

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

AMANDA DE SOUZA SETRA FACHINI

VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE SEMENTES DE *Ilex*
paraguariensis A.St-Hil. SUBMETIDAS À ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA E AO
TRATAMENTO COM REGULADORES DE CRESCIMENTO
NANOENCAPSULADOS

CURITIBA

2026

AMANDA DE SOUZA SETRA FACHINI

VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE SEMENTES DE *Ilex*
paraguariensis A.St-Hil. SUBMETIDAS À ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA E AO
TRATAMENTO COM REGULADORES DE CRESCIMENTO
NANOENCAPSULADOS

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Florestal.

Orientadora: Profa. Dra. Dagma Kratz.

Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Carlos Nogueira

Prof. Dr. Allan Libanio Pelissari

CURITIBA

2026

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ / SISTEMA DE BIBLIOTECAS
BIBLIOTECA DE CIÊNCIAS FLORESTAIS E DA MADEIRA

Fachini, Amanda de Souza Setra

Viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis* A.St-Hil. submetidas à escarificação química e ao tratamento com reguladores de crescimento nanoencapsulados / Amanda de Souza Setra Fachini. - Curitiba, 2026.

1 recurso on-line : PDF.

Orientadora: Profa. Dra. Dagma Kratz

Coorientadores: Prof. Dr. Antônio Carlos Nogueira

Prof. Dr. Allan Libanio Pelissari

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal. Defesa: Curitiba, 06/03/2026.

1. Erva-mate - Semente. 2. Sementes – Dormência. 3. Reguladores de crescimento. 4. Tetrazolio. 5. Ácido giberélico. I. Kratz, Dagma. II. Nogueira, Antônio Carlos. III. Pelissari, Allan Libanio. IV. Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Agrárias. V. Título.

CDD – 634.9

CDU – 634.0.285

Bibliotecária: Marcia Cristina Fuchs – CRB 9/1321



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA
FLORESTAL - 40001016015P0

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA FLORESTAL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **AMANDA DE SOUZA SETRA FACHINI**, intitulada: **VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE SEMENTES DE *Ilex paraguariensis* A.St-Hil. SUBMETIDAS À ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA E AO TRATAMENTO COM REGULADORES DE CRESCIMENTO NANOENCAPSULADOS**, sob orientação da Profa. Dra. DAGMA KRATZ, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestra está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 05 de Março de 2026.

Assinatura Eletrônica

06/03/2026 13:54:13.0

DAGMA KRATZ

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

06/03/2026 14:11:38.0

FRANCIVAL CARDOSO FELIX

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS)

Assinatura Eletrônica

06/03/2026 13:32:05.0

MANOELA MENDES DUARTE

Avaliador Externo (EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL)

*Dedico primeiramente a Deus por ser meu apoio em momentos difíceis,
e à minha família por todo apoio nesta jornada.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus pela força, proteção e inspiração ao longo de toda esta jornada acadêmica.

Aos meus pais, Luciana e Márcio Setra, pelo amor e apoio, que foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. À minha irmã, Vitória, pela companhia, pela confiança e por ter me dado um dos maiores presentes: minha sobrinha Maria Olívia. Agradeço a vocês por todo o apoio; pois sei que cada um, à sua maneira, contribuiu para que eu atingisse meus objetivos.

Ao meu marido, Lucas Fachini, pelo carinho, paciência, compreensão e por compartilhar cada conquista. Obrigada, meu amor, por ter sido meu maior incentivador nesta jornada, por toda a companhia nas noites adentro, pelas xícaras de chá de madrugada e pelos cuidados nos momentos difíceis.

Agradeço também às minhas gatinhas de apoio emocional: Chandel, Nutella (*in memoriam*) e Panqueca; e aos meus despertadores com asas, June e Jhonny. Mesmo sem entender, eles me deram forças para continuar nos momentos difíceis, seja mordendo os pés, cantando da gaiola ou apenas dormindo no colo enquanto eu escrevia.

Aos meus amigos: Heloisa Gouveia e Leonel Kovalski que, com palavras de incentivo e solidariedade, tornaram esta caminhada mais leve e significativa, obrigada por todos esses anos de amizade; e à Bruna Zanatta, que tornou a jornada do mestrado mais leve e descomplicada, mesmo diante de todas as dificuldades e desafios.

À minha orientadora, Profa. Dra. Dagma Kratz, pela orientação dedicada, paciência e ensinamentos, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho e para minha formação acadêmica. A sua orientação atenta e generosa ampliou meus horizontes e fortaleceu meu percurso científico.

Aos meus coorientadores, Prof. Dr. Antonio C. Nogueira e Prof. Dr. Allan L. Pelissari, deixo um agradecimento muito especial pela disponibilidade, paciência e olhar cuidadoso em cada etapa deste trabalho. Suas contribuições, sugestões e apoio constante foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e para a qualidade desta dissertação.

Aos meus colegas de pós-graduação, Alessandra, Leonardo, Luara e Júlio, pela colaboração, companheirismo e discussões que enriqueceram minha pesquisa.

Agradeço também aos colegas da graduação, que trouxeram novas ideias e agregaram não apenas à minha pesquisa, mas à rotina do laboratório.

À minha colega, Natália Bonfante, que contribuiu com observações anatômicas e me auxiliou nas análises, as quais foram cruciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos professores Dra. Patrícia Soffiatti e Dr. Nelson Cosmo, que me auxiliaram nas análises anatômicas. Mesmo com todos os desafios, suas dicas e orientações foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Stuepp, e a UNICAMP pelo preparo e envio das soluções de reguladores de crescimento, que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFPR, pelo suporte nas análises imprescindíveis para o desenvolvimento da minha pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, pela estrutura, pelo suporte e pelo ambiente acadêmico propício à aprendizagem e à pesquisa.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR), pelo espaço, pelos recursos e pelas oportunidades disponibilizadas, que permitiram a realização desta dissertação.

À CAPES, pelo apoio financeiro, que tornou possível a dedicação integral aos estudos e à pesquisa.

E, finalmente, a todas as demais pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, vai meu sincero reconhecimento e agradecimento.

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando
nos mantemos fiéis a nós mesmos.”*

RESUMO

A produção de mudas seminais de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. é dificultada pela dormência complexa de seus pirênios. Esta dormência é caracterizada pela atuação conjunta de características morfológicas, fisiológicas e físicas, resultando em germinação lenta, desuniforme e com baixos percentuais. Diante desse cenário, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade e o desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate submetidos à escarificação química e tratados com diferentes reguladores de crescimento nanoencapsulados durante o processo de estratificação. Inicialmente, ensaios com azul de toluidina (1%) foram conduzidos para definição do tempo ideal de escarificação com ácido sulfúrico (H_2SO_4 2% v/v) ou hidróxido de potássio (KOH 4% m/v), nos períodos de 10, 20 e 30 minutos, adotando-se 30 minutos para o teste de tetrazólio. A viabilidade e os estádios embrionários foram classificados em viáveis, inviáveis e deteriorados. Realizaram-se análises morfoanatômicas por microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica. Posteriormente, as sementes foram estratificadas sob condições controladas, com ou sem escarificação com H_2SO_4 (2% v/v), e tratados com reguladores nanoencapsulados, com avaliações trimestrais por seis meses. A escarificação com H_2SO_4 aumentou a permeabilidade do endocarpo sem comprometer a viabilidade embrionária, enquanto com KOH promoveu danos estruturais e reduziu a viabilidade. As análises morfoanatômicas confirmaram que o H_2SO_4 afetou predominantemente o endocarpo, preservando endosperma e embrião, ao passo que o KOH desestruturou todos os tecidos. A associação entre escarificação ácida e reguladores, especialmente giberelina (GA_3) e citocinina (Kn), favoreceu o avanço do desenvolvimento embrionário e elevou a viabilidade aos três meses de estratificação. Aos seis meses, observou-se menor dependência da escarificação, com efeito predominante dos reguladores. Conclui-se que a dormência pode ser parcialmente superada por estratégias integradas que atuem sobre componentes físicos e fisiológicos.

Palavras-chave: erva-mate; dormência; tetrazólio; estratificação; giberelina.

ABSTRACT

The production of seedlings from seeds of *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. is hindered by the complex dormancy of its pyrenes. This dormancy is characterized by the combined action of morphological, physiological, and physical traits, resulting in slow, uneven germination with low percentages. Given this scenario, the present study aimed to evaluate the viability and embryonic development of yerba mate seeds subjected to chemical scarification and treated with different nanoencapsulated growth regulators during the stratification process. Initially, assays with toluidine blue (1%) were conducted to determine the ideal scarification time using sulfuric acid (H_2SO_4 2% v/v) or potassium hydroxide (KOH 4% w/v), over periods of 10, 20, and 30 minutes, with 30 minutes adopted for the tetrazolium test. Viability and embryonic stages were classified as viable, non-viable, and deteriorated. Morpho-anatomical analyses were performed using scanning electron microscopy and optical microscopy. Subsequently, the seeds were stratified under controlled conditions, with or without scarification using H_2SO_4 (2% v/v), and treated with nanoencapsulated regulators, with evaluations conducted every three months over a six-month period. Scarification with H_2SO_4 increased endocarp permeability without compromising embryonic viability, whereas KOH caused structural damage and reduced viability. Morpho-anatomical analyses confirmed that H_2SO_4 primarily affected the endocarp, preserving the endosperm and embryo, while KOH disrupted all tissues. The combination of acid scarification and growth regulators, especially gibberellin (GA_3) and cytokinin (Kn), promoted advancement in embryonic development and increased viability after three months of stratification. After six months, a reduced dependence on scarification was observed, with a predominant effect of the growth regulators. It is concluded that dormancy can be partially overcome through integrated strategies that act on both physical and physiological components.

Keywords: yerba mate; dormancy; tetrazolium; stratification; gibberelin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REAÇÃO DE REDUÇÃO DO CLORETO DE 2,35-TRIFENIL-2H-TETRAZÓLIO (CLORETO DE TETRAZÓLIO) PELA COENZIMA REDUZIDA NICOTINAMIDA ADENINA DINUCLEOTÍDEO (NADH) FORMANDO 1,3,5-TRIFENILFORMAZANO (FORMAZAN).....	27
FIGURA 2 – (A) COLETA DOS FRUTOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. COM AUXÍLIO DE UMA TESOURA DE PODA; (B) GALHOS COM FRUTOS MADUROS COLETADOS.	32
FIGURA 3 – FLUXOGRAMA DOS TRATAMENTOS DE ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA DOS SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	34
FIGURA 4 – ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO EMBRIONÁRIA DAS SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	35
FIGURA 5 – SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. APÓS METALIZAÇÃO EM OURO E FIXAÇÃO SOBRE FITA DE COBRE PARA ANÁLISE DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	36
FIGURA 6 – ANÁLISES AVALIADAS ATRAVÉS DAS IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	36
FIGURA 7 – FLUXOGRAMA EXPERIMENTAL: TRATAMENTOS DE ESCARIFICAÇÃO E APLICAÇÃO DE REGULADORES NANOENCAPSULADOS EM PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	38
FIGURA 8 – SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. IMERSAS EM SOLUÇÕES DE REGULADORES DE CRESCIMENTO SOB AGITADOR MAGNÉTICO.....	38
FIGURA 9 – EFEITO DA ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA E DO TEMPO DE EXPOSIÇÃO SOBRE A COLORAÇÃO DOS ENDOSPERMAS DAS SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	43
FIGURA 10 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA CLIVAGEM DAS LIGAÇÕES B-O-4 DA LIGNINA EM MEIO CATALÍTICO, ILUSTRANDO O PROCESSO DE	

HIDRÓLISE E DESPOLIMERIZAÇÃO PARCIAL DA ESTRUTURA DE TECIDOS LIGNOCELULÓSICOS.....	44
FIGURA 11 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) NA APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESCARIFICAÇÕES QUÍMICAS EM PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	52
FIGURA 12 - COMPARATIVO DOS CORTES LONGITUDINAIS DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) NA APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESCARIFICAÇÕES QUÍMICAS EM PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	55
FIGURA 13 -COMPARATIVO DAS ESTRUTURAS DAS SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. EM CORTES LONGITUDINAIS COM APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESCARIFICAÇÕES QUÍMICAS.	57
FIGURA 14 – ESTRUTURAS ANATÔMICAS DO ENDOCARPO DA <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. APÓS IMERSÃO EM SOLUÇÃO DE FRANKLIN ADAPTADA.....	59
FIGURA 15 - COMPARATIVO DOS EMBRIÕES EM CORTES LONGITUDINAIS NA APLICAÇÃO DE DIFERENTES ESCARIFICAÇÕES QUÍMICAS EM PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil..	60

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – VIABILIDADE E DETERIORAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. APÓS ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA COM 30 MIN DE IMERSÃO.....	46
GRÁFICO 2 – VIABILIDADE EMBRIONÁRIA POR ESTÁDIO DE MATURAÇÃO DAS SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. APÓS ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA COM 30 MIN DE IMERSÃO	48
GRÁFICO 3 - VARIAÇÃO NO NÚMERO, COMPRIMENTO E ÁREA DAS RACHADURAS DO ENDOCARPO DE PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. SOB DIFERENTES ESCARIFICAÇÕES QUÍMICAS (30 MIN).....	50
GRÁFICO 4 – EVOLUÇÃO DO GRAU DE UMIDADE (%) DAS SEMENTES DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. EM RELAÇÃO AO TEMPO E O TRATAMENTO EMPREGADO.....	62
GRÁFICO 5 – VIABILIDADE EMBRIONÁRIA DE PIRÊNIOS DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil. APÓS TRÊS MESES DE ESTRATIFICAÇÃO EM FUNÇÃO DA ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA E REGULADORES DE CRESCIMENTO.....	65
GRÁFICO 6 – INTERAÇÃO APÓS TRÊS MESES DE ESTRATIFICAÇÃO NOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	67
GRÁFICO 7 – INTERAÇÃO APÓS SEIS MESES NO ESTÁDIO CORAÇÃO DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	72
GRÁFICO 8 – INTERAÇÃO APÓS SEIS MESES NOS ESTÁDIOS DE TORPEDO DE <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.....	73

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) DA VIABILIDADE DAS SEMENTES DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. AOS SEIS MESES EM FUNÇÃO DOS FATORES REGULADOR DE CRESCIMENTO E ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA. 70

TABELA 2 – VIABILIDADE MÉDIA (%) DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. AOS SEIS MESES EM FUNÇÃO DO REGULADOR DE CRESCIMENTO. 70

TABELA 3 – VIABILIDADE MÉDIA (%) DE PIRÊNIOS DE *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. NO ESTÁDIO PÓS-CORAÇÃO AOS SEIS MESES EM FUNÇÃO DO REGULADOR DE CRESCIMENTO. 73

LISTA DE SIGLAS

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo.

RNA - Ácido Ribonucleico.

GA₃ - Giberelina.

Kn - Cinetina.

IBA - Ácido Indolbutírico.

PMS - Peso de Mil Sementes.

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Objetivo geral	18
1.1.2 Objetivos específicos.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 FAMÍLIA AQUIFOLIACEAE E GÊNERO <i>Ilex</i>	20
2.2 <i>Ilex paraguariensis</i> A.St.-Hil.	20
2.3 SEMENTES.....	22
2.3.1 Coleta e beneficiamento de sementes	25
2.3.2 Análise de sementes	26
2.4 DORMÊNCIA E TÉCNICAS DE SUPERAÇÃO.....	27
2.5 REGULADORES DE CRESCIMENTO NANOENCAPSULADOS.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 COLETA DE FRUTOS E BENEFICIAMENTO DAS SEMENTES	32
3.2 DETALHES EXPERIMENTAIS	33
3.2.1 ANÁLISES FÍSICAS.....	33
3.2.1.1 Peso de mil sementes (PMS)	33
3.2.1.2 Grau de Umidade	33
3.2.2 ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA.....	33
3.2.2.1 TESTE COM AZUL DE TOLUIDINA.....	33
3.2.2.2 ENSAIOS DE ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA	34
3.2.2.3 TESTE DE TETRAZÓLIO APÓS ESCARIFICAÇÃO DAS SEMENTES.....	34
3.2.2.4 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE SEMENTES	35
3.2.2.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	35
3.2.2.4.2 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA.....	37
3.2.3 COMBINAÇÃO ENTRE ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA E ESTRATIFICAÇÃO COM REGULADORES DE CRESCIMENTO	38
3.2.3.1 VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DAS SEMENTES AOS TRÊS E SEIS MESES	39
3.2.3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1.1 ANÁLISES FÍSICAS.....	42
4.2 ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA.....	43

4.2.1 TESTE AZUL DE TOLUIDINA.....	43
4.2.2 VIABILIDADE DAS SEMENTES APÓS ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA	46
4.2.3 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DAS SEMENTES.....	50
4.2.4 GRAU DE UMIDADE DAS SEMENTES DURANTE A ESTRATIFICAÇÃO	62
4.3 COMBINAÇÃO ENTRE ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA E ESTRATIFICAÇÃO COM REGULADORES DE CRESCIMENTO	64
CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
5 REFERÊNCIAS.....	78

1 INTRODUÇÃO

A erva-mate constitui um dos principais produtos florestais não madeireiros do Brasil, desempenhando papel estratégico na economia regional e na agricultura familiar, especialmente na região Sul do país (Chechi & Schultz, 2016; Penteado Junior, 2019). O país é o maior produtor mundial da espécie, com produção estimada em aproximadamente 1.212.696 de toneladas, concentrada principalmente nos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (IBGE, 2024). Além do consumo tradicional nas formas de chimarrão, tererê e chá-mate, a espécie tem despertado crescente interesse nos setores alimentício, cosmético e farmacêutico, em função da presença de compostos bioativos associados a potenciais benefícios à saúde (Dallabrida *et al.*, 2016; Cardozo *et al.*, 2021).

Apesar de sua importância, a produção de mudas seminais de *I. paraguariensis* permanece limitada por características intrínsecas de suas sementes, que apresentam dormência complexa e de difícil superação (Zanon, 1988; Santin *et al.*, 2015). Essa dormência está intimamente relacionada à estrutura do pirênio, unidade de dispersão da espécie, constituída por um endocarpo lenhoso que envolve a semente propriamente dita, formada por tegumento, endosperma abundante e embrião imaturo. Em função dessa organização estrutural e do estágio inicial de desenvolvimento embrionário no momento da dispersão, o crescimento do embrião ocorre de forma lenta e prolongada, podendo se estender por vários meses, o que resulta em germinação tardia, desuniforme e com baixos percentuais (Heuser *et al.*, 1993; Barroso, 1999; Loizeau *et al.*, 2016).

Diversos estudos caracterizam a dormência das sementes de erva-mate como morfofisiológica profunda ou dormência combinada, uma vez que resulta da atuação integrada de componentes morfológicos, fisiológicos e físicos (Cuquel *et al.*, 1994; Medeiros, 1998; Wendling, 2004; Dolce *et al.*, 2010; Galíndez *et al.*, 2018; Souza, 2022). O componente morfológico está relacionado à dispersão da semente contendo embrião imaturo ou rudimentar, que necessita de um período adicional de desenvolvimento pós-dispersão para atingir a maturidade fisiológica. O componente fisiológico decorre da presença de compostos fenólicos e outras substâncias inibidoras da germinação, localizadas principalmente no endosperma e no tegumento, que restringem a atividade metabólica do embrião. Já o componente físico está associado ao endocarpo lenhoso, que impõe resistência mecânica e limita a

embebição, as trocas gasosas e a protrusão da radícula (Fowler & Sturion, 2000; Mireski *et al.*, 2019).

Como consequência dessas restrições, a estratificação em areia constitui o método mais empregado para a superação da dormência das sementes, sendo tradicionalmente recomendada por períodos mínimos de seis meses (Zanon, 1988). Contudo, o processo germinativo pode se estender por até 365 dias, caracterizando-se por elevada irregularidade na emergência das plântulas e por perdas expressivas de viabilidade decorrentes da deterioração fisiológica durante o armazenamento prolongado em condições úmidas (Daniel, 2009; Brasil, 2025). Estudos recentes indicam que protocolos conduzidos sob temperaturas controladas, entre 5 e 15 °C, por períodos de até 180 dias, podem favorecer o avanço do desenvolvimento embrionário sem comprometer a viabilidade, apontando alternativas para a otimização do processo (Duarte *et al.*, 2023).

Entretanto, mesmo sob condições controladas, a estratificação convencional apresenta limitações operacionais e fisiológicas relevantes, uma vez que exige longos períodos de condução e resulta em germinação lenta e pouco uniforme. Além disso, a permanência prolongada das sementes em substratos úmidos favorece a deterioração fisiológica e a incidência de microrganismos, comprometendo a qualidade dos lotes de sementes.

Na tentativa de reduzir o tempo necessário para a superação da dormência e aumentar a uniformidade da germinação, diferentes estratégias têm sido investigadas. O ajuste térmico pode favorecer a germinação em temperaturas constantes próximas a 25 °C (Reinke *et al.*, 2024), enquanto métodos de escarificação mecânica e química visam aumentar a permeabilidade do endocarpo. No entanto, tratamentos excessivamente agressivos podem causar danos irreversíveis ao embrião, reduzindo a viabilidade das sementes. Essa abordagem busca promover a deterioração controlada do endocarpo, aumentando sua permeabilidade sem comprometer a integridade embrionária, equilibrando eficiência germinativa e preservação da viabilidade.

Adicionalmente, o uso de reguladores de crescimento tem sido explorado como estratégia para acelerar a superação da dormência fisiológica. A aplicação de nitrato de potássio (KNO₃), associada à alternância de temperaturas durante a estratificação, apresentou efeitos positivos na germinação de sementes de erva-mate (Cuquel *et al.*, 1994). Estudos também indicam que sementes oriundas de matrizes expostas a

maiores temperaturas e maior incidência de radiação solar tendem a apresentar embriões mais desenvolvidos, sugerindo influência direta das condições ambientais sobre a intensidade da dormência inicial (Fowler *et al.*, 2007). Mais recentemente, tem-se discutido o potencial do uso de reguladores de crescimento nanoencapsulados, capazes de promover liberação controlada de compostos bioativos, podendo aumentar a eficiência fisiológica e reduzir efeitos fitotóxicos, o que representa uma estratégia inovadora para sementes com dormência complexa.

Em síntese, embora diferentes abordagens tenham sido testadas, incluindo estratificação prolongada, ajustes térmicos, escarificação mecânica e química e aplicação de reguladores de crescimento, nenhuma estratégia isolada tem sido capaz de reduzir de forma consistente o tempo de germinação e promover elevada uniformidade das plântulas de erva-mate. Esse cenário evidencia lacunas no entendimento integrado dos mecanismos estruturais, fisiológicos e hormonais que regulam a dormência da espécie.

Diante disso, parte-se da hipótese de que a dormência das sementes de erva-mate pode ser parcialmente superada por estratégias que atuem de forma integrada sobre seus diferentes componentes, morfológico, fisiológico e físico. Investigar métodos que reduzam o tempo de estratificação, aumentem a uniformidade da germinação e preservem a viabilidade das sementes é fundamental tanto para a otimização da produção de mudas quanto para o avanço do conhecimento sobre a biologia reprodutiva da espécie.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

- Avaliar a viabilidade e o estágio embrionário das sementes de erva-mate submetidas à escarificação química e estratificação, com aplicação de reguladores de crescimento nanoencapsulados.

1.1.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito da escarificação com ácido sulfúrico e hidróxido de potássio na permeabilidade do endocarpo de pirênios de erva-mate.
- Avaliar a viabilidade embrionária das sementes de erva-mate após a escarificação química com ácido sulfúrico e hidróxido de potássio.

- Caracterizar os efeitos da escarificação química sobre a estrutura do endocarpo e do embrião, por meio de análises morfoanatômicas e de microscopia eletrônica de varredura.
- Avaliar a influência da combinação entre escarificação química e aplicação de reguladores de crescimento vegetal nanoencapsulados na viabilidade e no desenvolvimento embrionário de sementes de erva-mate após três e seis meses de estratificação.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Aquifoliaceae e gênero *Ilex*

A família Aquifoliaceae, pertencente à ordem Aquifoliales, é a mais conhecida do grupo. Tradicionalmente, inclui os gêneros *Ilex* (o mais diverso) e *Nemopanthus*, este último foi agrupado dentro de *Ilex* com base em dados moleculares (Cuénoud *et al.*, 2000). São arbustos ou árvores dioicas, com distribuição em regiões tropicais e temperadas.

Esta família possui importância madeireira, medicinal e ornamental abrangendo espécies como a erva-mate (Simpson, 2010). No gênero *Ilex* dentre suas características, destacam-se as folhas normalmente espiraladas, com ou sem estípulas, perenes e de margens serreadas, crenadas ou inteiras. O comprimento das folhas varia entre 2 e 15 cm, com base aguda à obtusa e ápice truncado ou agudo, frequentemente acuminado. Na floração são observadas inflorescências organizadas em cimeira, racemo ou fascículo, com flores pequenas unissexuadas, actinomorfas e hipoginas. Os frutos são drupóides núcunhos, globosos e coloração vermelha, preta ou marrom, seu o exocarpo é membranoso e mesocarpo carnoso. Os frutos possuem de 4-6 pirênios (sementes com endocarpo aderido) uniloculares, cada pirênio possui uma semente com endosperma farto e embrião imaturo, de desenvolvimento tardio (8 a 12 meses) (Barroso, 1999; Loizeau *et al.*, 2016).

No Brasil, as Aquifoliaceae possuem 58 espécies distribuídas entre os biomas do Cerrado e Mata Atlântica. O gênero *Ilex* contém 12 espécies em Florestas Ombrófilas (F.O.), sendo que na F.O. Densa (F.O.D.) e na F.O. Mista (F.O.M.) no Estado do Paraná reúne o maior número de espécies e indivíduos, destacando-se *Ilex microdonta* Reissek dominante da Serra do Mar (Koehler *et al.* 2002, Scheer *et al.* 2011). As espécies de *Ilex* alternam-se na composição da floresta conforme a melhora da drenagem do solo ou no estrato inferior da F.O.D. Montana e estrato médio da F.O.M. Montana (onde predomina a *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil) (Roderjan *et al.* 2002).

2.2 *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.

A espécie *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. é uma árvore perenifolia que pode atingir até 30 metros de altura e 100 centímetros de diâmetro na idade adulta (em

florestas nativas), quando cultivada a altura oscila entre 3 e 5 metros. Possui um tronco cilíndrico, reto ou pouco tortuoso, com fuste curto. É racemosa, de copa baixa, densifoliada e folhagem verde-escura. A casca externa possui coloração cinza-clara a acastanhada, persistente, áspera, com lenticelas abundantes, a casca interna apresenta textura arenosa e coloração branco-amarelada, que oxida e escurece em contato com o ar (Ivanchechen, 1988, Carvalho, 2003).

As folhas são simples, alternas, geralmente estipuladas, obovadas, de margem irregular serrilhada ou dentada no terço basal, subcoriáceas a coriáceas, glabra, de coloração verde-escura e mais clara nas partes adaxial e abaxial respectivamente. As flores são brancas, pequenas, agrupadas em inflorescências do tipo tirso, em pequenos fascículos com até cinco flores. O fruto de coloração roxa-escura (quando maduro), globoso com mesocarpo carnoso, do tipo drupóide nukulânio, com até 5 pirênios com dorso convexo (Barroso *et al.*, 1999, Carvalho, 2003). As sementes são de cor castanho-claro a escuro, pequenas e duras de forma variável.

I. paraguariensis é uma espécie dioica (Groppo-Junior & Pirani, 2002; Bruxel *et al.*, 2018) e apresenta alta heterogeneidade na floração e frutificação, com diferentes estágios fenológicos em uma mesma planta (Zanon, 1988; Pires *et al.*, 2014). A dispersão é zoocórica, principalmente realizada por aves. A posição dos ramos na copa influencia o desenvolvimento dos frutos, já que radiação e luminosidade variam dentro da árvore, afetando o comportamento fenológico e a qualidade das sementes produzidas (Rocha *et al.*, 1990).

A unidade de dispersão da espécie é um pirênio, que é formado por um endocarpo lenhoso e a semente, esta última constituída por: tegumento, endosperma e embrião (Heuser; Ferreira; Mariath, 1993). As sementes têm dormência morfofisiológica (Cuquel *et al.*, 1994; Medeiros, 1998; Wendling, 2004; Dolce *et al.*, 2010; Galíndez *et al.*, 2018), considerada a principal causa do baixo percentual de germinação da espécie. A germinação de *Ilex paraguariensis* é influenciada tanto por características anatômicas, como a espessura do tegumento e a localização de inibidores químicos, quanto pela regulação hormonal (Cuquel *et al.*, 1994; Medeiros, 1998; Galíndez *et al.*, 2018). Além disso, estudos indicam que diversos lotes de sementes de erva-mate apresentam alta porcentagem de sementes vazias e deterioradas, fator que compromete a viabilidade inicial das sementes (Duboc & França, 2016; Souza *et al.*, 2020).

No Brasil, as folhas de erva-mate são consumidas como chá mate, chimarrão e tererê, sendo um dos principais produtos não madeireiros do sul do país (Coelho *et al.*, 2002), com uma produção anual de 1.212.696 toneladas de folhas verdes em 2024 (IBGE PAM e PVES, 2024). Portanto, a erva-mate é uma espécie de grande importância econômica e social, especialmente para a agricultura familiar (Chechi & Schultz, 2016). O principal produtor de mate do Brasil é o estado do Paraná, responsável por 64% da produção nacional, seguido pelo Rio Grande do Sul, com aproximadamente 25% e Santa Catarina com cerca de 12% (IBGE PAM e PVES, 2024). Entretanto, a produção de mudas de erva-mate é a partir de mudas seminais, e enfrenta desafios significativos devido à dormência de suas sementes, que apresentam embrião imaturo e endocarpo duro (lenhoso). A superação dessa dormência é crucial para acelerar o processo de germinação e, conseqüentemente, aumentar a eficiência da produção de mudas (Penteado Junior, 2019, DERAL-PR, 2020).

2.3 Sementes

A semente é definida como um óvulo fertilizado e desenvolvido sendo constituída por três partes: tegumento, tecidos de reserva e embrião. O tegumento da semente, também chamado de casca, é dividido entre testa (externa) e tégmen (interna), tem como função proteção contra injúrias mecânicas, ataques de microorganismos e insetos. Existe uma característica intrínseca da semente, que auxilia na sua longevidade, algumas permanecem viáveis por um longo período (sementes ortodoxas) enquanto outras perdem a viabilidade rapidamente (recalcitrantes) (Oliveira, 2013). Essas características geralmente possuem funções de regulação de água e oxigênio, auxiliando na germinação. Entretanto pode ocorrer a impermeabilidade da estrutura, ocasionando um mecanismo conhecido como dormência (Oliveira, 2013).

Durante a formação da semente, o primeiro tecido a se diferenciar é a testa, seguido do tégmen, neste processo as divisões celulares podem ser anticlinais, periclinais ou oblíquas além de camadas colapsarem ou se absorverem (Souza, 2009). Na testa, algumas espécies podem apresentar cicatrizes que auxiliam na identificação da espécie, além de uma estrutura chamada de Arilo, um revestimento carnoso que pode cobrir parcial ou inteiramente a semente, cuja função é atração de agentes dispersores por ser adocicado e de coloração atrativa (Oliveira, 2013).

No tegumento também observamos externamente a micrópila, que pode ou não ser perceptível, o hilo que se refere a cicatriz do funículo e a rafe que é resultado de uma cicatriz do feixe vascular que percorre a semente do funículo a calaza (base da nucela do óvulo, em algumas sementes é uma saliência ou mancha escura no tegumento próxima ao hilo e oposta a micrópila) (Oliveira, 2013).

Os tecidos de reserva da semente têm como função fornecer suprimentos necessários para o desenvolvimento do embrião até a formação completa dos órgãos responsáveis pela autonomia fisiológica da planta. O endosperma é um tecido triploide formado através da fusão do gameta masculino (andrófito) com a célula central ou média (Souza, 2009). O embrião, por sua vez, é a principal estrutura da semente, pois é através dele que se constituirá um novo indivíduo, sua divisão é dada pelos cotilédones e o eixo embrionário (Oliveira, 2013). A formação do embrião ($2n$) é resultante da fusão de um núcleo espermático (n) com a oosfera (n), após se iniciam as divisões celulares para formação dos primórdios cotiledonares até a maturação embrionária (Souza, 2002; Souza, 2009).

Os tecidos vegetais contêm diferentes hormônios, cujas funções variam conforme suas concentrações, influenciando diretamente o desenvolvimento da semente (Marcos-Filho, 2015). Quando aplicados externamente, esses hormônios são denominados reguladores de crescimento. Esses processos são regulados por mecanismos fisiológicos, especialmente pelas interações hormonais. As giberelinas (GAs) controlam diversos aspectos do desenvolvimento vegetal, incluindo a germinação e o crescimento das plântulas, além de estarem associadas à superação da dormência (Bewley & Black, 1994; Davies, 1995). Durante a germinação, as GAs estimulam a produção de enzimas hidrolíticas, promovendo o enfraquecimento dos tecidos ao redor do embrião e a mobilização das reservas para fornecer energia (Métivier, 1986; Groot & Karssen, 1987).

Quando aplicadas exogenamente, as giberelinas, especialmente o ácido giberélico, podem induzir a germinação de sementes dormentes, estimulando a síntese de RNA mensageiro para a produção de α -amilase e outras hidrolases. Em sementes, a giberelina está presente no embrião durante o processo germinativo. A dormência e a germinação são fortemente influenciadas pela relação entre ácido abscísico (ABA) e giberelinas: embriões com baixos níveis de ABA podem apresentar germinação precoce (Taiz & Zeiger, 2009; Sena *et al.*, 2019).

Durante a maturação, a semente passa por diversos processos, sendo a desidratação uma das etapas finais, acompanhada da redução dos níveis ou da sensibilidade ao ABA e de alterações no metabolismo dos tecidos de reserva (Marcos-Filho, 2015). O Ácido Abscísico (ABA) é o principal hormônio na indução e manutenção da dormência, além disso, pode retardar ou inibir o desenvolvimento dos tecidos vegetais. O ABA também é responsável pelo controle da maturação do embrião, impedindo a germinação precoce, a resposta varia com a maturidade embrionária: quanto mais imaturo maior a sensibilidade e quanto mais maduro menor. Em sementes o ABA auxilia no desenvolvimento em três etapas: 1) na divisão celular e diferenciação dos tecidos; 2) Acúmulo de compostos de armazenamento e 3) proteção do embrião a dessecação e na desidratação da semente (perda superior a 90% de água) (Taiz & Zeiger, 2009; Marcos-Filho, 2015; Sena *et al.*, 2019).

A auxina é comumente utilizada em estudos de propagação vegetativa para indução na formação de raízes, isso se dá, pois, este hormônio estimula o alongamento celular, auxilia na divisão celular e formação de raízes adventícias de folhas e caules. Pode ser aplicada de forma exógena através do Ácido Indol-Acético (IAA) e do Ácido Indolbutírico (IBA). A auxina tem uma rápida ação, promovendo o alongamento celular após 10 minutos, além disso aumenta a capacidade de extensão das paredes celulares (Taiz & Zeiger, 2009).

Para a germinação de sementes são necessários alguns hormônios como a citocinina e o etileno, além do ácido giberélico. As citocininas são sintetizadas em diversas regiões da planta, como nos embriões em desenvolvimento, frutos e folhas jovens. Este hormônio também é frequentemente encontrado em tecidos jovens, que estejam no processo de divisão celular nos meristemas apicais de caules e raízes. A citocinina participa de diversos processos vegetais como a divisão celular, alongamento celular, maturação do cloroplasto entre outros. Uma razão importante nos tecidos é a relação auxina/citocinina que auxilia na diferenciação em raiz ou gema (Taiz & Zeiger, 2009).

Durante o processo de maturação, dos frutos e sementes, ocorrem diversas modificações (bioquímicas e fisiológicas), deste modo, cada espécie desenvolve uma estratégia para aumentar a sua taxa de sobrevivência, pois durante o período de dispersão as condições ambientais podem não estar ideais para a germinação. A dormência das sementes é caracterizada pela incapacidade de germinar, mesmo em condições ambientais favoráveis, devido a fatores intrínsecos à semente. Esse

mecanismo de defesa visa promover a sobrevivência e dispersão da espécie. (Fowler & Bianchetti, 2000).

2.3.1 Coleta e beneficiamento de sementes

A qualidade da semente não depende apenas do potencial de germinação, as características genéticas, fisiológicas, bioquímicas e anatômicas também influenciam, pois atuam no comportamento antes mesmo da germinação (Oliveira, 2013). Deste modo, buscando características melhores, ou específicas, deve-se planejar o processo de coleta das sementes, que devem ser executadas de forma eficiente e rápida, inicialmente selecionando as matrizes, evitando árvores isoladas ou de bordadura, devido à baixa variabilidade genética (Oliveira, 2013).

As coletas podem ocorrer em remanescentes nativos ou áreas de produção de sementes. A seleção das plantas é realizada conforme o objetivo, quando a característica de interesse é a madeira, busca-se matrizes pela avaliação do fuste por exemplo (Oliveira, 2013). Entretanto algumas características gerais são consideradas para seleção de matrizes: porte (altura e diâmetro), forma da copa (deve ser bem desenvolvida), periodicidade na produção de frutos e sementes, vigor e forma do tronco (Oliveira, 2013).

Para determinar a época ideal de coleta, deve-se conhecer as características de cada espécie e assim determinar o momento e o planejamento, buscando a melhor viabilidade da execução. Espécies com sementes recalcitrantes, não toleram dessecação (ou baixa umidade), desta forma seu período frutificação e viabilidade são curtos, enquanto sementes ortodoxas suportam o armazenamento por tolerar secagens (e baixas umidades), como é o caso da erva-mate. Além disso, é necessário planejar a técnica de coleta, podendo ser em árvores em pé (com auxílio de escada, escalada com esporas, rapel, escalada com escada de cordas, mecanizada, árvores abatidas e no chão), todavia, alguns fatores podem limitar a coleta como a sazonalidade, distribuição, localização entre outros (Oliveira, 2013; Piña-Rodrigues *et al.*, 2015, Araujo *et al.*, 2018).

Após a coleta dos frutos, estes são direcionados ao local onde serão beneficiados e as sementes extraídas. Este processo de beneficiamento é necessário para a retirada de impurezas vindas com o lote, como pedaços de folhas, galhos, frutos imaturos ou deteriorados etc.). A extração das sementes é realizada de acordo com o tipo de fruto, quando secos o processo é manual (mais utilizado) ou mecânico,

todavia para evitar injúrias na semente é necessário que o fruto perca umidade, após os frutos seguirem para o processo de secagem natural ou artificial, esta etapa é necessária principalmente para sementes ortodoxas. Já em frutos carnosos, a extração das sementes ocorre por meios úmidos seja pela maceração (manual ou mecânico) ou pela fermentação. Assim como é realizado para os frutos, as sementes também passam pelo processo de beneficiamento onde é realizada a limpeza do lote (retiradas de bagaços, polpas, sementes ocas, chochas etc.) (Oliveira, 2013).

2.3.2 Análise de sementes

A análise de sementes é importante para determinar a qualidade de lotes, sendo avaliadas características genéticas, físicas, sanitárias e fisiológicas. Dentre as análises físicas temos a porcentagem de pureza, peso de mil sementes e grau de umidade, que apresentam alta variabilidade entre diferentes espécies e, dentro de uma mesma espécie (características genéticas), quanto à procedência das sementes, ao seu lote e ao tempo de armazenamento em câmaras frias (Fortes *et al.*, 2008). Além disso as análises físicas buscam avaliar alterações como injúrias no tegumento ou lesões no embrião (Oliveira, 2013).

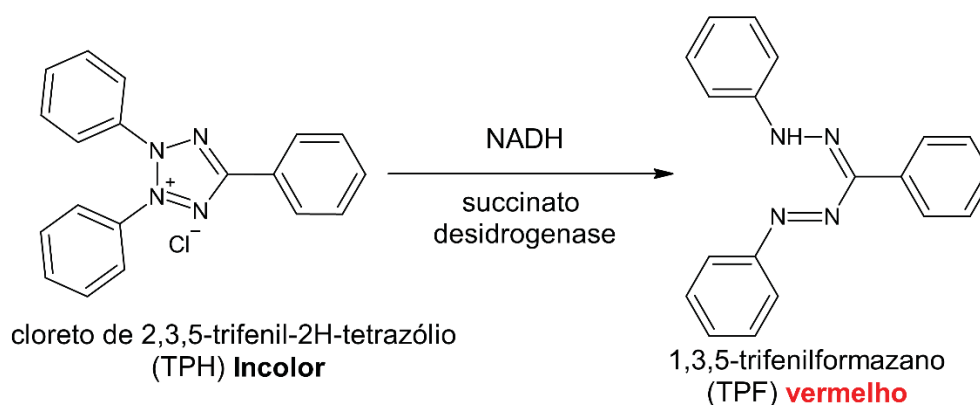
As análises sanitárias buscam avaliar os efeitos causados por microorganismos e insetos (Oliveira, 2013). Buscando minimizar os efeitos de microorganismos, as Regras para Análise de Sementes (RAS) indicam alguns tratamentos pré-germinativos a partir da utilização de detergente, hipoclorito de sódio (0,5% da solução comercial) entre outros métodos (Brasil, 2009).

Para a análise fisiológica realizam-se testes de embebição em água, de condutividade elétrica, de envelhecimento acelerado, de germinação, de tetrazólio entre outros. Estes testes visam avaliar o vigor, viabilidade, qualidade e germinação para determinar o potencial para produção de plântulas vigorosas e saudáveis, além de alterações no metabolismo celular (Oliveira, 2013; Araujo *et al.*, 2018).

Para espécies que apresentam dormência, ou seja, impedimentos para a germinação mesmo em condições ideais, é indicado a realização do teste de tetrazólio, para avaliar a viabilidade da semente. O teste de tetrazólio se baseia em avaliar as atividades das enzimas desidrogenases nos tecidos vivos, pois elas catalisam as reações respiratórias durante a glicólise e o ciclo de Krebs. Para realização do teste é utilizado o sal de tetrazólio (cloreto de 2,3,5 trifenil tetrazólio) incolor que reage com a forma reduzida da co-enzima dinucleotídeo de nicotinamida

adenina (NADH) e quando o tetrazólio é reduzido forma 1,3,5 trifenilformazano (formazan) de coloração vermelha, como pode ser observado na Figura 1 (Delouche *et al.*, 1976; Piña-Rodrigues *et al.*, 2015).

Figura 1 – Reação de redução do Cloreto de 2,35-trifenil-2H-tetrazólio (Cloreto de tetrazólio) pela coenzima reduzida Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo (NADH) formando 1,3,5-trifenilformazano (Formazan).



Fonte: Adaptado de Delouche *et al.* (1976).

Deste modo o sal de tetrazólio é um bom indicativo de viabilidade, por reagir apenas com tecido vivos além de ser um método rápido de diagnóstico, e ao contrário de testes de germinação que podem ser alterados por diversos fatores, o tetrazólio proporciona maior homogeneidade e as avaliações são individuais (Piña-Rodrigues *et al.*, 2015).

2.4 Dormência e técnicas de superação

Para algumas espécies, testes de germinação são mais onerosos por apresentarem características restritivas, ou seja, impedimentos associados ao embrião, tegumento, endosperma ou algum outro componente da semente. Estes impedimentos são chamados de dormência, que dificulta a germinação ou em algumas situações a torna inviável (Araujo *et al.*, 2018).

Diferente de quiescência (estado de repouso reversível) que pode ser facilmente superada, a dormência mesmo com condições ambientais favoráveis as sementes não germinam. A dormência é controlada por fatores genéticos, que influenciam sua intensidade. Esse fenômeno pode ser entendido como um mecanismo de sobrevivência da espécie. Isso ocorre porque uma semente que germina logo após se desprender da planta-mãe origina uma plântula jovem e frágil. Em condições adversas, essa plântula pode não sobreviver. O risco é ainda maior durante o inverno,

pois os recursos disponíveis são mais escassos do que em períodos mais quentes (Popinigis, 1985; Carvalho & Nakagawa, 2012).

A dormência pode ser classificada em dois tipos: primária e secundária. A dormência primária é característica da própria espécie e geralmente ocorre durante a maturação da semente. Já a dormência secundária resulta de condições ambientais adversas, como altas temperaturas e baixa umidade relativa. Além dessa classificação, os mecanismos de dormência estão relacionados às estruturas da semente. A dormência tegumentar, ou física, consiste na regulação da entrada de água, impedindo a embebição dos tecidos internos mesmo quando as sementes estão em condições favoráveis à germinação. Outro tipo está associado ao desenvolvimento do embrião, pois, mesmo após a maturidade da semente, o embrião pode não estar completamente formado. Por fim, a regulação hormonal também é considerada um mecanismo de dormência, estando relacionada ao equilíbrio entre substâncias promotoras e inibidoras do crescimento (Popinigis, 1985; Carvalho & Nakagawa, 2012).

Algumas espécies podem apresentar uma ou mais dormências, por isso são desenvolvidas técnicas para superar essa característica de acordo com cada tipo de dormência. Uma das técnicas mais aplicadas em sementes com dormência tegumentar é a escarificação mecânica, que consiste em esfregar as sementes contra superfícies abrasivas, seja através de lixas manuais ou automáticas, buscando causar pequenas avarias no tegumento para expor os tecidos internos, evitando injúrias excessivas ou perfurações profundas que reduziriam o poder germinativo. Outras formas de superar a dormência tegumentar são os tratamentos com água quente ou a escarificação com substâncias químicas, como ácidos ou bases (Popinigis, 1985; Mojena & Guerra, 2018).

Quando as sementes apresentam altas concentrações de substâncias inibidoras da germinação solúveis em água, a chamada dormência fisiológica, elas são lavadas em água corrente para lixiviação destas substâncias. Já quando a espécie apresenta imaturidade embrionária (dormência morfológica) é necessário deixar as sementes estratificando, ou seja, em condições adequadas de água, luz, substrato, entre outros, até que o embrião atinja a maturidade e possa germinar (Popinigis, 1985).

Além da estratificação, outros métodos podem ser utilizados para a superação da dormência em espécies florestais. Pereira e colaboradores (2019) testaram

diferentes técnicas para dez espécies, evidenciando a necessidade de adequação dos métodos conforme as características específicas de cada uma. No caso da erva-mate, cuja dormência é classificada como morfofisiológica profunda ou combinada (Cuquel *et al.*, 1994; Galíndez *et al.*, 2018; Souza, 2022), diferentes abordagens têm sido empregadas de forma complementar, incluindo a estratificação em areia por longos períodos (Zanon, 1988; Daniel, 2009), o uso de temperaturas controladas (Duarte *et al.*, 2023; Reinke *et al.*, 2024), a escarificação mecânica e química para aumentar a permeabilidade do endocarpo (Fowler; Sturion, 2000; Mireski *et al.*, 2019), bem como a aplicação de reguladores de crescimento, como giberelinas, citocininas e nitrato de potássio, visando estimular o desenvolvimento embrionário e reduzir a ação de inibidores fisiológicos (Cuquel *et al.*, 1994; Fowler *et al.*, 2007). Mais recentemente, estratégias inovadoras, como o uso de reguladores nanoencapsulados, também têm sido investigadas, com potencial para aumentar a eficiência dos tratamentos e tornar o processo de superação da dormência mais rápido e uniforme

2.5 Reguladores de crescimento nanoencapsulados

O uso de reguladores de crescimento constitui uma estratégia amplamente empregada para modular processos fisiológicos como germinação, crescimento e resposta a estresses. No entanto, a aplicação convencional desses compostos apresenta limitações relacionadas à baixa estabilidade, rápida degradação no ambiente e reduzida eficiência de absorção pelas plantas. Até o início de 2024, a literatura científica sobre reguladores de crescimento nanoencapsulados ainda era escassa. Essa lacuna evidencia a escassez de informações consolidadas sobre a eficiência e os mecanismos de ação desses sistemas em condições reais.

A nanoencapsulação consiste na incorporação de moléculas bioativas em matrizes ou carreadores em escala nanométrica, como polímeros naturais ou nanopartículas biodegradáveis, permitindo liberação controlada, maior proteção contra degradação e aumento da biodisponibilidade dos compostos ativos (Jiménez-Arias *et al.*, 2023; Campos *et al.*, 2023). Estudos recentes demonstram que essa tecnologia pode melhorar significativamente a eficiência dos fitormônios, promovendo respostas fisiológicas mais consistentes (Sampedro-Guerrero *et al.*, 2023).

Revisões recentes destacam que sistemas nanoencapsulados de fitormônios apresentam grande potencial na agricultura sustentável, especialmente no aumento da tolerância a estresses abióticos e na melhoria do desenvolvimento vegetal. Nesse

sentido, Sampedro-Guerrero *et al.* (2023) demonstram que a liberação controlada de fitormônios pode modular respostas fisiológicas e moleculares em plantas sob condições adversas. De forma complementar, Campos *et al.* (2023) ressaltam que a associação entre reguladores de crescimento e nanocarreadores pode atuar de maneira sinérgica com microrganismos benéficos, como as rizobactérias promotoras de crescimento (PGPR - *Plant Growth-Promoting Rhizobacteria*).

Avanços experimentais mais recentes têm evidenciado resultados promissores. A aplicação de ácido giberélico (GA₃) nanoencapsulado em sementes de tomate promoveu melhorias no crescimento inicial e no desempenho morfofisiológico de plântulas sob diferentes condições hídricas, com destaque para a formulação de alginato/quitosana contendo 5 µg mL⁻¹ de GA₃, que reduziu a perda de água e aumentou a eficiência fotoquímica das plantas (Fregonezi *et al.*, 2024). De maneira semelhante, o encapsulamento de ácido indol-3-acético (IAA) em nanopartículas de lignina demonstrou potencial para modular o desenvolvimento do xilema e aumentar a produção de frutos em tomateiro, embora concentrações elevadas (100 µg mL⁻¹) possam induzir efeitos fitotóxicos, como a redução da clorofila e das trocas gasosas (Faleiro *et al.*, 2025). Além disso, nanopartículas biodegradáveis, como as de quitosana, têm sido testadas como carreadores eficientes de reguladores de crescimento, como o GA₃, resultando em incremento de biomassa e produtividade em feijoeiro e tomateiro (Pereira *et al.*, 2017; Pereira *et al.*, 2019).

Em espécies florestais, incluindo *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., o uso de reguladores de crescimento vegetal é amplamente empregado, principalmente em técnicas de propagação vegetativa e cultura de tecidos. Embora os artigos fornecidos não abordem diretamente a erva-mate, eles demonstram o potencial do uso de reguladores nanoencapsulados para superar limitações semelhantes em outras espécies florestais e agrícolas. Pesquisas com espécies modelo, como o tomateiro, mostram que o uso de nanopartículas de alginato/quitosana com GA₃ ou IAA (Ácido indol-acético) pode modular características fisiológicas e de crescimento (Fregonezi *et al.*, 2024; Faleiro *et al.*, 2025), reforçando a importância desses compostos no desenvolvimento vegetal e abrindo perspectivas para sua aplicação em espécies florestais nativas.

Apesar desses avanços, observa-se uma lacuna significativa na literatura quanto ao uso de tecnologias emergentes, como a nanoencapsulação de reguladores de crescimento em espécies florestais. Até o momento, estudos concentram-se

predominantemente em culturas agrícolas, sendo escassas ou inexistentes aplicações em espécies arbóreas e, especialmente, em *Ilex paraguariensis*. Nesse contexto, o uso de reguladores nanoencapsulados representa uma abordagem inovadora e promissora, com potencial para superar limitações relacionadas à estabilidade, eficiência e controle de liberação desses compostos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE FRUTOS E BENEFICIAMENTO DAS SEMENTES

Os frutos de *Ilex paraguariensis* A.St-Hil. (erva-mate) foram coletados no mês de fevereiro de 2024 no Pomar Clonal de Sementes da Bitumirim Indústria e Comércio de Erva-Mate Ltda., localizado no município de Ivaí, Paraná (24°14'56"S, 50°51'32"W; altitude: 903 m). A região apresenta clima Cfa (clima subtropical úmido mesotérmico, segundo Köppen-Geiger), com temperatura média anual de 18 °C e precipitação média de 1.500 mm/ano (Climate, 2021; Cui *et al.*, 2021).

Foram selecionadas quatro árvores matrizes com base na produtividade de frutos, coletando-se aproximadamente um quilograma de frutos por planta em estágio de maturação dos frutos (coloração vermelho-rosa, rosa e preto) como ilustrado na Figura 2. Inicialmente, as sementes foram extraídas do fruto através da maceração em peneira metálica (granulometria 2 mm) sob água corrente e, posteriormente, secas ao ar livre. Após a secagem, as sementes foram beneficiadas com o auxílio de um soprador elétrico para retirada das impurezas (restos de galhos, folhas, frutos e sementes chochas).

Figura 2 – (A) Coleta dos frutos de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. com auxílio de uma tesoura de poda; (B) Galhos com frutos maduros coletados.



Fonte: A autora (2024).

3.2 DETALHES EXPERIMENTAIS

3.2.1 ANÁLISES FÍSICAS

3.2.1.1 Peso de mil sementes (PMS)

De acordo com as Regras de Análise de Sementes (RAS) de 2009, as análises físicas de sementes florestais devem ser realizadas por meio de medição em balança analítica (0,001 g) de oito repetições contendo 100 sementes cada. Primeiramente avaliou-se a variância, o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) obtidos para as medidas de massa das sementes de erva-mate.

3.2.1.2 Grau de Umidade

O grau de umidade (U%) das sementes foi determinado pelo método de estufa a 105 ± 3 °C. Inicialmente, dois cadinhos metálicos (diâmetro < 8 cm) foram secos em estufa por 30 min, resfriados em dessecador e, posteriormente, pesados em balança analítica com precisão de 0,001 g. Foram utilizadas duas repetições de 100 sementes cada, as quais foram pesadas, secas por 24 h, resfriadas em dessecador e pesadas novamente para cálculo da perda de massa.

3.2.2 ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA

3.2.2.1 TESTE COM AZUL DE TOLUIDINA

Para determinar o tempo ideal de exposição às soluções de escarificação química, utilizou-se o azul de toluidina como marcador de permeabilidade. A lógica do teste baseia-se no fato de que as moléculas deste corante são maiores que as do ácido sulfúrico (H₂SO₄) e do hidróxido de potássio (KOH); logo, se o corante penetrar o endocarpo, as soluções químicas certamente também o fizeram.

O procedimento consistiu em submeter as sementes à escarificação química (em H₂SO₄ a 2% v/v ou KOH a 4% m/v) pelos tempos de 10, 20 e 30 minutos. Imediatamente após cada intervalo de escarificação, as sementes foram imersas em solução de azul de toluidina (0,1%) por dez minutos. A alteração da cor do endosperma, do amarelo original para tons esbranquiçados ou azulados, serviu como indicador visual da penetração.

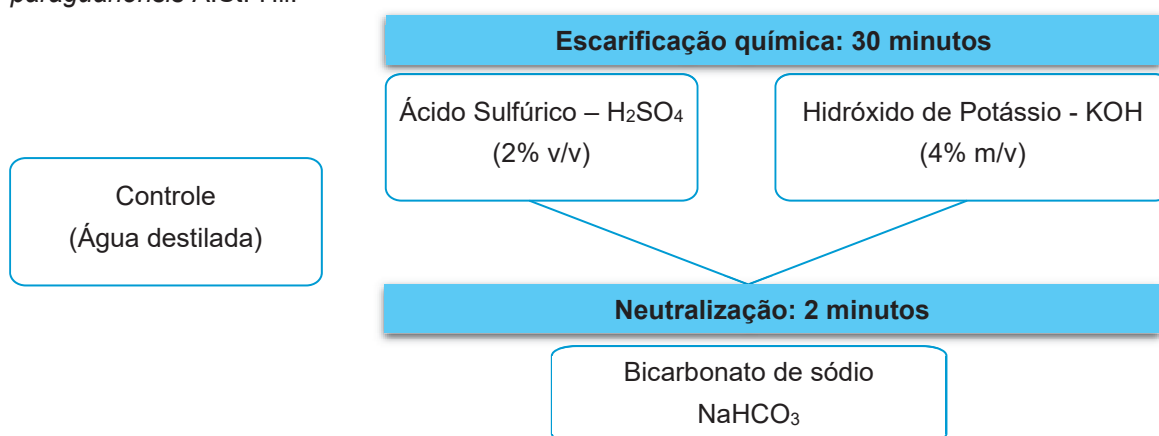
Com base na literatura para espécies de endocarpo lignificado, como a castanha-do-Brasil (Frazão *et al.*, 1984) e a erva-mate (Miotto, 2014), os tempos

testados visaram encontrar um equilíbrio que garantisse a permeabilidade sem causar danos irreversíveis ao embrião. A análise foi objetivada pela quantificação dos valores médios de *RGB* (*Red*, *Green* e *Blue*) das imagens obtidas em microscópio digital Leica DMS300.

3.2.2.2 ENSAIOS DE ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA

Com o tempo ideal de escarificação química estabelecido, realizaram-se os testes de viabilidade. Para tal, as sementes foram imersas nas soluções químicas e, posteriormente, neutralizadas em solução saturada de bicarbonato de sódio, a fim de remover resíduos dos agentes escarificantes e evitar ações prolongadas. A Figura 3 apresenta o fluxograma das etapas experimentais conduzidas.

Figura 3 – Fluxograma dos tratamentos de escarificação química dos sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



Fonte: A autora (2025).

As soluções de escarificação química foram previamente caracterizadas quanto ao potencial hidrogeniônico (pH), determinado com pHmetro digital calibrado. A solução de ácido sulfúrico a 2% (v/v) apresentou pH médio de 0,8, enquanto a solução de hidróxido de potássio a 4% (m/v) apresentou pH médio de 13,3. A solução saturada de bicarbonato de sódio, utilizada para neutralização após a escarificação química, apresentou pH médio de 7,8. Essa caracterização permitiu observar a intensidade química dos agentes utilizados e assegurar a interrupção da ação dos escarificantes antes das etapas subsequentes.

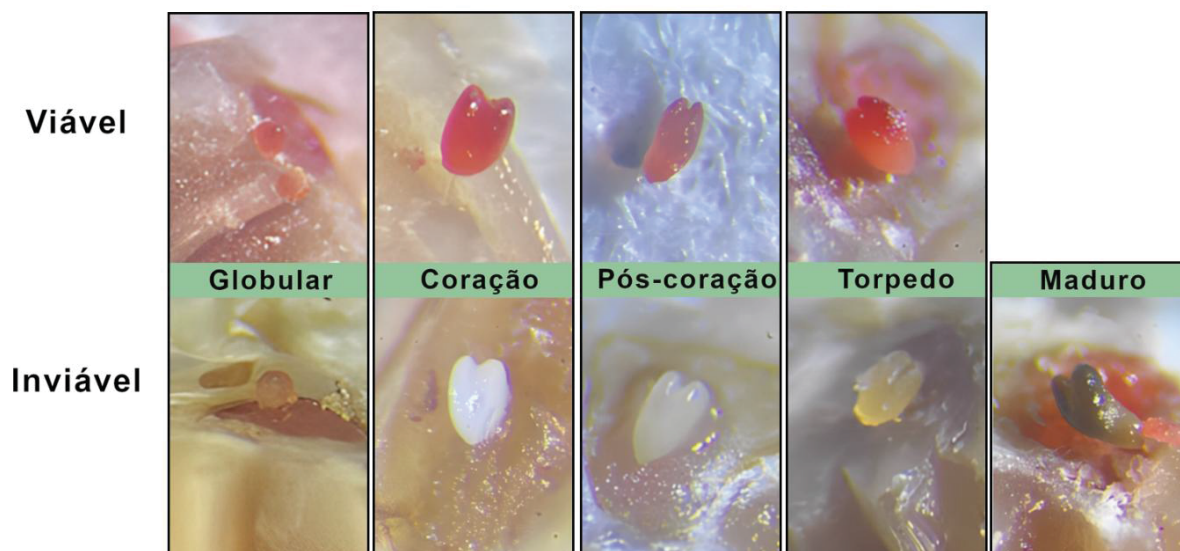
3.2.2.3 TESTE DE TETRAZÓLIO APÓS ESCARIFICAÇÃO DAS SEMENTES

Para a realização do teste de tetrazólio, as sementes foram inicialmente hidratadas mediante imersão em água destilada por 18 horas a 35 °C. Em seguida,

procedeu-se à secção longitudinal para exposição do endosperma. As sementes foram então submersas em solução de tetrazólio a 1% (cloreto de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazólio) por 18 horas a 30 °C. O experimento foi conduzido com quatro repetições de 50 sementes por tratamento, seguindo a metodologia estabelecida pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 2009).

Na avaliação dos estádios embrionários das sementes de erva-mate, adotou-se a metodologia proposta por Catapan (1998) para determinação do grau de maturação do lote. Por meio de cortes transversais na região micropilar, expôs-se completamente o embrião, permitindo uma análise criteriosa (Figura 4). A classificação considerou dois parâmetros principais: (A) o estágio de desenvolvimento embrionário e (B) o padrão de coloração resultante da reação com o tetrazólio, os embriões foram classificados em viáveis, inviáveis e deteriorados (tecidos necrosados, vazias e/ou predadas), conforme os critérios técnicos estabelecidos pelas RAS (Brasil, 2009).

Figura 4 – Estádios de maturação embrionária das sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



Fonte: A autora (2024). No presente estudo não foi encontrado estágio embrionário maduro viável.

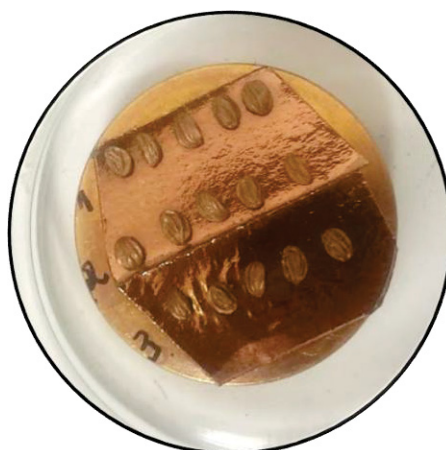
3.2.2.4 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DE SEMENTES

3.2.2.4.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para análise em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram utilizadas dez sementes de cada tratamento de escarificação, sendo cinco seccionados longitudinalmente e cinco inteiros. As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas nos equipamentos: JEOL JSM 6360-LV, com resolução de

3,0 nanômetros (nm), em ampliações até 300 kX, e TESCAN VEGA3 LMU, com resolução de 3,0 nm, em ampliações variando de 1000x a 50000x. As amostras (sementes) foram metalizadas em ouro e fixadas em fita de cobre, para captura das imagens, conforme a Figura 5.

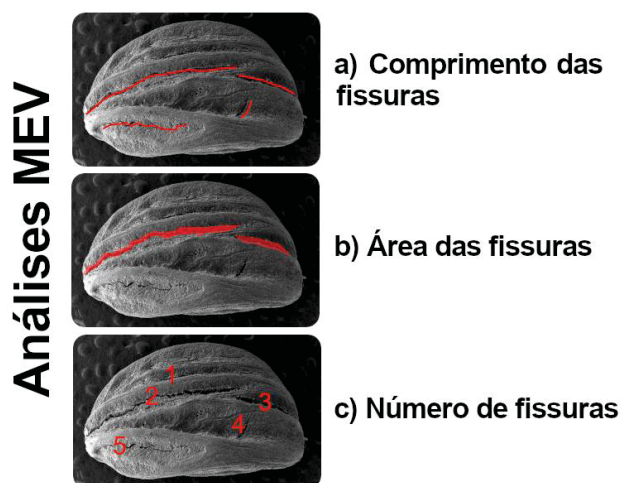
Figura 5 – Sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. após metalização em ouro e fixação sobre fita de cobre para análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).



Fonte: A autora (2024).

A partir das imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura, procedeu-se à análise quantitativa das alterações estruturais do endocarpo. Foram mensurados o número, o comprimento e a área das rachaduras observadas na superfície do endocarpo aderido as sementes. As mensurações foram realizadas em imagens digitais calibradas, utilizando software de análise de imagens ImageJ, a partir da escala das próprias imagens (Figura 6).

Figura 6 – Análises avaliadas através das imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).



Fonte: A autora (2024).

O comprimento das fissuras (μm , Figura 6a) foi obtido por meio da marcação individual de cada fissura; para a área (μm^2 , Figura 6b), foram demarcadas as regiões ocupadas pelas fissuras visíveis, individualmente, enquanto o número de rachaduras (Figura 6c) foi determinado por contagem direta nas imagens, permitindo a quantificação objetiva do efeito dos tratamentos de escarificação química sobre a integridade do endocarpo.

3.2.2.4.2 CARACTERIZAÇÃO ANATÔMICA

Para a avaliação anatômica, as sementes foram desidratadas em uma série etílica em concentrações crescentes (15% a 95%). Após pré-infiltração das amostras foi realizada, inicialmente, com uma mistura 1:1 de etanol 95% e Histoiresina Leica™, durante quatro dias; posteriormente o material foi infiltrado em histoiresina pura por quatro dias de acordo com as instruções do fabricante.

As amostras foram seccionadas em micrótomo Olympus CUT 4055. Os cortes, com espessura de 20 μm , foram distendidos em temperatura ambiente e colocados diretamente nas lâminas sobre gotas de água destilada e desidratados em placa aquecedora até a secagem da lâmina de água. Os cortes foram corados com azul de toluidina (O'Brien *et al.*, 1965) permitindo identificar os diferentes tecidos das sementes.

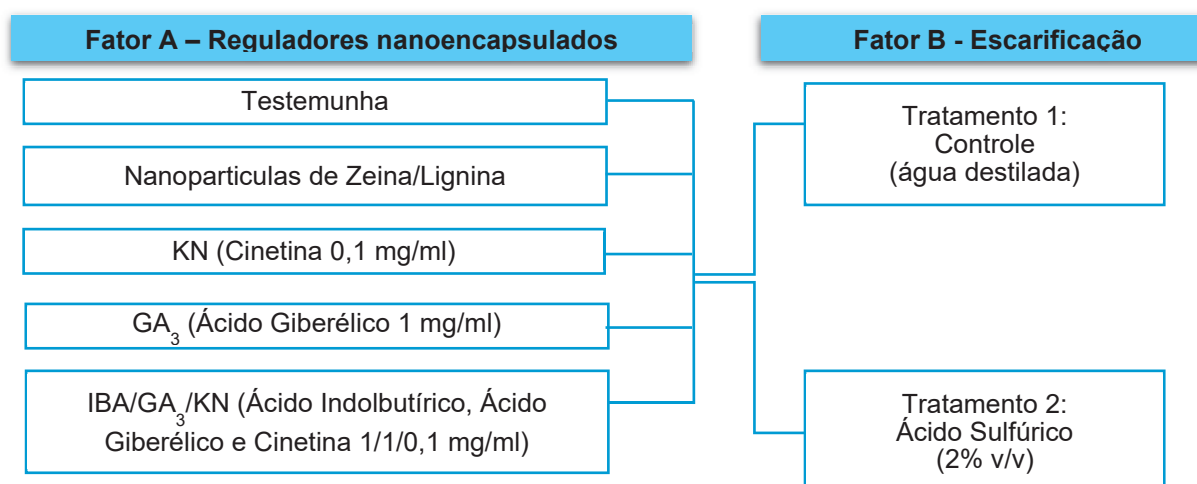
Para a identificação das células que compõem o endocarpo, utilizou-se a metodologia de maceração de Franklin, adaptada por Kraus e Arduim (1997), que consiste na imersão das amostras por 48 horas a 60 °C em solução 1:1 (v/v) de peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 30%) e ácido acético glacial (CH_3COOH). No caso das sementes de erva-mate, esse período foi insuficiente para a completa desagregação celular, exigindo prolongamento da maceração por dez dias a 60 °C, seguido de mais dez dias em temperatura ambiente. Após, as sementes foram coradas com Safranina (1%).

As estruturas dos tecidos e células do endocarpo foram registradas em microscópio óptico de luz (Opton TNB-40T-PL), equipado com câmera digital acoplada. As observações foram realizadas sob iluminação transmitida, utilizando objetivas de diferentes ampliações, de modo a documentar as características anatômicas relevantes.

3.2.3 COMBINAÇÃO ENTRE ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA E ESTRATIFICAÇÃO COM REGULADORES DE CRESCIMENTO

O experimento foi conduzido com 160 pirênios por repetição, em duplicata, com avaliações trimestrais organizadas em um arranjo fatorial que considerou os reguladores de crescimento e escarificação química, conforme detalhado no fluxograma experimental (Figura 7). Com base nos resultados da etapa anterior, que determinou a eficiência dos agentes escarificantes, as sementes foram submetidas a imersão em solução de ácido sulfúrico a 2% (v/v) por 30 min. Após a exposição ao ácido, as sementes foram imediatamente imersas em solução saturada de bicarbonato de sódio para a neutralização de resíduos químicos e, posteriormente, lavadas em água corrente.

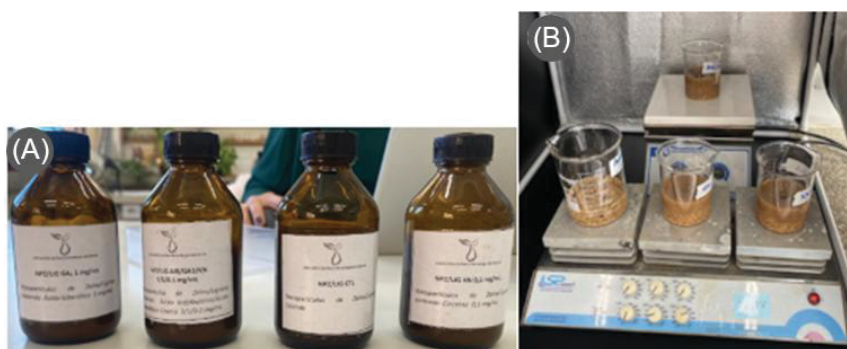
Figura 7 – Fluxograma experimental: Tratamentos de escarificação e aplicação de reguladores nanoencapsulados em pirênios de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



Fonte: A autora (2025).

Para aplicação dos reguladores de crescimento, foi utilizado o menor tempo para o teste de tetrazólio sugerido pela RAS para a erva-mate, deste modo, as sementes foram imersas em soluções com reguladores de crescimento nanoencapsulados (Figura 8A) por 18 horas sob agitador magnético em câmara escura (Figura 8B), para o processo de “pintura” das sementes, ou seja, que o endocarpo da erva-mate ficasse saturado com a solução dos reguladores.

Figura 8 – Sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. imersas em soluções de reguladores de crescimento sob agitador magnético.



Fonte: A autora (2024)

Após o processo de “pintura”, as sementes foram separadas em repetições, envoltas em tecido tule e acondicionadas em gerbox preto. O substrato utilizado foi areia de granulometria média (2 mm), com retenção hídrica de 3%, previamente esterilizada a 100 °C (Brasil, 2009). Posteriormente, as amostras foram mantidas em câmara de germinação do tipo *Biochemical Oxygen Demand* (BOD), com temperatura constante de 20 °C.

Durante o período de estratificação, o grau de umidade das sementes foi monitorado e determinado conforme a metodologia descrita no item 3.2.1.2, com avaliações realizadas aos três meses (tempo intermediário) e aos seis meses (tempo final) de estratificação.

3.2.3.1 VIABILIDADE E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DAS SEMENTES AOS TRÊS E SEIS MESES

Para a avaliação da viabilidade e estágio embrionário aos três e seis meses após a instalação, adotou-se integralmente a metodologia descrita no tópico 3.2.2.3.

A avaliação dos estádios de maturação foi conduzida em três intervalos temporais distintos: (1) na fase inicial do experimento, para estabelecer a linha de base de viabilidade do lote; (2) no terceiro mês após a instalação, como avaliação intermediária; e (3) ao término do período experimental (sexto mês), permitindo analisar a dinâmica de maturação.

3.2.3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas na linguagem de programação R (versão 4.4.1; 2024). Inicialmente, os dados foram submetidos à verificação dos pressupostos para análise de variância. A normalidade dos resíduos foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk, enquanto a homogeneidade das variâncias foi

verificada por meio do teste de Levene, ambos ao nível de significância de 5% ($p \geq 0,05$). O experimento de escarificação química foi conduzido um delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 3X3, sendo os fatores:

- A. Agente escarificante:
 - A.1. Controle;
 - A.2. Ácido sulfúrico (H_2SO_4 2% v/v);
 - A.3. Hidróxido de potássio (KOH 4% m/v).
- B. Tempo de imersão:
 - B.1. 10 minutos;
 - B.2. 20 minutos;
 - B.3. 30 minutos.

Para o experimento de combinação entre escarificação química e estratificação com reguladores de crescimento foi conduzido em DIC com esquema fatorial 5 X 2, sendo os fatores:

- A. Reguladores de crescimento:
 - A.1. Testemunha
 - A.2. Nanopartículas de zeína e lignina
 - A.3. Cinetina (Kn)
 - A.4. Giberelina (GA_3)
 - A.5. Combinação de Ácido Indolbutírico (IBA) + Kn + GA_3
- B. Escarificação química:
 - B.1. Controle
 - B.2. Ácido sulfúrico a 2% (v/v)

As variáveis que atenderam simultaneamente aos pressupostos de normalidade e homoscedasticidade foram analisadas por meio de análise de variância (ANOVA) bifatorial. Nos casos de diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, também ao nível de 5% de significância.

Para as variáveis que não atenderam aos pressupostos da ANOVA, foram utilizados métodos estatísticos não paramétricos. O teste de Kruskal-Wallis (1952) foi empregado para avaliar os efeitos dos fatores, e, quando detectadas diferenças significativas, as medianas foram comparadas por meio do teste de Dunn (1964), com correção do valor de p pelo método de Benjamini-Hochberg (1995).

As análises estatísticas foram realizadas separadamente para cada tempo de avaliação (três e seis meses), sendo as variáveis analisadas individualmente de acordo com sua natureza, incluindo os percentuais de viabilidade, inviabilidade, deterioração e a distribuição dos estádios embrionários.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1.1 ANÁLISES FÍSICAS

O peso de mil sementes (PMS) do lote avaliado foi de 8,18 g (CV = 3%), com grau de umidade inicial de 7,6%, valor compatível com sementes ortodoxas, tolerantes à dessecação. Com base nesses parâmetros, estimou-se que o lote continha 122.257 sementes por quilograma.

No estudo de Souza *et al.* (2022), os autores observaram grau de umidade inicial de 8,7%, valor superior ao encontrado no presente estudo. Em contrapartida, os resultados diferem daqueles relatados por Meneguetti *et al.* (2004), que avaliaram sementes de erva-mate coletadas na região de Guarapuava (PR) e encontraram um peso de mil sementes (PMS) de 6,69 g, associado a um grau de umidade de 11,6%. Trata-se, portanto, de um lote mais úmido e constituído por sementes de menor massa quando comparado ao avaliado neste trabalho. Diferenças semelhantes foram relatadas por Galíndez *et al.* (2018), que, ao analisarem espécies do gênero *Ilex*, observaram para erva-mate grau de umidade de 10,6% ($\pm 0,7\%$) e PMS estimado de 6,40 g, valor próximo ao reportado por Meneguetti *et al.* (2004).

As variações observadas entre os estudos podem ser explicadas, em parte, pelas diferenças no grau de umidade dos lotes avaliados. Durante o processo de maturação, as sementes passam por uma fase de desidratação progressiva, considerada fundamental para a aquisição da tolerância à dessecação em espécies com sementes ortodoxas, como a erva-mate (Popinigis, 1985; Marcos-Filho, 2015). Assim, lotes avaliados com maior grau de umidade apresentam maior massa fresca e valores de PMS distintos daqueles observados em sementes mais secas, evidenciando a sensibilidade dessa variável às condições de coleta, beneficiamento e armazenamento.

Além disso, a composição estrutural do pirênio de *I. paraguariensis*, caracterizada por endosperma abundante e embrião imaturo, reforça a influência do conteúdo hídrico sobre a massa das sementes (Barroso *et al.*, 1999; Loizeau *et al.*, 2016). Soma-se a isso a elevada variabilidade intraespecífica da espécie, amplamente documentada para características fenológicas, fisiológicas e físicas, especialmente entre diferentes matrizes e regiões de coleta (Rocha *et al.*, 1990; Fowler *et al.*, 2007). Segundo Fortes *et al.* (2008), parâmetros físicos como PMS e grau de umidade podem

variar significativamente dentro de uma mesma espécie em função da procedência, do lote e do tempo de armazenamento.

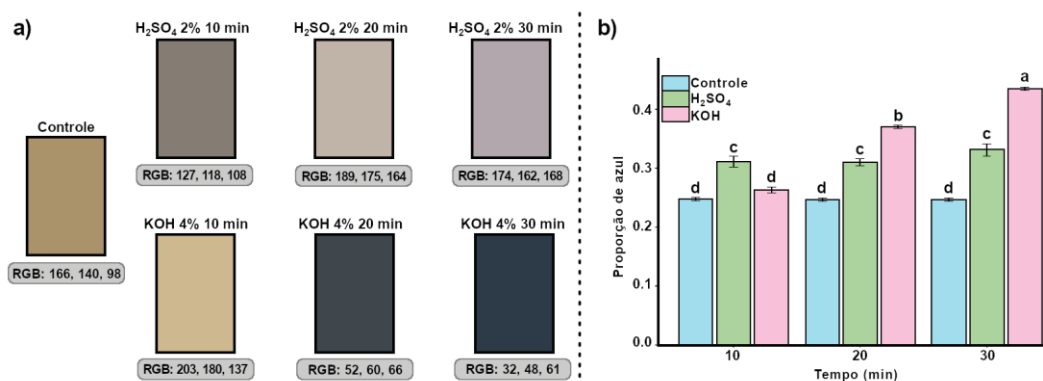
Dessa forma, os resultados indicam que o PMS e o grau de umidade devem ser interpretados de maneira integrada, uma vez que refletem tanto o estado fisiológico das sementes quanto as condições ambientais e operacionais envolvidas na produção do lote de sementes. Embora o PMS seja um importante indicador físico, sua interpretação isolada é limitada, reforçando a necessidade de análises complementares para a adequada caracterização da qualidade do lote.

4.2 ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA

4.2.1 TESTE AZUL DE TOLUIDINA

Os tratamentos de escarificação química resultaram em alterações visíveis na coloração do endosperma das sementes quando comparados ao controle, variando conforme o agente químico e o tempo de exposição. Na Figura 9a, observa-se a variação da coloração do endosperma das sementes submetidas aos diferentes tratamentos, bem como a resposta associada ao aumento do tempo de escarificação.

Figura 9 – Efeito da escarificação química e do tempo de exposição sobre a coloração dos endospermas das sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



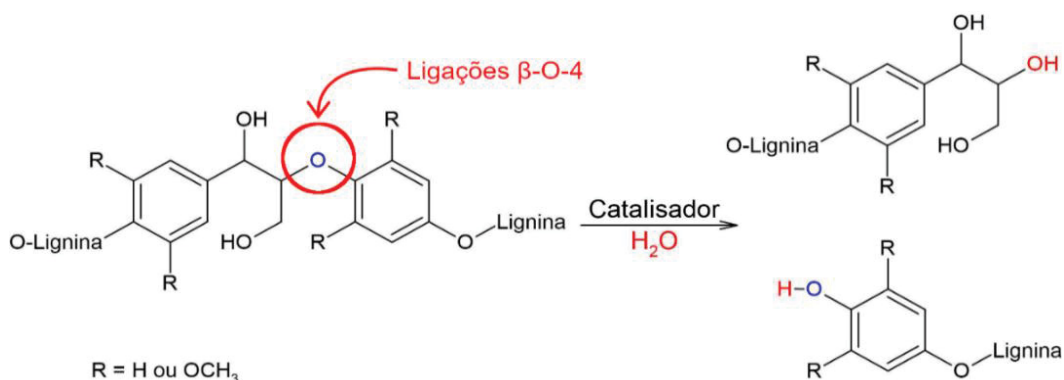
*Médias seguidas de letras iguais não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% nível de significância. Fonte: A autora (2025).

O endosperma das sementes do tratamento controle apresentaram coloração predominantemente marrom-clara, enquanto os tratamentos com H₂SO₄ a 2% resultaram em tonalidades progressivamente mais claras à medida que o tempo de exposição aumentou. Em contraste, as sementes tratadas com KOH a 4% apresentaram escurecimento acentuado, especialmente nos tempos de 20 e 30 min, indicando uma resposta diferenciada dos tecidos internos à ação do agente alcalino.

A análise quantitativa da proporção de azul no endosperma (canal RGB) confirmou essas alterações visuais (Figura 9b). Observou-se efeito significativo do tipo de tratamento e do tempo de exposição ($p < 0,05$). As sementes tratadas com H_2SO_4 apresentaram aumento gradual da proporção de azul ao longo do tempo, enquanto os tratamentos com KOH resultaram nos maiores valores desse parâmetro, especialmente após 30 minutos de exposição. O controle manteve valores significativamente menores e constantes entre os tempos avaliados, evidenciando a baixa permeabilidade natural do endocarpo.

Essas diferenças entre os agentes químicos podem ser explicadas pelos distintos mecanismos de interação do ácido e da base com os tecidos lignocelulósicos do endocarpo. O endocarpo de espécies florestais apresenta elevada proporção de lignina, cuja estrutura polimérica é majoritariamente constituída por ligações éter do tipo β -O-4, consideradas as mais abundantes e, ao mesmo tempo, mais suscetíveis à clivagem química (Figura 10) (Sturgeon *et al.*, 2014; Mensah *et al.*, 2022). Em meio catalítico, a ação do H_2SO_4 ou do KOH favorece a hidrólise dessas ligações, promovendo a despolimerização parcial da lignina e o aumento da porosidade da parede celular (Sturgeon *et al.*, 2014; Mensah *et al.*, 2022). Esse processo explica o clareamento progressivo do tecido observado visualmente e o aumento gradual da proporção de azul ao longo do tempo, indicando maior permeabilidade do endocarpo, o que permitiu a difusão de moléculas do azul de toluidina para o endosperma.

Figura 10 - Representação esquemática da clivagem das ligações β -O-4 da lignina em meio catalítico, ilustrando o processo de hidrólise e despolimerização parcial da estrutura de tecidos lignocelulósicos.



Fonte: A autora (2026)

A abordagem adotada neste estudo avança em relação a metodologias semelhantes descritas na literatura. Tezuka *et al.* (2013), ao investigarem a permeabilidade de pirênios de *Ilex latifolia* e *I. rotunda* com azul de metileno,

restringiram suas análises à observação qualitativa das estruturas externas, como endocarpo e tegumento. Além da quantificação objetiva da coloração, o presente estudo demonstrou a eficácia de tempos de imersão no corante significativamente menores (10 minutos, em comparação às 48 horas utilizadas por esses autores), tornando o método mais eficiente e operacionalmente viável.

Resultados convergentes foram relatados por Yang *et al.* (2022), que testaram a escarificação de sementes de *Hovenia dulcis* (*Rhamnaceae*) com H_2SO_4 (98%) por uma hora, seguida de diferentes tempos de embebição em Safranina 0,1% (0, 1, 6, 12 e 24 horas), com o objetivo de rastrear a absorção de água. Os autores observaram que sementes não escarificadas não absorveram o corante, enquanto sementes escarificadas iniciaram a absorção pela região da micrópila após uma hora, atingindo aproximadamente metade do tegumento após 12 horas e sua totalidade após 24 horas.

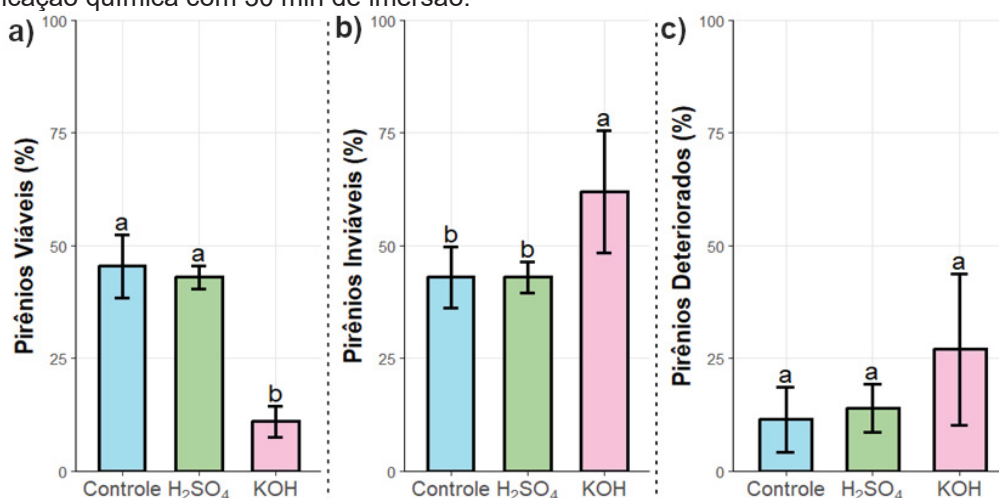
De forma semelhante, Souza *et al.* (2022) avaliaram a absorção de água em pirênios de erva-mate escarificados mecanicamente até a exposição do endosperma, os quais foram imersos em solução de azul de metileno a 1% por 48 horas. Nas sementes íntegros, observou-se aumento de massa, porém sem coloração dos tecidos internos, enquanto nas sementes escarificados houve absorção do corante pelo endosperma, confirmando a ruptura das barreiras físicas à difusão de água. Esses resultados corroboram os padrões observados no presente estudo e reforçam a confiabilidade do uso de corantes como ferramenta indicadora da permeabilização do endocarpo.

Diante dos padrões de absorção observados, tanto na literatura quanto no presente estudo, verificou-se que a combinação entre a avaliação visual da coloração e a quantificação da proporção de azul foi suficiente para indicar a permeabilização efetiva do endocarpo. Nesse contexto, o tempo de 30 minutos mostrou-se adequado para permitir a penetração do corante nos tecidos internos das sementes, independentemente do agente químico utilizado. Assim, esse período foi adotado para a etapa subsequente dos testes de viabilidade com cloreto de tetrazólio, visando selecionar o tratamento de escarificação química mais apropriado, considerando simultaneamente a eficiência na permeabilização do endocarpo e a preservação da viabilidade embrionária.

4.2.2 VIABILIDADE DAS SEMENTES APÓS ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA

Os resultados de viabilidade das sementes estão apresentados no Gráfico 1, no qual se observa que o tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4 2% v/v) manteve a qualidade fisiológica das sementes, com viabilidade média de 43,0%, não diferindo significativamente do controle (45,5%) pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Em contraste, a aplicação de hidróxido de potássio (KOH) reduziu significativamente a viabilidade para 11,0%.

Gráfico 1 – Viabilidade e deterioração das sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. após escarificação química com 30 min de imersão.



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ou Dunn a 5% de probabilidade de erro. Fonte: A autora (2024).

A manutenção da viabilidade no controle e com aplicação de H_2SO_4 indica que a escarificação química ácida, quando aplicada em concentração adequada, foi capaz de aumentar a permeabilidade do endocarpo lignificado, conforme evidenciado no teste com azul de toluidina (tópico 4.2.1), sem causar danos aos tecidos embrionários. A literatura apresenta resultados convergentes aos observados neste estudo, reforçando a eficiência da escarificação química ácida na superação da dormência física. Yang *et al.* (2022), ao avaliarem sementes de *Hovenia dulcis* submetidas a diferentes tempos de imersão em H_2SO_4 (98%), observaram aumento expressivo da embebição nas sementes escarificadas, enquanto no controle a absorção de água permaneceu inferior a 10%, evidenciando a eficiência do método na ruptura das barreiras físicas. De forma semelhante, Kher & Nataraj (2015) verificaram que a escarificação com ácido sulfúrico a 10% por 24 horas proporcionou os maiores percentuais de germinação em sementes de *Hyphaene dichotoma*. Em

conjunto, esses estudos reforçam que a escarificação ácida, quando adequadamente ajustada à espécie e ao tempo de exposição, constitui uma estratégia eficaz para a superação da dormência física em sementes com tegumento ou endocarpo resistentes.

Por outro lado, a expressiva redução da viabilidade observada no tratamento com KOH em 30 min, sugere que a escarificação básica pode induzir danos irreversíveis aos tecidos internos do pirênio, comprometendo o potencial fisiológico das sementes. Em meios fortemente alcalinos, a degradação química tende a ser menos seletiva, afetando não apenas o tegumento, mas também tecidos embrionários sensíveis, o que tem sido apontado como uma limitação do uso da escarificação básica em sementes com embriões pouco desenvolvidos ou endocarpo espesso. Estudos como o de Aguiar *et al.* (2021), ao avaliarem a escarificação alcalina com hidróxido de sódio (soda cáustica 20,0% m/m) por 15 minutos em sementes de *Dimorphandra mollis*, demonstraram que esse tratamento não foi eficaz nem superior ao controle, além de resultar em respostas germinativas inferiores às obtidas por escarificação mecânica ou por imersão em ácido sulfúrico (99,9% por 20 minutos).

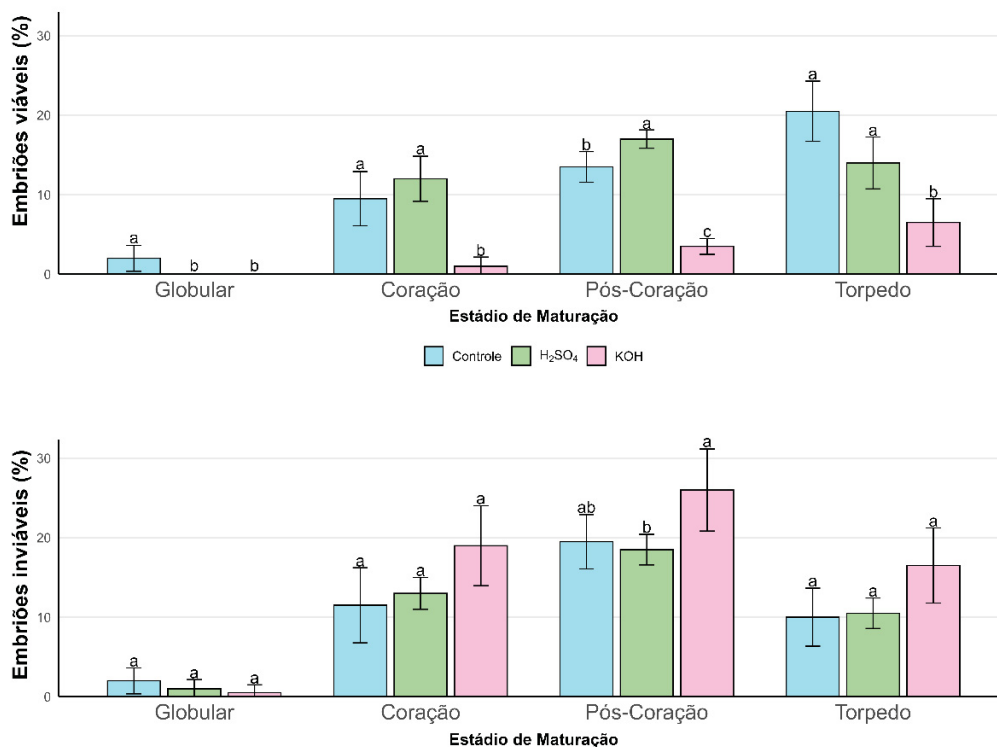
Situações análogas foram relatadas em outros estudos, nos quais soluções alcalinas, incluindo hidróxidos de sódio e de potássio (NaOH e KOH), apresentaram efeitos deletérios ou promoveram a deterioração das sementes quando utilizadas por tempos de imersão prolongados, reduzindo os percentuais de germinação e/ou aumentando a inviabilidade (Sun *et al.*, 2006; Fernandes-de-Campos *et al.*, 2015). Esses achados reforçam que o tipo de agente químico utilizado é determinante para o sucesso da escarificação, especialmente em sementes com endocarpo espesso e embriões sensíveis, como ocorre na erva-mate.

A análise da inviabilidade das sementes revelou que a aplicação de KOH resultou em 62,0% de pirênios inviáveis, valor superior aos demais tratamentos avaliados, que atingiram até 43,0% de inviabilidade. O percentual de sementes deterioradas também foi mais elevado nos tratamentos com escarificação básica, embora não tenha diferido estatisticamente dos demais. Resultados semelhantes foram relatados por Galíndez *et al.* (2018), Mireski *et al.* (2019) e Winhelmann *et al.* (2022a), que observaram percentuais de inviabilidade superiores a 40,0%, frequentemente acompanhados por pelo menos 10,0% de pirênios deteriorados. No entanto, esses valores não são universais para a espécie, uma vez que outros estudos reportam maior viabilidade, como Duarte *et al.* (2024). Dessa forma, os elevados

índices de inviabilidade observados neste trabalho podem estar relacionados às características específicas do lote analisado, refletindo a variabilidade inerente à propagação sexuada de *Ilex paraguariensis*, possivelmente influenciada por fatores como condições de polinização, maturação e qualidade fisiológica das sementes.

Em espécies com embrião imaturo, a capacidade germinativa está diretamente relacionada ao grau de desenvolvimento embrionário no momento da dispersão. Desse modo, buscou-se avaliar a influência da escarificação química sobre a viabilidade embrionária em função dos diferentes estádios de maturação, conforme apresentado no Gráfico 2. Foram identificados os estádios globular, coração, pós-coração e torpedão, sendo registrada apenas uma ocorrência no estágio maduro, a qual já se encontrava deteriorada.

Gráfico 2 – Viabilidade embrionária por estágio de maturação das sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. após escarificação química com 30 min de imersão



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ou Dunn a 5% de probabilidade de erro. Fonte: A autora (2024).

A baixa frequência de embriões no estágio globular, associada à predominância dos estádios coração, pós-coração e torpedão, indica que o lote analisado apresentava grau intermediário de maturação embrionária. Esse padrão foi corroborado pelos baixos percentuais de embriões viáveis observados no estágio globular, independentemente do tratamento aplicado. No estudo de Souza *et al.*

(2022), o lote de sementes de erva-mate apresentou menor grau de maturação, uma vez que 55,5% dos embriões avaliados se encontravam nos estádios globular e coração. Essa distribuição evidencia a heterogeneidade embrionária característica da erva-mate, amplamente descrita na literatura como um dos principais fatores responsáveis pela germinação lenta, irregular e desuniforme da espécie (Niklas, 1987; Medeiros *et al.*, 1999; Fowler & Sturion, 2000).

À medida que o desenvolvimento embrionário avançou para os estádios de coração e pós-coração, observou-se incremento progressivo da viabilidade embrionária nos tratamentos controle e com escarificação ácida. Nesses estádios intermediários, os percentuais médios de embriões viáveis variaram entre 10 e 12% para coração e entre 13% e 17% para pós-coração. Em contraste, a escarificação básica resultou em percentuais significativamente menores de embriões viáveis nesses mesmos estádios, acompanhados por aumento expressivo da inviabilidade, sugerindo maior sensibilidade dos tecidos embrionários em processo de diferenciação aos efeitos da escarificação alcalina.

Quando comparados aos resultados do presente estudo, os percentuais de viabilidade embrionária relatados por Duarte *et al.* (2024) foram superiores, ultrapassando 20% nos estádios de coração e pós-coração. Tal variação pode ser atribuída à procedência das sementes, à variabilidade genética dos lotes e às condições ambientais durante a formação das sementes, fatores amplamente reconhecidos como determinantes do desenvolvimento embrionário e do potencial fisiológico das sementes (Medeiros *et al.*, 1999; Souza *et al.*, 2022).

O estágio torpedo apresentou elevada representatividade no lote avaliado, correspondendo a aproximadamente 25% a 33% dos embriões analisados, considerando-se a soma de embriões viáveis e inviáveis em todas as repetições. Esse estágio concentrou, ainda, os maiores percentuais de embriões viáveis nos tratamentos controle e com escarificação ácida, indicando maior potencial fisiológico associado a estádios mais avançados de desenvolvimento embrionário. Por outro lado, mesmo nesse estágio mais avançado, a escarificação com hidróxido de potássio manteve elevados percentuais de inviabilidade, evidenciando efeito deletério persistente e pouco seletivo sobre os tecidos embrionários. Duarte *et al.* (2024) e Souza *et al.* (2022) não registraram embriões no estágio torpedo em seus estudos, reforçando a imaturidade dos lotes avaliados.

A variabilidade na maturação embrionária, assim como nos percentuais de viabilidade e de sementes deterioradas (tecidos necrosados, vazias e/ou predadas), além de constituir uma característica intrínseca da erva-mate, pode estar relacionada à fonte das sementes. Souza *et al.* (2020) demonstraram que lotes provenientes de diferentes regiões apresentam variações na proporção de sementes deterioradas, afetando significativamente o percentual de viabilidade. De forma semelhante, Winhelmann *et al.* (2022) avaliaram matrizes de regiões distintas do Rio Grande do Sul e observaram variações na quantidade de sementes deterioradas e, consequentemente, nos percentuais de viabilidade, evidenciando que a origem do material propagativo pode resultar em lotes com maior ou menor potencial fisiológico.

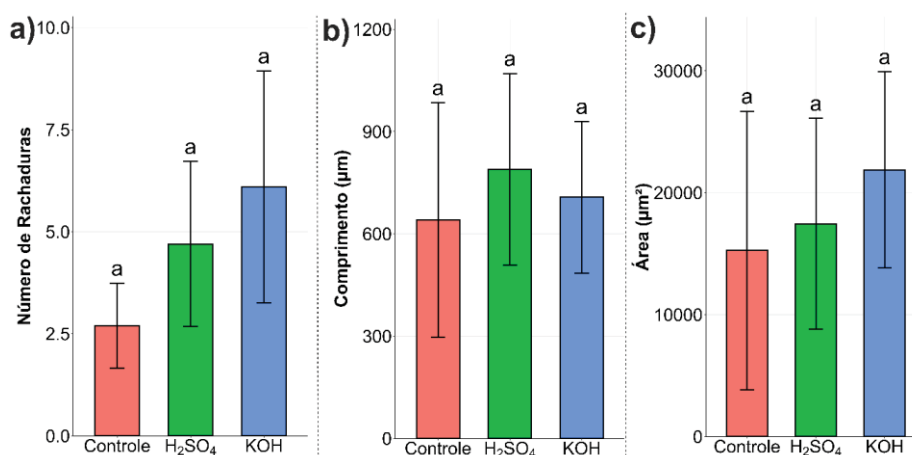
Esses resultados demonstram que, embora a escarificação química seja eficiente na superação da dormência física, ela não atua sobre limitações associadas à dormência morfológica nem corrige a heterogeneidade dos estádios embrionários. Assim, reforça-se a importância da seleção criteriosa da fonte de sementes e da adoção de estratégias pré-germinativas complementares, como a estratificação, para promover o avanço da maturação embrionária e aumentar o sucesso da propagação sexuada da erva-mate.

4.2.3 ANÁLISE MORFOANATÔMICA DAS SEMENTES

Considerando que os tratamentos de escarificação atuam principalmente por meio de alterações nas estruturas externas das sementes (tegumento ou endocarpo), foram avaliados parâmetros anatômicos do endocarpo associados à formação de fissuras, tais como número, comprimento e área média das rachaduras.

Os tratamentos de escarificação química não diferiram estatisticamente quanto ao número de rachaduras, comprimento e área média das fissuras do endocarpo (Gráfico 3). Embora os valores médios indiquem resultados numericamente superiores dessas variáveis nos tratamentos com H_2SO_4 e KOH em relação ao controle, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. A ausência de diferenças estatísticas pode estar associada à elevada variabilidade das variáveis analisadas, possivelmente relacionada ao reduzido número de pirênios avaliados por tratamento.

Gráfico 3 - Variação no número, comprimento e área das rachaduras do endocarpo de pirênios de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. sob diferentes escarificações químicas (30 min).



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Fonte: A autora (2025).

Nesse contexto, deve-se considerar que, em sementes com dormência física, a organização e a composição do endocarpo e do tegumento podem variar significativamente entre unidades amostrais, influenciando tanto a intensidade quanto a profundidade dos efeitos promovidos pelos tratamentos de escarificação. Estudos clássicos e revisões recentes indicam que modificações estruturais relevantes nesses tecidos, capazes de alterar a resistência mecânica e a permeabilidade do envoltório da semente, nem sempre são detectadas por análises quantitativas convencionais, sobretudo em condições de elevada variabilidade intra-amstral (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Lamont *et al.*, 2023).

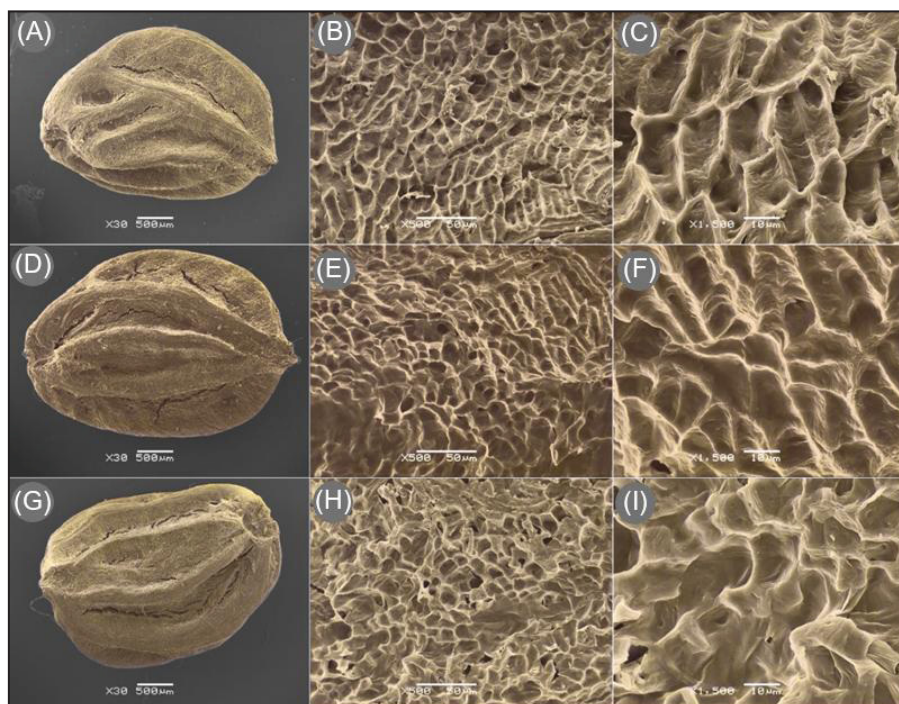
Apesar da ausência de diferenças estatísticas nas métricas quantitativas, a análise das micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a partir das quais essas medidas foram extraídas, evidencia maior ocorrência e maior extensão de fissuras no endocarpo ligado as sementes submetidas aos tratamentos químicos, especialmente no tratamento com KOH, em comparação ao controle. Essas fissuras podem atuar como regiões anatômicas preferenciais de permeabilidade, favorecendo a entrada de água no interior do pirênio. Trata-se de um mecanismo análogo ao descrito para as rachaduras na cutícula de sementes de soja ou à ativação de regiões especializadas do tegumento, como a lente (estrofíolo), em muitas leguminosas, isto é, eventos anatômicos críticos que desencadeiam a embebição e a superação da dormência física (Smýkal *et al.*, 2014).

Esse mecanismo foi recentemente corroborado em soja selvagem (*Glycine soja*), na qual o tratamento com ácido sulfúrico concentrado promoveu a remoção da cutícula e o surgimento de microfissuras no tegumento, sendo essas alterações

estruturais diretamente responsáveis pelo aumento da permeabilidade à água e pela elevação da germinação (Gong *et al.*, 2025). A identificação precisa dessas regiões de entrada de água, entretanto, requer observações cuidadosas ao longo do tempo, uma vez que a embebição inicial pode ser lenta e ocorrer por aberturas microscópicas antes que fissuras maiores se tornem funcionalmente ativas (Hu *et al.*, 2009).

Em conjunto, esses resultados qualitativos sugerem que os tratamentos de escarificação promovem alterações estruturais localizadas no endocarpo, potencialmente suficientes para aumentar sua permeabilidade, conforme ilustrado na Figura 11. Contudo, tais modificações podem ocorrer de forma heterogênea entre as sementes.

Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) na aplicação de diferentes escarificações químicas em pirênios de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



*Imagens coloridas artificialmente pela autora. Legenda: (A, B, C) Controle; (D, E, F) Escarificação ácida (H_2SO_4 2%); (G, H, I) Escarificação básica (KOH 4%). Fonte: A autora (2024)

No tratamento controle (Figura 11A), observaram-se pequenas fissuras no endocarpo dos pirênios, bem como a organização estrutural das fibras presentes nesse tecido. Em contraste, na escarificação com ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 2%), verificou-se aumento no número de fissuras, acompanhado de evidente corrosão da superfície do endocarpo (Figura 11D).

Essas alterações estruturais indicam que o tratamento ácido promoveu maior abrasão do endocarpo, o que pode favorecer a entrada de água e gases, além de

possibilitar a remoção ou redução de reguladores associados à dormência, contribuindo, assim, para o desenvolvimento embrionário. A eficácia do ácido sulfúrico pode estar relacionada à sua capacidade de hidrolisar componentes lipofílicos da barreira, como cutina e suberina, que consistem em poliésteres de ácidos graxos. Esse mecanismo é corroborado por estudos bioquímicos em feijão-preto, onde sementes duras apresentaram teores significativamente mais elevados de ácidos graxos saturados (ex.: ácido octadecanoico, 27,48%) e álcoois (ex.: hexadecanol, 1,29%), componentes essenciais para a síntese de cutina, suberina e ceras hidrofóbicas que reforçam a impermeabilidade do tegumento (Pozhilarasi *et al.*, 2025). Em leguminosas, a integridade da cutícula e de camadas suberizadas é fundamental para a manutenção da impermeabilidade do envoltório seminal (Smýkal *et al.*, 2014). Esse efeito é particularmente evidente em sementes de soja selvagem, nas quais o tratamento com ácido sulfúrico concentrado removeu seletivamente uma cutícula de aproximadamente 7,5 µm de espessura, expondo a micrópila e criando uma superfície permeável à água (Gong *et al.*, 2025).

A corrosão observada sugere a ocorrência de uma ação química semelhante no endocarpo da erva-mate, promovendo a degradação de componentes estruturais análogos. Nesse contexto, Ko *et al.* (2004), ao avaliarem diferentes métodos para a superação da dormência física em sementes de *Calystegia soldanella* (Convolvulaceae), constataram que a escarificação com ácido sulfúrico concentrado (98%) foi o tratamento mais eficaz. A imersão das sementes por três horas resultou em 100% de germinação e, nas análises em microscopia eletrônica de varredura, foram observadas rachaduras ao longo do tegumento, permitindo maior entrada de água e intensificação das trocas gasosas (Ko *et al.*, 2004).

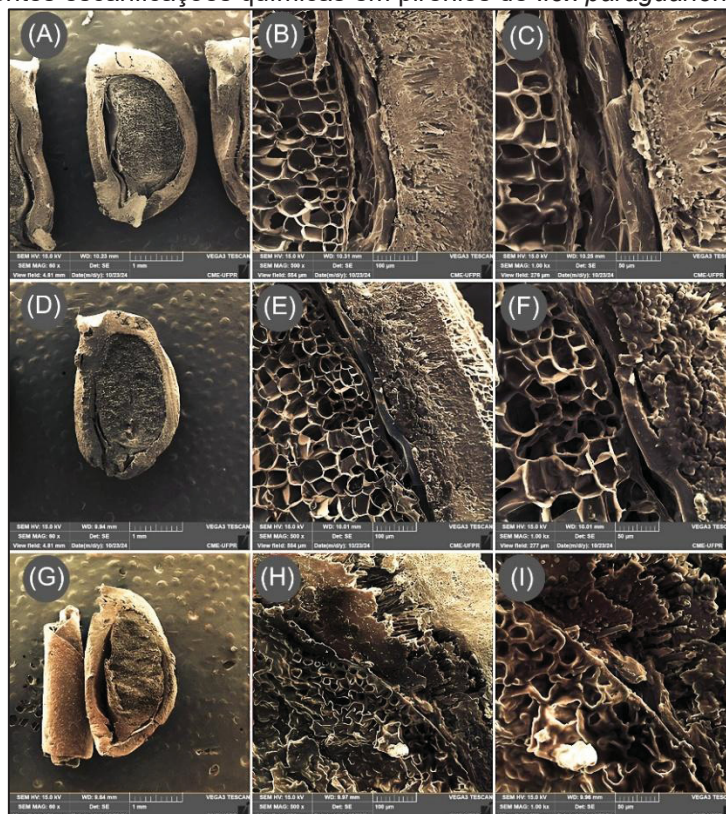
Por sua vez, na escarificação básica com KOH (4%), observaram-se fissuras maiores no endocarpo (Figura 11G), sugerindo maior intensidade de dano estrutural. Esse efeito pode representar risco de comprometimento da integridade dos tecidos internos e, conseqüentemente, da viabilidade das sementes. A ação mais agressiva do KOH, mesmo em baixa concentração, pode ser explicada por sua atuação sobre uma gama mais ampla de componentes da parede celular. Enquanto os ácidos atuam preferencialmente sobre componentes alifáticos, como cutina e suberina, as bases são eficazes na degradação de compostos fenólicos e na saponificação de ligações éster.

No estudo de Pozhilarasi *et al.*, (2025), as análises metabólicas dos tegumentos de feijão-preto, as sementes duras exibiram altos teores de compostos, os quais contribuem para a rigidez e impermeabilidade da matriz lignificada. Tratamentos alcalinos como o KOH podem, portanto, promover uma desestruturação ampla dessa matriz fenólica, explicando o dano estrutural observado. Considerando que a dureza seminal em muitas espécies está associada a uma matriz complexa composta por lignina, taninos e polissacarídeos (Smýkal *et al.*, 2014), o KOH pode estar promovendo uma desestruturação mais profunda e abrangente dessa matriz, resultando no colapso estrutural observado. Essa desestruturação intensa e pouco seletiva causada pelo KOH na erva-mate contrasta com a ação mais localizada descrita para algumas leguminosas, nas quais os tratamentos atuam preferencialmente em pontos estruturalmente mais frágeis e pré-determinados do tegumento, como o hilo ou a lente (Hu *et al.*, 2009).

Em maior detalhe, observa-se que a estrutura do endocarpo foi diferentemente afetada pelos tratamentos de escarificação química. As Figuras 11B e 11C evidenciam a integridade estrutural do tecido no tratamento controle, caracterizada por superfícies bem definidas e pela presença de poucas ou nenhuma cavidade profunda. Nas sementes submetidos à escarificação com ácido sulfúrico, as micrografias (Figuras 11E e 11F) indicam leve afinamento das camadas superficiais do endocarpo, com formação de cavidades discretas e pouco profundas. Em contraste, o tratamento com KOH, mesmo em baixa concentração, promoveu maior desestruturação do endocarpo, resultando em superfícies mais homogêneas e com menor rugosidade, além de aumento na frequência e profundidade das cavidades observadas (Figuras 11H e 11I). Essas alterações indicam maior intensidade de abrasão superficial do tecido em comparação aos demais tratamentos. Essa diferença na profundidade e padrão de ação entre os agentes químicos é consistente com estudos em outras espécies. No estudo de Molizane *et al.*, (2018) para *Erythrina speciosa*, a corrosão pelo ácido sulfúrico variou entre lotes de sementes com diferentes graus de dormência: em sementes de baixa dormência, a corrosão foi mais extensa e superficial, enquanto em sementes de alta dormência, foi mais localizada e profunda. Isso sugere que a arquitetura e a composição química do envoltório modulam a penetração do agente escarificante, definindo tanto a eficácia quanto o risco de danos excessivos.

A importância de se avaliar tanto a superfície quanto os cortes internos é corroborada por estudos que demonstram que a penetração de agentes escarificantes e os danos estruturais resultantes podem se restringir a camadas específicas ou atingir tecidos internos, dependendo da natureza e especificidade do tratamento (Hu *et al.*, 2009). Embora as imagens das sementes inteiras forneçam uma visão clara das alterações superficiais promovidas pelas diferentes escarificações, elas não permitem inferir a profundidade da ação química no interior do pirênio. Nesse sentido, foram realizados cortes longitudinais, também analisados por microscopia eletrônica de varredura (Figura 12), com o objetivo de verificar a extensão da ação química nos tecidos internos e sua possível relação com a integridade estrutural das sementes.

Figura 12 - Comparativo dos cortes longitudinais da microscopia eletrônica de varredura (MEV) na aplicação de diferentes escarificações químicas em pirênios de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



*Imagens coloridas artificialmente pela autora. Legenda: (A, B, C) Controle; (D, E, F) Escarificação ácida (H₂SO₄ 2%); (G, H, I) Escarificação básica (KOH 4%). Fonte: A autora (2024).

Os cortes longitudinais analisados por microscopia eletrônica de varredura possibilitaram a visualização da profundidade da ação dos tratamentos de escarificação química nos diferentes tecidos das sementes. No tratamento controle, observa-se a preservação da integridade estrutural, com manutenção do formato e da

organização dos tecidos, permitindo a identificação clara do endocarpo, do tegumento e do endosperma (Figuras 12B e 12C).

No tratamento com ácido sulfúrico (H_2SO_4 a 2%), foi observada a penetração do agente químico até camadas internas do tegumento, evidenciada pela desestruturação das fibras e da camada esclerenquimática desse tecido (Figuras 12E-F), enquanto o endosperma apresentou poucas alterações visuais. Resultados semelhantes foram descritos por Ko *et al.* (2004) em sementes de *Calystegia soldanella* (Convolvulaceae), nas quais o tegumento, composto por três camadas e zonas distintas, foi progressivamente afetado pela escarificação com H_2SO_4 concentrado (98%) por três horas. Esse padrão indica que a ação do ácido se concentrou predominantemente nas camadas externas e intermediárias do pirênio, promovendo abrasão suficiente para reduzir a resistência mecânica do envoltório, sem comprometer de forma expressiva os tecidos internos.

Em contraste, a escarificação com hidróxido de potássio (KOH a 4%), mesmo em baixa concentração, promoveu desestruturação mais intensa dos tecidos das sementes, resultando em superfícies com aspecto mais homogêneo, perda do contorno celular e alterações mais pronunciadas no endosperma (Figuras 12H-I). Esses achados indicam que a maior agressividade do tratamento alcalino ultrapassou o limite desejável de abrasão do endocarpo, atingindo tecidos internos essenciais à germinação, o que é consistente com a redução da viabilidade observada nesse tratamento.

A presença de tecidos desorganizados ou parcialmente colapsados nos cortes longitudinais das sementes escarificados sugere a existência de um limiar crítico de exposição aos agentes químicos, a partir do qual os efeitos deixam de ser benéficos. Em leguminosas, a domesticação selecionou precisamente esse equilíbrio: redução suficiente da barreira do tegumento para permitir a embebição rápida, aliada à manutenção da integridade mecânica necessária à proteção do embrião (Smýkal *et al.*, 2014). Os resultados obtidos com o KOH neste estudo ilustram o lado negativo desse equilíbrio, em que a superação da dormência é alcançada ao custo da viabilidade.

Esse conceito de limiar é fundamental e já foi observado em estudos com leguminosas, nos quais tempos crescentes de escarificação ácida levaram de uma permeabilidade inicialmente restrita ao hilo a danos generalizados na superfície da semente, com impactos diretos sobre a viabilidade (Hu *et al.*, 2009). De forma

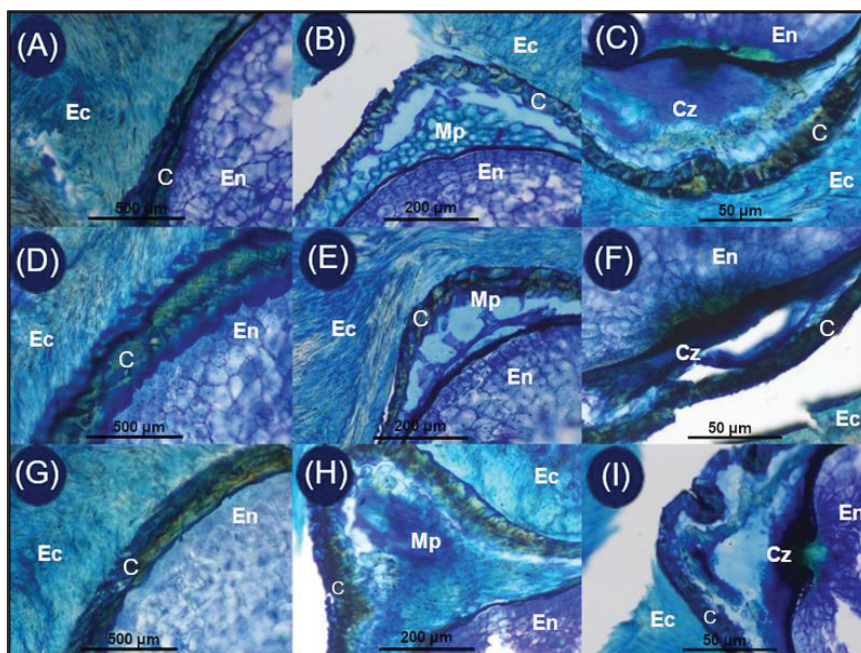
semelhante, em soja selvagem, o tratamento com ácido sulfúrico mostrou uma janela ótima de 20 min; períodos mais longos de exposição reduziram a germinação e causaram danos aos tecidos internos (Gong *et al.*, 2025). Tal condição contribui para explicar o aumento da proporção de pirênios inviáveis observado nos testes de viabilidade, especialmente nos tratamentos mais agressivos.

Nesse contexto, a análise estrutural detalhada por MEV, particularmente nos cortes longitudinais, evidencia que a escarificação química é eficaz na redução das barreiras físicas impostas pelo endocarpo. Contudo, sua aplicação deve ser cuidadosamente controlada, uma vez que a abrasão excessiva pode comprometer a integridade dos tecidos internos e afetar negativamente a viabilidade. Trabalhos como o de Molizane *et al.* (2018) em *Erythrina speciosa* reforçam que mesmo dentro de uma mesma espécie, a resposta ao ácido sulfúrico pode variar entre lotes, exigindo ajustes nos tempos de exposição. No caso da erva-mate, a seletividade do H₂SO₄ permitiu uma abrasão controlada das camadas externas, enquanto o KOH mostrou-se destrutivo e inespecífico, comprometendo tecidos internos essenciais. Além disso, a redução parcial dessas barreiras físicas pode, em etapas subsequentes do processo germinativo, favorecer a absorção de água e de reguladores de crescimento, desde que a integridade dos tecidos sensíveis seja preservada.

Os resultados anatômicos complementam e reforçam os achados obtidos por MEV, permitindo uma avaliação mais detalhada da organização e da integridade dos tecidos ao longo dos diferentes tratamentos. Nos cortes anatômicos, foram analisados o endocarpo, o tegumento e o endosperma, com ênfase nas conexões entre essas estruturas, bem como nos efeitos da escarificação em regiões sensíveis, como a micrópila e a chalaza. Essas regiões desempenham papel fundamental no desenvolvimento da semente e do embrião: a micrópila, por apresentar maior porosidade, atua como via preferencial para a entrada de água e gases, enquanto a chalaza está relacionada ao suprimento de nutrientes durante o desenvolvimento da semente ainda ligada à planta-mãe, conforme evidenciado nos cortes anatômicos (Figura 13).

Assim, a avaliação integrada das análises anatômicas e das micrografias de MEV permite identificar tratamentos capazes de reduzir a dormência física em *Ilex paraguariensis* sem causar danos estruturais às regiões críticas para a germinação.

Figura 13 -Comparativo das estruturas das sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. em cortes longitudinais com aplicação de diferentes escarificações químicas.



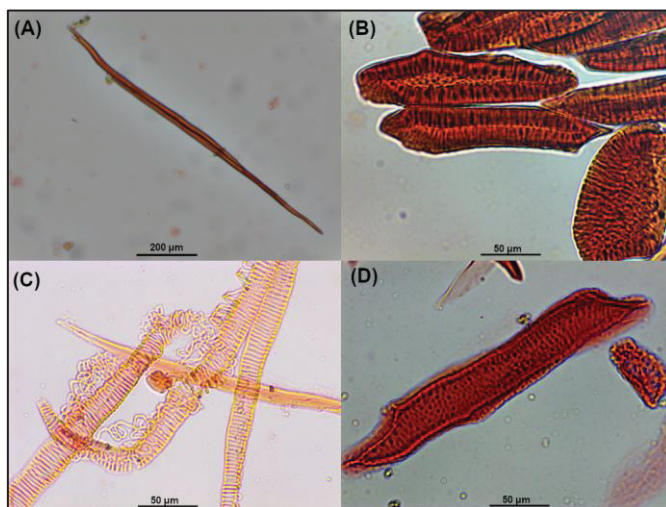
Legenda: (A) Controle; (B) Tecidos da Micrópila no controle; (C) Tecidos da chalaza no controle. (D) Escarificação ácida (H_2SO_4 2%); (E) Tecidos da Micrópila após H_2SO_4 2%; (F) Tecidos da chalaza após H_2SO_4 2%. (G) Escarificação básica (KOH 4%); (H) Tecidos da Micrópila após KOH 4%; (I) Tecidos da chalaza após KOH 4%. **Ec** - Endocarpo; **C** - Tegumento; **En** - Endosperma; **Mp** - Micrópila; **Cz** - Chalaza/Calaza. Fonte: A autora (2025)

Neste estudo, a análise anatômica evidenciou a presença de esclereides ao longo de todo o tegumento das sementes, apresentando coloração amarelada, associadas a duas camadas de cutícula, externa e interna, com coloração azul-escuro, conforme ilustrado nas Figuras 13A-I. As células parenquimáticas foram observadas apenas nas extremidades da semente, especificamente nas regiões da micrópila e da chalaza (Figuras 13B-E-H e C-F-I).

Esses resultados diferem do descrito por Reinke *et al.* (2024), que relataram a presença de uma camada de células parenquimáticas e lignificadas no tegumento das sementes. A predominância de esclereides ao longo do tegumento, associada à dupla camada de cutícula observada neste estudo, sugere uma estrutura tegumentar com maior grau de rigidez e proteção, o que pode influenciar a intensidade da dormência física e a resposta aos tratamentos de escarificação.

A partir dos cortes anatômicos, observou-se a presença de lignina no endocarpo dos pirênios, o qual é constituído exclusivamente por fibras (Figura 14A). A maceração de Franklin, adaptada por Kraus e Arduim (1997), evidenciou a presença de células macrosclereídes compondo o tegumento da semente de erva-mate (Figura 14B). Além disso, foram identificadas estruturas de metaxilema e protoxilema, correspondentes ao xilema primário, presentes no endocarpo (Figuras 14C e 14D).

Figura 14 – Estruturas anatômicas do endocarpo da *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. após imersão em solução de Franklin adaptada.



Legenda: (A) Fibras; (B) Macrosclereídes; (C) Protoxilema; (D) Metaxilema. Fonte: A autora (2025)

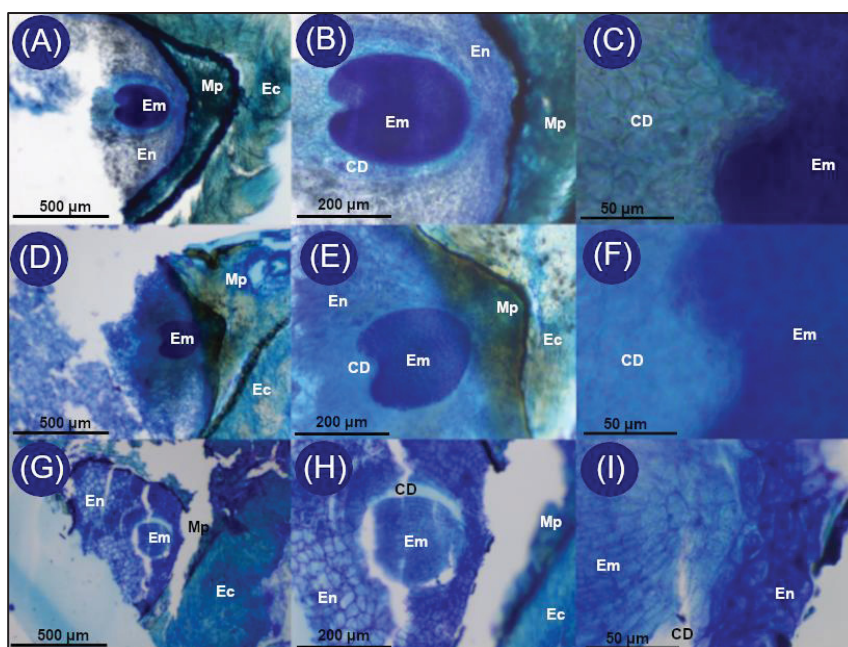
A predominância de tecidos lignificados e esclerenquimáticos no endocarpo e no tegumento confere elevada rigidez estrutural e baixa plasticidade a essas camadas, contribuindo para o aumento da dureza do pirênio e para a restrição da absorção de água e da difusão de gases. Essa configuração anatômica constitui uma estratégia clássica de dormência física. Contudo, a presença dessa estrutura rígida nem sempre se correlaciona diretamente com o grau de dormência mensurado fisiologicamente. Em *Erythrina speciosa*, sementes com graus de dormência diferentes não apresentaram variações significativas na espessura da cutícula ou na altura das células paliçádicas (Molizane *et al.*, 2018). Isso indica que a impermeabilidade pode ser regulada por alterações bioquímicas localizadas (como a deposição diferencial de compostos fenólicos ou suberina) que não alteram a morfologia geral do tegumento, mas afetam sua permeabilidade seletiva.

Observa-se a presença de macrosclereídes (Figura 14B) e de fibras, funcionalmente equivalentes à camada de Malpighi, ou parênquima paliçádico, descrita para os tegumentos de leguminosas (Smýkal *et al.*, 2014). A ocorrência de uma dupla cutícula reforça ainda mais essa barreira estrutural. Assim, o endocarpo de erva-mate desempenha, simultaneamente, o papel de tegumento (proteção biológica) e de pericarpo interno (proteção física do fruto), o que explica sua elevada dureza. Essa configuração anatômica reforça o papel do endocarpo como uma barreira física à germinação, evidenciando a necessidade da aplicação de tratamentos de

escarificação química para a redução parcial da resistência mecânica imposta por esse tecido.

O tegumento apresenta uma organização composta por uma camada de esclereides recoberta por cutículas externa e interna, o que reforça seu caráter protetor. Em contraste, o tecido de reserva (endosperma) de erva-mate é constituído predominantemente por células parenquimáticas. Na região adjacente ao embrião, observa-se a presença da denominada cavidade digestiva, na qual não foi possível identificar com precisão o tipo celular predominante (Figuras 15).

Figura 15 - Comparativo dos embriões em cortes longitudinais na aplicação de diferentes escarificações químicas em pirênios de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



Legenda: (A) Embrião - controle; (B) Tecidos da internos ao pirênio no controle; (C) Detalhes do embrião no controle; (D) Embrião – H₂SO₄ 2%; (E) Tecidos da internos ao pirênio após H₂SO₄ 2%; (F) Detalhes do embrião após H₂SO₄ 2%; (G) Embrião – KOH 4%; (H) Tecidos da internos ao pirênio após KOH 4%; (I) Detalhes do embrião após KOH 4%. **Ec** - Endocarpo; **CD** – Cavidade Digestiva; **En** - Endosperma; **Mp** - Micrópila; **Em** - Embrião. Fonte: A autora (2025)

O embrião é constituído por diversas células em processo de diferenciação, sendo possível observar, no tratamento controle, a presença da camada digestiva com coloração azul-claro, distinguindo-se do parênquima do endosperma adjacente. Essa camada apresenta organização celular definida ao redor do embrião (Figuras 15C, 15F e 15I).

Na escarificação com ácido sulfúrico, a camada digestiva mostrou-se menos definida, não sendo possível visualizar claramente o formato das células dessa região. Ainda assim, a organização geral dos tecidos embrionários foi preservada, sem

evidências de danos estruturais severos. Em contraste, no tratamento com hidróxido de potássio, a camada digestiva foi identificada apenas como uma região amorfa, sem a presença de células individualizadas, impossibilitando a identificação de formato, tamanho ou tipo celular ao redor do embrião. Nesse tratamento, observou-se acentuada desestruturação dos tecidos embrionários, indicando danos severos às células internas (Figura 15H).

As alterações anatômicas observadas nos tecidos embrionários fornecem suporte estrutural aos resultados obtidos nos testes de viabilidade. A preservação da organização celular do embrião e dos tecidos internos no tratamento com ácido sulfúrico é consistente com o percentual de viabilidade semelhante ao observado no controle, indicando que a ação do ácido se concentrou predominantemente nas camadas externas do pirênio, sem comprometer de forma significativa as estruturas essenciais ao desenvolvimento embrionário.

Por outro lado, a intensa desestruturação dos tecidos embrionários observada no tratamento com hidróxido de potássio explica a elevada proporção de pirênios inviáveis associada a esse tratamento. O sucesso de qualquer método de superação da dormência física depende fundamentalmente de sua especificidade. Em condições naturais, processos como as flutuações térmicas promovem a abertura seletiva de regiões especializadas do envoltório seminal, como o hilo ou a lente, sem causar danos ao embrião (Smýkal *et al.*, 2014).

Nesse sentido, os resultados indicam que o H_2SO_4 , apesar de ser um agente químico abrasivo, apresentou maior seletividade em relação às camadas externas do pirênio, aproximando-se desse padrão ideal de atuação. O KOH, por sua vez, é um agente inespecífico e altamente destrutivo, comprometendo a integridade do sistema de proteção materno (endocarpo e tegumento) e, conseqüentemente, dos tecidos filiais (endosperma e embrião). Portanto, a escarificação química deve ser vista como uma intervenção de precisão, cuja eficácia e segurança dependem da interação entre a natureza do agente e a constituição específica do envoltório seminal. Esses achados demonstram a importância de se considerar não apenas a intensidade, mas sobretudo a seletividade do tratamento empregado.

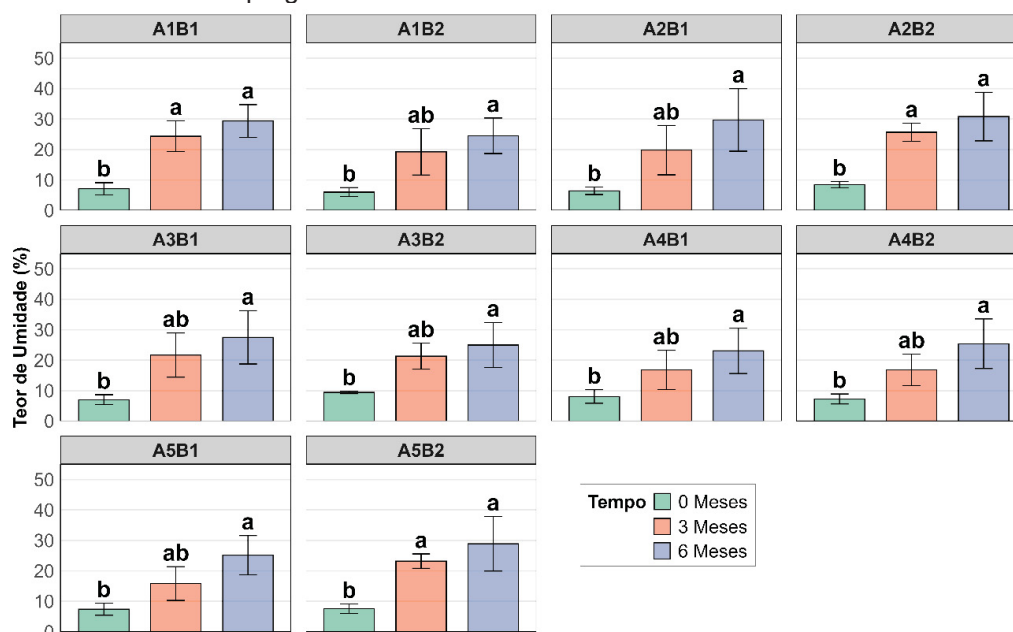
Os resultados obtidos com a erva-mate reforçam, portanto, a noção mais ampla de que a resposta à escarificação é altamente específica, dependendo da interação entre a natureza química do agente e a arquitetura do envoltório da semente, conforme já observado em sistemas-modelo de dormência física (Hu *et al.*, 2009;

Smýkal *et al.*, 2014). Desta forma, os resultados deste estudo em conjunto com trabalhos recentes como o de Gong *et al.* (2025) em soja selvagem, evidencia que não existe um protocolo universal para a quebra de dormência física. Enquanto em algumas espécies (como a soja) um agente químico forte pode atuar de forma seletiva sobre uma barreira bem definida (a cutícula), em outras (como a erva-mate, com seu endocarpo complexo e multicamadas) a mesma abordagem pode não ser suficiente ou pode causar danos colaterais severos. Isso ressalta a necessidade de estudos anatômico-fisiológicos detalhados para o desenho de tratamentos eficazes e seguros para cada espécie.

4.2.4 GRAU DE UMIDADE DAS SEMENTES DURANTE A ESTRATIFICAÇÃO

Com o objetivo de compreender a dinâmica do teor de umidade ao longo da estratificação, foi analisada a variação temporal desse parâmetro dentro de cada tratamento, não sendo realizadas comparações estatísticas entre tratamentos distintos. No presente estudo, as avaliações foram realizadas aos três meses (tempo intermediário) e aos seis meses (tempo final), permitindo acompanhar a dinâmica de absorção de água ao longo da estratificação, conforme apresentado no Gráfico 4.

Gráfico 4 – Evolução do grau de umidade (%) das sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. em relação ao tempo e o tratamento empregado.



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. **A1**: testemunha; **A2**: nanopartículas de zeína e lignina; **A3**: citocinina (Kn); **A4**: giberelina (GA₃); **A5**: ácido Indolbutírico (IBA) + citocinina (Kn) + giberelina (GA₃). **B1**: sem escarificação química; **B2**: escarificação química com H₂SO₄ a 2% por 30 minutos. Fonte: A autora (2025).

O grau de umidade apresentou variação significativa ao longo do tempo de estratificação dentro de cada tratamento, conforme indicado pelas letras distintas associadas às médias (Gráfico 4). De modo geral, em todos os tratamentos avaliados, os valores observados aos 3 e 6 meses foram superiores aos registrados no tempo inicial (0 meses), evidenciando incremento do teor de umidade durante a estratificação. A uniformidade dos valores iniciais entre tratamentos e a progressão consistente da umidade ao longo do tempo indicam manutenção das condições controladas de estratificação, evidenciando adequado rigor experimental na condução do experimento. Esse comportamento corrobora os resultados de Duarte *et al.* (2023), que também observaram aumento significativo da umidade em sementes de erva-mate submetidas a diferentes protocolos de estratificação, com teores passando de 10,1% (sementes frescas) para até 40,6% após estratificação convencional. Esse comportamento é característico de sementes com natureza higroscópica, nas quais o teor de água tende a se ajustar às condições ambientais ao longo do tempo, buscando o equilíbrio higroscópico com o meio de armazenamento (Marcos-Filho, 2015).

No tempo inicial (0 meses), os tratamentos apresentaram valores semelhantes de teor de umidade, em torno de 7,6%, não sendo realizada comparação estatística entre tratamentos nessa condição. Aos três meses de armazenamento, observou-se aumento significativo do teor de umidade em relação ao tempo inicial na maioria dos tratamentos, embora, em alguns casos, esse aumento tenha sido intermediário, não diferindo estatisticamente nem de zero nem de seis meses. A ocorrência de respostas intermediárias sugere que, em determinados casos, o equilíbrio higroscópico pode ter sido atingido mais precocemente, enquanto em outros a absorção de água ocorreu de forma gradual, possivelmente em função da heterogeneidade estrutural das sementes e da permeabilidade dos tecidos de proteção (Marcos-Filho, 2015). Duarte *et al.* (2023) também relataram variações na absorção de água em função do substrato e da temperatura, reforçando a influência das condições de armazenamento na dinâmica hídrica das sementes.

Aos seis meses, os maiores valores de teor de umidade foram registrados na maioria dos tratamentos, diferindo significativamente do tempo inicial e, em vários casos, também do período de três meses. Esse comportamento indica tendência de elevação progressiva da umidade ao longo do armazenamento, ainda que a magnitude dessa variação tenha diferido entre os tratamentos. Do ponto de vista estrutural, a semente de erva-mate possui endocarpo lenhoso, porém não totalmente

impermeável, o que sugere que a entrada de água ocorre de forma gradual e passiva durante a estratificação em areia úmida. Assim, com a exposição contínua à umidade, a barreira física é progressivamente vencida, resultando em teores de água semelhantes entre sementes escarificadas e não escarificadas ao final do período avaliado.

Do ponto de vista fisiológico, o aumento do teor de umidade durante o armazenamento pode favorecer a intensificação da atividade metabólica e respiratória, acelerando processos de deterioração e afetando a longevidade das sementes, especialmente quando associado a períodos prolongados de armazenamento (Copeland & McDonald, 2001; Ellis & Roberts, 1980). Nesse contexto, o estudo de Duarte *et al.* (2023) destacou que o aumento da umidade durante a estratificação esteve associado a avanços no desenvolvimento embrionário (como os estágios de coração e torpedo), sugerindo que a absorção de água é um fator crítico para a superação da dormência e a maturação do embrião da erva-mate.

Cabe ressaltar que o teste com azul de toluidina demonstrou maior rapidez de penetração do corante nas sementes submetidas à escarificação ácida, evidenciando que esse tratamento aumenta a permeabilidade a moléculas de maior tamanho. Dessa forma, embora a água (uma molécula pequena) consiga penetrar gradualmente mesmo em sementes não escarificadas, a escarificação pode facilitar a entrada inicial de compostos maiores, como reguladores de crescimento nanoencapsulados, especialmente nas fases iniciais da estratificação.

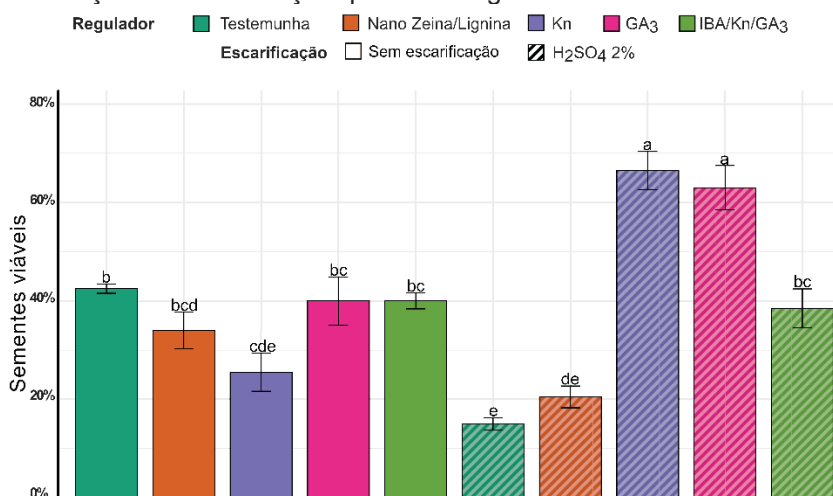
Assim, os resultados reforçam a importância do controle e monitoramento do teor de umidade durante o armazenamento, evidenciando que o fator tempo exerce influência significativa sobre esse parâmetro dentro de cada tratamento, enquanto a escarificação atua mais como moduladora da permeabilidade inicial do que como determinante do teor final de água nas sementes.

4.3 COMBINAÇÃO ENTRE ESCARIFICAÇÃO QUÍMICA E ESTRATIFICAÇÃO COM REGULADORES DE CRESCIMENTO

Aos três meses, observou-se interação significativa entre a escarificação química e a aplicação de reguladores de crescimento ($p < 0,05$). Os tratamentos escarificados combinados com ácido giberélico (GA₃) e cinetina (Kn) apresentaram os maiores percentuais de viabilidade aos três meses, ao passo que os mesmos reguladores aplicados sem escarificação tiveram desempenho inferior (Gráfico 5).

Esse padrão é consistente com o entendimento generalizado de que a dormência em pirênios com componente físico/morfológico depende tanto da remoção parcial das barreiras do tegumento quanto da presença de sinais fisiológicos promotores (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Nonogaki, 2014). Em pirênios de erva-mate, estudos demonstram que o endocarpo lignificado atua como barreira física à embebição e à difusão de gases, sendo progressivamente modificado ao longo da estratificação (Souza *et al.*, 2022; Reinke *et al.*, 2024).

Gráfico 5 – Viabilidade embrionária de pirênios de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. após três meses de estratificação em função da escarificação química e reguladores de crescimento.



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Legenda: Kn: Citocinina; GA₃: Giberelina; IBA: Ácido Indolbutírico; H₂SO₄: Ácido sulfúrico. Fonte: A autora (2025).

A escarificação aumentou a permeabilidade funcional do endocarpo, favorecendo a entrada de água, oxigênio e dos reguladores aplicados, potencializando a resposta embrionária. Essa interpretação é sustentada pelas alterações estruturais do endocarpo evidenciadas nas análises anatômicas, pela coloração do endosperma nas sementes tratadas com ácido e pela resposta fisiológica observada. Tais modificações são consistentes com a literatura, que associa o aumento da permeabilidade do tegumento ou endocarpo à maior difusão de água, gases e sinais hormonais, um pré-requisito para a superação de dormências de natureza física ou morfofisiológica (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Lamont & Pausas, 2023).

Na erva-mate, a estrutura lignificada do endocarpo constitui uma barreira física à absorção de água, conforme demonstrado pela impermeabilidade ao azul de metileno em pirênios intactos (Souza *et al.*, 2022). Durante a estratificação prolongada, observa-se o aumento do teor de umidade das sementes (Duarte *et al.*,

2023) e a ocorrência de hifas fúngicas associadas ao endocarpo (Reinke *et al.*, 2024), sugerindo uma modificação gradual dessa estrutura, capaz de favorecer a hidratação e o desenvolvimento embrionário. No entanto, esses estudos não avaliaram diretamente se a estratificação reduz a necessidade de escarificação química para fins de testes de germinação ou viabilidade.

Aos três meses, a aplicação isolada de reguladores de crescimento não foi suficiente para promover aumentos expressivos na viabilidade das sementes quando o endocarpo permaneceu íntegro, indicando que a atuação desses compostos depende do acesso físico ao embrião, condicionado pela permeabilidade do endocarpo (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Resultados semelhantes têm sido relatados para espécies com dormência morfofisiológica, nas quais a resposta a reguladores exógenos é limitada quando a barreira física não é previamente atenuada (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Galíndez *et al.*, 2018).

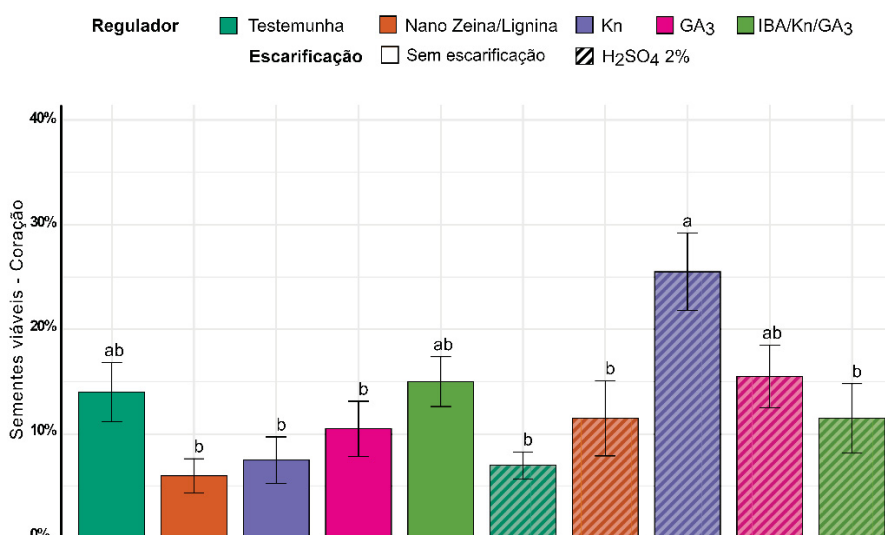
O aumento de viabilidade observado em dois tratamentos específicos pode estar associado à interpretação do teste de tetrazólio, especialmente em sementes com estruturas complexas e diferentes graus de desenvolvimento embrionário. A subjetividade do teste de tetrazólio está associada à interpretação visual dos padrões de coloração, os quais variam conforme metodologia, concentração da solução e condições do tecido, podendo inclusive resultar em superestimação da viabilidade (Kaiser *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2019; Costa *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2025).

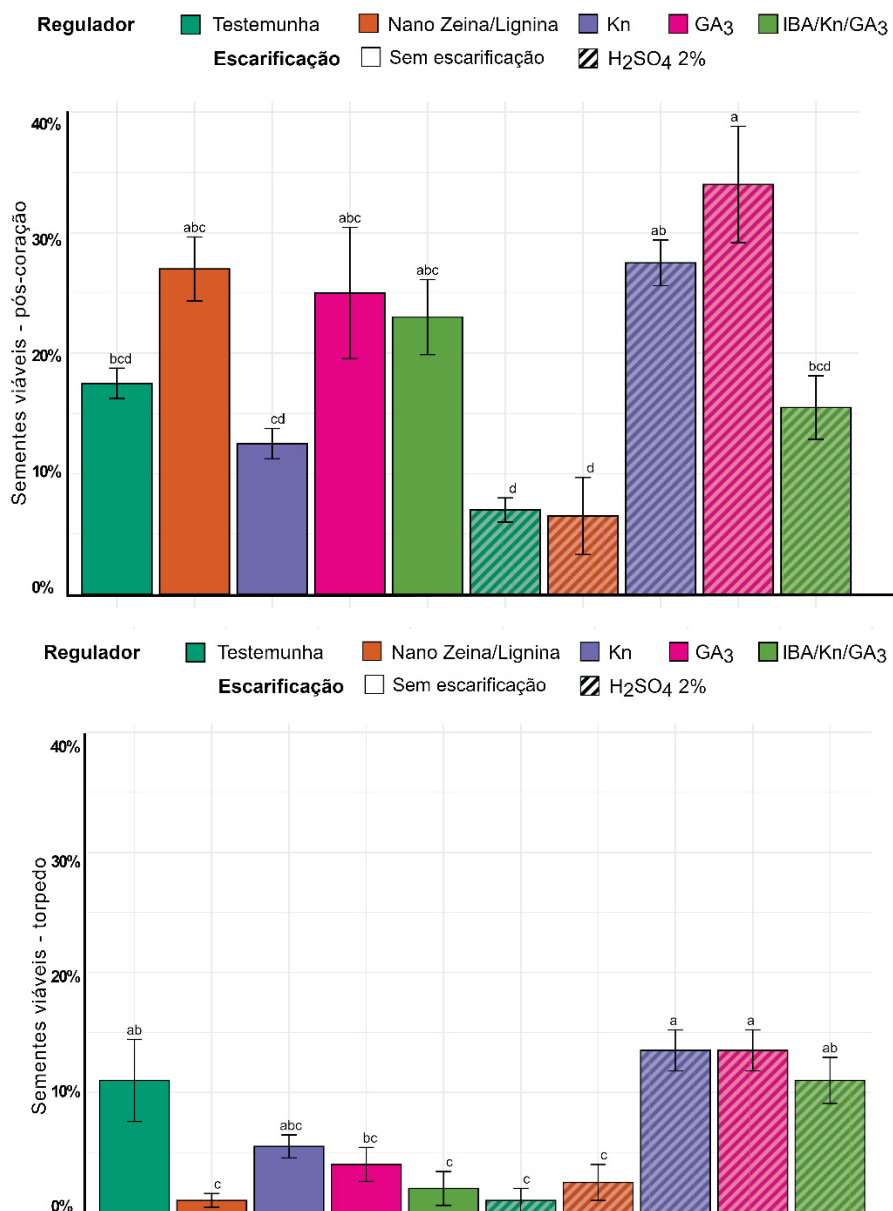
A utilização de reguladores de crescimento como a giberelina é importante pois é promotora da germinação, desempenhando funções essenciais no desenvolvimento embrionário e estimulando a síntese de α -amilase, enzima responsável pela mobilização de reservas (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Taiz & Zeiger, 2009; Nonogaki, 2014). Além disso, a citocinina auxilia na divisão, alongamento e diferenciação celular, reduzindo o efeito de inibidores de crescimento (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Taiz & Zeiger, 2009). Esses efeitos hormonais estão associados à retomada do metabolismo embrionário e à mobilização de reservas, especialmente em sementes com embriões imaturos ou com dormência morfofisiológica (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006). Estudos indicam que a aplicação combinada de reguladores de crescimento contendo giberelinas e citocininas pode promover a germinação e reduzir a dormência em sementes forrageiras, possivelmente por ativar sistemas antioxidantes e modular o balanço hormonal (Agostini *et al.*, 2022). Dessa forma, os resultados deste trabalho

evidenciam a ação integrada desses reguladores nas sementes de erva-mate, potencializada pelo aumento da permeabilidade promovido pela escarificação ácida.

Entre os estádios embrionários, os tratamentos que empregaram escarificação química associada a reguladores de crescimento nanoencapsulados apresentaram os melhores resultados, aumentando o percentual de embriões em estádios mais desenvolvidos, como pós-coração e torpedo (Gráfico 6). A nanoencapsulação pode ser interpretada, neste contexto, como uma estratégia capaz de prolongar a disponibilidade dos reguladores, aumentar sua estabilidade e otimizar sua eficiência fisiológica, principalmente quando a permeabilidade do endocarpo é parcialmente aumentada. Nesse sentido, a escarificação torna-se mais relevante, pois pode modular a resposta da semente a estímulos externos, conforme descrito em modelos de liberação sequencial de dormência (Lamont & Pausas, 2023). Quando associada à aplicação exógena de reguladores de crescimento envolvidos nos processos germinativos, essa técnica contribuiu para o avanço do desenvolvimento embrionário, indicando potencial para acelerar esse processo, em consonância com modelos fisiológicos que descrevem a dormência como um estado regulado pela interação entre fatores estruturais e hormonais (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Finch-Savage & Footitt, 2017). Esse efeito é particularmente relevante em sementes de erva-mate, nas quais a progressão embrionária depende da manutenção prolongada de sinais hormonais durante a estratificação (Duarte *et al.*, 2023; Reinke *et al.*, 2024). Nos estádios globular e maduro não foram encontrados indivíduos suficientes para a realização da análise.

Gráfico 6 – Interação após três meses de estratificação nos estádios de desenvolvimento embrionário de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.





*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Legenda: Kn: Citocinina; GA₃: Giberelina; IBA: Ácido Indolbutírico; H₂SO₄: Ácido sulfúrico. Fonte: A autora (2025)

Na fase coração, observou-se variação significativa no percentual de pirênios viáveis entre os tratamentos, com maiores valores médios nos tratamentos que combinaram escarificação química com a aplicação de reguladores, especialmente citocinina (Kn) e giberelina (GA₃). Esse estágio representa uma fase crítica de transição no desenvolvimento embrionário, na qual o aumento da atividade metabólica torna o embrião mais responsivo a estímulos hormonais externos (Nonogaki, 2014; Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

No estágio pós-coração, o efeito da escarificação química tornou-se mais evidente, principalmente quando associada aos reguladores citocinina e giberelina, que apresentaram os maiores percentuais de pirênios viáveis. Esse resultado sugere que, mesmo com o avanço do desenvolvimento embrionário, a permeabilidade do endocarpo ainda atua como fator limitante nos estádios intermediários, condicionando a resposta fisiológica do embrião a estímulos externos. Isso reforça a ideia de que alterações na estrutura de barreiras protetoras devem ocorrer antes ou simultaneamente à ativação metabólica do embrião (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Lamont & Pausas, 2023).

Na fase torpedo, os maiores percentuais de pirênios viáveis foram observados nos tratamentos escarificados associados aos reguladores citocinina (Kn) e giberelina (GA₃), os quais diferiram estatisticamente de parte dos demais tratamentos. Em contraste, os tratamentos sem escarificação apresentaram os menores valores de viabilidade, evidenciando a importância da escarificação química para a manutenção da viabilidade nas fases mais avançadas do desenvolvimento embrionário, uma vez que a remoção ou alteração de barreiras físicas é frequentemente um pré-requisito para a progressão do desenvolvimento e germinação em sementes com dormência física ou morfofisiológica (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

De modo geral, observou-se um padrão consistente ao longo dos estádios de desenvolvimento embrionário. A combinação entre escarificação química e aplicação de reguladores de crescimento, especialmente citocinina (Kn) e giberelina (GA₃), resultou em maiores percentuais de pirênios viáveis. Esse efeito foi mais evidente em comparação aos tratamentos não escarificados.

Aos seis meses, a viabilidade das sementes foi influenciada significativamente pelo fator regulador vegetal ($p = 0,014$), enquanto a escarificação química não apresentou efeito significativo quando avaliada isoladamente ($p = 0,073$). Também não foi observada interação significativa entre os fatores ($p = 0,118$) (Tabela 1). Estes resultados sugerem que, com o avanço da estratificação, a barreira física do endocarpo deixa de ser o fator limitante predominante, ocorrendo uma reorganização fisiológica interna em que o balanço hormonal assume o papel central. Esta transição indica que as restrições iniciais à difusão foram mitigadas pelo tempo de exposição à umidade, tornando a maturação do embrião mais dependente da regulação bioquímica do que de intervenções físicas externas (Finch-Savage & Footitt, 2017; Lamont & Pausas, 2023).

Tabela 1 – Análise de variância (ANOVA) da viabilidade das sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. aos seis meses em função dos fatores regulador de crescimento e escarificação química.

Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	p-valor
Regulador de crescimento	4	587,4	146,85	3,71 *	0,014
Escarificação química	1	136,9	136,9	3,45 ^{ns}	0,073
Regulador × Escarificação	4	318,6	79,65	2,01 ^{ns}	0,118
Resíduo	30	1189,0	39,63		

*Valores de $p \leq 0,05$ indicam efeito significativo, ns – não significativo. Fonte: A autora (2025).

Considerando a ausência de interação significativa, as médias do fator regulador de crescimento foram analisadas de forma isolada, independentemente da escarificação química (Tabela 2). Observa-se que o tratamento controle apresentou o maior percentual médio de viabilidade (53,25%), diferindo estatisticamente do tratamento com nanopartículas de zeína/lignina, que apresentou o menor valor (41,50%). Os demais reguladores apresentaram desempenho intermediário, não diferindo estatisticamente do controle nem do tratamento menos eficiente. Essa distribuição das médias indica que, aos seis meses, o efeito hormonal atua de forma moduladora, mas sem promover contrastes amplos entre todos os tratamentos, o que é coerente com a ausência de interação significativa entre reguladores e escarificação.

Tabela 2 – Viabilidade média (%) de pirênios de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. aos seis meses em função do regulador de crescimento.

Regulador de Crescimento	Média viabilidade (%)	Erro padrão (%)
Controle	53,25 a	2,38
Nanopartículas Zeína/Lignina	41,50 b	2,92
Citocinina (Kn)	48,00 ab	2,60
Giberelina (GA₃)	45,25 ab	2,88
Ácido Indolbutírico (IBA) + Kn + GA₃	47,25 ab	3,78

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Fonte: A autora (2025).

Embora a análise de variância da viabilidade geral aos seis meses não tenha indicado efeito significativo isolado da escarificação química, nem interação significativa entre escarificação e reguladores de crescimento, esse resultado não implica que a escarificação seja biologicamente desnecessária, uma vez que sua atuação é mais relevante nas fases iniciais da superação da dormência. Com o avanço do período de estratificação, ocorre uma reorganização fisiológica interna, com

alterações graduais no endocarpo e reequilíbrio hormonal, reduzindo gradualmente a dependência de intervenções externas, como a escarificação química, e permitindo que os efeitos dos reguladores de crescimento aplicados atuem de forma aditiva. Esse padrão é compatível com modelos nos quais a superação de dormência envolve estágios sequenciais e interativos (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Finch-Savage & Footitt, 2017; Lamont & Pausas, 2023). Esse padrão temporal tem sido descrito para sementes com dormência morfofisiológica, nas quais a estratificação prolongada assume papel central na liberação progressiva das restrições físicas e fisiológicas à germinação (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Galíndez *et al.*, 2018). Para a erva-mate, a dormência combinada foi confirmada (Souza *et al.*, 2022), o que fundamenta a necessidade de estratificação para sua superação.

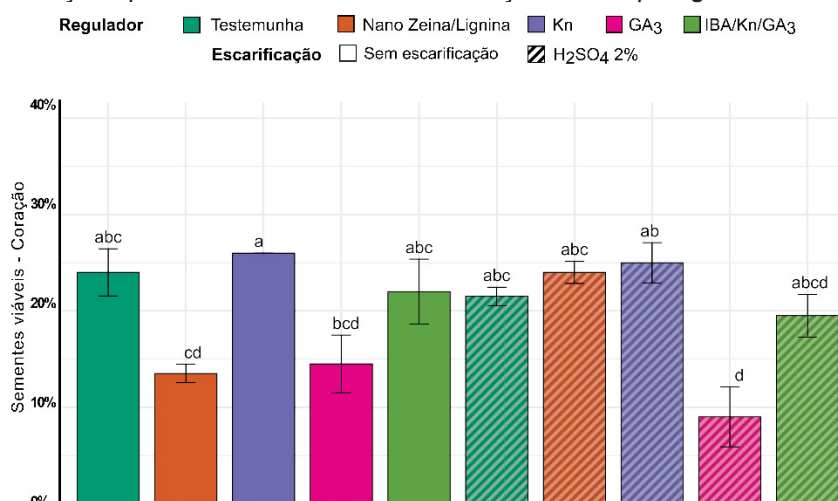
Na avaliação dos estádios de desenvolvimento embrionário, verificou-se ausência de indivíduos nos estádios globular e maduro, indicando que, no período avaliado, os embriões desenvolveram-se, mas não atingiram a maturidade, atingindo estádios coração, pós-corção e torpedo. No estágio pós-corção, embora presente entre os tratamentos, as proporções observadas foram intermediárias e com menor contraste entre combinações específicas, quando comparadas ao estágio torpedo. Dessa forma, os resultados evidenciam que a viabilidade das sementes está associada principalmente à aplicação de reguladores de crescimento, com resposta positiva mais evidente quando combinados à escarificação química, especialmente nos estádios intermediários e avançados do desenvolvimento embrionário, com destaque para o estágio torpedo, no qual a combinação de GA₃ associada à escarificação química apresentou os maiores percentuais de embriões viáveis, em consonância com a ideia de que a estratificação reduz progressivamente a dependência estrutural e promove maior autonomia fisiológica do embrião (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006).

A ausência de indivíduos maduro após seis meses de estratificação não indica ineficiência dos tratamentos, mas reflete a dinâmica própria do desenvolvimento embrionário em erva-mate. Nessa condição, o embrião pode permanecer por períodos prolongados em estádios intermediários, mesmo sob condições controladas de estratificação. Essa lentidão na maturação embrionária também foi observada em estudos recentes, nos quais a completa maturação dependeu de períodos mais longos ou de combinações específicas de fatores ambientais e nutricionais (Duarte *et al.*, 2023; Reinke *et al.*, 2024). Esse comportamento é consistente com o padrão descrito

para espécies lenhosas com dormência morfofisiológica profunda, nas quais o desenvolvimento embrionário e a germinação podem ocorrer de forma dissociada no tempo (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Galíndez *et al.*, 2018).

Quando os dados obtidos aos seis meses são analisados de forma desagregada por estágio embrionário, observa-se que o padrão de interação entre os fatores regulador de crescimento e escarificação química não é homogêneo ao longo do desenvolvimento, evidenciando resposta diferencial em função do estágio embrionário. No estágio coração, foi detectada interação significativa entre os fatores, evidenciando que a resposta das sementes dependeu da combinação entre o tipo de regulador de crescimento e a atenuação prévia das barreiras físicas do tegumento ou endosperma (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Nonogaki, 2014) (Gráfico 7). Neste estágio, o tratamento com citocina (sem escarificação) apresentou os melhores resultados, embora não tenha diferido estatisticamente de tratamentos não escarificados (testemunha e IBA/Kn/GA₃) e tratamentos escarificados (testemunha ácido, Nano Zeína/Lignina, Kn e IBA/Kn/GA₃), configurando um conjunto de tratamentos com desempenho fisiológico semelhante. Esse resultado indica que, nesse estágio inicial, a modulação hormonal pode exercer influência mesmo na ausência de escarificação, embora sem formação de grupos amplamente contrastantes.

Gráfico 7 – Interação após seis meses no estágio coração de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Legenda: Kn: Citocinina; GA₃: Giberelina; IBA: Ácido Indolbutírico; H₂SO₄: Ácido sulfúrico. Fonte: A autora (2025)

Para o estágio pós-coração, observa-se alteração nesse padrão de resposta, com redução da dependência da combinação entre os fatores e maior uniformidade

entre os tratamentos. Deste modo, não foi observada interação significativa entre os fatores regulador de crescimento (fator A) e escarificação química (fator B), nem efeito significativo da escarificação avaliada isoladamente ($p = 0,207$). Contudo, verificou-se efeito significativo do fator regulador vegetal ($p = 0,038$), indicando influência desse fator sobre a proporção de embriões nesse estágio (Tabela 3). Apesar disso, o teste de comparação de médias não identificou diferenças estatísticas entre os tratamentos, uma vez que todos foram agrupados na mesma classe pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. As médias variaram entre 19% e 30%, evidenciando amplitude relativamente reduzida entre os tratamentos.

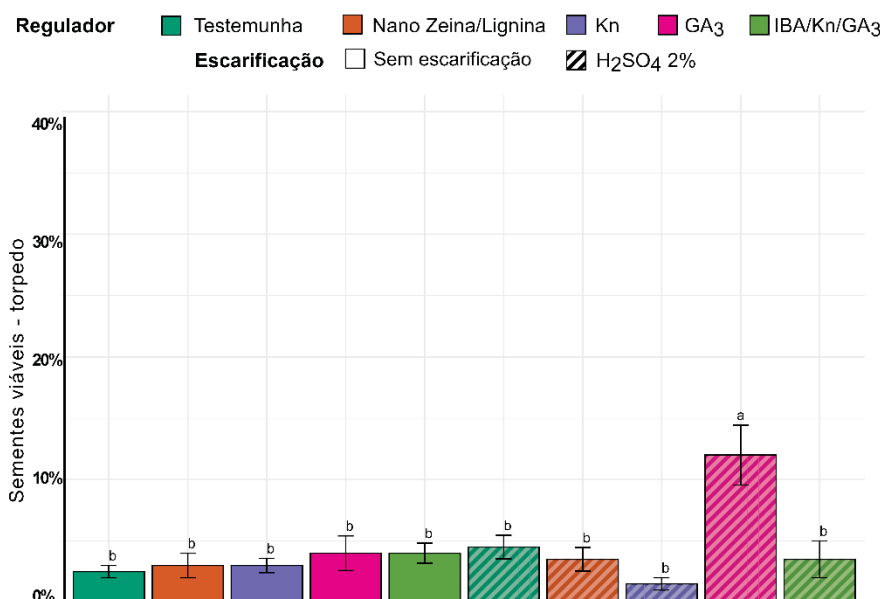
Tabela 3 – Viabilidade média (%) de sementes de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. no estágio pós-coração aos seis meses em função do regulador de crescimento.

Regulador de Crescimento	Média viabilidade pós-coração (%)	Erro padrão (%)
Controle	27,00 a	2,33
Nanopartículas Zeína/Lignina	19,50 a	2,77
Citocinina (Kn)	20,25 a	2,27
Giberelina (GA ₃)	25,50 a	2,60
Ácido Indolbutírico (IBA) + Kn + GA ₃	22,75 a	3,28

*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Legenda: Kn: Citocinina; GA₃: Giberelina; IBA: Ácido Indolbutírico. Fonte: A autora (2025)

Esse comportamento sugere que, no estágio pós-coração, o desenvolvimento embrionário apresenta resposta mais uniforme entre os tratamentos, sem contrastes marcantes, refletindo uma fase de progressão estrutural relativamente estável. Diferentemente do observado no estágio torpeda (Gráfico 8), no qual a combinação de GA₃ associada à escarificação química promoveu avanço mais pronunciado, o estágio pós-coração parece representar uma etapa de transição com menor sensibilidade diferencial aos tratamentos aplicados (Finch-Savage & Footitt, 2006; Lamont & Pausas, 2023).

Gráfico 8 – Interação após seis meses nos estádios de torpeda de *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.



*Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro. Legenda: Kn: Citocinina; GA₃: Giberelina; IBA: Ácido Indolbutírico; H₂SO₄: Ácido sulfúrico. Fonte: A autora (2025)

Já no estágio torpedo, observou-se efeito marcante do tratamento escarificado com GA₃, que se destacou de forma significativa em relação aos demais, sugerindo maior eficiência dessa combinação para o avanço do desenvolvimento embrionário em fases mais avançadas. Nesse estágio, a giberelina associada à escarificação promove maior frequência de embriões em estádios mais diferenciados, indicando que a maior permeabilidade estrutural favorece a progressão do desenvolvimento embrionário. Cabe destacar que, embora classificados como torpedo conforme os critérios metodológicos adotados, alguns embriões apresentavam morfologia compatível com uma fase de transição para o estágio maduro, evidenciando alongamento superior aos torpedos, porém inferior ao maduro. Contudo, em virtude do sistema de classificação empregado, tais indivíduos foram enquadrados no estágio imediatamente anterior. Esses resultados indicam que, aos seis meses de estratificação, o desenvolvimento embrionário em erva-mate avança predominantemente para estádios intermediários, com a completa maturação dependendo de condições específicas de estratificação (Duarte *et al.*, 2023; Reinke *et al.*, 2024), refletindo uma transição fisiológica progressiva na qual fatores ambientais e nutricionais sincronizam-se para superar as limitações à germinação (Finch-Savage & Footitt, 2006).

De forma integrada, a progressão dos estádios embrionários evidencia que a resposta aos tratamentos varia ao longo do desenvolvimento. Nos estádios iniciais, a

influência depende da combinação entre fatores; no estágio intermediário, observa-se maior uniformidade; já na fase mais avançada, destaca-se o tratamento escarificado com GA₃, que apresenta maior frequência de embriões no estágio torpedo, evidenciando efeito específico dos tratamentos sobre a progressão embrionária.

Assim, estudos como o de Cuquel *et al.* (1994) já indicavam que a aplicação de ácido giberélico associada à estratificação poderia aumentar a germinação de sementes de erva-mate, embora com eficiência variável. Os resultados do presente estudo ampliam essa compreensão, ao demonstrar que o efeito do regulador é condicionado pelo estado estrutural e fisiológico do pirênio, especialmente nos estágios iniciais, e que essa dependência diminui progressivamente com a estratificação. Esse padrão está em consonância com modelos que descrevem a superação de dormência como um processo sequencial, no qual a permeabilidade e o estado fisiológico interno modulam a resposta a estímulos externos (Finch-Savage & Leubner-Metzger, 2006; Lamont & Pausas, 2023).

De forma integrada, os resultados indicam que a interação entre a escarificação química e a aplicação de reguladores de crescimento em pirênios de erva-mate é fortemente modulada pelo tempo de estratificação. Aos três meses, quando as barreiras estruturais do endocarpo ainda impõem restrições à difusão de água, gases e sinais hormonais, a resposta aos reguladores exógenos depende, em grande medida, do aumento prévio da permeabilidade promovido pela escarificação, resultando em efeitos interativos entre os fatores. À medida que a estratificação avança para seis meses, ocorre uma reorganização fisiológica progressiva, associada à atenuação dessas barreiras e ao reequilíbrio hormonal interno, o que reduz a dependência da semente em relação a estímulos externos e favorece a atuação predominantemente aditiva dos tratamentos. Esse padrão temporal é compatível com modelos fisiológicos que descrevem a superação da dormência como um processo sequencial, no qual fatores estruturais e hormonais atuam de forma integrada e dinâmica ao longo do desenvolvimento embrionário.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A viabilidade e o desenvolvimento embrionário de sementes de erva-mate são modulados pela interação entre fatores estruturais e fisiológicos ao longo da estratificação. A escarificação química ácida (H_2SO_4 2% v/v) aumenta a permeabilidade inicial do endocarpo sem comprometer a integridade embrionária, enquanto a aplicação de reguladores de crescimento nanoencapsulados atua diretamente na modulação do desenvolvimento fisiológico. Aos três meses, a combinação entre escarificação e reguladores, especialmente giberelina e citocinina, promoveram os maiores avanços na progressão para estádios mais desenvolvidos, como pós-coração e torpedo. Aos seis meses, o fator tempo reduz a dependência da escarificação, e o balanço hormonal assume papel predominante na manutenção da viabilidade e na progressão embrionária. Assim, a superação da dormência em erva-mate ocorre de forma sequencial, envolvendo a atenuação inicial das barreiras físicas e a posterior reorganização fisiológica interna do embrião.

A escarificação com ácido sulfúrico, por 30 minutos, preserva a viabilidade embrionária e mantém desempenho semelhante ao controle, enquanto o hidróxido de potássio provoca danos estruturais severos e reduz significativamente a viabilidade das sementes. O tratamento ácido promove aumento da permeabilidade do endocarpo, evidenciado pelo teste com azul de toluidina, sem comprometer os tecidos internos, ao passo que a escarificação básica apresenta ação pouco seletiva e elevada proporção de embriões inviáveis. Dessa forma, o ácido sulfúrico mostra-se adequado para a atenuação da dormência física em pirênios de erva-mate.

As análises morfoanatômicas evidenciam que o endocarpo da erva-mate é constituído predominantemente por fibras, enquanto o tegumento é composto por dupla camada de cutícula, presença de macrosclereídes e nas regiões mais sensíveis (micrópila e chalaza) por células parenquimáticas, conferindo alta rigidez estrutural ao pirênio. A escarificação ácida promove abrasão controlada das camadas externas e formação de fissuras localizadas, enquanto o tratamento alcalino causa desestruturação intensa e atinge tecidos internos. As observações anatômicas confirmam que a seletividade do agente químico é determinante para reduzir a resistência mecânica do endocarpo sem comprometer a integridade do embrião.

Aos três meses de estratificação, a influência da escarificação química associada aos reguladores de crescimento foi significativa, evidenciando interação

entre os fatores. A combinação de escarificação com giberelina e citocinina resulta nos maiores percentuais de viabilidade e nos estádios embrionários, com aumento da frequência nos estádios pós-coração e torpedo.

Aos seis meses, a escarificação química não exerce efeito isolado significativo sobre a viabilidade geral, enquanto o fator regulador de crescimento mantém influência. Isso indica, que o avanço da estratificação atenua progressivamente as limitações estruturais impostas pelo endocarpo e amplia o papel da regulação hormonal no controle do desenvolvimento embrionário. Contudo, quando o estágio torpedo é analisado de forma específica, observa-se que a combinação entre escarificação e giberelina promove a maior frequência de embriões nesse estágio, diferindo significativamente dos demais tratamentos. Esse resultado demonstra que, embora a escarificação perca relevância como fator isolado ao longo do tempo, sua associação à giberelina ainda potencializa o avanço embrionário em fases mais diferenciadas, evidenciando um efeito biológico funcional e direcionado.

Dessa forma, conclui-se que a integração entre escarificação química e aplicação de reguladores de crescimento constitui estratégia promissora para otimizar a produção de mudas de erva-mate. Os resultados contribuem para o entendimento dos mecanismos estruturais e fisiológicos envolvidos na dormência e fornecem subsídios técnicos para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes e seguros de propagação sexuada. Destaca-se que a ausência de reaplicação dos reguladores ao longo da estratificação pode limitar a manutenção de seus efeitos aos seis meses, considerando a possibilidade de lixiviação, degradação ou metabolização em ambiente úmido. A reaplicação periódica durante a estratificação constitui hipótese a ser avaliada em estudos futuros, com potencial para intensificar o desenvolvimento embrionário em estádios mais avançados.

5 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F. I. dos S.; SILVA, R. C. da; COSTA, R. M.; REIS, C. dos S.; FARIAS, M. F. de; PARRA-SERRANO, L. J. Eficiência de diferentes métodos para superação da dormência em sementes de *Dimorphandra mollis*. Pesquisa Florestal Brasileira, [S. l.], v. 41, 2020. DOI: <https://doi.org/10.4336/2021.pfb.41e201901953>.
- ARAUJO, M. M.; NAVROSKI, M. C.; SCHORN, L. A. (Org.). Produção de sementes e mudas: um enfoque à silvicultura. Santa Maria, RS, Editora UFSM, 2018, 448 p.
- BARROSO, G. M. Dicotiledôneas: morfologia de frutos e sementes aplicada a sistemática vegetal. Editora UFV, 1999.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. Journal of the Royal Statistical Society Series B: Statistical Methodology, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. Seeds: physiology of development and germination. 2 Ed. New York: Plenum Press, 1994.
- BRASIL. Regras para Análise de Sementes. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009.
- BRASIL. Regras para Análise de Sementes. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2025. Disponível em: https://wikisda.agricultura.gov.br/pt-br/Laborat%C3%B3rios/Metodologia/Sementes/RAS_2025/cap_14_florestais_rev_1.
- BRUXEL *et al.* A cultura da erva-mate e os ácaros: situação atual e perspectivas. Editora Evangraf, 2018.
- CAMPOS, E. V. R. *et al.* Encapsulated plant growth regulators and associative microorganisms: Nature-based solutions to mitigate the effects of climate change on plants. Plant Science, v. 331, p. 111688, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2023.111688>.

CARDOZO, A. G. L.; ROSA, R. L. da; NOVAK, R. S.; *et al.* Erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. – hil.): uma revisão abrangente sobre composição química, benefícios à saúde e recentes avanços. Research, Society and Development, v. 10, n. 11, p. e590101120036–e590101120036, 2021. Disponível em: <https://rsdjournal.org/rsd/article/view/20036>.

CARVALHO, N. M., NAKAGAWA, J. Sementes. ciência, tecnologia e produção. Funep, 2012.

CARVALHO, P. E. R. Erva-mate: *Ilex paraguariensis*. - Portal Embrapa. <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1139739/erva-mate-ilex-paraguariensis.2003>. 2003. Acesso em 10 de junho de 2025.

CATAPAN, M. I. S. Influência da temperatura, substrato e luz na germinação de sementes de *Ilex paraguariensis* St.-Hil. 109 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1998.

CHECHI, L. A.; SCHULTZ, G. A Produção de erva-mate: um estudo da dinâmica produtiva nos estados do Sul do Brasil. Enciclopédia Biosfera, Goiânia, v. 13, n. 23, p. 16-26, 2016

CLIMATE. Climate-Data.org. Dados climáticos para Ivaí. (1991-2021). Disponível em: <https://pt.climate-data.org/america-do-sul/brasil/parana/ivai-43687/>.

COELHO, G. C.; MARIATH, J. E. A.; SCHENKE, L. E. P. Populational diversity on leaf morphology of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., Aquifoliaceae). Brazilian Archives of Biology and Technology, Curitiba, v. 45, p. 47-51, 2002.

COPELAND, Larry O.; MCDONALD, Miller B. Principles of Seed Science and Technology. Boston, MA: Springer US, 1999. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4615-1783-2>.

CORTINES, E; BIANQUINI, Luana Almeida; DIAS, Ana Helena De Souza; *et al.* Superação de Dormência em Sementes da Liana Abrus precatorius L. Floresta e Ambiente, v. 17, n. 2, p. 98–103, 2010. Disponível em: <http://floram.org/doi/10.4322/floram.2011.012>

COSTA, M. A. et al. Seed Quality Evaluation by Tetrazolium Staining of *Parkia multijuga* Benth. *Agricultural Sciences*, v. 9, n. 5, p. 577-586, 2018. DOI: <https://doi.org/10.4236/as.2018.95040>.

CUÉNOUD, P (1 de janeiro de 2000). «Molecular Phylogeny and Biogeography of the Genus *Ilex* L. (Aquifoliaceae)». *Annals of Botany* (em inglês). 85 (1): 111–122. ISSN 0305-7364. doi:10.1006/anbo.1999.1003

CUI, D.; LIANG, S.; WANG, D.; *et al.* A 1 km global dataset of historical (1979–2013) and future (2020–2100) Köppen–Geiger climate classification and bioclimatic variables. *Earth System Science Data*, v. 13, n. 11, p. 5087–5114, 2021. Disponível em: <<https://essd.copernicus.org/articles/13/5087/2021/>>.

CUQUEL, F. L., *et al.* “Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate”. *Scientia Agricola*, vol. 51, no 3, dezembro de 1994, p. 415–21. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1590/S0103-90161994000300006>. Acesso em: 19 de maio de 2025

DALLABRIDA, Valdir Roque, *et al.* “Com erva-mate não se faz só chimarrão! Situação atual e perspectivas de inovação no setor ervateiro do Planalto Norte Catarinense”. *DRd - Desenvolvimento Regional em debate*, vol. 6, no 2, julho de 2016, p. 247–73. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.24302/drd.v6i2.1225>.

DANIEL, O. *Erva Mate: Sistema De Produção E Processamento Industrial*. Ufgd, 2009.

DAVIES, P. J. *Plant Hormones*. Springer Netherlands, 1995.

DELOUCHE, J.C.; STILL, T.W.; RASPET, M.; LIENHARD, M. O teste de tetrazólio para viabilidade da semente. Brasília: AGIPLAN, 1976. 103p

DERAL/PR. Departamento de Economia Rural. Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. Prognóstico Agropecuário. Prognóstico Erva-mate 2020. Disponível em: https://www.agricultura.pr.gov.br/sites/default/arquivos_restritos/files/documento/2021-09/progostico_erva_mate_-_2020.pdf.

DOLCE, N. R.; MROGINSKI, L. A.; REY, H. Y. Endosperm and endocarp effects on the *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (Aquifoliaceae) seed germination. Seed Science and Technology, Zurich, v. 38, n. 2, p. 441-448, 2010

DUARTE, M. M, *et al.* "Physical characteristics, viability, and sanitary analysis of *Ilex paraguariensis* seeds and seedling emergence from different mother trees". FLORESTA, vol. 54, no 1, janeiro de 2024. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.5380/rf.v54i1.86790>.

DUARTE, M. M. *et al.* How temperature, substrate, and stratification periods influence *Ilex paraguariensis* embryonic development. Australian Journal of Botany, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/BT23010>.

DUBOC, E.; FRANÇA, R. S. S. S. R. Resultados preliminares sobre a qualidade de sementes de erva-mate coletados no Estado de Mato Grosso do Sul em 2015. Cadernos de Agroecologia, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 1-10, 2016.

DUNN, O. J. (1964). Multiple Comparisons Using Rank Sums. Technometrics, 6(3), 241–252. <https://doi.org/10.1080/00401706.1964.10490181>.

ELLIS, R. H.; ROBERTS, E. H. Improved Equations for the Prediction of Seed Longevity. Annals of Botany, v. 45, n. 1, p. 13–30, 1980. Disponível em: <https://academic.oup.com/aob/article/169757/Improved>.

FALEIRO, R. *et al.* Assessment of the impact of biodegradable lignin nanoparticles encapsulating IAA on tomato development: from seed to fruit. BMC Plant Biology, v. 25, artigo 262, 2025. <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06539-1>.

FERNANDES-DE-CAMPOS, K. A.; SAPATINI, J. R.; PEDROSO-DE-MORAES, C. Superação de dormência em sementes de *Bombax malabaricum* D.C. (Malvaceae). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 17, n. 4, p. 515–520, 2015. DOI: https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_175.

FINCH-SAVAGE, W. E.; FOOTITT, S.. Seed dormancy cycling and the regulation of dormancy mechanisms to time germination in variable field environments. Journal of Experimental Botany, v. 68, n. 4, p. 843–856, 2017. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/2948773/Seed>;

FINCH-SAVAGE, W. E.; LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, v. 171, n. 3, p. 501–523, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111%2Fj.1469-8137.2006.01787.x>.

FORTES, F. O, *et al.* “Agrupamento em amostras de sementes de espécies florestais nativas do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil”. *Ciência Rural*, vol. 38, no 6, setembro de 2008, p. 1615–23. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000600019>. Acesso em: 20 de maio de 2025.

FOWLER, J. a. P., e J. A. Sturion. Aspectos da formação do fruto e da semente na germinação da erva-mate. 2000. www.infoteca.cnptia.embrapa.br, <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/289938>.

FOWLER, J. A. P.; BIANCHETTI, A. Dormência em sementes florestais. [S. l.]: EMBRAPA Florestas, 2000. 27 p. (Documentos, 40).

FOWLER, J. A. P.; STURION, J. A.; ZUFFELLATO-RIBAS, K. C. Variação do desenvolvimento embrionário das sementes de erva-mate. *Pesquisa Florestal Brasileira*, Colombo, PR, n. 54, p. 105-108, 2007. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/314118>. Acesso em: 19 set. 2024.

FRAZÃO, D. a. C., *et al.* Escarificação química na emergência de sementes de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*, H.B.K.). 1984. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/961308>.

FREGONEZI, B. F. *et al.* Seed Priming with Nanoencapsulated Gibberellic Acid Triggers Beneficial Morphophysiological and Biochemical Responses of Tomato Plants under Different Water Conditions. *Agronomy*, v. 14, n. 3, p. 588, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/agronomy14030588>.

GALÍNDEZ, G. *et al.* “Three Levels of Simple Morphophysiological Dormancy in Seeds of *Ilex* (Aquifoliaceae) Species from Argentina”. *Seed Science Research*, vol. 28, no 2, junho de 2018, p. 131–39. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1017/S0960258518000132>.

GIBERTI GC (1995) Florística, sistemática y potencialidades con relación a um banco de germoplasma para la yerba mate. In Winge H, Ferreira A, Mariath J, Tarasconi L (eds), Erva-Mate: Biologia e Cultura no Cono Sul. University Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, pp. 303–312.

GONG, Y.; ZHANG, D.; LV, J.; *et al.* Breaking wild soybean seed physical dormancy: optimal methods and seed coat structural changes. Genetic Resources and Crop Evolution, v. 72, n. 7, p. 8533–8545, 2025. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/s10722-025-02464-2>.

GROOT, S. P. C.; KARSSSEN, C. M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. Planta, v. 171, n. 4, p. 525–531, 1987.

GROPPO-JUNIOR, M. & PIRANI, J.R. 2002. Aquifoliaceae In: Wanderley, M.G.L., Shepherd, G.J., Giulietti, A.M., Melhem, T.S., Bittrich, V., Kameyama, C. (eds.) Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, vol. 2, pp: 31-38.

HEUSER, E. D.; FERREIRA, A. G.; MARIATH, J. E. de A. *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae) Endosperma e embrião durante a embriogênese tardia. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica, La Plata, v. 29, n. 1/2, p. 39-48, 1993

HU, X. W.; WANG, Y. R.; WU, Y. P.; *et al.* Role of the lens in physical dormancy in seeds of *Sophora alopecuroides* L. (Fabaceae) from north-west China. Australian Journal of Agricultural Research, v. 59, n. 6, p. 491–497, 2008. Disponível em: <https://connectsci.au/cp/article/59/6/491/126503/Role-of-the-lens-in-physical-dormancy-in-seeds-of>.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2024). Produção de Erva-mate (cultivo) PAM. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/erva-mate-cultivo/br>.

IBGE. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura (PEVS) |. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9105-producao-da-extracao-vegetal-e-da-silvicultura.html?=&t=downloads>.

IVANCHECHEN, S. L. Estudo morfológico e terminológico do tronco e casca de 30 espécies arbóreas em floresta ombrófila mista. 1988. 221 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, PR.

JIMÉNEZ-ARIAS, D. *et al.* Encapsulation with Natural Polymers to Improve the Properties of Biostimulants in Agriculture. *Plants*, v. 12, n. 1, p. 55, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants12010055>.

KAISER, D. K. *et al.* Adjustment of the methodology of the tetrazolium test for estimating viability of *Eugenia uniflora* L. seeds during storage. *Journal of Seed Science*, v. 36, n. 3, p. 344-350, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2317-1545v36n31022>.

KAISER, D. K.; FREITAS, L. C. N. de; BIRON, R. P.; *et al.* Adjustment of the methodology of the tetrazolium test for estimating viability of *Eugenia uniflora* L. seeds during storage. *Journal of Seed Science*, v. 36, n. 3, p. 344–351, 2014. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372014000300010&lng=en&tlng=en.

KHER, M. M.; NATARAJ, M. Effect of sulfuric acid treatment on breaking of seed dormancy and germination of Indian doum palm, *Hyphaene dichotoma*, a threatened and endemic palm. *Environmental and Experimental Biology*, v. 13, p. 99-101, 2015.

KO, J.-M.; PARK, H.-J.; MIN, B.-M.; *et al.* Effects of various pretreatments on seed germination of *Calystegia soldanella* (Convolvulaceae), a coastal sand dune plant. *Journal of Plant Biology*, v. 47, n. 4, p. 396–400, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/BF03030557>>

KOEHLER, A., Galvão, F. & Longhi, S.J. 2002. Floresta Ombrófila Densa Altomontana: aspectos florísticos e estruturais de diferentes trechos na Serra do Mar, PR. *Ciência Florestal* 12(2): 27-39

KRAUS, J. E. e ARDUIN, M. Manual básico de métodos em morfologia vegetal. Seropédica: EDUR. Acesso em: 24 nov. 2025, 1997

KRUSKAL, W. H., & WALLIS, W. A. (1952). Use of Ranks in One-Criterion Variance Analysis. *Journal of the American Statistical Association*, 47(260), 583–621. <https://doi.org/10.1080/01621459.1952.10483441>.

LAMONT, Byron B.; PAUSAS, Juli G. Seed dormancy revisited: Dormancy-release pathways and environmental interactions. *Functional Ecology*, v. 37, n. 4, p. 1106–1125, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111%2F1365-2435.14269>.

LOIZEAU P-A *et al.* (2005) Towards an understanding of the distribution of *Ilex L.* (Aquifoliaceae) on a world-wide scale. *Biologiske Skrifter* 55, 501–520.

LOIZEAU PA, SAVOLAINEN V, ANDREWS S, BARRIERA G & SPICHIGER R (2016) Aquifoliaceae. In: Kadereit JW & Bittrich V (eds.) *The families and genera of vascular plants - flowering plants Eudicots*. Vol. 14. Springer, New York. Pp. 31-36.

MARCOS-FILHO, J. *Fisiologia de sementes de plantas cultivadas*. Abrates, 2015.

MEDEIROS, A. C. de S. Dormência em sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.). 1998. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/290859>. Acesso em: 22 de maio de 2024.

MENEGUETI, J. C. B.; NÓBREGA, L. H. P.; SMANHOTTO, A.; DA SILVEIRA, J. C. M. Superação da dormência de Sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St.-Hil.) por estratificação. *Varia Scientia*, [S. l.], v. 4, n. 8, p. p. 157–182, 2004. Disponível em: <https://e-revista.unioeste.br/index.php/variascientia/article/view/732>. Acesso em: 12 jun. 2025.

MENSAH, M.; TIA, R.; ADEI, E.; *et al.* A DFT Mechanistic Study on Base-Catalyzed Cleavage of the β -O-4 Ether Linkage in Lignin: Implications for Selective Lignin Depolymerization. *Frontiers in Chemistry*, v. 10, p. 793759, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.793759>.

MIOTTO, R. Métodos para quebra de dormência de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) St.-Hil. dezembro de 2014. Disponível em: <https://rd.uffs.edu.br:8443/handle/prefix/477>.

MIRESKI, M. C., *et al.* “Secagem na viabilidade e desenvolvimento embrionário de sementes de *Ilex paraguariensis*”. *Ciência Florestal*, vol. 29, no 3, setembro de 2019, p. 1354–62. Disponível em: <https://doi.org/10.5902/1980509824451>. Acesso em 15 de fevereiro de 2025.

MOJENA, P. A; DÍAZ GUERRA, A. Experimentos sobre superação da dormência em sementes florestais. 1. ed. Curitiba, PR: Appris, 2018. 176 p., il., 24 cm. (Sustentabilidade, impacto, direito, gestão e educação ambiental).

MOLIZANE, D. M.; JULIO, P. G. dos S.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; *et al.* Physical, physiological and anatomical changes in *Erythrina speciosa* Andrews seeds from different seasons related to the dormancy degree. *Journal of Seed Science*, v. 40, n. 3, p. 331–341, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2317-15372018000300331&lng=en&tlng=en

NIKLAS, C. O. Estudios embriológicos y citológicos en la yerba mate *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Bonplandia*, v. 6, n. 1, p. 45–56, 1987. Disponível em: <https://revistas.unne.edu.ar/index.php/bon/article/view/1504>

NONOGAKI, Hiroyuki. Seed dormancy and germination - emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00233/abstract>.

O'BRIEN, T. P., *et al.* “Polychromatic Staining of Plant Cell Walls by Toluidine Blue O”. *Protoplasma*, vol. 59, no 2, junho de 1964, p. 368–73. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1007/BF01248568>. Acesso em: 05 de junho de 2025.

OLIVEIRA, O. S. Tecnologia de sementes florestais: espécies nativas. Odilson Dos Santos Oliveira, 2013.

PENTEADO JUNIOR, J. F.; GOULART, I. C. G. dos R. Erva 20: sistema de produção para erva-mate. - Portal Embrapa. <https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1106677/erva-20-sistema-de-producao-para-erva-mate>. Acesso em 15 de setembro de 2024.

PEREIRA, A. E. S. *et al.* Chitosan nanoparticles as carrier systems for the plant growth hormone gibberellic acid. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 150, p. 141-152, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.027>.

PEREIRA, A. E. S. *et al.* Polymeric nanoparticles as an alternative for application of gibberellic acid in sustainable agriculture: a field study. *Scientific Reports*, v. 9, p. 7135, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43494-y>.

PEREIRA, V. J., *et al.* “Eficiência dos tratamentos para a superação ou quebra de dormência de sementes de *Fabaceae*”. *Revista de Ciências Agrárias*, janeiro de 2019, p. 187-197 Páginas. DOI.org (Datacite), <https://doi.org/10.19084/RCA.16814>.

PIÑA-RODRIGUES, F. C. M.; FIGLIOLIA, M. B.; SILVA, A. (Orgs.). *Sementes florestais tropicais: da ecologia à produção*. Londrina: ABRATES, 2015.

PIRES, E. Z. *et al.* Biologia reprodutiva de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hill.) em remanescente de Floresta Ombrófila Mista Altomontana. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, Lages, v. 13, n. 2, p. 171-180, 2014.

POPINIGIS, F. *Fisiologia da semente*. Brasília, 2ª ed, 1985. 289 p.

POZHILIRASI, S; MENAKA, C; YUVARAJA, A; *et al.* Exploration of the metabolites and structural anatomy of seed coat dormancy in black gram vbn-8 using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) and scanning electron microscopy (SEM) analysis. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, n. 1, p. 144–157, 2025. Disponível em: <https://www.thejaps.org.pk/Volume/2025/35-01/12.php>.

REINKE, R. K, *et al.* “Embryo development in seeds of *Ilex paraguariensis* A.St.-Hil. in stratification treatments”. *Ciência e Natura*, vol. 46, novembro de 2024, p. e75135. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.5902/2179460X75135>.

ROCHA, A. C. *et al.* Época e intensidade de florescimento e pegamento de frutos segundo a distribuição pelos quadrantes em Laranjeiras. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 25, n. 6, p. 85-88, 1990.

RODERJAN, C.V., GALVÃO, F., KUNIYOSHI, Y.S. & HATSCHBACH, G.G. 2002. As unidades fitogeográficas do estado do Paraná, Brasil. *Ciência & Ambiente* 13(24): 75-92

SAMPEDRO-GUERRERO, J. *et al.* Efficient strategies for controlled release of nanoencapsulated phytohormones to improve plant stress tolerance. *Plant Methods*, v. 19, p. 47, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13007-023-01025-x>.

SANTIN, D., *et al.* “Sobrevivência, crescimento e produtividade de plantas de erva-mate produzidas por miniestacas juvenis e por sementes”. *Ciência Florestal*, vol. 25, no 3, setembro de 2015, p. 571–79. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.5902/1980509819608>.

SANTOS, F. S. dos; VIEIRA, E. S. N.; PANOBIANCO, M. Tetrazolium test for *Pinus taeda*: preparation, staining, and seed viability classes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 54, e01088, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1678-3921.pab2019.v54.01088>.

SCHEER, M.B., MOCOCHINSKI, A.Y. & RODERJAN, C.V. 2011. Estrutura arbórea da Floresta Ombrófila Densa Altomontana de serras do Sul do Brasil. *Acta Botânica Brasílica* 25(4): 735-750

SENA, J. O. A. de; CASTRO, P. R. C.; KLUGE, R. A. (org.). *Introdução à fisiologia do desenvolvimento vegetal*. 2. ed Maringá, PR: EdUEM, 2019. 396 p., il., 24 cm. ISBN 9788576287575.

SILVA, J. C. *et al.* Seed Viability of *Comiphora leptophloeos* (Mart.) J.B. Gillett (Burseraceae) Assessed by the Tetrazolium Test. *International Journal of Plant Biology*, v. 16, n. 4, p. 139, 2025. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijpb16040139>.

SIMPSON, M. G (2010). *Plant Systematics* 2 ed. Amsterdam: Elsevier

SMÝKAL, P.; VERNOUD, V.; BLAIR, M. W.; *et al.* The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Frontiers in Plant Science*, v. 5, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2014.00351/abstract>.

SOUZA, A. C. de; *et al.* “Causes of dormancy in *Ilex paraguariensis* pyrenes”. *Rodriguésia*, vol. 73, 2022, p. e01942020. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.1590/2175-7860202273036>.

SOUZA, A. C. *et al.* Causes of low seed quality in *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. samples (Aquifoliaceae). *Floresta e Ambiente, Seropédica*, v. 27, n. 4, e20170960, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.096017>.

SOUZA, L. A. *Morfologia e Anatomia Vegetal (Célula, Tecidos, Órgãos e Plântula)*. UEPG, 2002.

SOUZA, L. A. *Sementes e Plântulas: Germinação, Estrutura e Adaptação*. Todapalavra Editora, 2009.

STURGEON, M. R.; KIM, S.; LAWRENCE, K.; *et al.* A Mechanistic Investigation of Acid-Catalyzed Cleavage of Aryl-Ether Linkages: Implications for Lignin Depolymerization in Acidic Environments. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, v. 2, n. 3, p. 472–485, 2014. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/sc400384w>.

SUN, Y.C.; ZHANG, Y.J.; WANG, K.; *et al.* NaOH Scarification and Stratification Improve Germination of *Iris lactea* var. *chinensis* Seed. *HortScience*, v. 41, n. 3, p. 773–774, 2006. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.41.3.773>.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

TEZUKA, T., *et al.* “Factors Affecting Seed Germination of *Ilex latifolia* and *I. rotunda*”. *HortScience*, vol. 48, no 3, março de 2013, p. 352–56. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.48.3.352>.

WENDLING, I. *Propagação vegetativa de erva-mate (Ilex paraguariensis Saint Hilaire): estado da arte e tendências futuras*. Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2004. 46 p. (Documentos, 91)

WINHELMANN, M. C., *et al.* “Avaliação da qualidade de sementes de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A.St.-Hil.) oriundas de diferentes plantas matrizes”. *Ciência Florestal*,

vol. 32, no 1, março de 2022a, p. 247–65. DOI.org (Crossref), <https://doi.org/10.5902/1980509848110>. Acesso em 22 de maio de 2024.

WINHELMANN, M. C., *et al.* Pre-Treatments, Stratification, and Emergence of Seeds of *Ilex paraguariensis* A.St.-HIL. 2022b. DOI: <https://doi.org/10.5380/rf.v52i2.80411>. Acesso: 19 de maio de 2024.

XAVIER, A., WENDLING, I. and SILVA, R. L. (2013). Silvicultura clonal: princípios e técnicas. 2. ed. Viçosa: UFV.

YANG, S.H; KWON, Y.-H.; KANG, K.-N.; *et al.* Acid Scarification Completes the Germination of *Hovenia dulcis* Seeds. Agronomy, v. 12, n. 11, p. 2801, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy12112801>.

ZANON, A. Produção de sementes de erva-mate. 1988. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/291006>. Acesso: 19 de maio de 2025.