecidos.

Considerando que *B. excelsa* tem boa capacidade de brotação (Scoles *et al.* 2011), a poda da parte aérea e da raiz na produção de mudas é adotada na Fazenda Agropecuária Aruanã, uma empresa especializada em cultivo de plantas tropicais sediada no Estado do Amazonas. Tal técnica, além de fácil aplicação e baixo custo, aumenta a sobrevivência no campo, após transferência para o plantio final.

Desta forma, pretende-se com esse estudo colaborar com a Fazenda e dar fundamentos técnico-científicos para os métodos empíricos ao avaliar quais as respostas das mudas de *B. excelsa* à poda que viabilizam o aumento da resistência e sobrevivência da espécie em campo. Para isso, foi analisado quantitativamente as reservas lipídicas e as modificações na morfologia celular durante o desenvolvimento inicial das mudas de *B. excelsa*, além de avaliar o efeito da poda no acúmulo de matéria seca como indicativo da recuperação do crescimento.

2. Material e Métodos

2.1. Procedência das sementes e produção de mudas

As sementes utilizadas no presente estudo foram provenientes da Fazenda Agropecuária Aruanã, localizada na rodovia AM-010 km 215, município de Itacoatiara/AM, oriundas das frutificações de 2020, 2021 e 2022. As mudas foram produzidas em condições ambientais locais, clima do tipo Amw, temperatura média anual de 27 °C e precipitação de 2.300 mm ano⁻¹.

As sementes foram coletadas durante a dispersão natural entre janeiro e março de

2022, em seguida armazenadas em areia em temperatura ambiente na Fazenda Aruanã, permanecendo até o mês de junho/2022 quando foram transportadas para o Laboratório de Sementes – LABSEM no Campus III do INPA, em Manaus/AM onde foram acondicionadas em câmara fria (15 °C) até o início dos experimentos.

As mudas utilizadas como controle foram produzidas no INPA/Campus III em Manaus, em ambiente de casa de vegetação, com 70% de luz natural, temperatura média anual de 27 °C e umidade média relativa do ar de 83%, irrigadas em dias alternados. As sementes foram semeadas com tegumento parcialmente removido e na posição horizontal em vermiculita fina como substrato.

Após a formação de plântulas com pelo menos 5 cm de comprimento da parte aérea e no mínimo duas folhas expandidas, foram transplantadas para embalagens de polietileno (20 x 12 x 10 cm), contendo vermiculita e terra vegetal, na proporção de 2:1, como substrato. Após o transplante permaneceram na casa de vegetação durante um ano (1a0p) e dois anos (2a0p). Para permitir a avaliação final ao mesmo tempo as mudas de dois anos foram oriundas da frutificação 2020 e as de um ano da frutificação de 2021.

As mudas submetidas a poda foram produzidas na Fazenda Aruanã, em condições ambientais locais. Foram utilizadas sementes dos mesmos anos como as do controle (2020 e 2021), semeadas sem tegumento em posição vertical em sementeiras de bancada suspensa, com serragem como substrato e, irrigadas diariamente.

Após a formação de plântulas com pelo menos 10 cm de comprimento da parte aérea, foram submetidas a primeira poda manual, com auxílio de tesoura de poda. O corte foi realizado na parte aérea, permanecendo cerca de 5 cm de comprimento e na raiz principal, permanecendo cerca de 2 cm (Figura 1 A). Em seguida foram transplantadas para embalagens de saco preto de polietileno (12 x 8 x 6 cm), contendo barro peneirado como substrato. Após o transplante permaneceram em ambiente de viveiro rústico com cobertura de palha, durante 1 ano (1a1p). Na mesma embalagem e no mesmo ambiente as mudas da frutificação de 2020 sofreram a 2ª poda e permaneceram no viveiro por mais um ano (2a2p).

A metodologia utilizada na técnica de poda estão descritas na Tabela 1 e ilustrada na Figura 1.

2.2. Avaliação da produção de matéria seca

Em junho de 2022 as mudas produzidas na fazenda de um ano e dois anos foram transportadas para o viveiro do Laboratório de Sementes – LABSEM/Inpa no Campus III e, mantidas em ambiente telado com 50% de sombreamento, até o início dos experimentos.

Foram utilizadas 20 sementes e 20 mudas de cada tratamento (Tabela 1). As mudas foram retiradas das embalagens, o substrato eliminado e, em seguida cortadas em quatro partes: (1) folhas, (2) caule, (3) hipocótilo, (4) raízes. As partes foram cuidadosamente limpas manualmente com pincel em água corrente e quando necessário, o resto do tegumento foi retirado. Para a avaliação das variáveis matéria seca, cada uma das partes das vinte mudas de cada tratamento foi colocada em saco de papel devidamente identificado e o material foi submetido a secagem em estufa a 105 °C e, após 24 h, pesado em balança (0,001 g).

As variáveis diâmetro do caule, medido na base acima do hipocótilo e da raiz principal, medido na base abaixo do hipocótilo com paquímetro digital (precisão 0,01 mm); a altura do caule, medida da base do hipocótilo até o pecíolo da última folha e o comprimento da raiz principal, medida da base abaixo do hipocótilo até a coifa com régua milimetrada e, o número de folhas, contadas individualmente, tiveram suas medições realizadas no material fresco.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) e os resultados submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). As análises foram efetuadas com auxílio do software R versão 4.3.1.

2.3. Estudos Anatômicos e Histoquímicos

Os estudos anatômicos e histoquímicos foram realizados no Laboratório de Botânica Agroflorestal – LABAF na Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

As amostras para as descrições anatômicas foram constituídas por 10 sementes e 10 hipocótilos das mudas de cada tratamento (Tabela 1), divididas em 02 (duas) subamostras, onde 05 (cinco) foram utilizadas para cortes frescos e 05 (cinco) foram

fixadas para o preparo de lâminas semi-permanentes. Neste estudo, a denominação semente é o embrião fresco, envolto apenas pelo resquício do endosperma, ou seja, a semente sem o tegumento, de acordo com Tsou & Mori (2002). Hipocótilo, foi denominado, a porção de ligação entre a parte aérea e a raiz, das mudas de cada tratamento.

Antes dos procedimentos, cada semente e hipocótilo das 02 (duas) subamostras, foram seccionadas de forma transversal em três partes devidamente identificadas, porção apical (polo caulinar), mediana e basal (polo radicular).

Os testes histoquímicos foram realizados com material fresco, cortados a mão livre, com auxílio do micrótomo de mesa e os procedimentos para a reação, seguiu-se as metodologias propostas por Ventrella *et al.* (2013), descritos na Tabela 2. A montagem das lâminas para as observações das reações foi realizada em glicerina.

No preparo das lâminas semi-permanentes, as amostras foram fixadas em formalina neutra tamponada (FNT) por 48 horas e, posteriormente conservadas em álcool etílico 70% (Lillie 1965). As amostras foram seccionadas em micrótomo de mesa e coradas com Safrablau (Kraus e Arduin 1997) e, as lâminas montadas em glicerina.

As observações dos aspectos anatômicos foram realizadas em microscópio óptico Zeiss Primo Star (1000x) e as fotografias em câmera digital acoplada Canon Power Shot A6 50 IS.

2.4. Quantificação da Reserva Lipídica das sementes

A extração química dos óleos e as análises cromatográficas foram realizadas na Central de Análises Químicas – CAQ da Escola Superior de Tecnologia – EST da Universidade do Estado do Amazonas – UEA.

As amostras para quantificar as reservas lipídicas foram constituídas por 20 sementes e 20 hipocótilos das mudas de cada tratamento (Tabela 1), secas em estufa a 60 °C por 24 h, trituradas em moedor elétrico de grãos modelo MG200 Black Decker® e, divididas em duplicatas de 10 g.

A extração do óleo foi realizada com hexano P.A. (C₆H₁₄), marca Synth[®] no aparelho extrator Soxhlet, submetido a aquecimento de 50 °C, em duas lavagens de 250 ml por 4 horas cada. Após esta etapa, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 50 °C e 80 rpm, para separação da mistura (óleo/solvente). O óleo foi pesado em balança (0,001 g). O rendimento do óleo foi calculado a partir da massa do material seco e da massa do óleo extraído, conforme fórmula 1 (IAL 2008):

$$\frac{100 \times N}{P} = \text{g de lipídios por cento} \quad (1)$$

Onde:

N = n° de gramas de lipídios

P = n° de gramas da amostra

A reação de transesterificação foi realizada em meio ácido em sistema de refluxo, com 50 ml de metanol P.A. (CH₃OH) marca Synth[®] e 0,02 ml de ácido sulfúrico 98% (H₂SO₄) marca Biograde[®], em aquecimento à 50 °C, pelo período de 4 horas. As misturas reacionais obtidas de cada tratamento foram transferidas para funis de separação e permaneceram em repouso durante 12 horas para separação das fases. A fase mais densa (glicerol) foi descartada e o éster metílico, passou por sucessivas lavagens com água destilada. A camada aquosa foi desprezada e a orgânica utilizada para injeção.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo em fase gasosa acoplado à espectrômetro de massas (CG-MS), modelo CG-7890B/MS5977A marca Shimadzu[®]. Com coluna cromatográfica RTX-Biodiesel TG; hélio como gás de arraste a uma vazão de 1,0 ml/min com volume de injeção de 1 µl, em modo split (20:1) a 270 °C. As temperaturas do detector e do injetor foram de 220 °C e 200 °C, respectivamente.

A porcentagem dos ácidos graxos é dada pela divisão da área de cada ácido pela área total, multiplicada por 100.

3. Resultados

3.1. Avaliação da produção de matéria seca

Comparando as médias das biomassas secas verifica-se que as sementes possuem matéria seca mais alta (1,793 g) e, que se reduz com o desenvolvimento das mudas; como observado na matéria seca do hipocótilo das mudas controle de um ano que se reduziu para 1,007 g e, para 0,850 g nas mudas de dois anos. Mudanças com poda apresentam no primeiro ano matéria seca do hipocótilo de 0,929 g sem diferença estatística com as mudas controle. No entanto, nas mudas de dois anos e com duas podas a matéria seca do hipocótilo aumentou a valores estatisticamente mais altos (1,325 g) do que ambas as mudas dos controles e as com um ano após a primeira poda (Figura 2 e Tabela 3).

Quanto a matéria seca da parte aérea (caule e folhas), as mudas do controle com um ano de desenvolvimento apresentaram em média 2,107 g e, no segundo ano o valor se manteve, 1,804 g. Entretanto, após poda a matéria seca da parte aérea foi mais alta (2,788 g) no primeiro ano e, aumentou ainda mais no segundo ano (3,940 g) (Figura 3 e Tabela 4).

Analisando o caule separadamente das folhas, observa-se que, após a primeira poda apresentou 1,830 g de matéria seca e, após a segunda poda 2,843 g, representando um aumento três vezes maior do que os respectivos controles (Figura 4A e Tabela 4). A altura do caule não reflete o aumento da massa seca, pois apesar de apresentar valores mais altos no comprimento após a primeira poda, de 31,4 cm e, após a segunda poda de 29,6 cm, em relação aos respectivos controles, 27,6 cm e 25,0 cm, não apresentam discrepância entre si (Figura 4B e Tabela 4). Entretanto o aumento da biomassa pode ser explicado pelo aumento do diâmetro do caule que após poda aumentou de 4,0 para 4,8 mm nas mudas com uma poda e, aumentou ainda mais após a 2ª poda para 6,2 mm (Figura 4C e Tabela 4).

A matéria seca das folhas apresenta um padrão diferente do que o caule, onde o peso seco das folhas nas mudas controle se reduziu entre o primeiro e o segundo ano de 1,498 g para 0,588 g e, se manteve estável nas mudas após poda entre 0,957 g e 0,919 g

(Figura 5A e Tabela 4). Como a matéria seca, o número de folhas foi maior apenas no primeiro ano do controle (10,5) e se reduziu para (5,6) no segundo ano. Considerando que as folhas foram retiradas duas vezes manualmente, nas mudas com poda, o número se manteve estável 5,5 e 6,5 similares ao controle do 2º ano (Figura 5B e Tabela 4).

Desta forma o aumento da biomassa da parte aérea depende principalmente do diâmetro do caule, com pouca contribuição da altura e, nenhuma influência da folhagem.

Na parte subterrânea observa-se, similar a parte aérea, uma estagnação da massa seca nas mudas controle entre o 1º ano (0,509 g) e 2º ano (0,536 g) e, um aumento significativo pela poda no primeiro ano (1,816 g) e, ainda mais após a 2ª poda (2,912 g) (Figura 6A e Tabela 4). Considerando que as mudas com poda tiveram também a raiz principal podada e foram mantidas em sacos de polietileno menores (12 x 8 x 6 cm), do que as embalagens plásticas dos tratamentos controles (20 x 12 x 10 cm), o comprimento médio da raiz primária não ultrapassou 9,3 cm com 1 poda e 7,9 cm com 2 podas (Figura 6B e Tabela 4). Entretanto o diâmetro da raiz principal aumentou significativamente de 4,7 mm no primeiro ano da poda para 7,1 mm no segundo ano da poda (Figura 6C e Tabela 4).

Os resultados indicam que as reservas da semente foram utilizadas para o crescimento da parte aérea e da raiz (controle e poda). A poda estimulou o acúmulo da biomassa no diâmetro do caule e da raiz principal, já no primeiro ano e ainda mais no segundo ano. O que pode indicar maior resistência após transplante para o plantio definitivo.

3.2. Estudos Anatômicos e Histoquímicos

Em corte transversal observa-se que a semente apresenta cinco (5) camadas de células distintas. A primeira é o resquício do endosperma, que se apresenta espessado, as células estão dispostas sem organização definida, não se observa conteúdo de reservas (Figura 7 A-C).

A segunda camada representa a epiderme do embrião, esta se apresenta biestratificada (Figura 7B). O primeiro estrato é bisseriado, com células de formato tabular, tamanho irregular, de paredes espessadas, com amido e lipídios; algumas células formam idioblastos com compostos fenólicos e alcalóides (Figura 8 B-E). Acima e ao

longo deste estrato observa-se a presença de cutícula cerosa espessa. O segundo estrato é formado por uma única série de células menores, compactas, formato arredondado e de tamanho relativamente uniforme; apresenta camada de cutícula cerosa, menos densa do que o primeiro estrato, com conteúdo lipídico.

A terceira camada, logo abaixo da epiderme, representa o meristema fundamental cortical (futura região do córtex na plântula). É formada por células parênquimáticas compactas, sem espaços intercelulares; pode-se observar entre 9 a 11 estratos de células, de tamanho menor e mais uniforme que a quinta camada. O meristema fundamental cortical é reduzido, comparado com a ampla região medular. A quinta camada é a maior de todo o tecido embrionário e representa a região medular. Esta camada é formada por células parenquimáticas alongadas, de tamanhos variados, desuniformes, sem formar estratos. Ambas as camadas, terceira e quinta, compõe-se por células grandes e vacuolizadas, que reservam grande quantidade de lipídios e proteínas (Figura 8 A,C).

Entre as camadas de células parenquimáticas há um anel meristemático, formado por quatro estratos de células de formato arredondado, uniformes e justapostas (Figura 7C).

As diferentes camadas do tecido embrionário apresentam o mesmo arranjo celular nas três porções estudadas: caulinar (PC), mediana (PM) e radicular (PR).

No hipocótilo das mudas, em corte transversal, observa-se a epiderme, similar a do embrião, as regiões cortical e medular, compostas por células parenquimáticas e o câmbio vascular colateral (Figura 7 D-O). Nas células parênquimáticas das regiões cortical e medular há amido como conteúdo de reserva e, presença de lignina nos tecidos xilemáticos e floemáticos (Figura 8 B, F). Foi observado o mesmo arranjo celular nas três porções estudadas, caulinar (PC), mediana (PM) e radicular (PR) dos hipocótilos.

Os hipocótilos das mudas controle de um (Figura 7 D-F) e dois (Figura 7 G-I) anos, apresentam característica de crescimento secundário, com diferenciação apenas na região do tecido vascular. Não há diferenciação na estrutura das regiões cortical e medular, que permanece ainda com característica primária. Observa-se divisões periclinais do câmbio formando o xilema secundário para o interior e o floema secundário para a periferia, há a presença de xilema primário disposto isoladamente.

Nas mudas submetidas a uma (Figura 7 J-L) e duas (Figura 7 M-O) podas, observa-se que o câmbio mantém as divisões periclinais aumentando o floema secundário e, ocorre divisões anticlinais, onde o xilema secundário acompanha o crescimento em espessura do hipocótilo. Nas mudas submetidas a duas podas o aumento dos tecidos vasculares é maior e mais evidente quanto comparado ao controle da mesma idade e, observa-se o xilema secundário disposto em cordões com raios xilemáticos pouco desenvolvido, característico do crescimento secundário.

Foi observado que os hipocótilos apresentam estrutura vascular com arranjo que se assemelha a do caule, indicando que o hipocótilo de mudas de *B. excelsa* é uma estrutura intermediária de transição caulinar.

E ainda que o tecido floemático é desenvolvido primeiro, pois apresenta diferenciação celular mais evidente do que o tecido xilemático, pode-se relacionar essa característica, ao transporte das reservas armazenadas no hipocótilo para o desenvolvimento da muda, considerando a principal função deste tecido condutor, em transportar metabólitos em solução para todas as partes da planta. Outro fato relacionado observado é a mobilização e deposição de reservas, que ocorre nos hipocótilos das mudas em desenvolvimento. Enquanto as principais reservas lipídicas e proteicas das sementes são mobilizadas para os pontos de crescimento das mudas, o amido é depositado como reserva neste tecido.

Foi possível constatar que a poda acelera o desenvolvimento do tecido vascular ocasionando o crescimento em espessura do órgão, o que indica que a planta investe na condução das reservas estocadas para recuperação e crescimento após o corte, além de garantir a rigidez celular.

A análise dos resultados aqui apresentados sugere que as alterações morfoanatômicas podem ser importantes na tolerância à danos de *B. excelsa*, possivelmente interagindo com estratégias metabólicas.

3.3. Quantificação das Reservas Lipídicas

As sementes apresentaram rendimento de óleo de 90,3% e, com o desenvolvimento das mudas ocorreu redução deste óleo nos hipocótilos, para 11,1% após um ano e 5,5% após dois anos. Nas mudas após poda observou-se uma menor redução

no primeiro ano (23,1%) e aos dois anos (10,4%), este último valor se igualou com as mudas do controle de um ano (Figura 9 e Tabela 3).

A partir dos cromatogramas do óleo das sementes e dos hipocótilos das mudas foi possível determinar os percentuais dos ácidos graxos presentes e, a identidade química desses ácidos graxos determinada por espectrometria de massas conforme demonstrado nas Figuras 10 e 11 e Tabela 5.

As sementes apresentam 59,4% de ácidos graxos insaturados e 40,7% saturados. Nos tratamentos de poda foi possível observar que as mudas submetidas a uma poda mantiveram a porcentagem de ácidos graxos insaturados (58,53%) quando comparadas com as mudas da mesma idade sem poda que apresentaram 73,44%. Enquanto nas mudas submetidas a duas podas, houve aumento dessa porcentagem para 85,60% comparada as mudas controle com 43,71%.

Entre os ácidos graxos insaturados observados, estão o linoleico e oleico e, foi constatado 1,15% do ácido elaídico, isômero do oleico, apenas nas mudas controle com um ano de desenvolvimento e, 0,99% do ácido eicosanoico constatado apenas nas mudas controle com dois anos de desenvolvimento.

Nas sementes foi observado 28,58% de ácido linoleico e 30,78% do ácido oleico. Ambos os tratamentos de poda ocasionaram aumento da porcentagem do ácido linoleico, sendo observado 39,44% nas mudas submetidas a uma poda e, 54,71% nas mudas submetidas a duas podas, comparada as mudas controles que apresentaram 36,70% e 25,15%, respectivamente.

Quanto a porcentagem do ácido oleico foi observado que nas mudas submetidas a uma poda reduziu (19,09%) e aumentou nas mudas com duas podas (30,89%), comparando com as mudas controle com valores de 35,59% e 17,57%, respectivamente.

Quanto aos ácidos graxos saturados, estão o palmítico e esteárico em maiores porcentagens e observados em todos os tratamentos e, em porcentagens menores o ácido oxiraneundecanoico presente apenas nas sementes e, o ácido oxiranoctanóico (0,67%) apenas nas mudas controle com dois anos de desenvolvimento.

As porcentagens dos ácidos saturados observadas nas sementes foram 22,25%

palmítico, 16,73% esteárico e 1,67% oxiraneundecanoico.

Nas mudas submetidas a uma poda ocorreu aumento das porcentagens, tanto do ácido palmítico (23,57%) quanto do ácido esteárico (17,90%), comparado as mudas controle com valores de 14,71% e 11,85%, respectivamente. Houve redução do ácido palmítico e esgotamento do ácido esteárico nas mudas submetidas a duas podas, conforme as porcentagens observadas nas mudas controle com 29,67% de palmítico e 25,95% de esteárico.

A poda influenciou no consumo dos lipídios e conseqüentemente no metabolismo dos ácidos graxos, considerando as alterações nas porcentagens indicadas nos tratamentos de poda comparado aos controles de mesma idade.

4. Discussão

As reservas das sementes são fonte de energia para o desenvolvimento inicial e os processos metabólicos em funcionamento e/ou como fonte de matéria para a construção de tecidos vegetais que irão constituir a plântula (Buckeridge *et al.* 2004; Bewley *et al.* 2013; Marcos-Filho 2015). Neste estudo foi observado em *B. excelsa* os maiores valores de matéria seca nas sementes (1,793 g) comparado com os hipocótilos das mudas controle e após poda, considerando que ainda apresentam estocadas todas as reservas nutricionais e proteínas, detectadas pelos testes histoquímicos e lipídicas, constatada pelo alto valor de rendimento (90,3%).

E o embrião de *B. excelsa* é descrito como macropodial, caracterizado por não apresentar cotilédones diferenciados (Tsou e Mori 2002), composto por tecidos parenquimáticos delimitados por anel de tecido meristemático (Camargo *et al.* 2000), rico em corpos proteicos e gotículas de óleo (Tsou e Mori 2002) e, envolto por camada epidérmica e uma película lignificada (Camargo *et al.* 2000). No presente estudo anatômico foi confirmado que o embrião de *B. excelsa* apresenta meristema fundamental cortical e medular formado por células parenquimáticas, que armazenam substâncias de reserva e, um anel meristemático, que origina os tecidos vasculares, corroborando com os autores. Essa observação indica que o embrião da espécie é o eixo embrionário

responsável pelo crescimento inicial e pelo estabelecimento de plântulas fornecendo energia e nutrientes.

O rendimento de lipídios (90,3%) observado no presente estudo é superior ao valor de 70,7% obtido no estudo de Gonçalves *et al.* (2002), 75% em Freitas *et al.* (2007) e 72,5% em Chunnieng *et al.* (2008), o que pode estar associado a utilização do solvente hexano. Considerado o principal solvente para obtenção de óleo, a partir das sementes, devido a sua alta capacidade de extração (Silva *et al.* 2021). O solvente éter de petróleo foi utilizado nos trabalhos de Gonçalves *et al.* (2002) e Freitas *et al.* (2007).

A origem da matéria-prima também afeta diretamente nos resultados, assim como o preparo da amostra, que pode afetar a taxa de rendimento da extração química devido à superfície de contato do material com o solvente (Silva *et al.* 2021). Cada um destes estudos apresentou uma metodologia e procedência das sementes diferentes o que pode ter influenciado nos resultados. As sementes utilizadas no presente estudo, permaneceram armazenadas em areia por 3 meses e por mais 2 meses em câmara fria, antes do preparo da amostra e a extração química do óleo.

A mobilização de reserva em sementes é utilizada pelo metabolismo das plântulas em crescimento, além de servir para a transferência de matéria, carbono e nitrogênio, principalmente (Buckeridge *et al.* 2004; Bewley *et al.* 2013; Marcos-Filho 2015). Visto também neste estudo na redução da biomassa nos hipocótilos das mudas com e sem poda, pois as principais reservas lipídicas e proteicas estão sendo mobilizadas para os pontos de crescimento.

A mobilização de carboidratos e lipídios é um processo contínuo durante o desenvolvimento da plântula, onde ocorre a produção e o transporte de sacarose nos tecidos de reserva. No entanto, se o desenvolvimento da plântula for descontínuo, o processo de mobilização poderá ser interrompido de forma a evitar acúmulo de excesso de açúcares por toda a plântula, o que pode aumentar os níveis de radicais livres e o consumo de energia para manter os tecidos vivos (Buckeridge *et al.* 2004). O que pode explicar as mudas submetidas à poda terem apresentado maior quantidade de óleo retardando o consumo do mesmo. Esse retardo no consumo pode ser uma estratégia da espécie, para evitar o excesso de açúcar, gerado para recuperar os órgãos aéreos e radiculares e, e impedir o desequilíbrio metabólico, prejudicando as funções vitais da

planta.

A poda, corte da parte aérea, consiste em eliminar a gema terminal da muda alterando o ritmo de crescimento, o que pode ser bom para o desenvolvimento da planta, porém depende do nível de tolerância da espécie (Dionísio *et al.* 2021; Schwartz *et al.* 2022). Estudo sobre o efeito da poda e do volume do tubete nas mudas de *B. excelsa*, constatou que a poda não influenciou na qualidade das mudas, após 165 dias de avaliação e que houve efeito significativo na altura do caule ($26,5 \pm 2,8$) e nos diâmetros do caule ($5,3 \pm 0,9$) e da raiz ($5,6 \pm 1,1$) (Dionísio *et al.* 2021). Outros estudos relacionados com a qualidade de mudas de *B. excelsa*, demonstraram que a poda não prejudica o desenvolvimento da espécie.

Em estudo da qualidade das mudas de *B. excelsa* de diferentes tamanhos em ambiente de viveiro, foi realizado antes do transplante para tubetes, corte da parte aérea e da raiz em plântulas aos 30 dias de germinação, verificou-se após seis meses de avaliação que a poda não prejudicou o desenvolvimento e o crescimento das mudas, apresentando efeito positivo nos diâmetros do caule e da raiz (Schwartz *et al.* 2022). Em plantios experimentais de castanha-da-amazônia na bacia do rio Trombetas em Oriximiná/Pará, *B. excelsa* mostrou alta capacidade de rebrote após episódios traumáticos (secagem, corte) nos ambientes de capoeira e castanhal, que gerou uma situação favorável ao crescimento em altura da planta, com incrementos significativos das taxas médias de crescimento bimestral nos meses seguintes ao rebrote (Scoles *et al.* 2011).

No estudo de Dionísio *et al.* (2021) e Schwartz *et al.* (2022) o tratamento aplicado é similar ao das mudas submetidas a primeira poda, diferindo no tempo de avaliação, pois no presente estudo as mudas foram avaliadas um ano após a poda realizada na fase de plântula. E corroborando com os resultados dos autores apresentaram efeito significativo nos diâmetros do caule e da raiz e, na altura do caule também constatado por Scoles *et al.* (2011).

O incremento do diâmetro do caule e da raiz pode ser explicado pelo desenvolvimento acelerado do tecido vascular que ocasiona o crescimento em espessura do órgão, observado no estudo anatômico dos hipocótilos das mudas submetidas a poda no presente estudo.

As embalagens influenciaram nos resultados do comprimento da raiz principal,

pois as mudas dos tratamentos submetidos à poda, estavam em embalagens menores do que as embalagens plásticas dos tratamentos controles. Foi observado que poda induziu a ramificação das raízes secundárias provavelmente para promover alcance de nutrientes. Mudas de *B. excelsa* produzidas em tubetes de 345 cm³ apresentaram maior crescimento radicular (14,1±2,5 cm) comparada as produzidas em tubetes de 115 cm³ (8,7±2,7 cm) (Dionísio *et al.* 2021).

As gorduras e os óleos presentes nas plantas existem principalmente na forma de triacilgliceróis, nos quais as moléculas de ácidos graxos se ligam covalentemente às hidroxilas do álcool glicerol (Taiz *et al.* 2017). Para mobilizar a energia armazenada na forma de triacilglicerol, ocorre a ação das enzimas lipases que liberam primeiro os ácidos graxos esterificados do triacilglicerol. Esses ácidos graxos livres podem então ser degradados através dos ciclos de β -oxidação e glioxilato e posteriormente convertidos em sacarose (Graham, 2008).

Esses ácidos graxos em plantas normalmente são ácidos carboxílicos de cadeia reta com um número par de átomos de carbono e, podem ser classificados em saturados e insaturados, os saturados não apresentam duplas ligações em suas cadeias, enquanto os insaturados apresentam uma ou mais duplas ligações (Cassim *et al.* 2019).

Dentre as características dos óleos vegetais, a estabilidade oxidativa é uma das mais importantes, pois o óleo, quando oxidado, se torna impróprio para consumo humano e reduz o tempo de vida útil e, esta oxidação está diretamente relacionada à presença de ar, água, aquecimento e à presença de insaturações nos óleos vegetais (Melo *et al.* 2014).

A composição de ácidos graxos em sementes de *B. excelsa* apresenta elevadas proporções de ácidos graxos insaturados, em relação aos saturados (Gonçalves *et al.* 2002; Silva *et al.* 2010). No presente estudo foi possível constatar que a composição lipídica de *B. excelsa* apresenta maior porcentagem de ácidos graxos insaturados, observado tanto nas sementes quanto nos hipocótilos das mudas. O que comprova a sensibilidade da espécie a rancidez oxidativa, pois quanto maior o grau de instauração de um ácido graxo, maior a propensão a oxidação.

Isômeros são compostos que possuem os mesmos átomos nas mesmas proporções, mas esses átomos se ligam uns aos outros de diferentes formas (Seca 2021). O ácido elaídico é quimicamente semelhante em tudo ao ácido oleico, exceto na

configuração da ligação dupla e por ser muito mais raro na natureza, no entanto, é um dos produtos do processo industrial de hidrogenação. Este processo é utilizado pela indústria alimentícia para aumentar o prazo de validade de óleos ou produzir gordura vegetal hidrogenada (Pinho e Suarez 2013). O que pode indicar que o óleo presente nos hipocótilos das mudas até um ano de desenvolvimento ainda se apresentam viáveis, onde esse isômero está presente apesar de ocorrer em menor porcentagem.

O ácido linoleico, com duas duplas ligações, podem ser oxidados a uma velocidade de 64 a 100 vezes maior que o ácido oleico, com uma dupla ligação (Alcarde *et al.* 2019). A realização da poda ocasionou aumento da porcentagem do ácido linoleico nas mudas submetidas tanto a uma poda, quanto nas mudas que receberam duas podas. Os ácidos insaturados são muito importantes para o aumento da resistência e na defesa contra o ataque de patógenos, especialmente fungos (Lim *et al.* 2017). O que pode explicar esse aumento das porcentagens do ácido linoleico nos tratamentos de poda.

Quanto a porcentagem do ácido oleico nas mudas submetidas a uma poda houve redução e, nas mudas submetidas a duas podas ocorreu o aumento da porcentagem. O ácido oleico é bastante popular pelo sabor único, pelo valor nutricional e pelos benefícios à saúde humana, é fonte de compostos importantes como esterol e vitamina E (Huang *et al.* 2020). Esse resultado sugere que podas consecutivas promovem o aumento da porcentagem do ácido oleico, o que pode explicar a atratividade pelos predadores e, que a poda realizada ainda no início do desenvolvimento diminui essa porcentagem, possibilitando redução no ataque das mudas em campo.

O ácido palmítico em excesso induz a apoptose celular utilizada como mecanismo de defesa em vegetais, que tem como consequência a destruição de células supérfluas ou defeituosas sendo considerado essencial para a manutenção do desenvolvimento do vegetal (Yu *et al.* 2019). Em condições de estresse, a planta acumula ácido esteárico nas membranas celulares, mantendo a fluidez e estabilidade das membranas, protegendo assim as células contra danos (Santos *et al.* 2021).

Nas mudas submetidas a uma poda ocorreu aumento das porcentagens, tanto do ácido palmítico (23,57%) quanto do ácido esteárico (17,99%), enquanto nas mudas submetidas a duas podas ocorreu a redução do ácido palmítico (14,41%) e o esgotamento do ácido esteárico. O que pode sugerir que podas consecutivas podem ser prejudiciais a

espécie, pois a planta “perde” a capacidade de defesa.

Compostos fitoquímicos, também chamados de metabólitos secundários, são elementos químicos, não nutrientes, de origem vegetal, que apresentam atividade biológica (Al-Marzoqi *et al.* 2016). Na planta estão envolvidos na defesa contra parasitas e predadores (Baena 2015). Os ácidos saturados oxiraneundecanóico e oxiranoctanóico são fitoquímicos com propriedades antioxidante (Al-Marzoqi *et al.* 2016) e antibacteriana (Hussein *et al.* 2016), respectivamente. O ácido oxiraneundecanóico ocorre nas sementes o que associa ao consumo de *B. excelsa* como benéfico à saúde humana por sua propriedade antioxidante (Martins 2015). E o ácido oxiranoctanóico ocorre nas mudas controle com dois anos de desenvolvimento, que pode estar associado ao desenvolvimento de defesa.

Na etapa inicial da conversão dos lipídios de reserva em sacarose, ocorre a hidrólise dos triacilgliceróis que libera as moléculas de ácidos graxos e glicerol e, parte desses ácidos são metabolizados no processo seguinte da β -oxidação. No entanto, alguns desses ácidos graxos são desviados para outras reações metabólicas em algumas sementes oleaginosas (Taiz *et al.* 2017). O que pode explicar a alteração das porcentagens e composição dos ácidos graxos nas mudas de *B. excelsa* que sofreram poda.

5. Conclusões

A poda estimula a realocação e acúmulo da biomassa no diâmetro do caule e da raiz principal, indicando que a técnica torna a espécie mais resistente após transplante para o plantio definitivo, por viabilizar mudas mais robustas.

Provocou alterações morfo-anatômicas no hipocótilo das mudas, ao acelerar o desenvolvimento do tecido vascular, responsável pelo crescimento em espessura do órgão e pela rigidez celular (presença de lignina), indicando a tolerância da espécie à danos.

Retardou o consumo do óleo nos hipocótilos das mudas, possivelmente para evitar o desequilíbrio metabólico da planta, enquanto se recupera dos danos da poda. E conseqüentemente ocorreu alteração na composição dos ácidos graxos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A semente de *B. excelsa* apresentou alta porcentagem de lipídios, a principal reserva da espécie. A composição lipídica é composta majoritariamente de ácidos graxos insaturados, o que comprova a sensibilidade à rancidez oxidativa.

O embrião de *B. excelsa* consta do eixo embrionário, sendo composto por células parenquimáticas, nas regiões cortical e medular, onde encontram-se as substâncias de reservas e, um anel de tecido meristemático que origina os tecidos vasculares. No corte transversal verifica-se também a epiderme biestratificada e resquícios do endosperma.

Anatomicamente os hipocótilos de mudas de *B. excelsa* apresentam estrutura vascular com arranjo que se assemelha a do caule, indicando que são uma estrutura intermediária de transição caulinar. Fato também relacionado a esta constatação é a deposição de amido, que ocorre nos hipocótilos das mudas em desenvolvimento, característico da estrutura caulinar.

Este estudo descreveu pela primeira vez o desenvolvimento anatômico dos feixes vasculares durante desenvolvimento das mudas. E foi constatado que o tecido floemático se desenvolve primeiro, confirmado pela diferenciação celular mais evidente, o que pode estar relacionado a função principal deste tecido condutor, em transportar metabólitos em solução para todas as partes da planta.

A poda ocasionou o aumento da biomassa do caule e da raiz principal, causado pelo incremento dos diâmetros caulinar e radicular.

Acelerou a formação dos feixes vasculares, aumentando as divisões periclinais das células do tecido floemático e formação do xilema (secundário), ocasionando o crescimento em espessura do órgão. Indicando que a planta investe na condução das reservas estocadas no hipocótilo para a recuperação e crescimento após o corte, além de garantir a rigidez celular, pela presença abundante de lignina nos tecidos vasculares.

E ainda retardou no consumo dos lipídios, possivelmente para evitar o desequilíbrio metabólico, durante a recuperação dos danos da poda. E conseqüentemente ocasionou alterações na composição dos ácidos graxos, que podem ter sido desviados para outras reações metabólicas.

O aumento expressivo no ácido oleico em mudas submetidas a duas podas, pode explicar a atratividade dos predadores, considerando que esse ácido é caracterizado pelo aroma e sabor único. No entanto, é necessário realizar estudos quanto a qualidade e a palatabilidade deste óleo neste período de desenvolvimento da muda.

A análise dos resultados aqui apresentados sugere que as alterações morfo-anatômicas e bioquímicas ocasionadas pela poda podem ser importantes na tolerância à danos de *B. excelsa*, possivelmente interagindo com estratégias metabólicas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alcarde, AR; Regitano d'Arce, M; Spoto, MHF. 2006. Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. 5ª edição. Editora Manole, Manole. 480p.

Al-Marzoqi, AH; Hadi, MY; Hameed, IH. 2016. Determination of metabolites products by *Cassia angustifolia* and evaluate antimicrobial activity. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 8(2): 25-48.

Appetzato-da-Glória, B; Carmello-Guerreiro, SM. 2006. *Anatomia Vegetal*. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 438p.

Bewley, JD; Bradford, KJ; Hilhorst, HWM; Nonogaki, H. 2013. *Seeds: physiology of development, germination and dormancy*. Plenum, New York. 392p.

Buckeridge, MS; Santos, HP; Tiné, MAS; Aidar, MPM. 2004. Mobilização de reservas. In: Ferreira, AG; Borghetti, F (orgs.) *Germinação: do básico ao aplicado*. Artmed, Porto Alegre. pág. 163-185.

Camargo, IP; Castro, EM; Gavilanes, ML 2000. Aspectos da Anatomia e Morfologia de amêndoas e plântulas de castanheira-do-Brasil. *Cerne* 6 (2):11-18.

Camargo, JLC; Ferraz, IDK; Mesquita, MR; Santos, BA; Brum, HD 2008. *Guia de Propágulos e Plântulas da Amazônia*. INPA, Manaus, 168p.

Cassim, AM; Gouget, P; Gronnier, J; Laurent, N; Germain, V; Grison, M; Boutte, Y; Gerbeau-Pissot, P; Simon-Plas, F; Mongrand, S. 2019. Plant lipids: key players of plasma membrane organization and function. *Progress in Lipid Research*. 73:1-27

Corner, EJH 1976. *The seeds of dicotyledons*. Cambridge University Press, Cambridge, 552p.

Catenacci, FS; Ribeiro, M; Smith, NP; Cabello, NB. 2023. *Bertholletia excelsa*. Flora e Funga do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br>). Acessado em 25 de novembro de 2023.

Costa, JR; Castro, ABC; Wandelli, EV; Coral, SCT; Souza, SAG 2009. Aspectos silviculturais da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) em sistemas agroflorestais na

Amazônia Central. *Acta Amazônica* 39(4): 843-850.

Chunhieng, T; Hafidi, A; Pioch, D; Brochier, J; Montet, D. 2008. Detailed Study of Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*) Oil Micro-Compounds: Phospholipids, Tocopherols and Sterols Thavarith. *J. Braz. Chem. Soc.* 19(7):1374-1380.

Dionísio, LFS; Schwartz, G; Almeida, MJS; Rocha, TS; Corvera, R. 2021. Effects of pruning and recipient volume on seedlings quality of *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae). *European Academic Research.* 9:1198-1212.

Flora e Funga do Brasil 2023. *Lecythidaceae*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<https://floradobrasil.jbrj.gov.br>). Acessado em 23 de novembro de 2023.

Freitas, SP; Freitas-Silva O; Miranda, IC; Coelho, MAS. 2007. Extração e fracionamento simultâneo do óleo da castanha-do-Brasil com etanol. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 27(supl.): 14-17.

Furr, M; Mahlberg, PG. 1981. Histochemical analyses of laticifers and glandular trichomes in *Cannabis sativa*. *Journal of Natural Products.* 44:153-159.

Gonçalves, JFC; Fernandes AV; Oliveira AFM; Rodrigues, LF; Marengo RA. 2002. Primary metabolism components of seeds from Brazilian Amazon tree species. *Braz. J. Plant Physiol.* 14:139-142.

Graham, IA. 2008. Mobilização de óleo para armazenamento de sementes. *Revisão Anual de Biologia Vegetal.* 59:115-142.

Huang, J; Sun, Q; Song, G; Qi, S; Chen, J; Zhang, P; Geng, T; Lin, Q; Duan, Y. 2020. Antioxidant and anti-isomerization effects of sesamol and resveratrol on high oleic acid peanut oil. *Food Science and Technology.* 123: 1-10.

Hussein, HJ; Hadi, MY; Hameed, IH. 2016. Study of chemical composition of *Foeniculum vulgare* using Fourier transform infrared spectrophotometer and gas chromatography - mass spectrometry. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy.* 8(3): 60-89.

IAL 2008. Instituto Adolfo Lutz. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos.* 4ª edição 1ª edição digital. São Paulo. 1020p.

IBGE 2022. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da extração vegetal e da silvicultura - PEVS 2022, Rio de Janeiro, 36:1-8.

Johansen, DA 1940. *Plant Microtechnique*. 1th ed. McGraw-Hill Books Company, New York and London, 258p.

Kraus, JE; Arduin, M 1997. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. EDUR, Seropédica, 198p.

Larcher, W. 2000. *Ecofisiologia vegetal*. Editora Rima, São Paulo. 531p

Lillie, RD 1965. *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry*. McGraw-Hill Book Company, 715p.

Lim, G; Singhal, R; Kachroo, A; Kachroo, P. 2017. Fatty Acid and Lipid Mediated Signaling in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology*. 36:55-69.

Mace ME; Howell, CR 1974. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. *Canadian Journal of Botany* 52: 2423-2426.

Marcos-Filho, J. 2015. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. 2º edição. Editora Abrates, Londrina. 660 p.

Martins, M. 2015. Composição da Castanha. In: Kluczkovski, AM; Scussel, VM. *Gerenciamento de Riscos da Castanha-do-Brasil*. Editora Nova Letra, Blumenau, Santa Catarina. pág. 39-52.

Melo, MAR; Maria, AMF; Silva, EV; Filho, JRC; Souza, AG. 2014. Study of the oxidative stability of oils vegetables for production of biodiesel. *Revista Verde*. 9(1): 84-88.

Müller, CH; Figueiredo, FJC; Kato, AK; Carvalho, JEU; Stein, RLB; SILVA, AB 1995. *A cultura da castanha-do-Brasil*. EMBRAPA, coleção Plantar: 23, 65p.

Oliveira, MVT. 2000. Artificial regeneration in gaps and skidding trails after mechanized forest exploitation in Acre, Brazil. *Forest Ecology and Management* 127:67-76.

Pearse, AGE 1972. *Histochemistry: theoretical and applied*. 4th. Ed. Longman group

Limited, 314p.

Pinho, DMM; Suarez, PAZ. 2013. A Hidrogenação de Óleos e Gorduras e suas Aplicações Industriais. *Revista Virtual Química*. 5 (1): 47-62.

Salomão, R.; Santana, AC; Brienza Junior, S; Rosa, NA; Precinoto, RS 2014. Crescimento de *Bertholletia excelsa* Bonpl. (castanheira) na Amazônia trinta anos após a mineração de bauxita. *Boletim do Museu Paraense Emilio Goeldi: Ciências naturais* 9:307- 320.

Santos, LCD; Lima, LARS; Castro, AHF. 2021. Ácidos Graxos Vegetais: Composição Química, Atividade Biológica e Potencial Biotecnológico. In: Paniagua, CES. *Trabalhos nas Áreas de Fronteira da Química 2*. Editora Atena. Ponta Grossa, Paraná. Pág.34-42.

Seca, AML. 2021. Isômeros: compostos iguais com diferenças. *Açores Magazine*. 6-7.

Silva, RFS; Ascheri, JLR; Souza, JML. 2010. Influência do Processo de Beneficiamento na influência do processo de beneficiamento na qualidade de amêndoas de Castanha-do-Brasil. *Ciênc. Agrotec*. 34(2): 445-450.

Silva, RG; Vilhena, AEG; Martelli, MC. 2021. Extração por prensagem e por solvente do óleo do resíduo do beneficiamento da Castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* H.b.k.). In: Faria, LJG; Andrade, EL (Orgs.). *Engenharia de produtos naturais: planejamento, experimentação, obtenção de produtos e purificação*. Editora Científica Digital, Guarujá. pág. 184-197.

Silva, BIA; Salomão, RP; Santana, AC; Sousa, VG; Hage, ALF. 2020. Predação de mudas de castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em áreas sob restauração florestal na Amazônia. *Braz. J. of Develop* 6 (4): 20667-20689.

Schwartz, G; Rocha, TS; Almeida, MJS; Dionisio, LFS; Corvera, R. 2022. Seedlings quality of *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae) produced in forest nursery. *Agriculture and Forestry*. 68 (1): 219-232.

Scoles, R; Gribel, R; Klein GN. 2011. Crescimento e sobrevivência de castanheira (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) em diferentes condições ambientais na região do rio

- Trombetas, Oriximiná, Pará. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi* 6 (3): 273-293.
- Taiz, L; Zeiger, E; Moller, IM; Murphy, A. 2017. *Fisiologia e desenvolvimento vegetal*. 6ª Edição. Editora Artmed, Porto Alegre. 858p.
- Tsou, CH; Mori, AS 2002. Seed coat anatomy and its relationship to seed dispersal in subfamily Lecythidoideae of the Lecythidaceae (The Brazil Nut Family). *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, vol. 43:37-56.
- Ventrella, MC; Almeida, LA; Nery, LA; Coelho, VPM. 2013. *Métodos histoquímicos aplicados às sementes*. Editora UFV, Minas Gerais, n. 18.
- Vidal, BC. 1970. Dichroism in collagen bundles stained with xylidine-Ponceau 2R. *Annales d'Histochimie*. 15:289-296.
- Yu, G; Hongwei, L; Zhang, N; Wang, YB; Wang, Y; Yangping, L; Huanhuan H; Yinghong, L; Yufeng, H; Hanmei, L; Junjie, Z; Yi, T; Yubi, H. 2019. Loss of p53 sensitizes cells to palmitic acid-induced apoptosis by reactive oxygen species accumulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20: 2-16.
- Zuidema, PA. 2003. Ecología y manejo del árbol de castaña (*Bertholletia excelsa*). PROMAB Científica, série 6.
- Zuidema, PA; Boot, RGA. 2002. Demography of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) in the Bolivian Amazon: impact of seed extraction on recruitment and population dynamics. *Journal of Tropical Ecology*. 18 (01): 1-31.

FIGURAS

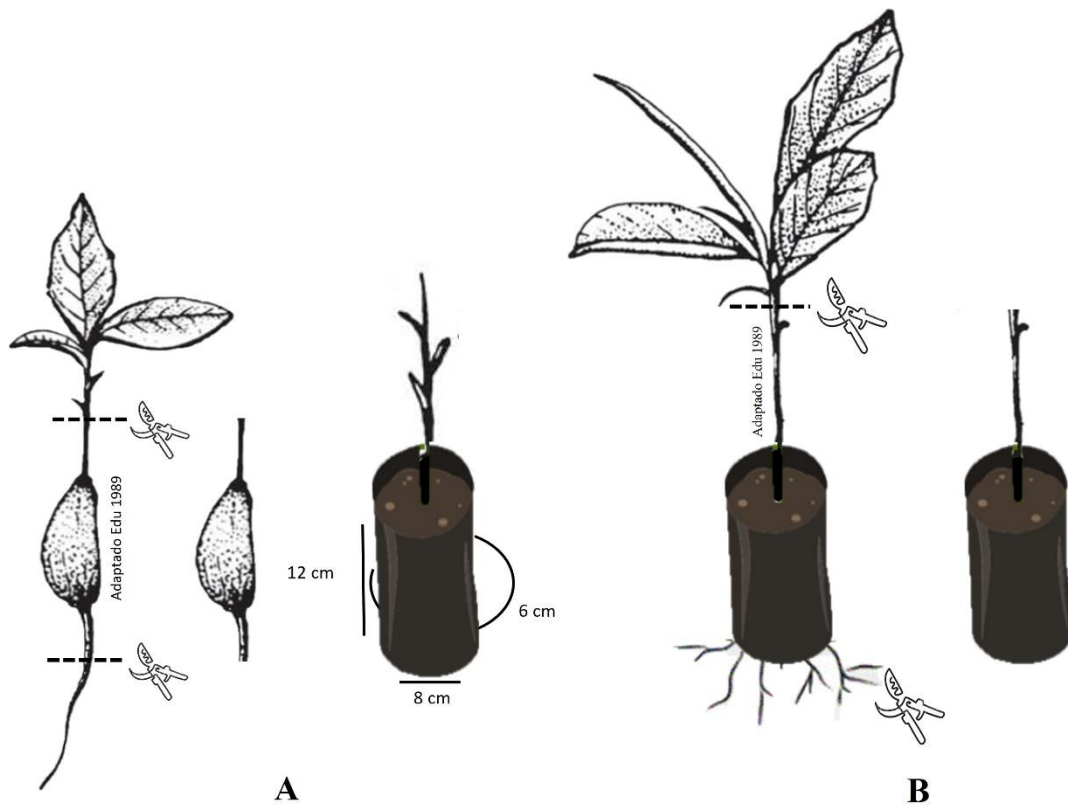


Figura 1. Ilustração da técnica de poda realizada nas mudas de *B. excelsa* produzidas na Fazenda Aruanã, utilizadas no estudo. A – 1ª poda realizada na fase de plântula; B – 2ª poda realizada após o desenvolvimento por aproximadamente um ano em ambiente de viveiro.

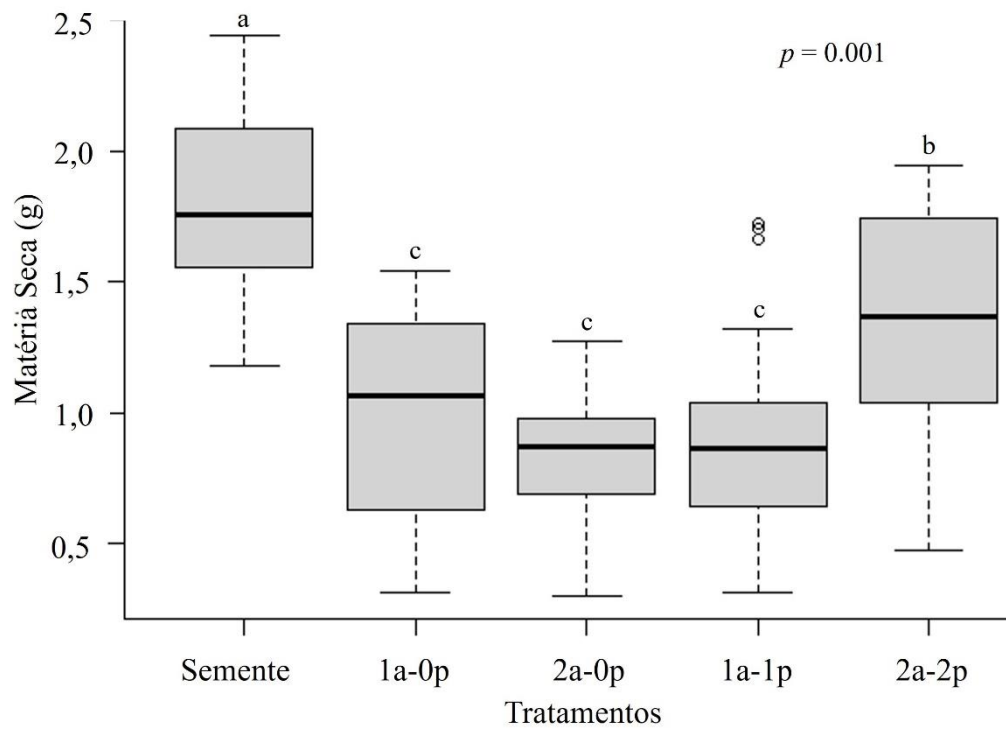


Figura 2. Boxplot da matéria seca das sementes e dos hypocótilos de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p – valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não.

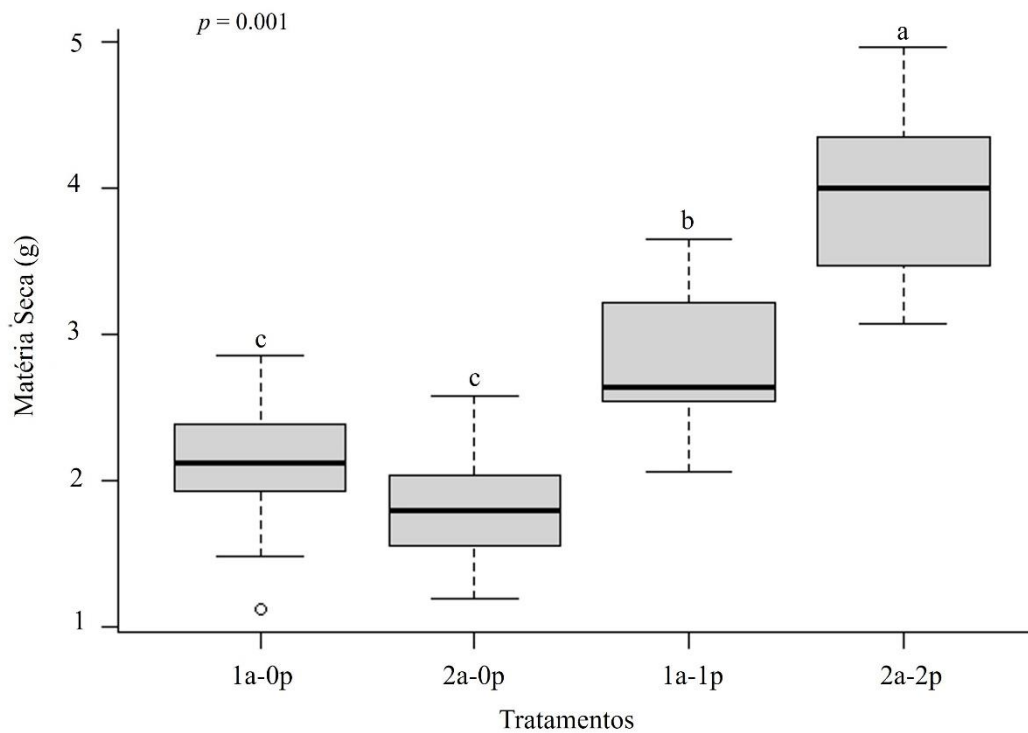
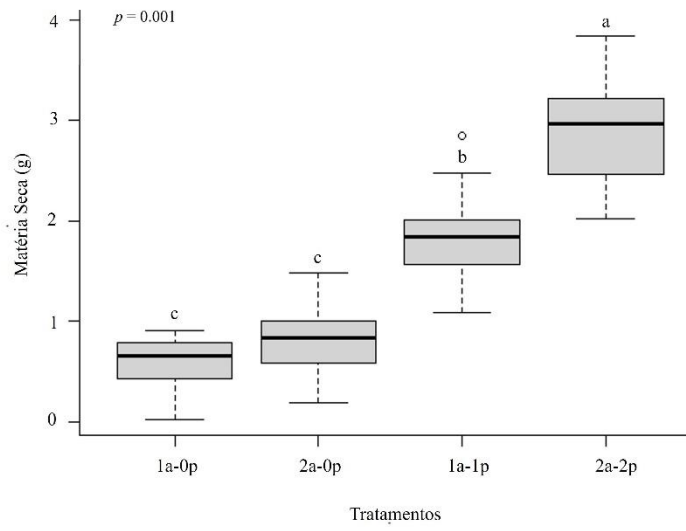
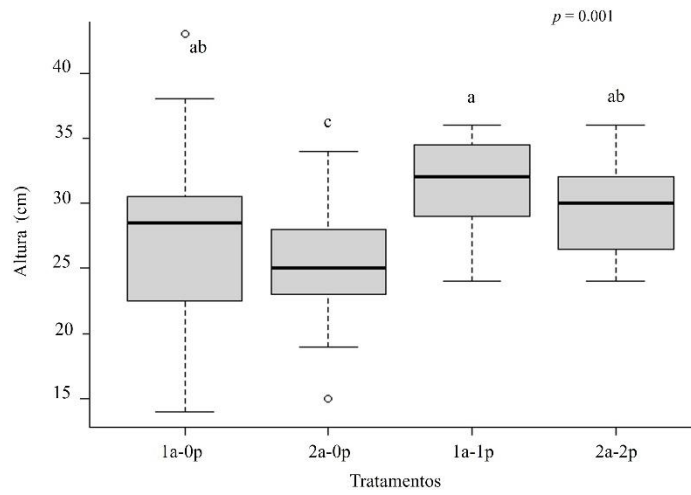


Figura 3. Boxplot da matéria seca da parte aérea de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p – valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não.

A



B



C

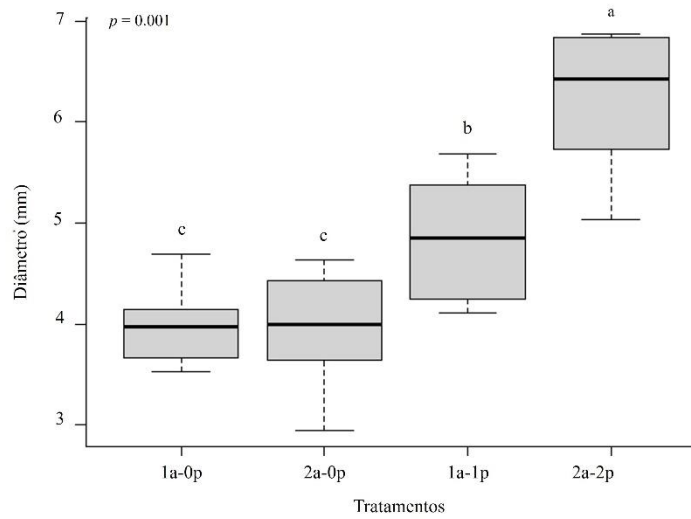
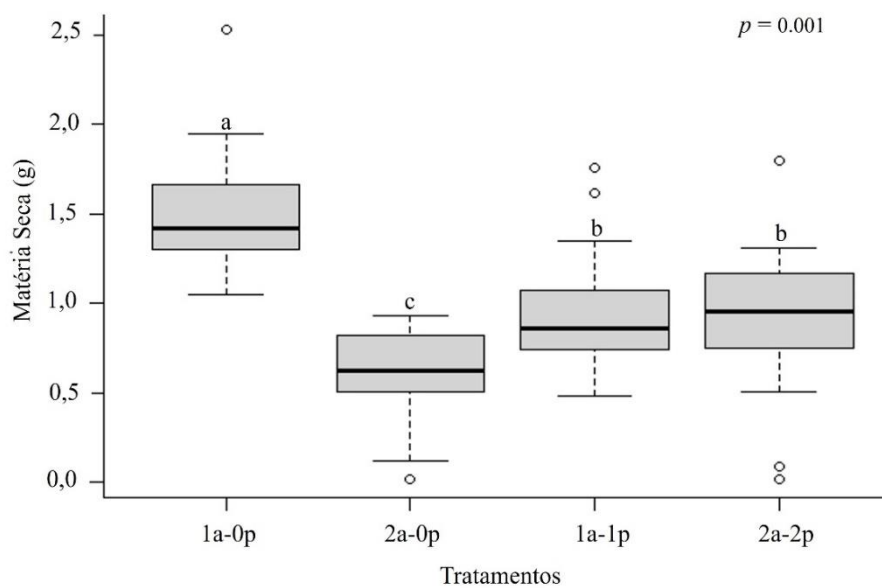


Figura 4. Boxplot da matéria seca (A), da altura (B) e do diâmetro (C) do caule de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p – valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não.

A



B

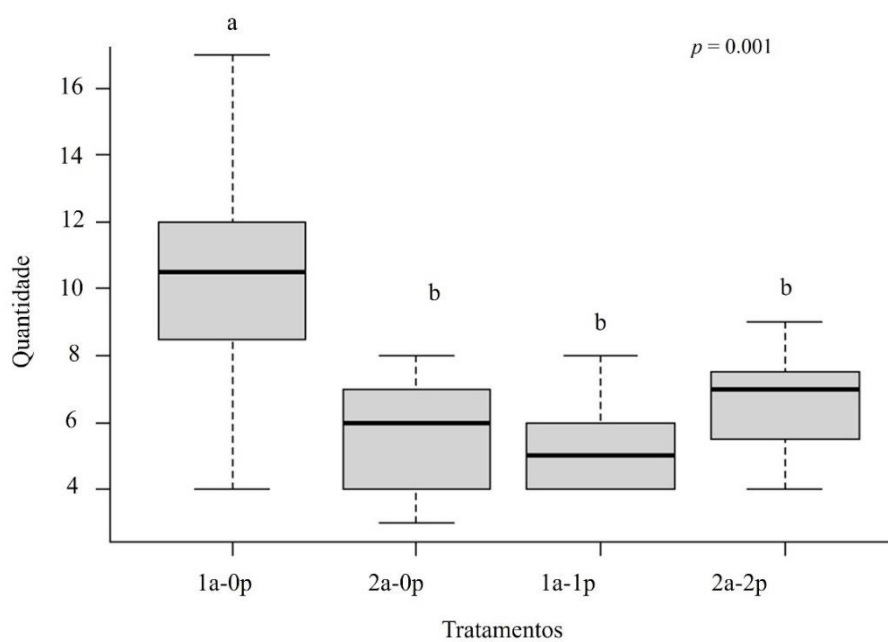
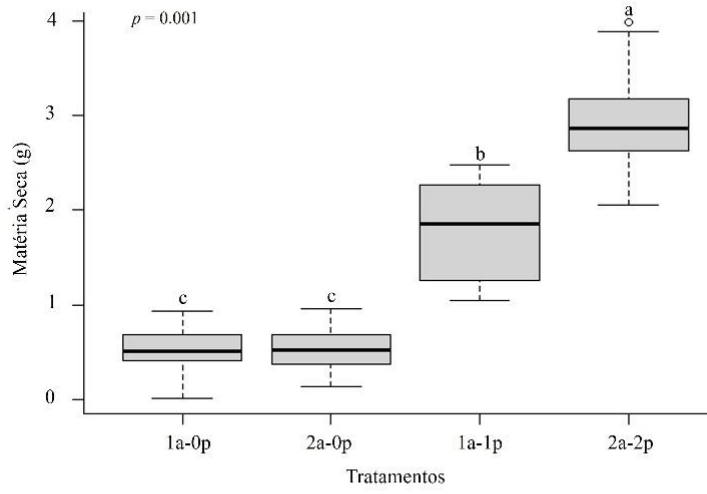
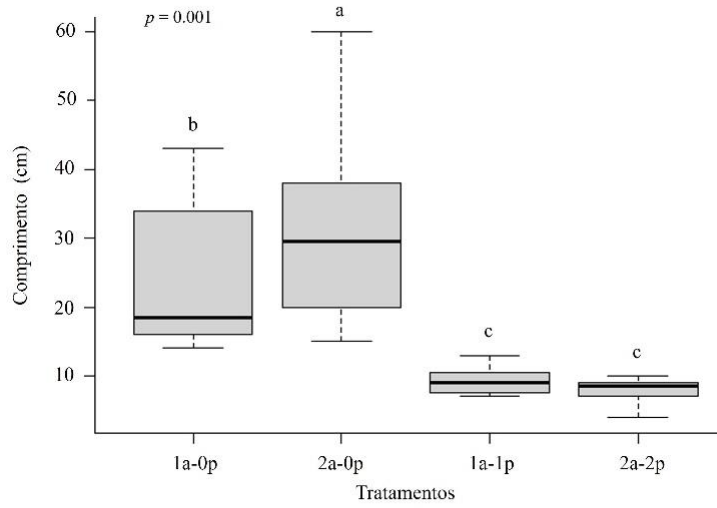


Figura 5. Boxplot da matéria seca (A) e do número de folhas (B) de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p - valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não.

A



B



C

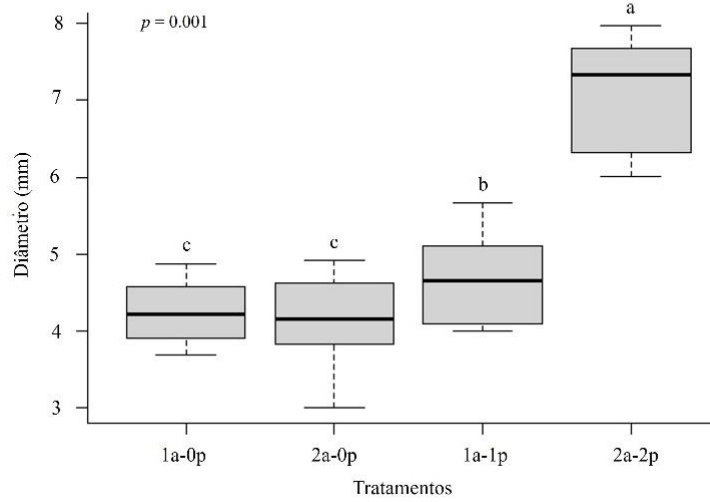


Figura 6. Boxplot da matéria seca (A), do comprimento (B) e do diâmetro (C) das raízes de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Letras iguais, acima dos boxplots, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). p – valor (p) parâmetro estatístico que indica se determinada hipótese deve ser rejeitada ou não.

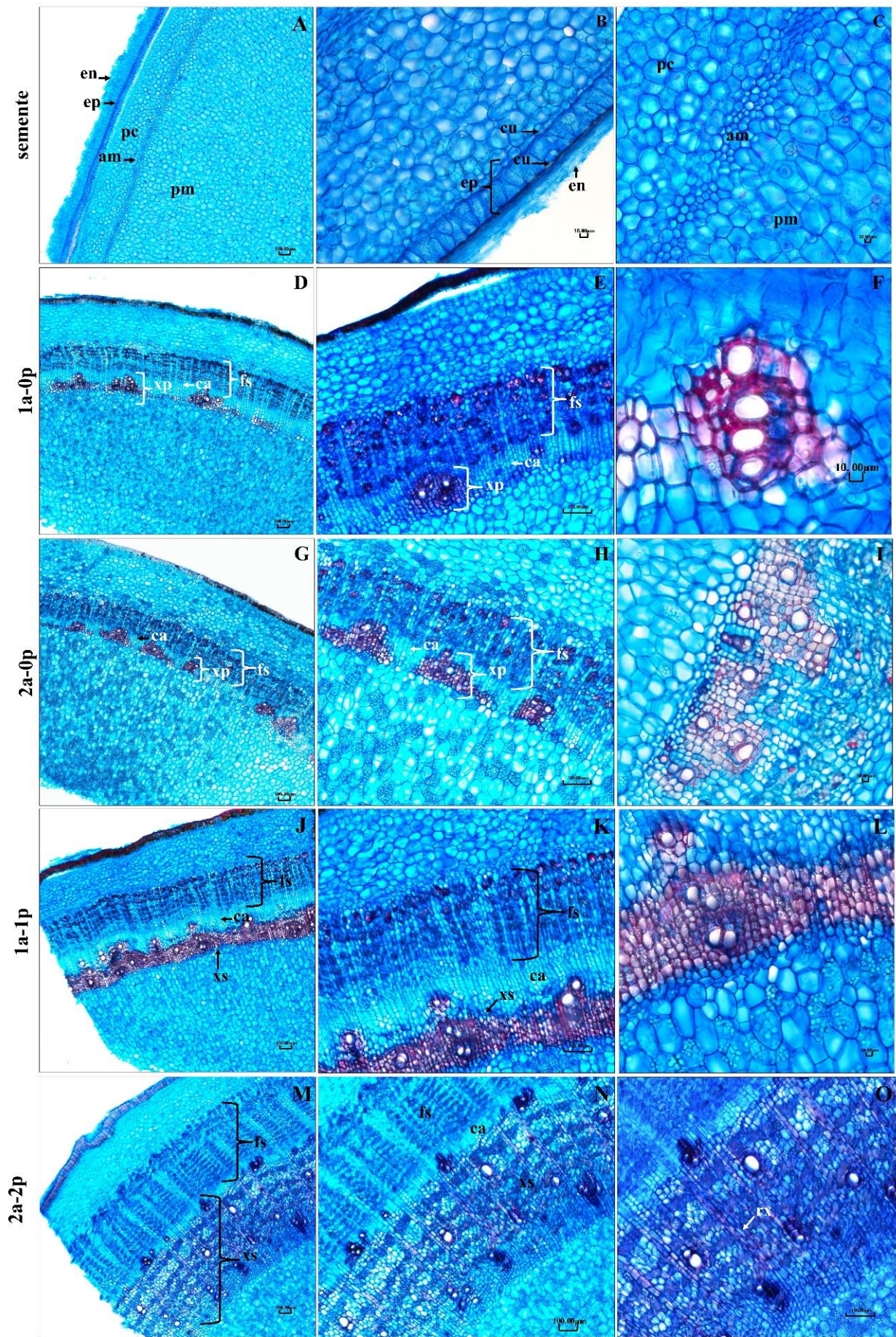


Figura 7. Anatomia das sementes (A-C) e dos hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade - 1a-0p (D-F); controle com dois anos de idade - 2a-0p (G-H); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda - 1a-1p (J-L); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas - 2a-2p (M-O). A – corte transversal da semente evidenciando as camadas de células distintas; B – detalhe da epiderme do embrião; C – detalhe do anel meristemático; D, G, J, M – corte transversal do hipocótilo em estrutura secundária; E, H, K, N – detalhe da diferenciação do câmbio; F, I, L, O – detalhe dos tecidos vasculares. am – anel meristemático, em – endosperma, ep – epiderme, ca – câmbio, cu – cutícula, fs – floema secundário, pc – parênquima cortical, pm – parênquima medular, rx – raio xilemático, xp – xilema primário, xs – xilema secundário. corante safralbalu.

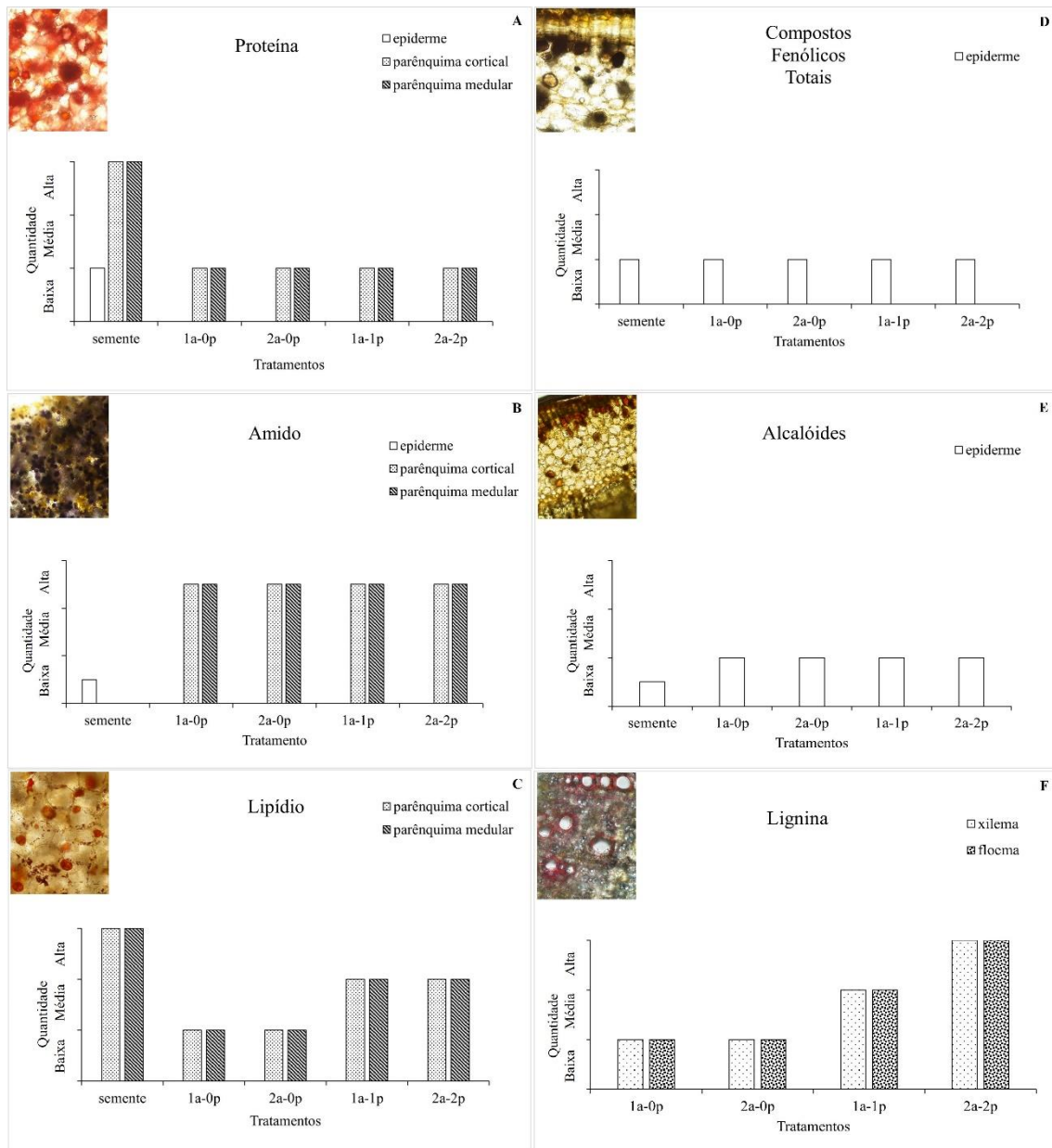


Figura 8. Representação categórica dos metabólitos detectados nas sementes e nos hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p), indicando os tecidos celulares onde ocorrem. A – proteína (XP), B – amido (Lugol), C – lipídio (Sudam III), D – compostos fenólicos totais (Cloroeto Férrico), E – alcalóides (Reagente de Wagner), F – lignina (Floroglucina ácida).

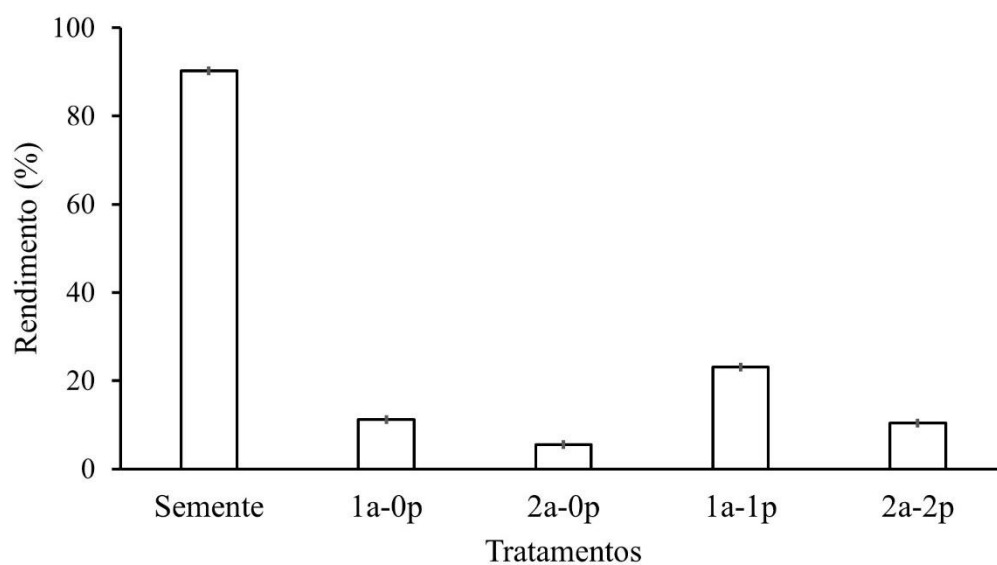


Figura 9. Porcentagem do rendimento de óleo das sementes e dos hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p).

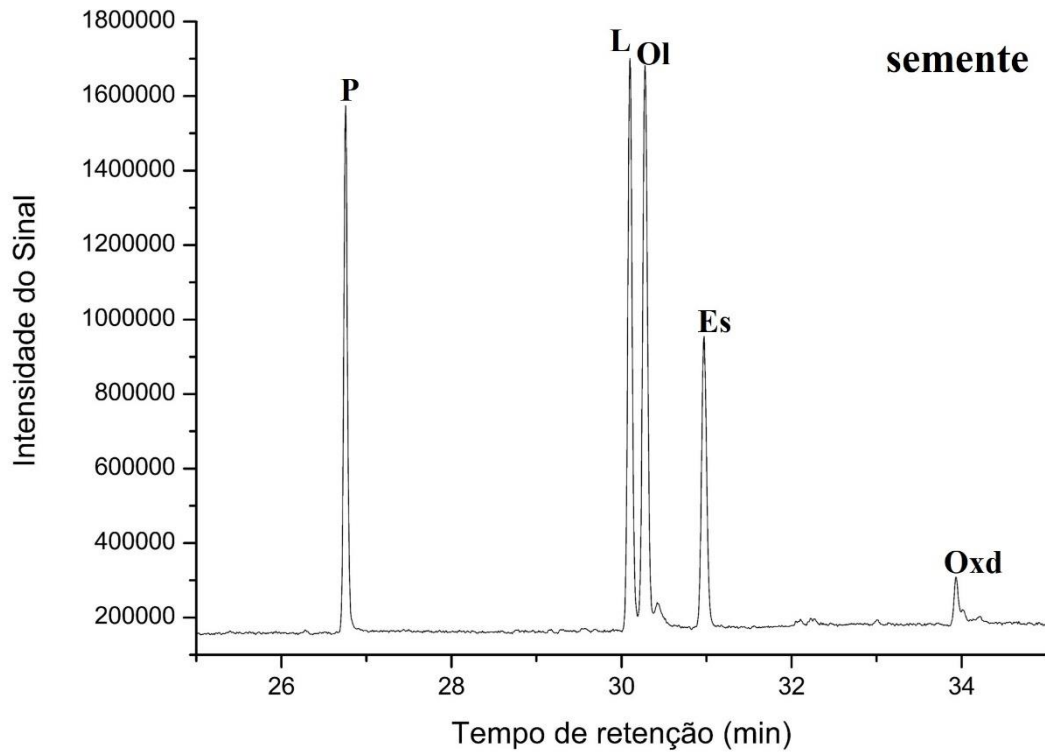


Figura 10. Cromatograma da composição dos ácidos graxos das amostras de óleo das sementes recém-colhidas de *B. excelsa*. Es (esteárico), L (linoleico), Ol (oleico), Oxd (oxiraneundecanóico), P (palmítico).

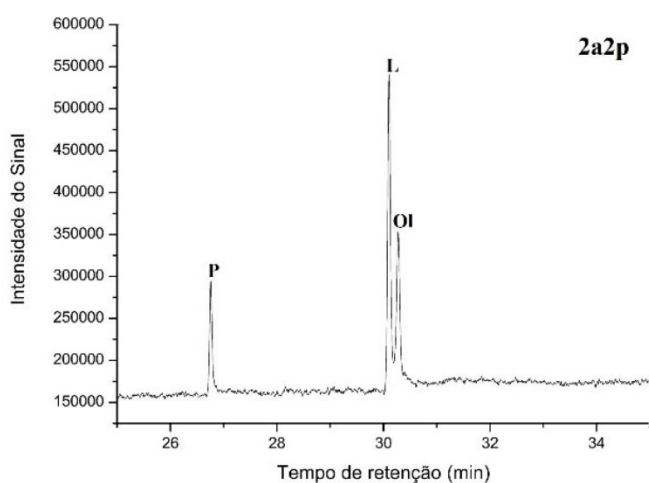
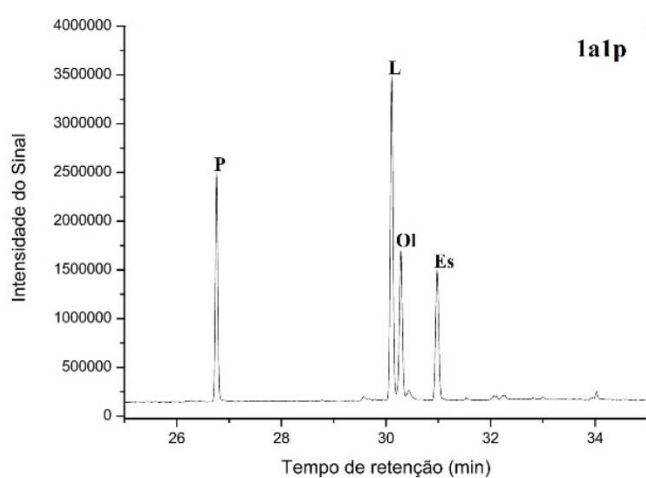
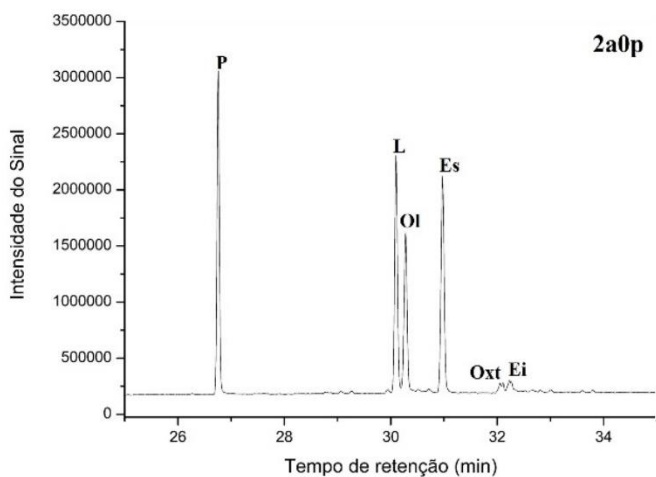
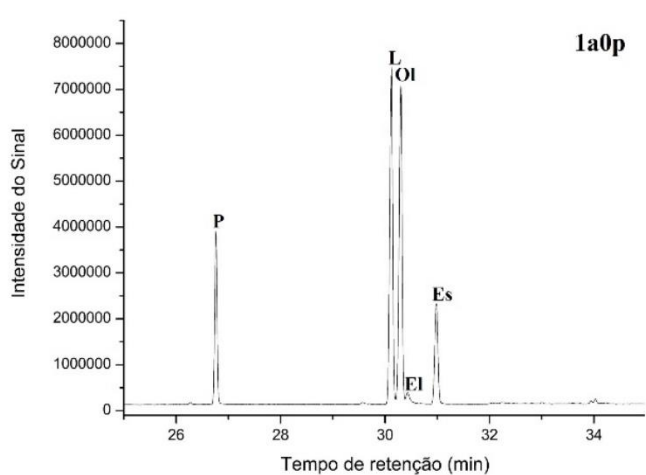


Figura 11. Cromatogramas da composição de ácidos graxos das amostras de óleo dos hipocótilos de mudas de *B. excelsa* nos seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p). Ei (eicosanóico), El (elaídico), Es (esteárico), L (linoleico), OI (oleico), Oxd (oxiraneundecanóico), Oxt (oxiranoctanóico), P (palmítico).

TABELAS

Tabela 1. Descrição dos tratamentos das mudas e sementes de *B. excelsa* utilizados no estudo.

Tratamentos	Idade	Descrição
Semente	-	Sementes (frutificação 2022) que após a coleta foram armazenadas em areia por 3 meses, e por mais 2 meses em câmara fria (15 °C).
1a-0p	1 ano	Mudas controle de um ano sem poda (frutificação de 2021)
2a-0p	2 anos	Mudas controle de dois anos sem poda (frutificação de 2020)
1a-1p	1 ano	Mudas com um ano de desenvolvimento (frutificação de 2021) submetidas a 1ª poda. A poda é realizada na fase de plântula, ao atingirem 10 cm de altura: corte da parte aérea permanecendo cerca de 5 cm e da raiz principal, permanecendo cerca de 2 cm. Em seguida foram transplantadas para embalagens, com barro peneirado como substrato e, mantidas em ambiente de viveiro por um ano (Figura 1A).
2a-2p	2 anos	Mudas com dois anos de desenvolvimento submetidas a 1ª e 2ª poda (frutificação de 2020). Após a 1ª poda na fase de plântula e o desenvolvimento por aproximadamente um ano em ambiente de viveiro, a muda é submetida a 2ª poda: corte da parte aérea em torno de 25 cm de altura, retirando todas as folhas e, das raízes secundárias que estavam saindo da embalagem e, permanecem no viveiro por mais um ano (Figura 1B).

Tabela 2. Testes histoquímicos para detecção das classes de metabólitos nas sementes e nos hipocótilos das mudas de *B. excelsa*, baseado em Ventrella *et al.* (2013).

Substâncias	Grupo de Metabólito	Teste aplicado	Reação	Método original
LIPÍDIOS	Lipídios totais	Sudam III	Alaranjado	Pearse 1972
PROTEÍNAS	Proteínas totais	Xilidine Ponceau	Vermelho	Vidal 1970
CARBOIDRATOS	Amido	Reagente de Lugol	Roxo	Johansen 1940
	Totais	Cloreto Férrico	Marrom	Johansen 1940
COMPOSTOS FENÓLICOS	Tanino	Vanilina clorídrica	Vermelho	Mace e Howel 1974
	Lignina	Floroglucina ácida	Rosa	Johansen 1940
ALCALÓIDES	Gerais	Reagente de Wagner	Castanho	Furr e Mahlberg 1981

Tabela 3. Valores médios da matéria seca e da quantificação do óleo das sementes e dos hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p).

Características	Tratamentos					CV (%)
	Semente	1a-0p	2a-0p	1a-1p	2a-2p	
Matéria Seca (g)	1,793 a	1,007 bc	0,850 c	0,929 c	1,325 b	31,70
Rendimento (%)	90,3	11,1	5,5	23,1	10,4	

Médias seguidas pela mesma letra na mesma variável (linhas), não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV – coeficiente de variação.

Tabela 4. Valores médios das variáveis avaliadas de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p).

Características Avaliadas	Tratamentos								CV (%)
	1a-0p		2a-0p		1a-1p		2a-2p		
Matéria Seca Parte Aérea (g)	2,107	c	1,804	c	2,788	b	3,940	a	16,41
Matéria Seca Caule (g)	0,609	c	0,817	c	1,830	b	2,843	a	25,39
Matéria Seca Folha (g)	1,498	a	0,588	c	0,957	b	0,919	b	34,71
Matéria Seca Raiz (g)	0,509	c	0,536	c	1,816	b	2,912	a	27,69
Diâmetro Caule (mm)	4,0	c	4,0	c	4,8	b	6,2	a	11,04
Diâmetro Raiz (mm)	4,2	bc	4,1	c	4,7	b	7,1	a	11,07
Altura Caule (cm)	27,6	ab	25,0	b	31,4	a	29,6	a	17,91
Comprimento Raiz (cm)	24,2	b	31,1	a	9,3	c	7,9	c	44,28
Número Folhas	10,5	a	5,6	b	5,5	b	6,5	b	29,08

Médias seguidas pela mesma letra na mesma variável (linhas), não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). CV – coeficiente de variação.

Tabela 5. Análise de ácidos graxos por espectrometria de massa do óleo de sementes e hipocótilos de mudas de *B. excelsa*, com os seguintes tratamentos: controle com um ano de idade (1a-0p); controle com dois anos de idade (2a-0p); mudas com um ano de idade submetidas a uma poda (1a-1p); mudas com dois anos de idade submetidas a duas podas (2a-2p).

	Ácido Graxo	Tempo Retenção (min)	Fórmula Molecular	Percentual (%)				
				Semente	1a-0p	2a-0p	1a-1p	2a-2p
Insaturado	Linoleico	30.020	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	28,58	36,70	25,15	39,44	54,71
	Oleico	30.195	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	30,78	35,59	17,57	19,09	30,89
	Elaídico	30.385	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	-	1,15	-	-	-
	Eicosanoico	33.995	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	-	-	0,99	-	-
				59,35	73,44	43,71	58,53	85,60
Saturado	Palmitico	26.685	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	22,25	14,71	29,67	23,57	14,40
	Estearico	30.890	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	16,73	11,85	25,95	17,90	-
	Oxiraneundecanoico	33.885	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	1,67	-	-	-	-
	Oxiranoctanoico	33.900	C ₁₉ H ₃₆ O ₃	-	-	0,67	-	-
				40,65	26,56	56,29	41,47	14,40