

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



**Área de Concentração: Biotecnologia, Genômica e Bioinformática.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO



**MULTIPLICAÇÃO CLONAL *IN VITRO* DE *Jatropha curcas* L.  
(PINHÃO-MANSO).**

**ORIENTADA: Kelly Cristina Magalhães Luiz**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis**

BELO HORIZONTE

Maio - 2009

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Kelly Cristina Magalhães Luiz**

**MULTIPLICAÇÃO CLONAL *IN VITRO* DE *Jatropha curcas* L.  
(PINHÃO-MANSO).**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Área de Concentração: Biotecnologia,  
Genômica e Bioinformática

Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Departamento de Biologia Geral  
2009

A minha família, especialmente aos meus pais,  
José Maria e Maria Geralda.

## AGRADECIMENTOS

A ele, Deus, por ter tanta coisa a agradecer, por ser meu guardião, dar esperança, garra, colocar pessoas tão maravilhosas no meu caminho...

Ao orientador e professor Dr. Evanguedes Kalapothakis pela confiança, oportunidade, grande experiência compartilhada e pessoa maravilhosa que está por trás deste homem;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral pelo apoio e presença de professores e funcionários que contribuíram para a minha formação;

A Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda, FAPEMIG, CNPq, UFMG e Pós-Graduação em Genética pelo financiamento do projeto, congresso e outros;

Aos membros que compuseram a banca examinadora, Dra. Maria Rita e Dr. Vasco Azevedo, pelo tempo disponibilizado, pelas críticas e participação no aperfeiçoamento deste trabalho;

A Júnia, diretora da Phoneutria, pelo espaço cedido para o desenvolvimento do projeto;

As funcionárias da Phoneutria, Júnia, Maiza, Lucinéia e Denise, pelas inúmeras ajudas e conversas agradáveis e a doce e encantadora Susanne pela amizade, ajuda na bancada, nas correções, na vida;

Ao Luciano Cardoso, pelas informações e fotos cedidas;

Aos estudantes e amigos do Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares pela agradável convivência, acolhimento, ajuda constante e momentos de aprendizagem científicas e não-científicas: Ana Paula, Anderson, Andréa, André, Arthur, Bárbara, Caio, Carol, Cleide, Isa Pena, Isa Drummond, Flávia, Marcelle, Sara, Tati, Valéria e a Érika sempre tão prestativa. Muito obrigada por toda ajuda na correção da dissertação e análises estatísticas. Aos vizinhos de laboratório pelas constantes risadas;

Aos colegas e amigos da Pós-Graduação em Genética, pelas conversas agradáveis e auxílios;

A todos os familiares, principalmente aos meus pais pela dedicação, compreensão, estímulo, exemplo de vida e amor sempre. Mãe, você é meu espelho de vida, mulher e incentivo. Pai você também é, mas é diferente!

A amiga Lorenza, pelas constantes horas ao telefone, xingos e até mesmo no auxílio ao término da dissertação. E também aos amigos da pós-graduação, graduação, René Rachou, ensino médio e até do ensino fundamental (nossa quantos anos de tolerância) pela descontração e apoio.

Neste último ano devido à correria, o tempo passou num piscar de olhos e às vezes fui tão ausente e impaciente, mas acredito que vocês vão compreender o quão importante é ter a família e amigos em minha vida. Amo vocês!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

OBRIGADA!

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iv
<b>SUMÁRIO</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	x
<b>GLOSSÁRIO DE TERMOS UTILIZADOS</b> .....	xi
<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 <i>Jatropha curcas</i> L.....	14
1.2 Importância econômica da <i>Jatropha curcas</i> (pinhão-mansão).....	16
1.2.1 Medicinal.....	16
1.2.2 Demarcação de limites.....	16
1.2.3 Conservação do solo.....	17
1.2.4 Produção de sabão.....	17
1.2.5 Outros usos.....	17
1.2.6 Biocombustível - Óleo da <i>Jatropha curcas</i> (pinhão-mansão).....	17
1.3 Propagação da <i>Jatropha curcas</i> .....	21
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	26
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos.....	26
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
3.1 Condições gerais das culturas.....	27
3.2 Embriogênese zigótica.....	27
3.3 Micropropagação.....	28
3.3.1 Indução de brotações.....	28
3.3.2 Proliferação e alongamento dos brotos.....	29
3.3.3 Subcultivo para enraizamento.....	30
3.3.4 Enraizamento.....	31
3.3.5 Aclimatização.....	32
3.3.6 Meristemas: apical x lateral.....	33
3.3.7 Análises estatísticas.....	34

<b>4 RESULTADOS</b> .....	35
4.1 Indução de brotações.....	35
4.2 Proliferação e alongamento dos brotos.....	39
4.3 Subcultivo para enraizamento.....	43
4.4 Enraizamento.....	47
4.5 Aclimatização.....	48
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	58
<b>7 PERSPECTIVAS</b> .....	59
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	60

## LISTA DE FIGURAS

1 - <i>Jatropha curcas</i> L. (pinhão-mansô).....	15
2 - Esquema da reação de transesterificação do biodiesel.....	19
3 - Fluxograma ilustrativo contendo os estágios da embriogênese zigótica <i>in vitro</i> .....	28
4 - Fluxograma ilustrativo da etapa de proliferação de <i>Jatropha curcas</i> .....	30
5 - Fluxograma ilustrativo da etapa de subcultivo de <i>Jatropha curcas</i> .....	31
6 - Fluxograma ilustrativo da etapa de enraizamento de <i>Jatropha curcas</i> .....	32
7 - Fluxograma ilustrativo da etapa de aclimatização de <i>Jatropha curcas</i> .....	33
8 - Foto ilustrativa dos brotos de pinhão-mansô regenerados na etapa de indução da parte aérea <i>in vitro</i> em MSB5 com BAP.....	36
9 - Foto ilustrativa dos brotos de pinhão-mansô com raiz, regenerados na etapa de indução da parte aérea <i>in vitro</i> em MSB5, AIA e BAP.....	37
10 - Porcentagem de meristemas apicais e laterais que desenvolveram brotos na etapa de indução.....	38
11 - Número médio de brotos regenerados nos meristemas apicais e laterais na etapa de indução.....	38
12 - Comparação do número de brotações por meristemas apicais e laterais na etapa de indução.....	39
13 - Foto ilustrativa dos <u>sub-brotos 1</u> e raízes regenerados durante a etapa de proliferação e alongamento em MSB5 com BAP.....	40
14 - Porcentagem de brotos provenientes de meristemas apicais e laterais que desenvolveram <u>sub-brotos 1</u> na etapa de proliferação e alongamento.....	41
15 - Comparação do número de <u>sub-brotos 1</u> por brotos provenientes de meristemas apicais e laterais na etapa de proliferação e alongamento.....	42
16 - Comparação do número médio de <u>sub-brotos 1</u> provenientes de brotos de meristemas apicais e laterais regenerados na etapa de proliferação e alongamento de brotos.....	43
17 - Foto ilustrativa dos <u>sub-brotos 2</u> regenerados durante o subcultivo em MSB5 com BAP.....	44
18 - Porcentagem de <u>sub-brotos 1</u> de meristemas apicais e laterais que desenvolveram <u>sub-brotos 2</u> no subcultivo.....	45
19 - Comparação do número de <u>sub-brotos 2</u> provenientes de <u>sub-brotos 1</u> de meristemas apicais e laterais regenerados no subcultivo.....	46
20 - Comparação do número de <u>sub-brotos 2</u> por <u>sub-brotos 1</u> de meristemas apicais e laterais no subcultivo.....	47

- 21** - Foto ilustrativa das raízes regeneradas das mudas provenientes dos tratamentos em MSB5 com BAP durante a etapa de enraizamento em MS com AIB.....48
- 22** - Foto ilustrativa das mudas de *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso) aclimatada em terra vegetal, esterco e fertilizante 1%.....49
- 23** - Foto ilustrativa das mudas de *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso) aclimatada em terra vegetal, esterco, areia e fertilizante 1%.....50
- 24** - Foto ilustrativa das mudas de *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso) aclimatada em terra vegetal, esterco e solução 1% MS.....51
- 25** - Foto ilustrativa das mudas de *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso) aclimatada em terra vegetal, esterco, areia e solução 1% MS.....52
- 26** - Comparação da taxa de sobrevivência das mudas de *Jatropha curcas* L. submetidas a tratamentos diferentes na etapa de aclimatização.....53

**LISTA DE TABELAS**

1 - Rendimento de óleo em diversas oleaginosas.....	20
2 - Propriedades do óleo diesel e da <i>Jatropha curcas</i> (pinhão-mansão).....	21
3 - Estrutura química dos ácidos graxos do óleo da <i>Jatropha curcas</i> (pinhão-mansão).....	21

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**2ip** – isopenteniladenina

**2,4-D** - ácido 2,4-diclorofenoxiacético

**AIA** – ácido 3-indolacético

**AIB** – ácido indolbutírico

**ANA** – ácido naftalenoacético

**B5** – meio de Gamborg *et al.* (1968)

**BA** – 6-benziladenina

**BAP** – 6-benzilaminopurina

**CIN** - cinetina

**CNPq** – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

**CSt** - viscosidade cinemática ou centistokes

**DPM** – desvios padrões da média

**FAPEMIG** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

**MS** – meio de Murashige e Skoog (1962)

**MSB5** – meio MS acrescido de vitaminas do meio B5

**PVC** – cloreto de polivinila ou policloreto de vinila

**TDZ** - thidiazuron

**TEAF** – substrato contendo terra, esterco e areia irrigados com fertilizante

**TEAMS** - substrato contendo terra, esterco e areia irrigados com solução do meio MS

**TEF** - substrato contendo terra, esterco irrigados com fertilizante

**TEMS** - substrato contendo terra, esterco e areia irrigados com solução do meio MS

**W** – watts

**ZEA** – zeatina

## GLOSSÁRIO DE TERMOS UTILIZADOS

**Aclimatização:** processo no qual as plantas desenvolvidas *in vitro* são gradualmente expostas a condições naturais, principalmente de temperatura, luminosidade e umidade relativa.

**Brotos:** estruturas regeneradas na etapa de indução da parte aérea.

**Calo:** agregados celulares desorganizados que se originam da proliferação de células e multiplicam desordenadamente.

**Cultura de tecidos:** cultura de células vegetais isoladas de um grupo de células, tecidos ou órgãos em ambiente artificial, sob condições assépticas.

**Explante:** célula, tecido ou órgão de uma planta usado para iniciar culturas *in vitro*.

**Indução:** é o desencadeamento de um processo morfogênético pela exposição do explante a um estímulo físico, químico ou biológico.

**Meristema apical caulinar:** tecido que se encontra distal ao mais novo primórdio foliar.

**Micropropagação:** propagação clonal vegetativa de um genótipo selecionado por técnicas de cultura *in vitro*.

**Sub-brotos 1:** brotos regenerados na etapa de proliferação.

**Sub-brotos 2:** brotos regenerados na etapa de subcultivo.

## RESUMO

A gradual exaustão das reservas mundiais de petróleo, a alta do preço deste e preocupações sobre mudanças climáticas globais tem sido razão para explorar o uso de óleo vegetais como fonte de energia alternativa. Surge o interesse pelo óleo do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de biodiesel, sendo fonte de renda e emprego para o semi-árido. Esta planta nativa do Brasil possui muitos atributos, múltiplos usos e potencial considerável. Considerando a importância da espécie, associado ao seu grande interesse no mercado interno com a produção de óleo e, para gerar excedente exportável, o objetivo deste trabalho foi aperfeiçoar um protocolo, visando o crescimento *in vitro* para a produção em larga escala de mudas. Para a indução da parte aérea *in vitro*, meristemas de plântulas oriundas de embriões zigóticos foram isolados e cultivados em três meios: (1) MS, acrescido de vitaminas do meio B5 (denominado MSB5) e ácido 3-indolacético (AIA), (2) MSB5 e (3) MS, todos suplementados com diferentes concentrações de 6-benzilaminopurina (BAP). Brotos foram utilizados como explante nas etapas de proliferação e subcultivo e submetidos a dois tratamentos distintos: MSB5 suplementado com diferentes concentrações de BAP. Após o subcultivo, os clones foram transferidos para meios contendo sais básicos do meio MS e ácido indolbutírico (AIB). Plântulas regeneradas e mudas foram submetidas a substratos distintos na aclimatização: substrato a base de terra vegetal e esterco (TEF); terra vegetal, esterco e areia (TEAF), ambos irrigados semanalmente com fertilizante 1%; terra vegetal e esterco (TEMS); terra vegetal, esterco e areia (TEAMS), ambos irrigados semanalmente com solução 1% do meio MS. Para comparar o tipo de explante ideal para este protocolo, meristemas apicais e laterais foram utilizados para a indução da parte aérea *in vitro* em MSB5 suplementado com BAP, em seguida brotos foram inoculados para a etapa de proliferação e subcultivo em MSB5 com BAP. Os resultados mostraram que meristemas apicais foram mais eficientes para a micropropagação do pinhão-manso, associados com a indução da parte aérea, proliferação e subcultivo em MSB5 com BAP, enraizamento em MS com sais básicos suplementado com AIB e que o substrato TEAMS é o mais adequado para mudas de pinhão-manso cultivadas *in vitro*, portanto os resultados obtidos representam um grande avanço no processo de micropropagação de pinhão-manso, entretanto ajustes devem ser feitos no sentido de aprimorar a etapa de aclimatização. **Este trabalho foi representado sucintamente para a proteção intelectual da sua metodologia e resultados.**

Palavras-Chave: *Jatropha curcas*, micropropagação, biodiesel, pinhão-manso, regeneração *in vitro*.

## ABSTRACT

The gradual depletion of world oil reserves, its high price and concerns about global climate change has directed efforts to explore the use of vegetable oil as a source of alternative energy. Among several possibilities, we focus on the oil of physic nut (*Jatropha curcas* L.) for the production of biodiesel, and a source of income and employment for the semi-arid. This native plant to Brazil has many attributes, several uses and considerable potential. Considering the importance of the species, associated to its great interest in the internal market with oil production and, to generate exportable surplus, this work aimed to develop a method for *in vitro* growth for large-scale production of seedlings. For the induction *in vitro* of shoots, meristems of plantlets from zygotic embryos were isolated and inoculated in three media: (1) MS with vitamins from B5 medium (called MSB5) indole-3-acetic acid (IAA), (2) MSB5 and (3) MS, all supplemented with different concentrations of 6-benzylaminopurine (BAP). Shoots were used as explants in the stages of proliferation and subculture, and submitted to two different treatments: MSB5 supplemented with different concentrations of BAP. After shoots were developed, they were transferred to media containing basic salts of MS medium and IBA. Regenerated plantlets and seedlings were submitted to different substrates to acclimatization: substrate-based manure and plant soil (TEF), sand, manure and plant soil (TEAF) both irrigated weekly with 1% fertilizer, manure and plant soil (TEMS), sand, manure and plant soil (TEAMS), both irrigated weekly with 1% MS solution. To compare the explant type ideal for this method, apical and lateral meristems were used for the induction *in vitro* of shoots in MSB5 supplemented with BAP, then shoots were inoculated at the stage of proliferation and subculture in the presence of MSB5 with BAP. The results showed that apical meristems were more efficient for the micropropagation of physic nut, combined with the induction *in vitro* of shoots, proliferation and subcultivo in MSB5 with BAP, rooting in MS with basal salts supplemented with AIB and that the substrate TEAMS are adjusted for seedlings of physic nut cultivated *in vitro*, therefore the results represent a great advance in the process of micropropagation of physic nut, however adjustments must be made to improve the stage of acclimatization.

Keywords: *Jatropha curcas*, micropropagation, biodiesel, physic nut, *in vitro* regeneration.

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Jatropha curcas* L.

*Jatropha curcas* (Linnaeus), pertencente à família Euphorbiaceae é originária da América tropical, mas atualmente é distribuída amplamente em regiões tropicais áridas e semi-áridas do mundo (OPENSHAW, 2000). A distribuição geográfica do pinhão-mansão no Brasil, segundo Cortesão (1956) e Peixoto (1973) é bastante vasta devido a sua rusticidade e resistência a longas estiagens, sendo adaptável às condições de solo e clima muito variáveis, desde o Nordeste até São Paulo e Paraná.

*Jatropha curcas* L., é popularmente conhecida como physic nut, purging nut (Inglês), pinhão-mansão, pinhão-paraguaio, pinhão-de-purga e pinhão-de-cerca (Brasil), tempate (Honduras e El Salvador), médicinier, pignon d'Inde, purghere (França), Kadam (Nepal), yu-lu-tzu (China), mupuluka (Angola), butuje (Nigéria) e piñocillo (México) (NUNES, 2007).

O pinhão-mansão é uma pequena árvore ou arbusto, de crescimento relativamente rápido, podendo atingir uma altura de três a cinco metros, mas pode atingir oito a 10 metros em condições favoráveis (Figura 1A) (OPENSHAW, 2000; KUMAR & SHARMA, 2008). O diâmetro do tronco é de aproximadamente 20 cm; caule liso e macio, possuindo normalmente, cinco raízes, sendo uma central e quatro periféricas (KOBILKE *apud* HELLER, 1996; ARRUDA *et al.*, 2004).

Segundo Arruda *et al.* (2004) o tronco é dividido desde a base, em ramos compridos e espalhados, com numerosas cicatrizes produzidas pela queda das folhas na estação seca. As folhas são decíduas, lobadas, pecioladas e alternas (Figura 1B) (NUNES, 2007). É uma espécie diplóide com  $2n = 22$  cromossomos, monóica com flores unissexuais e sua polinização é feita por insetos (HELLER, 1996). O fruto é tipo cápsula trilocular, com uma semente por lóculo, formado por um pericarpo ou casca dura, inicialmente verde, passando a amarelo, castanho e por fim preto, quando atinge o estágio de maturação (Figura 1C) (ARRUDA *et al.*, 2004; NUNES, 2007).

A semente é ovalada com tegumento rijo e quebradiço. Quando secas apresentam 1,5-2,0 cm de comprimento e 1,0-1,3 cm de largura (Figura 1C). Na parte superior possui uma proeminência carnuda, a carúncula, que se encontra próxima à micrópila e na inferior do involúcro da semente existe uma película branca cobrindo a amêndoa; albúmen abundante, branco, oleaginoso, contendo o embrião provido de dois largos cotilédones achatados (NUNES, 2007). De acordo com Arruda *et al.* (2004), dependendo da variedade e dos tratamentos culturais, a semente pode ter de 33,7 a 45% de casca e de 55 a 66% de amêndoa.



**FIGURA 1 - *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansó).** A - Aspecto visual de uma planta de pinhão-mansó. Em B, a **seta vermelha** indica as folhas e a **seta branca** indica os frutos do pinhão-mansó. C – Frutos e sementes do pinhão-mansó. Fotos: Luciano Cardoso.

## 1.2 Importância econômica da *Jatropha curcas* (pinhão-mansão)

*J. curcas* é uma planta com muitos atributos, múltiplos usos e potencial considerável (OPENSHAW, 2000). As primeiras aplicações comerciais do pinhão-mansão foram relatadas em Lisboa, onde o óleo importado de Cabo Verde foi usado para a produção de sabão e para lâmpadas. A torta, extraída do processamento da semente foi usada como fertilizante para batatas (GÜBITZ *et al.*, 1999). Atualmente, a planta tem recebido atenção de muitos cientistas em virtude da sua grande importância econômica, medicinal e do óleo extraído da sua semente para fins energéticos (SOOMRO & MEMON, 2007).

### 1.2.1 Medicinal

Todas as partes da *Jatropha*, incluindo sementes, folhas e cascas, são usadas na medicina popular e para finalidades veterinárias (HELLER, 1996). A seiva (látex) da planta tem propriedades antimicrobianas contra *Staphylococcus* e *Streptococcus* spp, e *Escherichia coli*, além de ser usada como cicatrizante, hemostático e purgativo e possuir propriedades anticancerígenas devido à presença de um alcalóide conhecido como “jatrophina” (HELLER, 1996; PROJECT ZÂMBIA, 2000; ARRUDA *et al.*, 2004; MURALI *et al.*, 2007; JOHNSON & DEORE, 2008).

As raízes são usadas como um antídoto para picadas de cobras e são consideradas diuréticas, antileucêmicas e anti-helmínticas e as folhas são utilizadas para combater doenças de pele e sua decocção (cozimento) é usada para aliviar tosse e como um antisséptico após o nascimento. Registros sobre sua utilização contra o reumatismo também são existentes (HELLER, 1996; AUGUSTUS, *et al.*, 2002; NUNES, 2007).

As sementes são usadas como purgativo, verificando-se casos de intoxicação em crianças e adultos quando as ingerem em excesso. O óleo da semente pode ser aplicado no tratamento de eczema, doenças de pele e reumatismo. Atribuem-se as propriedades tóxicas do pinhão, a uma globulina, a curcasina, e também o ácido jatrófico de toxicidade igual ou superior à substância tóxica, ricinina, encontrada na mamona (*Ricinus communis*) (ARRUDA *et al.*, 2004). Além disto, de acordo com Rajore e Batra (2005) a planta atua na cura da anemia e doenças do coração.

### 1.2.2 Demarcação de limites

O pinhão-mansão é usado frequentemente como cerca viva. Sua utilização na demarcação de limites deve-se ao fato da planta não ser consumida por animais devido ao látex que escorre das folhas arrancadas ou feridas e por sua longevidade (PEIXOTO, 1973; PROJECT ZÂMBIA, 2000).

### 1.2.3 Conservação do solo

Por causa da sua tolerância à seca, de suas raízes laterais perto da superfície e da cobertura do solo com uma camada de matéria seca, faz do pinhão-manso, uma espécie conservadora do solo, reduzindo desta forma, a perda de água por evaporação e erosão, a velocidade do vento, protegendo contra enxurradas e enriquecendo o solo com matéria orgânica decomposta.

### 1.2.4 Produção de sabão

O óleo da semente do pinhão-manso é empregado na produção de sabão. A formação de espuma é consideravelmente boa, sua coloração é branca com efeitos positivos na pele, em parte devido ao conteúdo de glicerina do sabão (PROJECT ZÂMBIA, 2000).

Até antes da segunda Guerra Mundial, em 1939, o principal emprego do pinhão-manso era na saboaria e na fabricação de estearina, mas devido às necessidades militares, outras possíveis utilizações começaram a ser estudadas.

### 1.2.5 Outros usos

A semente de *J. curcas* é inadequada para a alimentação animal e dos seres humanos devido à presença de várias substâncias tóxicas incluindo os ésteres de forbol e curcina, mas apresenta propriedades moluscocidas, inseticidas e fungicidas. De acordo com Delgado e Parado (1989) em determinadas regiões do México a semente do pinhão-manso é comida, após ser cozida e assada. Há relatos de uma variedade não tóxica no México e América Central, devido à ausência de ésteres de forbol (WINK *apud* HELLER, 1996).

Das sementes processadas extrai-se o óleo e a torta (subproduto). A torta da *Jatropha* apresenta aos altos índices de nitrogênio, fósforo e potássio (NPK), tendo o potencial para adubo orgânico. Assim, a torta quando adicionada ao solo pode aumentar a produtividade agrícola (PROJECT ZÂMBIA, 2000; SUJATHA *et al.*, 2005).

Além destas propriedades, o pinhão-manso pode ser utilizado para outros fins, tais como na iluminação de casas, na indústria de fiação de lã, de tinta para escrever, tinta de impressão, pintura e cosméticos (OPENSHAW, 2000; ARRUDA *et al.*, 2004). Não pode, contudo ser utilizado como lubrificante, devido a sua baixa viscosidade e grande porcentagem de ácidos graxos impróprios, que podem provocar rápida resinificação. No entanto, pesquisas levaram a conclusão de que este óleo pode também ser utilizado como combustível nos motores diesel (CORTESÃO, 1956).

### 1.2.6 Biocombustível - Óleo da *Jatropha curcas* (pinhão-manso)

Como já é do conhecimento de toda sociedade brasileira, estamos vivendo na atualidade uma grande e possivelmente duradoura transição energética em todo mundo, que hoje é quase totalmente dependente do petróleo e do carvão mineral (BELTRÃO, 2006).

A gradual exaustão das reservas mundiais de petróleo, a alta do preço deste combustível e preocupações sobre mudanças climáticas globais tem sido razão para explorar o uso de óleo vegetais como fonte de energia alternativa (PRAMANIK, 2003; BERCHMANS & HIRATA, 2008). O Brasil consome 45 bilhões de litros de diesel por ano, dos quais 10% são importados (ESCOBAR, 2008). Nesse cenário, o biodiesel, permite a economia de divisas com a importação de produtos petrolíferos.

Entre as fontes renováveis tem recebido grande atenção a biomassa. De acordo com Barros (2007), podemos citar entre os principais produtos derivados da biomassa:

- Bioóleo – líquido negro obtido por meio do processo de pirólise (decomposição através do calor), que tem como principais destinações o aquecimento e a geração de energia elétrica;
- Biogás – obtido juntamente com o gás carbônico por meio da decomposição de materiais como lixo, alimentos, esgoto e esterco em digestores de biomassa;
- Biodiesel – produzido a partir de óleos derivados de plantas, gorduras de origem animal e até mesmo de óleos usados em frituras;
- Bioetanol “comum” – feito à base do sumo extraído da cana-de-açúcar;

Biodiesel é um combustível, monoalquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, derivado de biomassa renovável, que substitui parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil em motores de ignição por compressão, sem haver a necessidade de nenhuma modificação no motor. O biodiesel pode ainda substituir outros tipos de combustíveis fósseis na geração de energia, a exemplo do uso em caldeiras ou em geração de calor em processos industriais (FERRARI, 2005).

É obtido por meio de um processo de transesterificação, que tem por objetivo modificar a estrutura molecular do óleo vegetal, tornando-a praticamente idêntica a do óleo diesel e por conseqüência com propriedades físico-químicas iguais, sendo assim, ocorre à transformação de triglicerídeos em moléculas menores de ésteres de ácidos graxos, reduzindo a sua viscosidade e aumentando o seu número de cetanos (DANTAS *et al.*, 2006).



**Figura 2 - Esquema da reação de transesterificação do biodiesel.** Fonte: MEHER *et al.*, 2006.

Após este processo pode ser usado como um substituto do diesel, puro a 100% ou misturado em diversas proporções ao diesel, como alimento animal (exceto oleaginosas tóxicas) ou para a produção de biogás (STAUBMANN *et al.*, 1999; OPENSHAW, 2000).

Óleos vegetais provenientes de diversas oleaginosas têm sido testados com sucesso na produção de biodiesel e as principais fontes incluem óleos vegetais da semente da canola (EUA), semente de girassol (Itália e Sul da França), soja (EUA e Brasil), óleo de palma (Malásia), sementes de linhaça (Espanha), semente de algodão (Grécia), sebo bovino (Irlanda), *Jatropha* (Nicarágua e América do Sul), óleo do mahua e óleo de Neem (JAYASINGH, 2004; CHINCHOLKAR *et al.*, 2005; TAPANES *et al.*, 2006).

De acordo com a Lei 11.097/2005, a partir de 2008 é obrigatória a adição de dois por cento de biodiesel ao óleo diesel automotivo. No entanto, foi estabelecida pela Resolução do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) nº.2, em março de 2008, a obrigatoriedade de três por cento a partir de julho deste ano. O aumento do percentual de biodiesel adicionado ao óleo diesel, além do aumento da oferta de carros que funcionam tanto a álcool quanto a gasolina, representou em 2008 uma economia anual da ordem de US\$ 1 bilhão na importação de diesel.

Devido à dimensão continental do Brasil, e da sua diversidade de clima e de solos, estima-se que se tenha aqui mais de 200 espécies de oleaginosas com possibilidade de extração de óleos vegetais para a produção de biodiesel em larga escala, além do sebo bovino, gorduras de origem animal e um quarto das reservas superficiais e subsuperficiais de água doce. Assim, o país apresenta reais condições para se tornar um dos maiores produtores de bioenergia mundial, entre elas o biodiesel (BELTRÃO, 2006; MELO *et al.*, 2006; CARVALHO *et al.*, 2007).

Entre os produtos agrícolas, a semente da *Jatropha curcas* (pinhão-mansão) tem atraído o interesse de várias agências em desenvolvimento nos trópicos e subtropicais por possuir elevado teor de óleo na mesma (25-30%) e no albúmen (50-60%) superior ao da

maioria das oleaginosas utilizadas no mercado de biocombustíveis (Tabela 1), fácil cultivo, propriedades como: baixa acidez e melhor estabilidade à oxidação que a soja e a palma, baixa viscosidade se comparada à mamona e melhor condição de armazenamento em comparação ao óleo de palma (PURCINO & DRUMMOND, 1986; SHAH *et al.*, 2004; ARRUDA *et al.*, 2004; SUJATHA *et al.*; 2005; TAPANES *et al.*, 2008).

**Tabela 1 - Rendimento de óleo em diversas oleaginosas**

<b>Matéria prima</b>	<b>Capacidade (kg óleo/ha)</b>
Milho	145
Castanha-de-caju	148
Algodão	273
Soja	375
Girassol	800
Cacau	863
Amendoim	890
Canola	1000
Mamona	1188
<b>Pinhão-manso</b>	<b>1590</b>
Abacate	2217
Coco	2260
Palma/Dendê	5000

Fonte: [http://chibas-bioenergy.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=35&Itemid=55#1](http://chibas-bioenergy.org/index.php?option=com_content&task=view&id=35&Itemid=55#1) (modificado).

O óleo do pinhão-manso é mais viscoso do que o diesel e tem menor ponto de combustão (número de cetanos) (Tabela 2). Por estas razões não é usado diretamente nos motores sobre longos períodos de tempo. O óleo contém 21% de ácidos graxos saturados e 79% de insaturados, sendo que o ácido linoléico (C18:2) e o ácido oléico (C18:1) contabilizam juntos até 80% da composição do óleo. O ácido palmítico (C16:0) e o ácido esteárico (C18:0) são outros ácidos graxos presentes neste óleo (Tabela 3). O óleo não é comestível, porém tem o potencial para ser uma alternativa comercialmente viável ao óleo diesel, pois tem todas as características desejáveis físico-químicas e de desempenho como aquela do diesel (OPENSHAW, 2000; MURALI *et al.*, 2007).

**Tabela 2 - Propriedades do óleo diesel e da *Jatropha curcas* (pinhão-mansão)**

Propriedades	Diesel	Biodiesel de pinhão-mansão
Viscosidade (cSt)	4.59	49.93
Número de cetanos	45-55	40-45
Enxofre	1.0-1.2	0.13

Fonte: <http://www.pinhaomanso.com.br/pinhaomanso.html> (modificado); KUMAR e SHARMA, 2008 (modificado).

**Tabela 3 – Estrutura química dos ácidos graxos do óleo da *Jatropha curcas* (pinhão-mansão)**

Nome comum	Estrutura	Notação
Ácido palmítico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	16:0
Acido esteárico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	18:0
Acido oléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1
Acido linoléico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2

Fonte: [http://pt.wikibooks.org/wiki/Bioqu%C3%ADmica/%C3%81cidos\\_gordos](http://pt.wikibooks.org/wiki/Bioqu%C3%ADmica/%C3%81cidos_gordos).

Segundo Arruda *et al.* (2004) a produtividade do pinhão-mansão varia em função da região de plantio, do método de cultivo e tratamentos culturais, idade da cultura, bem como da quantidade de chuva e fertilidade do solo. Para CARNIELLI (2003), o pinhão-mansão produz, no mínimo, duas toneladas de óleo por hectare/ano. Para a concretização da produção em grande escala de biodiesel, é preciso também de alta produção de óleo por hectare, fazendo-se necessário a propagação do pinhão-mansão.

### 1.3 Propagação da *Jatropha curcas*

O pinhão-mansão pode se estabelecer por duas maneiras: por sementes ou por clonagem. Independente da forma de propagação, a seleção das matrizes deverá ser rigorosa, dando preferência às plantas superiores. Além das características genéticas e procedência das sementes, a formação, o vigor e sanidade das mudas são indispensáveis para obtenção de plantas mais produtivas (NUNES, 2007).

A propagação por sementes é vantajosa por gerar indivíduos mais vigorosos e duradouros, atingindo idade produtiva após quatro anos, porém é mais tardia e apresenta grandes índices de polinização cruzada, o que determina alta variabilidade genética nos cultivos seminais (ARRUDA *et al.*, 2004; NUNES, 2007). Quando em boas condições de produção, sua longevidade alcança cerca de 30 a 50 anos de vida (CORTESÃO, 1956).

Uma solução para a grande variabilidade encontrada em plantas obtidas a partir de sementes quanto à produtividade agrícola é a propagação clonal, pois esta técnica poderá contribuir para a maximização dos ganhos em uma única geração, mantendo características desejáveis pelos agricultores (GERALD *et al.*, 2006). A via clonal ou vegetativa do pinhão-mansão se estabelece por estaquias, enxertia e micropropagação ou cultura de tecidos vegetais *in vitro* (SATURNINO *et al.*, 2005).

As plantas provenientes de estacas são de vida mais curta, sistema radicular mais fraco, baixa resistência à seca e doenças, porém começam a produzir já no segundo ano (CORTESÃO, 1956; DEORE & JOHNSON, 2008; SHRIVASTAVA & BANERJEE, 2008). No entanto, a inconveniência da multiplicação por estacas, está no grande volume de cortes (estacas) necessários para a propagação em escala comercial (SATURNINO *et al.*, 2005). Plantas propagadas de enxertos apresentam dificuldade de enraizar, pois desenvolvem apenas raízes laterais (SALÉ, 2008).

A propagação do pinhão manso por estacas ou sementes apresenta bons resultados em relação ao percentual de germinação, entretanto o desenvolvimento lento e não uniforme das mudas, juntamente com os danos causados por pragas, podem limitar o desenvolvimento de mudas e sua posterior comercialização (<http://www.pinhaomanso.com.br/pinhaomanso.html>).

As culturas de tecidos foram desenvolvidas para a propagação e conservação do genótipo selecionado de plantas tropicais (ENGELMANN, 1991). Comparado às técnicas convencionais, estes protocolos forneceram altas taxas de multiplicação e minimizam o risco de doenças. Considerada uma ferramenta de trabalho de grande importância, as técnicas de cultura de tecidos vegetais fazem parte da Biotecnologia e, juntas trabalham, desenvolvendo estudos relacionados ao metabolismo, fisiologia, desenvolvimento e reprodução de plantas com propriedades desejáveis. Estas podem ser utilizadas como técnica auxiliar ao melhoramento genético convencional, participando de diferentes etapas, em alguns casos, apresentando soluções únicas, capaz de ampliar a variabilidade genética, reduzir o tempo para lançamento de novos cultivares, introduzir genes de interesse agrônomo entre outras (FERREIRA *et al.*, 1998, NUNES, 2007).

A micropropagação pode ser definida como a regeneração *in vitro* de plantas a partir de órgãos, tecidos, células ou protoplastos usando técnicas de cultura de tecidos para produzir uma planta de um genótipo selecionado. Em geral, o tecido de uma planta comumente conhecido como explante é isolado para criar uma cultura de tecido estéril das espécies *in vitro* (MURALI *et al.*, 2007; JOHNSON & DEORE, 2008). A cultura é iniciada de um explante. Uma vez que a cultura foi estabelecida e cresceu bem *in vitro*, a multiplicação do tecido ou regeneração da planta inteira pode ser realizada.

A micropropagação vem sendo muito utilizada para a clonagem de plantas, principalmente de espécies ornamentais, hortícolas, como a batata, frutíferas, por exemplo, abacaxi, morango, banana, e essências florestais, como o eucalipto, pois permite acesso mais rápido à mudas de melhor qualidade, especialmente das variedades tradicionais e as desenvolvidas pelos programas de melhoramento genético.

Os primeiros estudos com a cultura do eucalipto no Brasil tiveram início a partir de 1904, mas a primeira plantação clonal comercial de eucalipto no Brasil foi implantada

somente em 1979. O período de 1980 a 1995 caracterizou-se pela grande ênfase à propagação clonal e no início dos anos 90 pela técnica de cultura de tecidos. A seleção clonal, associada às técnicas de propagação, contribuiu para expressivo aumento no volume de madeira e produção de celulose por hectare. Atualmente o Brasil possui mais de 3,5 milhões de hectares de eucalipto, gerando milhões de empregos diretos e indiretos (BISON, 2004, CARVALHO, 2006).

Analisando as diferentes vias de propagação vegetativa é possível notar que a micropropagação é superior às demais, por oferecer multiplicação acelerada, menor necessidade de espaço físico, ausência de pragas e doenças durante o cultivo *in vitro*, além de ser uma técnica segura, graças ao maior controle dos fatores envolvidos e manter a identidade genética do genótipo propagado (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998, HIGASHI *et al.*, 2002).

Além da produção de mudas em grande escala em qualquer época do ano e com economia de tempo e espaço, a micropropagação ainda permite a uniformidade no desenvolvimento das mudas, o que permite a uniformização do plantio e sincronização da colheita. Alves *et al.* (2004), relatam que mudas micropropagadas sobrevivem mais no campo e crescem mais rapidamente nos primeiros estádios de desenvolvimento, do que as mudas convencionais. No entanto, existe a necessidade de se ajustar, para cada espécie, e/ou cultivar, as melhores condições de cultivo, para que se obtenha sucesso no processo (ERIG *et al.*, 2002).

Para atender a demanda por material vegetativo de pinhão-manso é necessária grande quantidade de material propagado, cujas técnicas convencionais de propagação não possibilitariam alcançar tal objetivo em curto prazo. As possibilidades aumentam com o uso da técnica da micropropagação. Com esta técnica, as dificuldades de reprodução são reduzidas, pois ela permite uma seleção precoce de material superior e uma produção em larga escala e em pequeno espaço físico. Sendo uma tecnologia adequada para culturas de ciclo longo, assim como *J. curcas*, visando à formação de plantios clonais.

A cultura *in vitro* de *J. curcas* é uma prática recente, cujo domínio ainda exige pesquisa e adaptação, pois são poucos os trabalhos com esta espécie. Wei *et al.* (2004) que utilizaram a micropropagação de *J. curcas*, relataram à regeneração via epicótilo no meio de Murashige e Skoog (1962), denominado MS suplementado com 6-benziladenina (BA) e ácido indolbutírico (AIB). Rajore e Batra (2005) apresentaram um método para a regeneração via ápices caulinares. Sujatha *et al.* (2005) desenvolveu um método para a proliferação de brotos e segmentos foliares de *J. curcas* não tóxica. Jha *et al.* (2007) propôs a regeneração de tecidos foliares via embriogênese somática. Murali *et al.* (2007) descreveram um método para a micropropagação *in vitro* em meio MS via meristemas com uma reduzida concentração de fitohormônios.

O crescimento e desenvolvimento *in vitro* de uma planta são determinados por vários fatores, como: genótipo, fonte de explante e a condição da cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998, NUNES, 2007). A escolha do genótipo a ser utilizado na cultura de tecidos vai depender dos objetivos experimentais.

A fonte de explante também é fator importante no sucesso da regeneração *in vitro*, pois a capacidade de regeneração depende da maturidade, do estado fisiológico e do tecido utilizado. Diversos explantes podem ser utilizados para iniciar a propagação *in vitro* de uma planta, em vista da totipotência das células vegetais. Entretanto, procura-se utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Normalmente, se tem maior sucesso utilizando tecidos jovens (PERES, 2002). Segundo Erig e Schuch (2005), o explante ideal deve ser estabelecido para cada genótipo de interesse.

As condições de cultura, principalmente o meio de cultura são decisivos para o sucesso da regeneração *in vitro*. Os meios nutritivos utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (CALDAS *et al.*, 1998).

O meio de cultura é constituído de componentes essenciais e opcionais. Os essenciais compreendem água, sais inorgânicos, fonte de carbono e energia, vitaminas e reguladores de crescimento e, os opcionais aminoácidos, amidas, ácidos orgânicos e substâncias naturais complexas (TORRES *et al.*, 2001). Os meios nutritivos atendem como princípio, as exigências de uma planta completa (CALDAS *et al.*, 1998). A adição de fitorreguladores ao meio tem por finalidade prover possíveis carências endógenas, pois o explante encontra-se isolado das regiões produtoras e hormônios na planta matriz (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Na cultura de tecidos, as citocininas mais comumente utilizadas são a cinetina (CIN), 6-benzilaminopurina (BAP), zeatina (ZEA), isopenteniladenina (2ip) e thidiazuron (TDZ), e as auxinas são o ácido 3-indolacético (AIA), ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolbutírico (AIB) e o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (CALDAS *et al.*, 1998). As citocininas e auxinas têm sido aplicadas em vários aspectos do desenvolvimento e crescimento da planta. Aplicações exógenas de auxinas e citocininas induzem a divisão celular em cultura de tecidos e a formação da parte aérea e raiz, são reguladas pela adição de citocininas e auxinas, respectivamente (PALLARDY & KOZLOWSKI, 2008).

A combinação adequada entre esses componentes, associada às demais condições da cultura (luz, temperatura, concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) é a base da tecnologia da cultura de tecidos vegetais. Várias são as formulações de meio usadas na cultura *in vitro*, elas se diferem uma das outras basicamente em relação à concentração dos sais (CALDAS *et al.*,

1998). Entretanto, para cada tipo de explante, espécie e cultivar, o meio de cultura mais adequado e eficiente deve ser determinado experimentalmente.

Mediante a importância econômica do pinhão-mansão e devido ao seu grande interesse no mercado interno com a produção de óleo e, para gerar excedente exportável, torna-se necessário à otimização de um protocolo, visando o crescimento *in vitro* para a produção regular em larga escala de mudas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Geral:**

Aperfeiçoar um protocolo para a regeneração *in vitro* em massa de *Jatropha curcas*.

### **2.2 Específicos:**

- ❖ Obtenção de um meio de cultura ideal para as etapas de: indução, proliferação e alongamento dos brotos e subcultivo;
- ❖ Enraizar as mudas;
- ❖ Determinar o tipo de substrato para aclimatização das mudas;
- ❖ Comparar o tipo de explante ideal para este protocolo.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos para regeneração *in vitro* de *Jatropha curcas* (pinhão-mansão) foi realizado no laboratório da empresa Phoneutria Biotecnologia e Serviços Ltda., situado em Belo Horizonte, Minas Gerais. Estudos anteriores com a micropropagação do pinhão-mansão realizados na empresa utilizando segmentos foliares e ápices caulinares não foram satisfatórios, portanto esta dissertação consiste em experimentos de indução de brotações em embriões zigóticos e micropropagação em meristemas: indução, proliferação e alongamento dos brotos, subcultivo, enraizamento e aclimatização. A metodologia foi representada resumidamente, devido à proteção intelectual dos dados.

#### 3.1 Condições gerais das culturas

Os explantes foram transferidos para placas de Petri contendo papel filtro estéril, onde foram excisados com o auxílio de bisturi com lâmina número 10 e pinça, em seguida inoculados, em frascos de vidro de 340 ml, contendo 30 ml do meio de cultivo estéril, constituído de sais básicos do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) (Sigma®) modificado de acordo com cada experimento. Os meios tiveram o pH ajustado para  $5,8 \pm 1$  antes da autoclavagem a  $120^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos. Logo após a inoculação, os frascos contendo os explantes foram tampados, vedados com filme de PVC (Homepack®) e transferidos para a sala de crescimento a  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas de 20W (Osram®) com fotoperíodo de 16 horas.

#### 3.2 Embriogênese zigótica

Para o início da regeneração *in vitro* do pinhão-mansão, foram descascadas manualmente, aproximadamente 400 sementes adquiridas comercialmente da Fazenda Tominaga, Janaúba, Minas Gerais. Em seguida, realizou-se o procedimento de assepsia por imersão das sementes em água destilada e 100  $\mu\text{l}$  do detergente comercial Ypê® por um minuto, seguido de álcool 70% v/v por um minuto e hipoclorito de sódio 1% v/v do produto comercial Santa Clara® por 20 minutos sob agitação constante (aproximadamente 50 rotações por minuto). Após o tratamento com detergente e álcool e desinfestação com hipoclorito de sódio, um tríplice enxágüe foi realizado em capela de fluxo laminar com água destilada estéril (NUNES, 2007).

Em câmara de fluxo laminar, os tegumentos das sementes foram separados longitudinalmente pela região oposta à micrópila com o auxílio de instrumentos cirúrgicos, cuidando para não provocar danos aos embriões. Os mesmos foram excisados e inoculados, três a três, em 30 ml de meio de cultivo básico MS (MURASHIGE & SKOOG,

1962) (Sigma®) contendo sais básicos, vitaminas do meio B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), sacarose (Sigma®), ágar (Merck®) e carvão ativado (Cromoline®). Os frascos foram mantidos em sala de crescimento por 20 dias (PROTÓCOLOS DE MICROPROPAGAÇÃO DO PINHÃO-MANSO, 2007) (Figura 3).



**FIGURA 3 - Fluxograma ilustrativo contendo os estágios da embriogênese zigótica *in vitro*.** Sementes de pinhão-mansco (*Jatropha curcas*) foram descascadas manualmente e submetidas à assepsia por imersão das sementes em água destilada e 100 µl do detergente comercial por um minuto, seguido de álcool 70% v/v por um minuto e hipoclorito de sódio 1% v/v por 20 minutos sob agitação constante (aproximadamente 50 rotações/min). Após o tratamento com detergente e álcool e desinfestação com hipoclorito de sódio, um triplice enxágüe foi feito em capela de fluxo laminar com água destilada estéril. Em câmara de fluxo laminar, embriões foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, inoculados e cultivados em 30 ml de meio com de sais básicos do meio MS (MURASHIGE & SKOOG, 1962) acrescido de vitaminas do meio B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), ágar, sacarose e carvão ativado. Após a inoculação os embriões foram mantidos em sala de crescimento por 20 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Foram utilizadas aproximadamente 400 sementes para a embriogênese zigótica *in vitro*.

### 3.3 Micropropagação

#### 3.3.1 Indução de brotações

Para a indução da parte aérea *in vitro*, meristemas (apical e lateral) de pinhão-mansco obtidos de plântulas com cerca de 20 dias de cultivo *in vitro* oriundas de embriões zigóticos, foram utilizados como explante e inoculados, três a três, no meio de cultivo. De acordo com Murali *et al.* (2007) e estudos feitos na empresa Phoneutria anterior a esta dissertação com a micropropagação do pinhão-mansco, mostraram baixa eficiência do processo final quando outras partes da planta foram utilizadas.

Meristemas excisados foram submetidos a três experimentos distintos: no tratamento 1, um total de 255 meristemas foram inoculados em meio MS, acrescido de vitaminas do meio B5 (GAMBORG *et al.*, 1968), denominado MSB5, suplementado com a auxina ácido 3-indolacético (AIA) (Sigma®) e diferentes concentrações da citocinina 6-benzilaminopurina

(BAP) (Sigma®), no tratamento 2, um total de 240 meristemas foram inoculados em MSB5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e no tratamento 3, um total de 246 meristemas foram inoculados em MS ausente de vitaminas do meio B5 e acrescido com diferentes concentrações de BAP (MURALI *et al.*, 2007; PROTOCOLOS DE MICROPROPAGAÇÃO DO PINHÃO-MANSO, 2007 modificados).

Após 28 dias de estabelecimento *in vitro* para a indução das brotações, as plântulas foram avaliadas baseadas nas seguintes variáveis:

- a) número de brotações e/ou raízes por tratamento – obtido por contagem do número de brotações e/ou raízes emitida por cada indivíduo nos diferentes tratamentos;
- b) porcentagem de explantes (meristemas) que desenvolveram brotos - obtido pela contagem do número de meristemas que desenvolveram brotos, dividido pelo número de meristemas total, multiplicado por 100;
- c) número médio de brotos regenerados – obtido pela contagem do número total de brotos regenerados dividido pelo número de meristemas que desenvolveram os mesmos;
- d) número de brotações por explante (meristemas) – obtido por contagem do número de brotações emitida dividido pelo número de meristemas total (taxa de multiplicação);

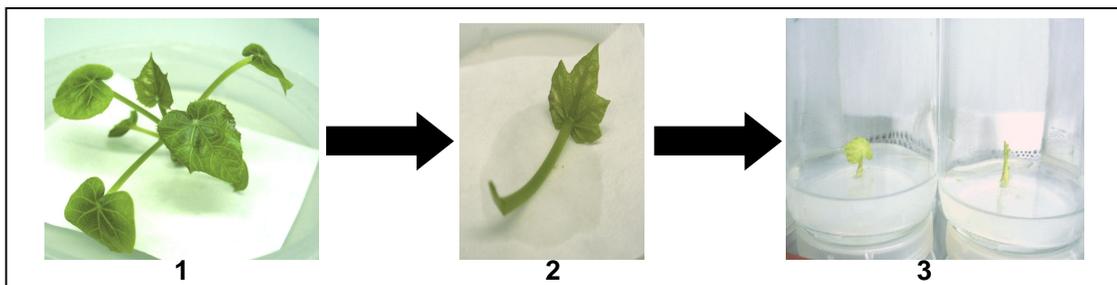
### 3.3.2 Proliferação e alongamento dos brotos

Para a etapa de proliferação, brotos de pinhão-manso foram obtidos das plântulas regeneradas durante a indução da parte aérea *in vitro*, utilizados como explante e submetidos, individualmente, a dois experimentos distintos: brotos foram inoculados em 30 ml de meio de cultivo estéril, MSB5 suplementado com diferentes concentrações de BAP (Sigma®) (Figura 4) (MURALI *et al.*, 2007 modificado).

Após 28 dias de estabelecimento da proliferação *in vitro* dos brotos, as plântulas foram avaliadas baseadas nas seguintes variáveis:

- a) número de brotações e/ou raízes por tratamento – obtido por contagem do número de brotações e/ou raízes emitida por cada indivíduo nos diferentes tratamentos;
- b) porcentagem de explantes (brotos) que desenvolveram sub-brotos 1 – obtido pela contagem do número de brotos que desenvolveram sub-brotos 1, dividido pelo número de brotos total, multiplicado por 100;
- c) número médio de sub-brotos 1 regenerados – obtido pela contagem do número total de sub-brotos 1 regenerados dividido pelo número de brotos que desenvolveram os mesmos;

- d) número de sub-brotos 1 por explante (brotos) – obtido por contagem do número de sub-brotos 1 emitido dividido pelo número de brotos total (taxa de multiplicação);



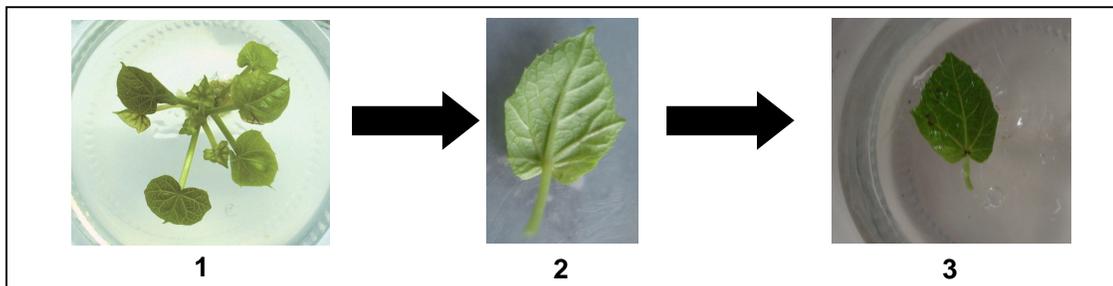
**FIGURA 4 - Fluxograma ilustrativo da etapa de proliferação de *Jatropha curcas*.** Brotos de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) provenientes indução da parte aérea *in vitro* (1), foram excisados com auxílio de pinça e bisturi (2), e submetidos para proliferação (3), a dois experimentos distintos: os brotos foram inoculados em 30 ml de meio de cultivo estéril, MSB5 suplementado com diferentes concentrações de BAP (3) e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

### 3.3.3 Subcultivo para enraizamento

Sub-brotos 1 de pinhão-mansão obtidos das plântulas regeneradas durante a etapa de proliferação e alongamento foram utilizados como fonte de explante durante a etapa de subcultivo para enraizamento e conduzidos a dois experimentos distintos: no primeiro experimento, sub-brotos 1 provenientes da proliferação e alongamento em MSB5 COM BAP foram inoculados em tratamento semelhante para o subcultivo, no segundo experimento, sub-brotos 1 oriundos da proliferação e alongamento em MSB5 com BAP, foram inoculados em tratamento semelhante para o subcultivo (Figura 5) (MURALI *et al.*, 2007 modificado).

Após 28 dias de estabelecimento do subcultivo dos sub-brotos *in vitro*, as plântulas foram avaliadas baseadas nas seguintes variáveis:

- número de brotações e/ou raízes por tratamento – obtido por contagem do número de brotações e/ou raízes emitida por cada indivíduo nos diferentes tratamentos;
- porcentagem de explantes (sub-brotos 1) que desenvolveram sub-brotos 2 e/ou raízes – obtido pela contagem do número de sub-brotos 1 que desenvolveram sub-brotos 2, dividido pelo número de sub-brotos 1 total, multiplicado por 100;
- número médio de sub-brotos 2 regenerados (brotos e/ou raízes) – obtido pela contagem do número total de sub-brotos 2 regenerados dividido pelo número de sub-brotos 1 que desenvolveram os mesmos;
- número de sub-brotos 2 e/ou raízes por explante (sub-brotos 1) – obtido por contagem do número de sub-brotos 2 emitido dividido pelo número de sub-brotos 1 total (taxa de multiplicação);



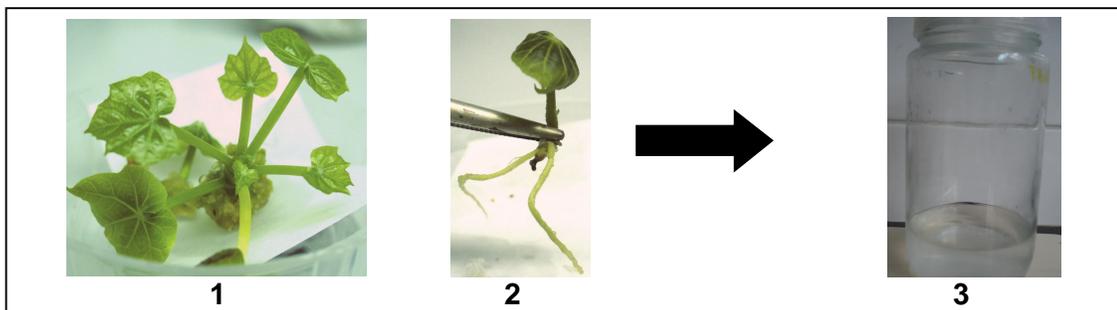
**FIGURA 5 - Fluxograma ilustrativo da etapa de subcultivo de *Jatropha curcas*.** Sub-brotos 1 de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) obtidos das plântulas regeneradas durante a etapa de proliferação e alongamento foram utilizados como fonte de explante durante a etapa de subcultivo enraizamento **(1)**. Estes foram excisados com auxílio de pinça e bisturi **(2)** e conduzidos a dois experimentos distintos **(3)**: no primeiro experimento, sub-brotos 1 provenientes da proliferação e alongamento em MSB5 suplementado com BAP, foram inoculados em tratamento semelhante para o subcultivo, no segundo experimento, sub-brotos 1 oriundos da proliferação e alongamento em MSB5 suplementado com BAP, foram inoculados em tratamento semelhante para o subcultivo e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

### 3.3.4 Enraizamento

Após o subcultivo, os clones de pinhão-mansô, provenientes das etapas de proliferação e subcultivo em MSB5 suplementado com diferentes concentrações de BAP, respectivamente, foram transferidos, individualmente, com o auxílio de pinça para frascos de vidro de 340 ml, contendo 30 ml do meio de cultivo estéril, constituído de sais básicos do meio MS (Sigma®), sacarose (Sigma®), ágar (Merck®) e a auxina ácido indolbutírico (AIB) (Sigma®) (Figura 6) (MURALI *et al.*, 2007). A esterilização dos frascos contendo meio de cultura foi realizada em autoclave, a  $120^\circ\text{C}$ , por 20 minutos.

As plântulas foram avaliadas baseadas nas seguintes variáveis:

- porcentagem de mudas que desenvolveram raízes principais e/ou secundárias – obtido pela contagem do número de mudas que desenvolveram raízes dividido pelo número de explantes total multiplicado por 100;
- número de raízes principais e secundárias por explante (clones) - obtido por contagem do número de raízes emitida dividido pelo número de clones total;
- número médio de estruturas regeneradas (raízes principais e/ou laterais) – obtido pela contagem do número total de estruturas regeneradas dividido pelo número de explantes que desenvolveram as mesmas;
- comprimento do sistema radicular – medido a partir do colo da planta, expresso em centímetros;
- número de raízes por dia - obtido por contagem do número de raízes emitida por dia.



**FIGURA 6 - Fluxograma ilustrativo da etapa de enraizamento de *Jatropha curcas*.** Os clones de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) (1 e 2) foram transferidos, com o auxílio de pinça para frascos de vidro, contendo 30 ml do meio de cultivo estéril (3), constituído de sais básicos do meio MS, sacarose, ágar e AIB e mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas.

### 3.3.5 Aclimatização

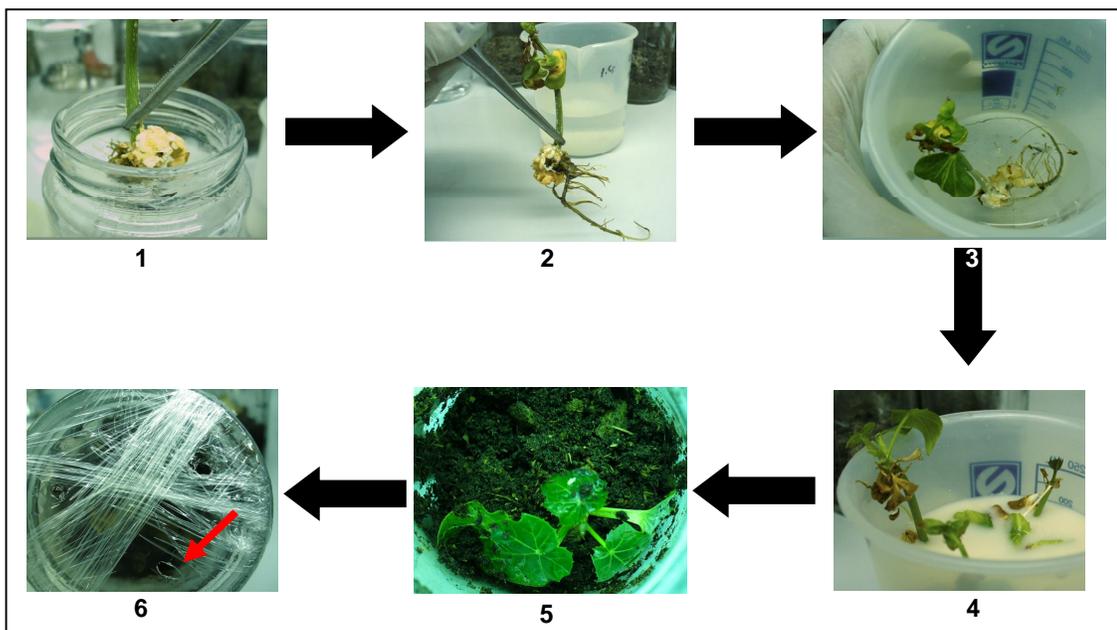
As brotações enraizadas de pinhão-mansão regeneradas *in vitro* tiveram suas raízes lavadas, para eliminar qualquer quantidade de resíduo de meio de cultura, posteriormente foram mergulhadas em fungicida 1% Cercobin 700W (Ihara®) por 10 minutos e transferidas para frascos de vidro contendo substrato estéril, modificado de acordo com cada experimento. A esterilização dos frascos contendo substrato foi realizada em autoclave, a  $120^\circ\text{C}$ , por 20 minutos.

As brotações foram submetidas a experimentos distintos: no primeiro experimento, denominado TEF, as plântulas foram plantadas em substrato a base de terra vegetal (Vitaplan®) e esterco, no segundo experimento, denominado TEAF, as plântulas foram plantadas em substrato a base de terra vegetal, esterco e areia, ambos os experimentos irrigados semanalmente com fertilizante 1%, no terceiro experimento, denominado TEMS, as plântulas foram plantadas em substrato a base de terra vegetal e esterco, no quarto experimento, denominado TEAMS, as plântulas foram plantadas em substrato a base de terra vegetal, esterco e areia, ambos os experimentos irrigados semanalmente com solução 1% do meio MS (Sigma®) (Figura 6) (OLIVEIRA *et al.*, 2000, LAMB *et al.*, 2002, MOGHAIEB *et al.*, 2006, MURALI *et al.*, 2007 modificados).

Logo após o plantio, os frascos com as plântulas foram vedados com filme de PVC (Homepack®), nas duas primeiras semanas, e a cada sete dias foram feitos orifícios, para a adaptação gradativa as condições ambientais. Estas permaneceram na presença de luz 16 horas por dia, irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas de 20W (Osram®), com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , por quatro semanas, em sala de crescimento, regadas com solução nutritiva.

Após este período, foram retirados os filmes de PVC e as plantas gradualmente expostas à luz solar e avaliadas baseadas na taxa de sobrevivência. Devido à morte dos clones durante esta etapa, 64 mudas provenientes da embriogênese zigótica em meio com

50% de sais básicos do meio MS, acrescido de vitaminas do meio B5, 0,7% de ágar, 3% de sacarose e 0,1% de carvão ativado, foram submetidas à aclimatização seguindo o mesmo protocolo descrito acima.



**FIGURA 7 - Fluxograma ilustrativo da etapa de aclimatização de *Jatropha curcas*.** Brotações enraizadas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) provenientes de embriogênese zigótica e mudas provenientes da micropropagação (1 e 2), tiveram suas raízes lavadas com água estéril (3), posteriormente foram mergulhadas em fungicida 1% por 10 minutos (4) e transferidas para frascos de vidro contendo substrato estéril (5), modificado de acordo com cada experimento. As brotações e mudas foram submetidas a quatro experimentos distintos: no primeiro experimento, denominado TEF, as plântulas foram inoculadas em substrato a base de terra vegetal e esterco, no segundo experimento, denominado TEAF, as plântulas foram inoculadas em substrato a base de terra vegetal, esterco e areia, ambos os experimentos irrigados semanalmente com fertilizante 1%, no terceiro experimento, denominado TEMS, as plântulas foram inoculadas em substrato a base de terra vegetal e esterco, no quarto experimento, denominado TEAMS, as plântulas foram inoculadas em substrato a base de terra vegetal, esterco e areia, ambos os experimentos irrigados semanalmente com solução 1% do meio MS. Logo após a inoculação, os frascos com as plântulas foram vedados com filme de PVC, nas duas primeiras semanas, e a cada sete dias foram feitos orifícios (5), indicado pela **seta vermelha**, para a adaptação gradativa da planta as condições ambientais. Estas plantas permaneceram na presença de luz 16 horas por dia, irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fornecidas por lâmpadas fluorescentes brancas de 20W, com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , por quatro semanas, em sala de crescimento.

### 3.3.6 Meristemas: apical x lateral

No desenvolvimento dos experimentos para micropropagação do pinhão-manso, foram observadas diferenças na resposta aos tratamentos entre meristemas apicais e laterais, portanto uma comparação do tipo de explante ideal com os resultados mais eficientes dos itens 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3 foi realizada.

Após 28 dias de estabelecimento *in vitro* em cada etapa, as plântulas foram avaliadas baseadas nas seguintes variáveis:

- a) porcentagem de explantes que desenvolveram brotos e/ou raízes – obtido pela contagem do número de explantes que desenvolveram estruturas regeneradas dividido pelo número de explantes total multiplicado por 100;
- b) número médio de estruturas regeneradas (brotos e/ou raízes) – obtido pela contagem do número total de estruturas regeneradas dividido pelo número de explantes que desenvolveram as mesmas;
- c) número de brotações e/ou raízes por explante – obtido por contagem do número de brotações emitida por explante (taxa de multiplicação);

Após a etapa de subcultivo, foi seguido o mesmo protocolo descrito nos itens 3.3.4 e 3.3.5.

### **3.3.7 Análises estatísticas**

Os resultados obtidos foram analisados com o auxílio do programa GraphPad InStat versão 3.00 (GraphPad Software, San Diego Califórnia USA) sendo estimadas as médias e desvios padrões da média (DPM) do número de estruturas regeneradas em cada tratamento nas diferentes etapas da micro manipulação. Os dados obtidos foram expressos como média  $\pm$  DPM. Utilizou-se o programa GraphPad InStat para a análise de variância (ANOVA) e o teste Student-Newman-Keuls quando eram comparados explantes submetidos a cinco diferentes tratamentos (ou seja as diferentes concentrações de BAP) e o teste t de Student quando existia dois tratamentos (por exemplo, meristema apical *versus* lateral e concentrações de BAP). O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .

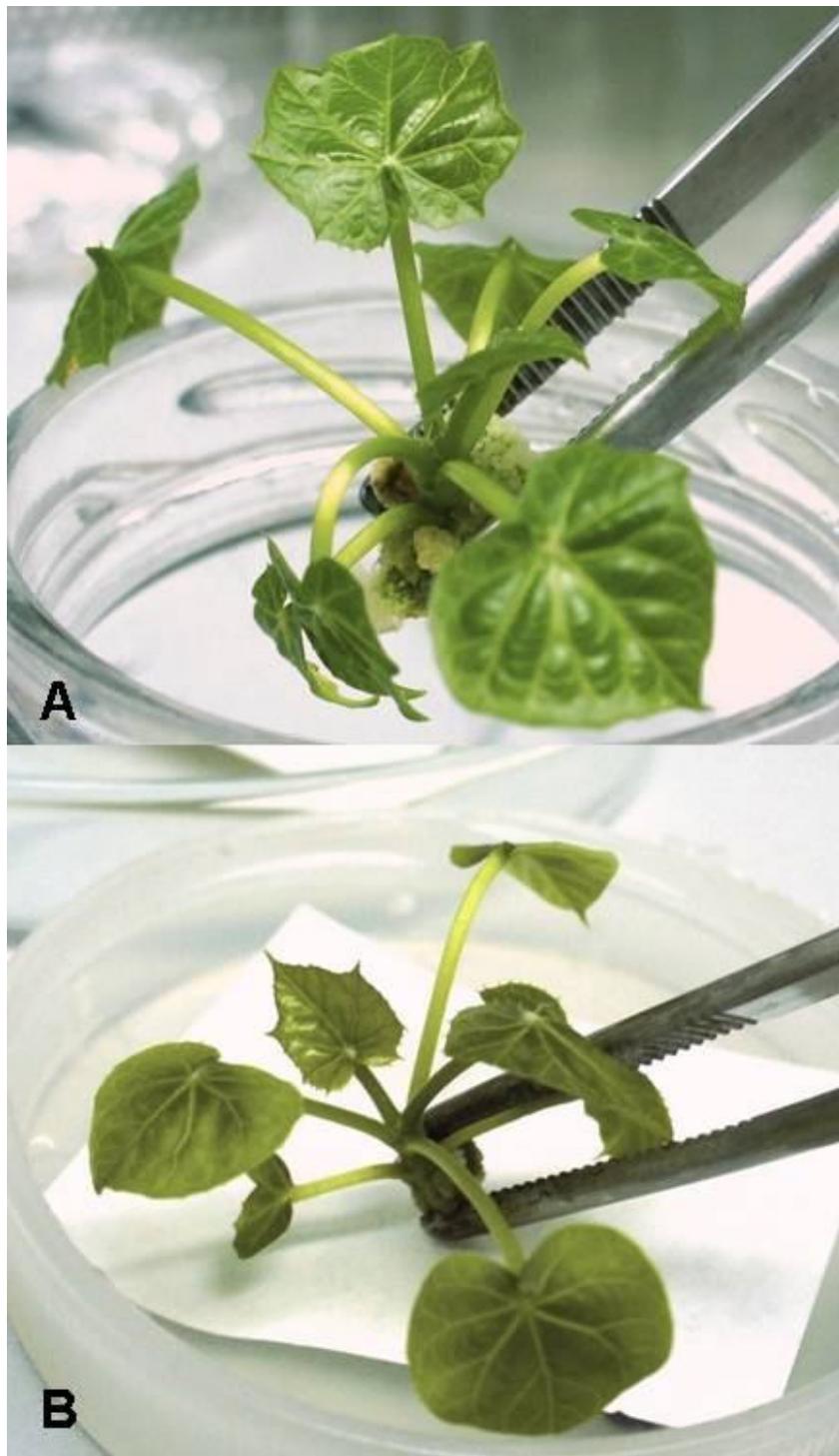
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Indução de brotações

Os resultados foram representados resumidamente, devido à proteção intelectual dos mesmos. O resultado comparativo após 28 dias entre os tratamentos, com meio MS acrescido de vitaminas do meio B5, denominado MSB5, com AIA e diferentes concentrações de BAP (tratamento 1), meio MSB5 com diferentes concentrações de BAP (tratamento 2) e meio MS sem vitaminas do meio B5 e acrescido de diferentes concentrações de BAP (tratamento 3), da etapa de indução da parte aérea *in vitro* do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) mostrou que ocorreu formação de brotos em todos os tratamentos e a porcentagem de meristemas que desenvolveram brotos variou de 4,16% a 25%.

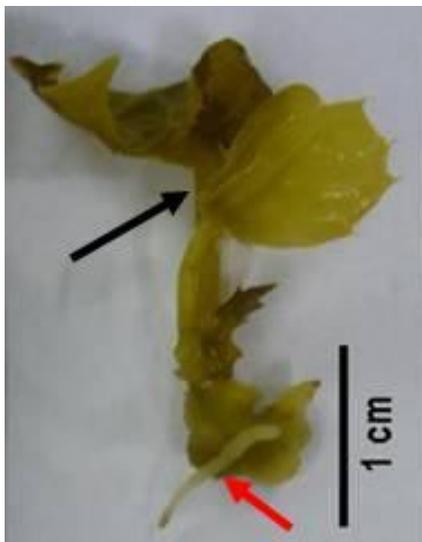
Os melhores resultados quanto ao número médio de brotos regenerados foram verificados com as concentrações mais elevadas de BAP em todos os tratamentos.

Quanto ao número de brotações por explante (meristemas), novamente as concentrações mais elevadas de BAP resultaram em um maior valor em todos os tratamentos. Comparando os três tratamentos avaliados, o melhor resultado obtido ocorreu no segundo, em MSB5, que foi, obteve-se um número máximo de 70 brotos e maior número de brotações (1,45 brotos por explante), ou seja, um em cada 48 meristemas inoculados em MSB5 com BAP tem a probabilidade de formar em média 1,45 brotos, no entanto tivemos um exemplar que formou número máximo de 12 brotos. As aparências dos brotos regenerados a partir de meristemas do tratamento mais eficiente na etapa de indução da parte aérea, MSB5 acrescido com BAP, são mostradas na Figura 8.



**FIGURA 8 – Foto ilustrativa dos brotos de pinhão-mansão regenerados na etapa de indução da parte aérea *in vitro* em MSB5 com BAP.** Meristemas de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) germinados *in vitro* foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram inoculados para a indução de brotos em 30 ml de meio MSB5 com BAP por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. **A** e **B** representam brotos em diferentes ângulos regenerados na etapa de indução da parte aérea *in vitro* em MSB5 com BAP. Foram obtidos 70 brotos deste tratamento. Fotos: Kelly Cristina Magalhães Luiz.

Durante a indução da parte aérea houve a formação de raiz em alguns tratamentos, o que não era o objetivo desta fase. O tratamento 1, em meio MSB5 suplementado com AIA e BAP, apresentou um número total de seis, sete e 12 raízes por tratamento, respectivamente e no tratamento 2, em meio MSB5 houve o aparecimento de uma, revelando que o processo de enraizamento ocorre em razão da presença de auxina e/ou concentrações diluídas de citocinina. A Figura 9 mostra os brotos e raiz, regenerados nesta etapa em meio MSB5, AIA e diferentes concentrações de BAP.

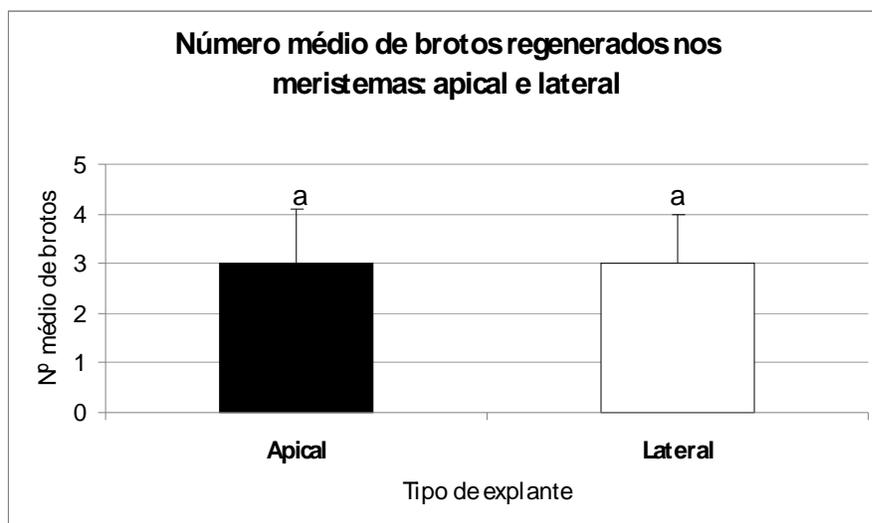


**FIGURA 9 – Foto ilustrativa dos brotos de pinhão-mansinho com raiz, regenerados na etapa de indução da parte aérea *in vitro* em MSB5, AIA e BAP.** Meristemas de pinhão-mansinho (*Jatropha curcas* L.) germinados *in vitro* foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram inoculados para a etapa de indução de brotos em 30 ml de meio MSB5 suplementado com AIA e diferentes concentrações de BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. A **seta preta** destaca os brotos e a **seta vermelha** indica a raiz, regenerados durante a etapa de indução da parte aérea *in vitro* em MSB5, AIA e diferentes concentrações de BAP. Foto: Kelly Cristina Magalhães Luiz.

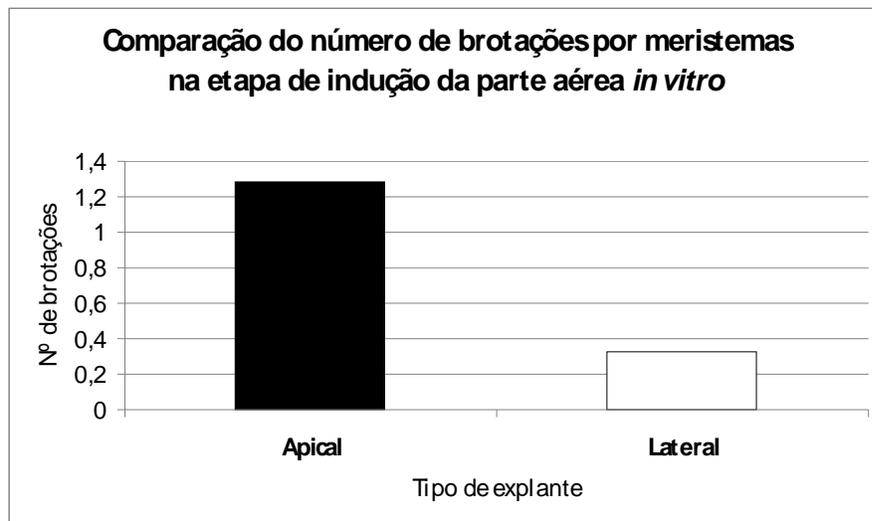
O resultado comparativo entre o explante ideal, meristema apical e/ou lateral para a micropropagação do pinhão-mansinho (*Jatropha curcas* L.), durante a etapa de indução da parte aérea *in vitro*, mostrou que a porcentagem de meristemas que desenvolveram brotos foi maior nos apicais em relação aos laterais, 42,9% e 10,7%, respectivamente (Figura 10). Na comparação do número médio de brotos regenerados nos meristemas apical e lateral mostrada na Figura 11, não houve diferença estatística. Quanto ao número de brotações por explante (meristemas apical ou lateral), meristemas apicais apresentaram maior número de brotações por explante quando comparado com meristemas laterais (Figura 12). Portanto, meristemas apicais são mais eficientes em promover a indução de brotos do pinhão-mansinho.



**FIGURA 10 - Porcentagem de meristemas apicais e laterais que desenvolveram brotos na etapa de indução.** Meristemas apicais e laterais de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) germinados *in vitro* foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram inoculados para a indução de brotos em 30 ml de meio MSB5 suplementado com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Meristemas apicais e laterais apresentaram 42,9 e 10,7% de meristemas que desenvolveram brotos na indução da parte aérea em MSB5 com BAP, respectivamente.



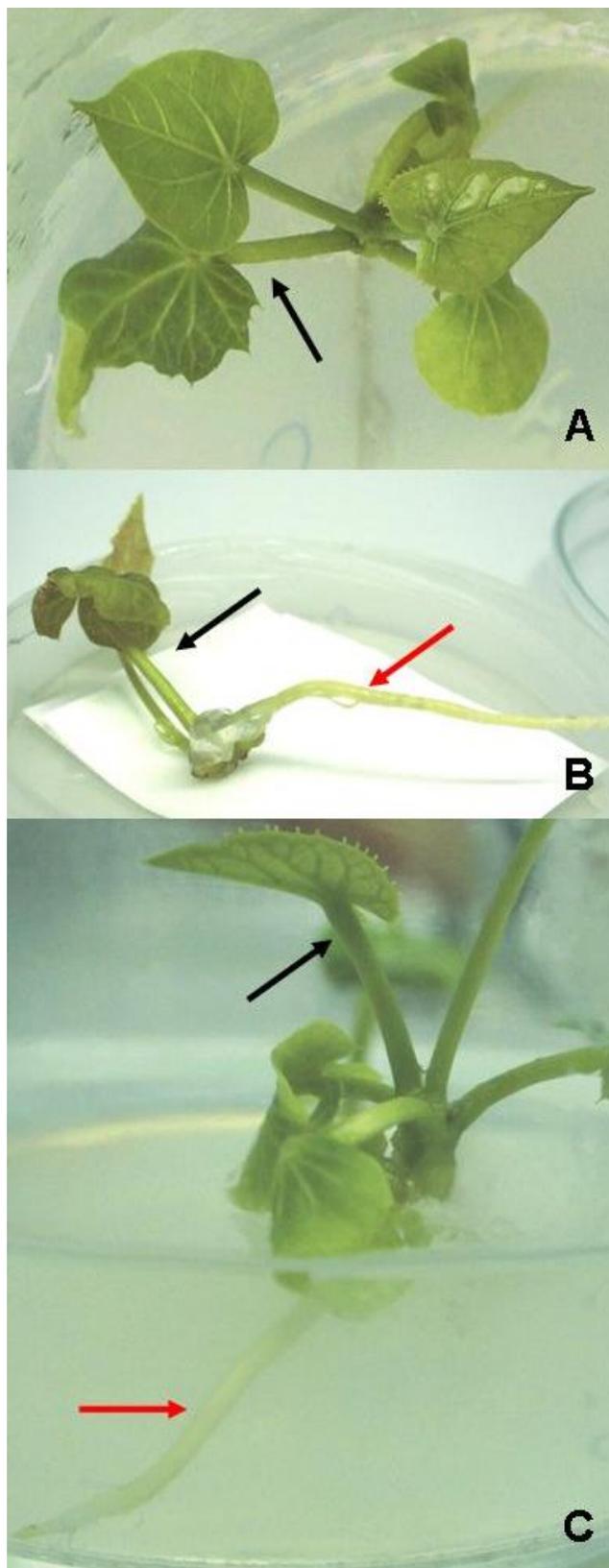
**FIGURA 11 - Número médio de brotos regenerados nos meristemas apicais e laterais na etapa de indução.** Meristemas apicais e laterais de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) germinados *in vitro* foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram inoculados para a indução de brotos em 30 ml de meio MSB5 suplementado com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. O número médio de brotos no meristema apical e lateral na indução da parte aérea em MSB5 com BAP, foi 3 para ambos. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 12 – Comparação do número de brotações por meristemas apicais e laterais na etapa de indução.** Meristemas apicais e laterais de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) germinados *in vitro* foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram inoculados para a indução de brotos em 30 ml de meio MSB5 suplementado com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. O número de brotações por meristema apical e lateral na indução da parte aérea em MSB5 com BAP foi 1,29 e 0,32, respectivamente.

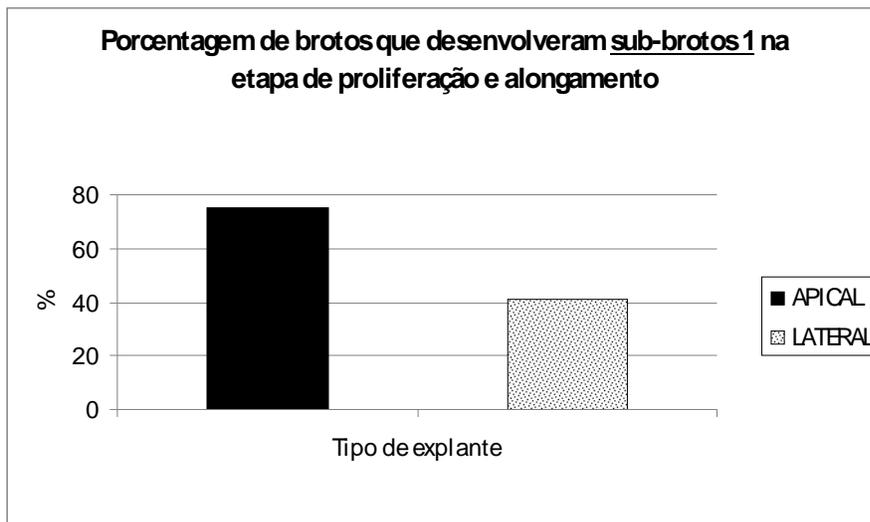
#### 4.2 Proliferação e alongamento dos brotos

Na etapa de proliferação e alongamento em meio MSB5 com BAP além da formação de brotos, ocorreu o desenvolvimento de raízes nos explantes oriundos da indução da parte aérea *in vitro* em meio MSB5 com BAP. Embora o desenvolvimento de raízes não seja objetivo nesta fase, demonstrou-se que meios com concentração reduzida de citocinina aplicados no início do processo de regeneração *in vitro* não inibem a formação de raiz. Os sub-brotos 1 e as raízes produzidos durante a proliferação e alongamento em MSB5 com BAP são mostrados na Figura 13.

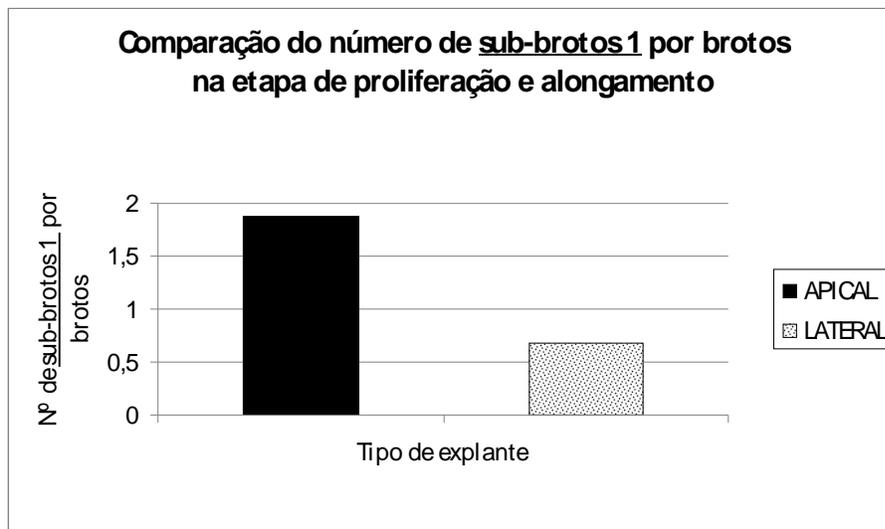


**FIGURA 13 – Foto ilustrativa dos sub-brotos 1 e raízes regenerados durante a etapa de proliferação e alongamento em MSB5 com BAP.** Brotos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) regenerados durante a indução da parte aérea *in vitro* foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram inoculados para a etapa de proliferação e alongamento em 30 ml de meio MSB5 suplementado com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Em **A**, **B** e **C** a **seta preta** destaca sub-brotos 1 regenerados durante a etapa de proliferação e alongamento destes em MSB5 com BAP. Em **B** e **C** a **seta vermelha** indica raízes regeneradas na etapa de proliferação e alongamento em MSB5 com BAP de brotos oriundos da indução da parte aérea. Fotos: Kelly Cristina Magalhães Luiz.

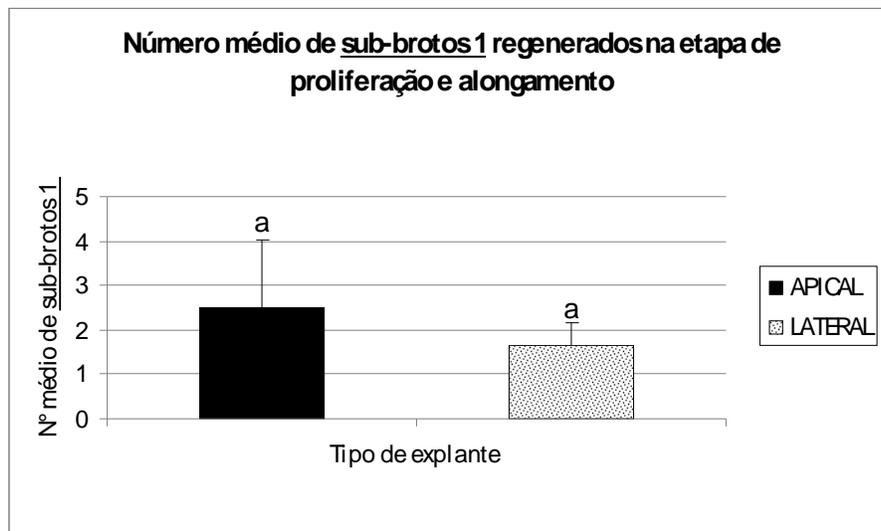
Na etapa de proliferação e alongamento, também foram feitas comparações entre brotos provenientes de meristema apical e do lateral. Nesta análise foi verificado que brotos oriundos do meristema apical apresentam tanto uma maior porcentagem de explante (brotos) que resultaram em sub-brotos 1, quanto maior número de sub-brotos 1 por explante (Figuras 14 e 15). Entretanto, brotos provenientes do meristema apical e lateral apresentam número médio de sub-brotos 1 semelhante (Figura 16).



**FIGURA 14 - Porcentagem de brotos provenientes de meristemas apicais e laterais que desenvolveram sub-brotos 1 na etapa de proliferação e alongamento.** Brotos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), vindos de meristemas apicais e laterais regenerados durante a indução da parte aérea *in vitro* em meio MSB5, suplementado com BAP foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram inoculados para a proliferação e alongamento em 30 ml de meio MSB5 suplementado com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Brotos vindos de meristemas apicais e laterais apresentaram 75 e 40,9% de brotos que desenvolveram sub-brotos 1, respectivamente.



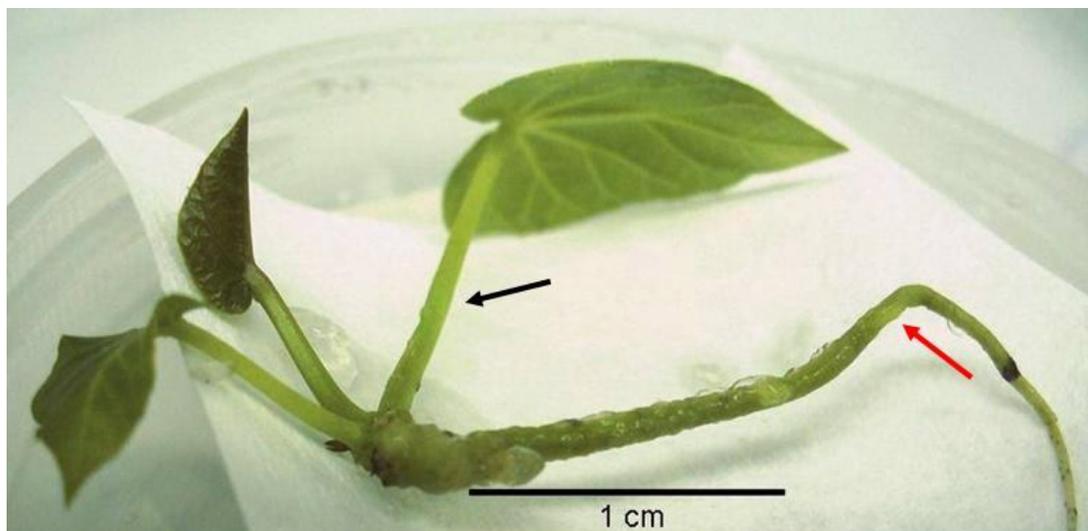
**FIGURA 15 - Comparação do número de sub-brotos 1 por brotos provenientes de meristemas apicais e laterais na etapa de proliferação e alongamento.** Brotos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), vindos de meristemas apicais e laterais regenerados durante a indução da parte aérea *in vitro* em meio MSB5, suplementado com BAP foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram inoculados para a proliferação e alongamento em 30 ml de meio MSB5 suplementado com e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. O número de sub-brotos 1 por brotos vindos de meristemas apicais e laterais na proliferação e alongamento em MSB5 com BAP, foi 1,88 e 0,68, respectivamente.



**FIGURA 16 - Comparação do número médio de sub-brotos 1 provenientes de brotos de meristemas apicais e laterais regenerados na etapa de proliferação e alongamento de brotos.** Brotos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), vindos de meristemas apicais e laterais regenerados durante a indução da parte aérea *in vitro* em meio MSB5, suplementado com BAP foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram inoculados para a proliferação e alongamento em 30 ml de meio MSB5 suplementado com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. O número médio de sub-brotos 1 provenientes de brotos de meristemas apicais e laterais na proliferação e alongamento em MSB5 com BAP, foi 2,5 e 1,6, respectivamente. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

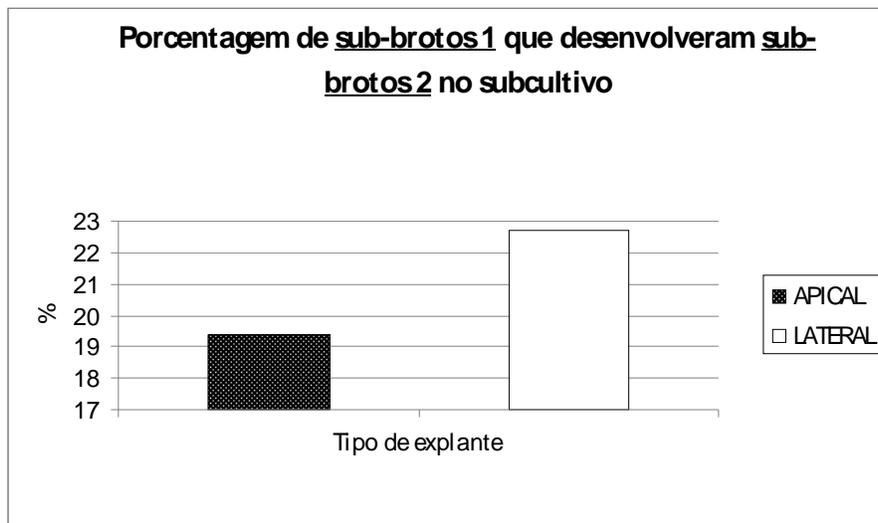
### 4.3 Subcultivo para enraizamento

A Figura 17 demonstra os sub-brotos 2 e as raízes produzidos no tratamento MSB5 com BAP.

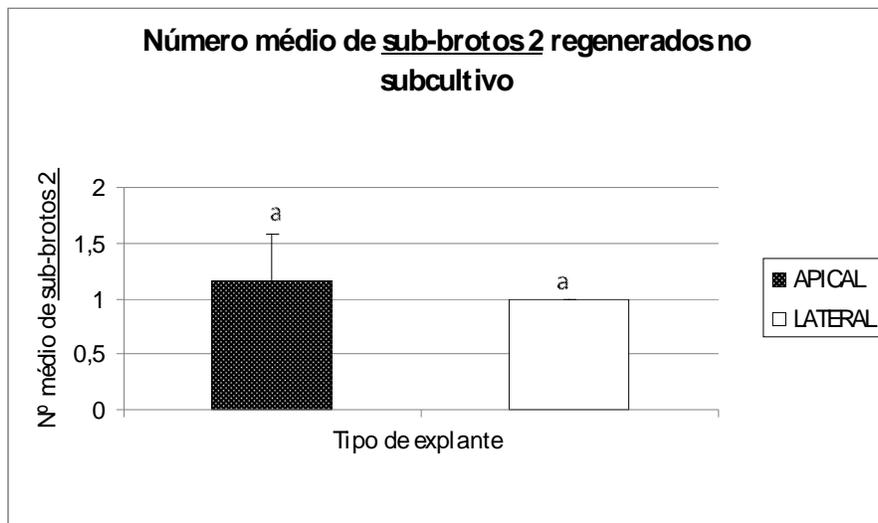


**FIGURA 17 – Foto ilustrativa dos sub-brotes 2 e raízes regenerados durante o subcultivo em MSB5 com BAP.** Brotos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) provenientes da indução da parte aérea *in vitro* foram regenerados na etapa de proliferação e alongamento em MSB5 com BAP, posteriormente sub-brotes 1 foram excisados com auxílio de pinça e bisturi e inoculados para a etapa de subcultivo em 30 ml de meio MSB5 suplementado com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. A **seta preta** destaca os sub-brotes 2 e a **seta vermelha** indica as raízes, regenerados durante a etapa de subcultivo. Foto: Kelly Cristina Magalhães Luiz.

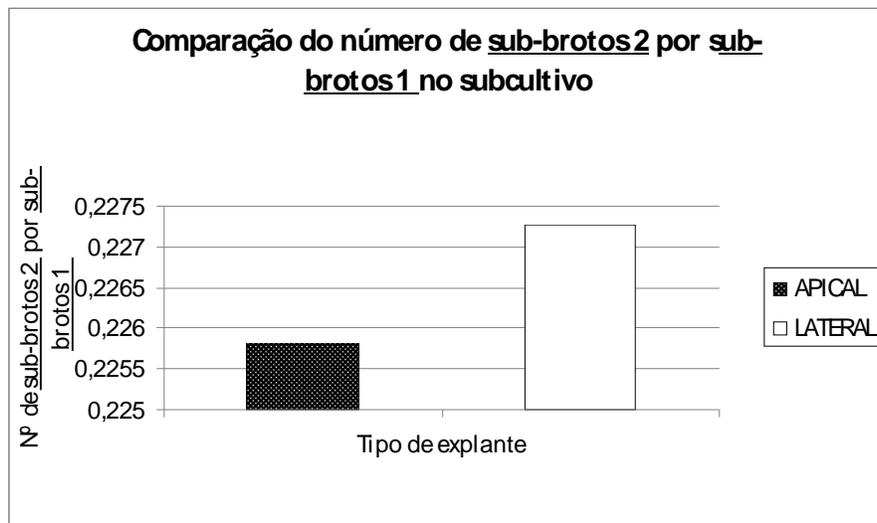
A comparação para o explante ideal no subcultivo, revelou que os meristemas laterais foram superiores aos apicais quanto à porcentagem dos sub-brotes 1 que desenvolveram sub-brotes 2 e quanto ao número de sub-brotes 2 por sub-brotes 1. Entretanto, estes dois meristemas não diferem estatisticamente em relação ao número médio de sub-brotes 2 regenerados (Figuras 18, 19 e 20).



**FIGURA 18 - Porcentagem de sub-brotos 1 de meristemas apicais e laterais que desenvolveram sub-brotos 2 no subcultivo.** Brotos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) regenerados durante a indução da parte aérea *in vitro* em meio MSB5, suplementado com BAP foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram regenerados para a proliferação e alongamento em MSB5 com BAP, posteriormente sub-brotos 1 foram excisados com auxílio de pinça e bisturi e inoculados para a etapa de subcultivo em 30 ml de meio MSB5 com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Sub-brotos 1 provenientes de brotos de meristemas apicais e laterais apresentaram 19,4 e 22,7% de sub-brotos 1 que desenvolveram sub-brotos 2, respectivamente.



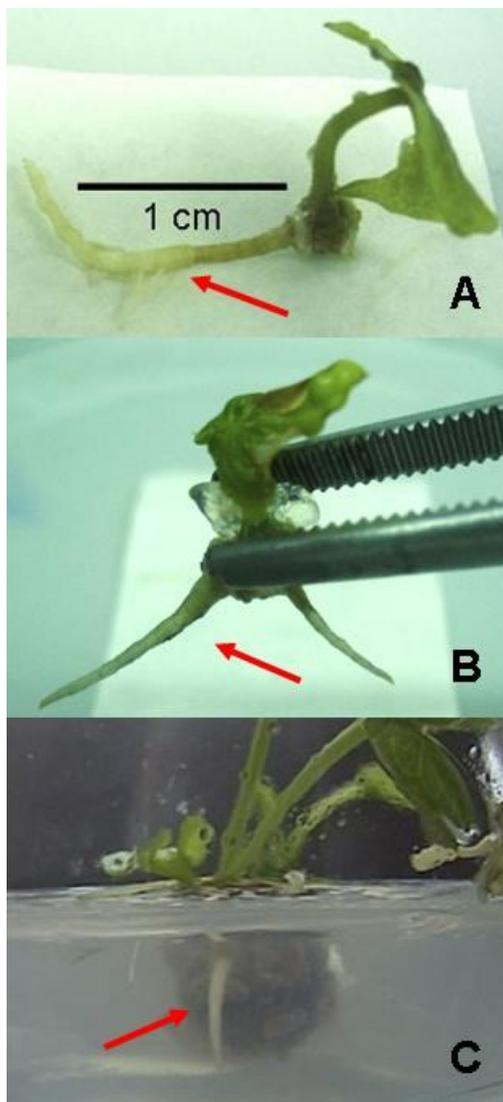
**FIGURA 19 - Comparação do número de sub-brotos 2 provenientes de sub-brotos 1 de meristemas apicais e laterais regenerados no subcultivo.** Brotos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) regenerados durante a indução da parte aérea *in vitro* em meio MSB5, suplementado com BAP foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram regenerados para a proliferação e alongamento em MSB5 com BAP, posteriormente sub-brotos 1 foram excisados com auxílio de pinça e bisturi e inoculados para a etapa de subcultivo em 30 ml de meio MSB5 com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. O número médio de sub-brotos 2 provenientes de sub-brotos 1, de brotos de meristemas apicais e laterais, no subcultivo em MSB5 com BAP, foi 1,2 e 1, respectivamente. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 20 - Comparação do número de sub-brotos 2 por sub-brotos 1 de meristemas apicais e laterais no subcultivo.** Brotos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) regenerados durante a indução da parte aérea *in vitro* em meio MSB5, suplementado com BAP foram excisados com auxílio de pinça e bisturi, em seguida foram regenerados para a proliferação e alongamento dos brotos em MSB5 com BAP, posteriormente sub-brotos 1 foram excisados com auxílio de pinça e bisturi e inoculados para a etapa de subcultivo em 30 ml de meio MSB5 com BAP e mantidos em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. O número de sub-brotos 2 por sub-brotos 1, vindos de brotos de meristemas apicais e laterais, no subcultivo, foi 0,225 e 0,227, respectivamente.

#### 4.4 Enraizamento

A Figura 21 mostra as raízes produzidas durante o enraizamento das mudas provenientes da regeneração em MSB5 com diferentes concentrações de BAP.



**FIGURA 21** – Foto ilustrativa das raízes regeneradas das mudas provenientes dos tratamentos em MSB5 com BAP durante a etapa de enraizamento em MS com AIB. Clones de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) regenerados nas etapas de proliferação e subcultivo em MSB5 com BAP foram inoculados para a etapa de enraizamento em 30 ml de meio com sais básicos do meio MS, ágar, sacarose e AIB e mantidos em sala de crescimento com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas. Em **A**, **B** e **C** a seta vermelha indica as raízes, regeneradas durante de enraizamento em MS com AIB. Fotos: Kelly Cristina Magalhães Luiz.

Na etapa de enraizamento, comparações entre mudas provenientes de meristemas apicais e laterais também foram realizadas e foi verificado o enraizamento apenas com raízes principais em 50% das mudas oriundas de meristemas apicais, já nas mudas provenientes de meristemas laterais a formação de raízes não ocorreu.

#### 4.5 Aclimatização

As mudas aclimatadas nos tratamentos TEF, TEAF, TEMS e TEAMS são mostradas nas Figuras 22, 23, 24 e 25, respectivamente. Os clones plantados não exibiram taxa de sobrevivência nesta etapa, porém as mudas provenientes da embriogênese zigótica exibiram taxas de sobrevivência superiores a 18%. A melhor sobrevivência foi observada no tratamento com terra, esterco, areia e solução 1% do meio MS (TEAMS), seguido dos

tratamentos TEF (terra, esterco e fertilizante 1%), TEMS (terra, esterco e solução 1% MS) e TEAF (terra, esterco, areia e fertilizante 1%) (Figura 26).



**FIGURA 22 – Foto ilustrativa das mudas de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão) aclimatada em terra vegetal, esterco e fertilizante 1%.** Mudas de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) regeneradas nas etapas de embriogênese zigótica em meio com sais básicos do meio MS, acrescido de vitaminas do meio B5, ágar, sacarose e carvão ativado foram lavadas com água estéril, mergulhadas em fungicida e inoculadas para a etapa de aclimatização em frascos de vidro contendo substrato a base de terra vegetal, esterco e fertilizante 1% (TEF) e mantidas em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, irrigadas com solução nutritiva semanalmente. Após este período, foram retiradas as películas de PVC e as mudas foram gradualmente expostas à luz solar. Foto: Kelly Cristina Magalhães Luiz.



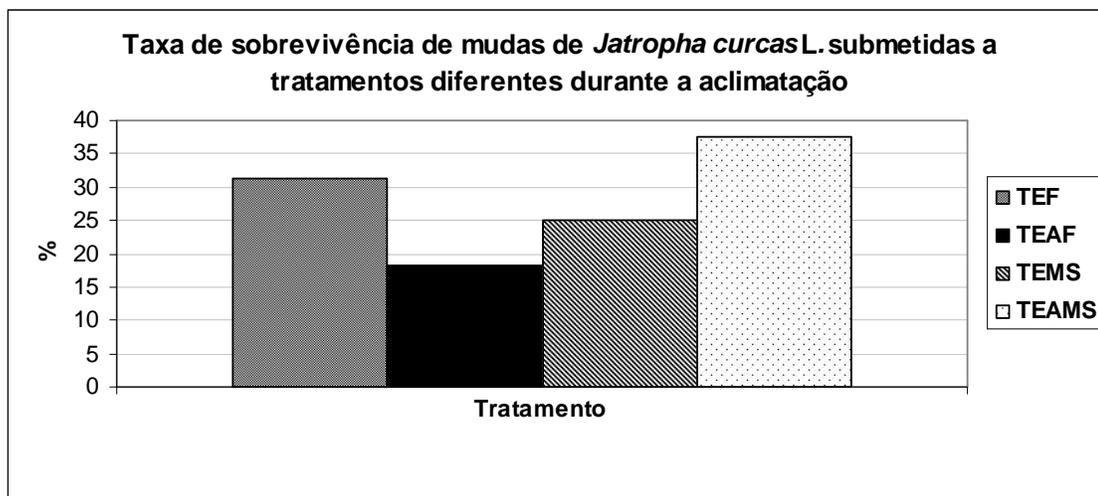
**FIGURA 23 – Foto ilustrativa das mudas de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão) aclimatada em terra vegetal, esterco, areia e fertilizante 1%.** Mudas de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) regeneradas nas etapas de embriogênese zigótica em meio com sais básicos do meio MS, acrescido de vitaminas do meio B5, ágar, sacarose e carvão ativado foram lavadas com água estéril, mergulhadas em fungicida e inoculadas para a etapa de aclimatização em frascos de vidro contendo substrato a base de terra vegetal, esterco, areia e fertilizante 1% (TEAF) e mantidas em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, irrigadas com solução nutritiva semanalmente. Após este período, foram retiradas as películas de PVC e as mudas foram gradualmente expostas à luz solar. Foto: Kelly Cristina Magalhães Luiz.



**FIGURA 24 – Foto ilustrativa das mudas de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão) aclimatada em terra vegetal, esterco e solução 1% MS.** Mudas de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) regeneradas nas etapas de embriogênese zigótica em meio com sais básicos do meio MS, acrescido de vitaminas do meio B5, ágar, sacarose e carvão ativado foram lavadas com água estéril, mergulhadas em fungicida e inoculadas para a etapa de aclimatização em frascos de vidro contendo substrato a base de terra vegetal, esterco e solução 1% MS (TEMS) e mantidas em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, irrigadas com solução nutritiva semanalmente. Após este período, foram retiradas as películas de PVC e as mudas foram gradualmente expostas à luz solar. Foto: Kelly Cristina Magalhães Luiz.



**FIGURA 25 – Foto ilustrativa das mudas de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão) aclimatada em terra vegetal, esterco, areia e solução 1% MS.** Mudas de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) regeneradas nas etapas de embriogênese zigótica em meio com sais básicos do meio MS, acrescido de vitaminas do meio B5, ágar, sacarose e carvão ativado foram lavadas com água estéril, mergulhadas em fungicida e inoculadas para a etapa de aclimatização em frascos de vidro contendo substrato a base de terra vegetal, esterco, areia e solução 1% MS (TEAMS) e mantidas em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, irrigadas com solução nutritiva semanalmente. Após este período, foram retiradas as películas de PVC e as mudas foram gradualmente expostas à luz solar. Foto: Kelly Cristina Magalhães Luiz.



**FIGURA 26 - Comparação da taxa de sobrevivência das mudas de *Jatropha curcas* L. submetidas a tratamentos diferentes na etapa de aclimação.** Mudas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) regeneradas nas etapas de embriogênese zigótica em meio com sais básicos do meio MS, acrescido de vitaminas do meio B5, ágar, sacarose e carvão ativado foram lavadas com água estéril, mergulhadas em fungicida e inoculadas para a etapa de aclimação em frascos de vidro contendo substrato a base de terra vegetal, esterco e fertilizante 1% (TEF), terra vegetal, esterco, areia e fertilizante 1% (TEAF), terra vegetal, esterco e solução 1% MS (TEMS) e terra vegetal, esterco, areia e solução 1% MS (TEAMS) e mantidas em sala de crescimento por 28 dias com temperatura de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ , irradiância de  $35 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e fotoperíodo de 16 horas, irrigadas com solução nutritiva semanalmente. Após este período, foram retiradas as películas de PVC e as mudas foram gradualmente expostas à luz solar. A taxa de sobrevivência foi 31,25%, 18,75%, 25% e 37,5% nos tratamentos TEF, TEAF, TEMS e TEAMS, respectivamente.

## 5 DISCUSSÃO

Os diferentes tratamentos, 1 - meio MS acrescido de vitaminas do meio B5, MSB5, suplementado com AIA e diferentes concentrações de BAP, 2 - meio MSB5 suplementado com diferentes concentrações de BAP e 3 - meio MS acrescido de diferentes concentrações de BAP, nos quais meristemas de pinhão-manso foram submetidos à indução da parte aérea promoveram, de modo geral, indução de brotações em *Jatropha curcas* L. Sendo alcançado no total, um maior número médio de brotações por explante no experimento 2 com MSB5 e BAP, seguido do experimento 3 com MS e BAP e por último o experimento 1 com MSB5, AIA e BAP.

De acordo com Grattapaglia e Machado (1998), a adição de citocininas é favorável, ou até necessária no início do cultivo para suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes. Das citocininas comercialmente disponíveis, o BAP é a que, em geral, apresenta melhores resultados e induz a formação de grandes números de brotos (CALDAS *et al.*, 1998). O efeito benéfico do BAP na multiplicação de brotações relaciona-se com a influência deste regulador na divisão celular e na liberação de gemas auxiliares inibidas pela dominância apical (CORDEIRO *et al.*, 2004). As auxinas são empregadas com menor frequência e quantidades excessivas estimulam a produção de calo, o que não é o objetivo nesta fase. AIA, uma auxina instável, que se degrada devido à fotoxidação e a ação da AIA-oxidase nos tecidos dos explantes, é considerada fraca, comparada com as demais auxinas (CALDAS *et al.*, 1998). O AIA pode ser interessante no início do cultivo, pois ele poderia suprir as necessidades iniciais do explante sem, contudo, ter um efeito excessivamente prolongado, que resultaria na formação de calo e comprometimento da parte aérea (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Os menores números de brotos na indução da parte aérea por meristemas foram obtidos nos tratamentos com as concentrações mais baixas de BAP, o que evidencia a importância desta citocinina para o processo de indução de *J. curcas*. Existem vários trabalhos que relatam à combinação de citocinina e auxina na indução *in vitro* de *J. curcas* (SUJATHA & MUKTA, 1996; SARDANA *et al.*, 2000; SUJATHA & PRABAKARAN, 2003; LI *et al.*, 2008), o que contrasta com o presente estudo, no qual o número total de brotações por explante foi o mais baixo na indução da parte aérea no tratamento suplementado com auxina. Estes trabalhos têm relatado a regeneração passando por um estágio intermediário de calo, sendo mais vulnerável a variação somaclonal e, portanto, podem surgir indivíduos que se distinguem da planta original.

Segundo Krikorian (1993), nos meios de cultura quando o nível de auxina em relação ao de citocinina é alto, promovem a formação de raízes, fato que pode ser observado na indução da parte aérea, principalmente no experimento 1 suplementado com auxina, no qual

houve maior número de formação de raízes. Enquanto que, balanços hormonais favoráveis a citocinina fazem com que se formem brotos, e quando, os balanços são aproximadamente iguais, não levam a uma diferenciação das células e sim a uma maior multiplicação delas e conseqüente crescimento do calo.

O maior número de brotos na indução da parte aérea de pinhão-manso foi o tratamento com meio MSB5 com de BAP com 1,45 brotos por explante. Este resultado está de acordo com Murali *et al.* (2007), em estudos sobre um processo comercialmente viável para a cultura *in vitro* em massa de *J. curcas* em meio MS.

A mesma composição básica na indução e proliferação é relatada por vários autores (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; MURALI *et al.*, 2007). No entanto, apesar do uso de citocininas estimular maior produção de partes aéreas, o seu excesso é tóxico e leva a sérios problemas na fase de enraizamento, portanto é freqüente observar uma diminuição das concentrações ao passar da fase de indução para a de multiplicação (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998; COELHO, 1999; RAJORE & BATRA, 2005, AHN *et al.*, 2007).

Quanto à formação de raízes durante a etapa de proliferação, os resultados foram observados somente quando se utilizou o meio MSB5 com a concentração reduzida de citocinina. Um resultado semelhante foi verificado durante a etapa de subcultivo para o enraizamento. Estes resultados confirmam que alguns tratamentos hormonais aplicados no início do processo de micropropagação podem inibir a posterior formação de raízes. Para resolver este aspecto de toxidez, faz-se a transferência das culturas para meio diluído, com concentrações reduzidas ou na ausência de citocinina (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Para alguns autores a fase de subcultivo para o pinhão-manso não é viável (SUJATHA & REDDY, 1998; RAJORE & BATRA, 2005; JOHNSON & DEORE, 2008), pois é uma etapa anti-econômica por demandar mão-de-obra adicional. No entanto, para Murali *et al.* (2007) os brotos foram subcultivados aproximadamente quatro semanas. O fato das raízes terem surgido na etapa de proliferação e subcultivo, pode está relacionado à redução na concentração de BAP e seu não aparecimento pode ser explicado por um possível efeito residual das citocininas. Sendo assim, faz-se necessário o subcultivo a fim de eliminar resíduos de hormônios que inibem o desenvolvimento das raízes.

Os clones regenerados *in vitro* não exibiram taxa de sobrevivência quando transferidos para a etapa de aclimatização, porém as mudas provenientes da embriogênese zigótica exibiram taxas de sobrevivência superiores a 18%. Os melhores resultados de sobrevivência na aclimatização foram observados no tratamento com terra, esterco, areia e solução 1% do meio MS (TEAMS), seguido dos tratamentos TEF (terra, esterco e fertilizante 1%), TEMS (terra, esterco e solução 1% MS) e TEAF (terra, esterco, areia e fertilizante 1%),

o que corrobora o de Murali *et al.* (2007), no qual as mudas de *J. curcas* regeneradas *in vitro* foram aclimataram em terra vegetal e esterco e fertilizante 1%.

A morte das mudas provenientes da regeneração *in vitro*, pode estar associada a alguns tratamentos hormonais aplicados em etapas anteriores, já que as mudas vindas da embriogênese zigótica apresentaram taxa de sobrevivência superior a 18% e, também ao fato destas apresentarem raízes mais curtas. De acordo com Grattapaglia e Machado (1998) o tipo de sistema de raízes, obtido no enraizamento *in vitro*, também determina o sucesso no transplante, sendo as raízes mais curtas as mais adequadas, uma vez que se apresentam na fase de crescimento ativo, facilitando o desenvolvimento da planta.

A aclimação é a fase da micropropagação em que ocorre a transferência das mudas produzidas *in vitro* para o ambiente externo, a casa de vegetação e, posteriormente, para o campo (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998). Entretanto esta passagem é crítica e representa, em alguns casos, um fator limitante do processo de micropropagação. Um dos obstáculos para a aplicação prática dos métodos de cultura de tecidos é a dificuldade de transferir com sucesso as mudas das condições *in vitro* para o solo em razão da planta deixar uma existência heterotrófica para um estado autotrófico e fatores como genótipo, estresse hídrico, infecção por patógenos e estresse pela luz, além das variações de temperatura, interferirem no sucesso da aclimação (SILVA *et al.*, 2003).

Alguns cuidados são indispensáveis para garantir a obtenção de mudas de qualidade, entre esses cuidados a qualidade do substrato é um dos fatores mais importantes (PIO *et al.*, 2005). O substrato tem por finalidade proporcionar condições adequadas à germinação e desenvolvimento inicial da muda; é fundamental para o bom desenvolvimento das raízes, devendo possuir baixa densidade, boa capacidade de absorção e retenção de água, boa aeração e drenagem para evitar o acúmulo de umidade, além de estar isento de pragas e com boa flora bacteriana (MACIEL *et al.*, 2000).

A comparação entre o meristema apical e lateral como tipo de explante ideal para esse protocolo, mostrou que o meristema apical é o mais eficiente para a micropropagação do pinhão-manso. Segundo Brasileiro e Dusi (1999), a escolha do melhor explante é, geralmente, função da sua capacidade de regeneração *in vitro*. Este resultado está de acordo com Murali *et al.* (2007), que afirmaram que meristemas apicais são preferidos em relação aos laterais.

A combinação entre o meio de cultura, substrato e explante ideais associados às demais condições de cultura (luz, temperatura, concentrações de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>) são necessários para o sucesso da propagação *in vitro*, mas o cuidado com a manipulação de explantes e meios de culturas, devem ser levados em conta também para evitar a desidratação, danificação de tecidos, contaminações e possíveis perdas de material. A micropropagação, mesmo sendo, na maioria das vezes, um processo demorado e dispendioso na obtenção do

protocolo para cada espécie, é uma ferramenta de propagação vegetativa de grande importância e devem-se buscar alternativas que a torne um processo barato, acessível e economicamente viável (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998, PULLMAN, *et al.*, 2003).

## 6 CONCLUSÕES

De maneira geral, as investigações feitas no presente estudo para a micropropagação do pinhão-mansão permitem concluir que o meristema apical é o explante mais eficiente associado com a indução da parte aérea, proliferação e subcultivo em MSB5 com BAP, enraizamento em MS com sais básicos suplementado com AIB e que o substrato contendo terra, esterco e areia irrigado com solução 1% do meio MS é o mais adequado para mudas de pinhão-mansão cultivadas *in vitro*, portanto os avanços foram obtidos até a fase de enraizamento, fazendo-se necessário ajustes na etapa de aclimatização.

## 7 PERSPECTIVAS

Contudo faz-se necessário:

- Domesticar as mudas;
- Estudar mecanismos de viabilidade econômica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, Y.J.; VANG, L.; MCKEON, T. A.; CHEN, G. Q. High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.). **In Vitro Cellular and Developmental Biology. Plant**, v.43, p. 9-15, 2007.

ALAGUMANIAN, S.; PERUMAL, V. S.; BALACHANDAR, R.; RAMESHKANNAN, K.; RAO, M. V. Plant regeneration from leaf and stem explants of *Solanum trilobatum* L. **Current Science**, v. 86, n.11, 2004.

ALVES, E. J.; LIMA, M. B.; SANTOS-SEREJO, J. A.; TRINDADE, A. V. Propagação. In: BORGES, A.L.; SILVA, L.S. **O cultivo da bananeira**. Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004, p. 59-86.

ARRUDA, F. P.; BELTRÃO, N. E. M.; ANDRADE, A. P.; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v.8, n.1, p. 789-799, jan-abr. 2004.

AUGUSTUS, G. D. P. S.; JAYABALAN, M.; SEILER, G. J. Evaluation and bioinduction of energy components of *Jatropha curcas*. **Biomass and Bioenergy**, v.23, p. 161-164, 2002.

BARROS, R. Energias alternativas de origem vegetal: A biomassa e os vários tipos de energia a partir de plantas e outras fontes orgânicas. In: **Energia para um Novo Mundo**. Rio de Janeiro: Conselho Regional de engenheiros e Arquitetos, 2007. p. 75-90.

BELTRÃO, N. E. M. Considerações gerais sobre o Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha, MG. **Anais...** Varginha, 2006.

BERCHMANS, H. J.; HIRATA, S. Biodiesel production from crude *Jatropha curcas* L. seed oil with a high content of free fatty acids. **Bioresource Technology**, v.99, p. 1716-1721, 2008.

BISON, O. **Melhoramento de eucalipto visando à obtenção de clones para a indústria de celulose**. 2004. 182p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Lavras, MG.

BRASIL. Lei nº. 11097, 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nºs 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 jan. 2005.

BRASIL. Resolução do Conselho Nacional de Política Energética nº. 2, de 13 de março de 2008. Estabelece em três por cento, em volume, o percentual mínimo obrigatório de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado ao consumidor final, nos termos do art. 2º da Lei nº. 11097, de 13 de janeiro de 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, 14 mar. 2005.

BRASILEIRO, A.C.M.; DUSI, D.M.A. Transformação genética de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI/ Embrapa-CNPq, 1999. v.2, p.679-735.

CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI/ Embrapa-CNPq, 1998. v.1, p. 87-132.

CARNIELLI, F. **O combustível do futuro**. 2003. Disponível em: <<http://www.ufmg.br/boletim/bol1413/quarta.shtml>> Acesso em: 15 fev. 2009.

CARVALHO, A. D. F. de. **Histórico do melhoramento genético de eucalipto no Brasil**. São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.genetica.esalq.usp.br/pub/seminar/ADFCarvalho-200602-Resumo.pdf>> Acesso em: 31 mar. 2009.

CARVALHO, M., VILELA, P. S., OLIVEIRA, R. O de. Biodiesel em Minas Gerais: riscos e oportunidades. **Assessoria Técnica da FAEMG**, Belo Horizonte, jan. 2007.

CHIBAS BIOENERGY. **Why *Jatropha curcas*?** Disponível em: <[http://chibas-bioenergy.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=35&Itemid=55#1](http://chibas-bioenergy.org/index.php?option=com_content&task=view&id=35&Itemid=55#1)> Acesso em: 14 fev. 2009.

CHINCHOLKAR, S. P.; SRIVASTAVA, S.; REHMAN, A.; DIXIT, S.; LANJEWAR, A. Biodiesel as an Alternative Fuel for Pollution Control in Diesel Engine. **Asian Journal of Experimental Sciences**, vol.19, n.2, p.13-22, 2005.

COELHO, M. C. F. **Germinação de sementes e propagação *in vitro* de sucupira branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] 1999. 119 p.** Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Lavras, MG.

CORDEIRO, I. M. C. C.; LAMEIRA, O. A.; OHASHI, S. T.; ROSAL, L. F. Efeito de BAP sobre a proliferação de brotos *in vitro* de *Schizolobium amazonicum* Huber ex Ducke (PARICÁ). **Cerne**, Lavras, v.10, n.1, p. 118-124, 2004.

CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica, 1956. 231p.

DANTAS, M B.; CONCEIÇÃO, M. M.; SOUZA, A. G.; SANTOS, I. M. G.; SILVA, F. C.; Obtenção de biodiesel através da transesterificação do óleo de milho: conversão em ésteres etílicos e caracterização físico-química. In: I CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: 2006. p. 237.

DELGARDO, M. J. L.; PARADO, T. E. Potential multipurpose agroforestry crops identified for the Mexican Tropics. In: WICKENS, G. E., HAQ, N., DAY, P. **New Crops for Food and Industry**. London: Chapman and Hall, 1989. p. 166–173.

DEORE, A. C.; JOHNSON, T. S. High-frequency plant regeneration from leaf-disc cultures of *Jatropha curcas* L.: an important biodiesel plant. **Plant Biotechnology Reports**, v.2, p. 7-11, 2008.

ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm - a review. **Euphytica**, v.57, p. 227–243, 1991.

ERIG, A. C.; ROSSI, A. de; FORTES, G. R. L. 6-benzilaminopurina e ácido indolbutírico na multiplicação *in vitro* da amoreira – preta (*Rubus idaeus* L.), cv. tupy. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.5, p. 765-770, 2002.

ERIG, A. C.; SCHUCH, M. W. Regeneração *in vitro* de brotos e raízes adventícias de marmeleiro (*Cydonia oblonga* Mill.) CVS. MC E ADAMS, utilizados como porta-enxertos para a pereira. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v.11, n.4, p. 419-424, 2005.

ESCOBAR, H. **Brasil vai fazer óleo diesel do caldo de cana**. 2008. Disponível em: <[http://www.mre.gov.br/portugues/noticiario/nacional/selecao\\_detalhe3.asp?ID\\_RESENHA=505325](http://www.mre.gov.br/portugues/noticiario/nacional/selecao_detalhe3.asp?ID_RESENHA=505325)> Acesso em: 12 fev. 2009.

FERRARI, R. A.; OLIVEIRA, V. da S.; SCABIO, A. Biodiesel de soja – taxa de conversão em ésteres etílicos, caracterização físico-química e consumo em gerador de energia, **Química Nova**, v.28, n.1. p. 19-23, 2005.

FERREIRA, M. A.; CALDAS, L. S.; PEREIRA, E. A. Aplicações da cultura de tecidos no melhoramento genético de plantas. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI/ Embrapa-CNPB, 1998. v.1, p. 21-43.

GAMBORG, O. L.; MILLER, R. A.; OJIMA, K. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. **Experimental Cell Research**. v.50, n.1, p. 151-158, 1968.

GERALD, L. T. S.; BRESSAN, E. de A.; PRADO JÚNIOR, J. P. Q.; ARAÚJO, D. R, F de.; MIRANDA, D.; FIOR, R. C.; SCHMIDT, V. A. Efeito da auxina na brotação e enraizamento de estacas de pinhão-mansão. In: III CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha, MG. **Anais...** Varginha, 2006. p. 59.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: Embrapa, SPI/ Embrapa-CNPB, 1998. v.1, p. 183-260.

GÜBITZ, G. M.; MITTELBACH, M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L.. **Bioresource Technology**, v.67, p. 73-82, 1999.

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas* L.** Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Rome: International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), 1996. 66p.

HIGASHI, E. N.; SILVEIRA, R. L. V. A. de; GONÇALVES, A. N. **Nutrição e adubação em minijardim clonal hidropônico de *Eucalyptus***. Piracicaba: IPEF, 2002. 21p. (IPEF. Circular Técnica, n. 194).

JAYASINGH, M. The use of biodiesel by the Indian railways. In: HEGDE, N.G.; DANIEL J.N.; DHAR S. ***Jatropha* and Other Perennial Oilseed Crops**. Pune: BAIF Development Research Foundation, 2004. p. 31-33.

JHA, T. B.; MUKHERJEE, P.; DATTA, M. M. Somatic embryogenesis in *Jatropha curcas* Linn., an important biofuel plant. **Plant Biotechnology Reports**, v.1, p. 135-140, 2007.

JOHNSON, T.S.; DEORE, A.C. Direct regeneration of plantlets in *Jatropha curcas*. **European patent**, EP20070827488, 2008. 33p.

KIM, MS.; KLOPFENSTEIN, N. B.; CREGG, B. M. *In vitro* and *ex vitro* rooting of micropropagated shoots using three green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) clones. **New Forests**, v.16, p.43-57, 1998.

KRIKORIAN, A. D. Hormones in tissue culture and micropropagation. In: DAVIES, P. J. **Plant Hormones**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1995. p. 774-796.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): A review. **Industrial crops and products**, v. 28, p. 1-10, 2008.

LAMB, C. R. C.; MILACH, S. C. K.; PASQUALI, G.; BARRO, R. S. Embriogênese somática e regeneração de plantas a partir de embrião maduro de aveia. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n.2, p. 123-130, 2002.

LI, M.; LI, H.; JIANG, H.; PAN, X.; WU, G. Establishment of an *Agrobacterium* -mediated cotyledon disc transformation method for *Jatropha curcas*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.92, p. 173-181, 2008.

MACIEL, A. L. de, R.; SILVA, A. B. da; PASQUAL, M. Aclimação de plantas de violeta (*Saintpaulia ionantha* Wendl) obtidas *in vitro*: efeitos do substrato. **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.24, n.1, p. 9-12, 2000.

MEHER, L. C.; VIDYA SAGAR, D.; NAIK, S.N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v.10, p. 248-268, 2006.

MELO, J. C.; BRANDER Jr, W.; CAMPOS, R. J. A.; PACHECO, J. G. A.; SCHULER, A. R. P.; STRAGEVITCH, L. Avaliação preliminar do potencial do pinhão manso para a produção de biodiesel. In: I CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BODIESEL, 1, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: 2006. p. 198-203.

MOGHAIEB, R. E. A.; EL-AWADY, M. A.; EL-MERGAWY, R. G.; YOUSSEF, S. S.; EL-SHARKAWY, A. M. A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.2, p. 143-148, 2006.

MURALI, K.S.; PATIL, M.; MAURYA, G. Commercially viable process of *in vitro* mass culture of *Jatropha curcas*. **European patent**, EP1817956A2, 2007. 11p. Disponível em: <[www.freepatentsonline.com/EP1817956A2.html](http://www.freepatentsonline.com/EP1817956A2.html)> Acesso em: 24 fev. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. **Physiologia Plantarum**, v. 15, n.3, p. 473-497, 1962.

NUNES, C. F. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de Pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2007. 78p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Lavras, MG.

OLIVEIRA, R. P. de; GOMES, T. da, S.; VILARINHOS, A. D. Avaliação de um sistema de micropropagação massal de variedades de mandioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.35, n.12, p. 2329-2334, 2000.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, v.19, n.1, p. 1-15, 2000.

PALLARDY, S. G.; KOZLOWSKI, T. T. In: \_\_\_\_\_. **Physiology of woody plants**. Amsterdam: Elsevier, 2008. 3ed. p. 368-369.

PEIXOTO, A. R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 284p.

PERES, L.E.P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas *in vitro*. **Biociência**, Brasília, n.25, p.44-48, 2002.

PINHÃO-MANSO. **A Planta: Pinhão Manso - *Jatropha curcas*** Disponível em: <<http://www.pinhaomanso.com.br/pinhaomanso.html>> Acesso em: 12 fev. 2009.

PIO, R.; RAMOS, J. D.; GONTIJO, T. C. A.; CARRIJO, E. P.; MENDONÇA, V.; FABRI, E. G.; CHAGAS, E. A. Substratos na produção de mudas de jabuticaba. **Revista Brasileira Agrocência**, Pelotas, v.11, n.4, p. 393-396, 2005.

PRAMANIK, K. Properties and use of *Jatropha curcas* oil and diesel fuel blends in compression ignition engine. **Renewable Energy**, v.28, p. 239-248, 2003.

PROJECT ZÂMBIA GTZ-ASSP. **The *Jatropha* Booklet**. A guide to *Jatropha* promotion in Zambia, 2000. 21p.

PROTOCOLOS DE MICROPROPAGAÇÃO DO PINHÃO-MANSO [da] Phoneutria **Biociência e Serviços Ltda**. Belo Horizonte, MG. 2007.

PULLMAN, G.S.; MONTELLO, P.; CAIRNEY, J.; XU, N.; FENG, X. Loblolly pine (*Pinus taeda* L). somatic embryogenesis: maturation improvements by metal analyses of zygotic and somatic embryos. **Plant Science**, v.164, p.955-969, 2003.

PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, O. A. **Pinhão manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, p. 74-99, 1986.

RAJORE, S.; BATRA, A. Efficient plant regeneration via shoot tip explant in *Jatropha curcas* L. **Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology**, v. 14, p. 73-75, jan. 2005.

SALÉ, N., A., C. **Oportunidades e desafios para o comércio internacional de biocombustível da *Jatropha curcas* (pinhão-manso) produzido em países em desenvolvimento**. 2008. 139p. Dissertação (Mestrado em Agronegócio) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Agronegócio, Porto Alegre, RS.

SARDANA, J.; BATRA, A.; ALI, D. J. An expeditious method for regeneration of somatic embryos in *Jatropha curcas* L. **Phytomorphology**, v.50, n. 3/4, p. 239-242, 2000.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n.229, p. 44-78, 2005.

SHAH, S.; SHARMA, S.; GUPTA, M. N. Biodiesel preparation by lipase-catalyzed transesterification of *Jatropha* oil. **Energy & Fuels**, v.18, p. 154-159, 2004.

SHRIVASTAVA, S.; BANERJEE, M. *In vitro* propagation of physic nut (*Jatropha curcas* L.): influence of additives. **International Journal of Integrative Biology**, v.3, n.1, p. 73-79, 2008.

SILVA, A. B. da; PASQUAL, M.; MACIEL, A. L. de, R.; DUTRA, L. F. BAP e substratos na aclimatização de plântulas de gloxínia (*Sinningia speciosa* Lood. Hiern.) provenientes de cultura de tecidos, **Ciência Agrotécnica**, Lavras, v.27, n.2, p. 255-260, 2003.

SOOMRO, R.; MEMON, R. A. Establishment of callus and suspension culture in *Jatropha curcas*. **Pak. J. Bot.**, v.39, n.7. p. 2431-2441, 2007.

STAUBMANN, R.; NCUBE, I.; GÜBITZ, G. M.; STEINER, W.; READ, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Biotechnology**, v.75, p. 117-126, 1999.

SUJATHA, M.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. **Plant Growth Regulation**, v.47, p. 83–90, 2005.

SUJATHA, M.; MUKTA, N. Morphogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Jatropha curcas*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.44, p. 135-141, 1996.

SUJATHA, M.; PRABAKARAN, A.J. New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.50, p. 75-82, 2003.

SUJATHA, M.; REDDY, T. P. Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Plant Cell Reports**, v.17, p. 561-566, 1998.

TAPANES, N. O.; ARANDA, D. A. G.; CARNEIRO, J. W. de M. Transesterificação dos glicerídeos do óleo de *Jatropha curcas* L. Estudo teórico. In: I CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1, 2006, Brasília, DF. **Anais...** Brasília: 2006. p. 241-246.

TAPANES, N. O.; ARANDA, D. A. G.; CARNEIRO, J. W. de M.; ANTUNES, O. A. C. Transesterification of *Jatropha curcas* oil glycerides: Theoretical and experimental studies of biodiesel reaction. **Fuel**, v.87, p. 2286–2295, 2008.

TORRES, A. C.; BARBOSA, N. V dos R.; WILLADINO, L.; GUERRA, M. P.; FERREIRA, C. F.; PAIVA, S. A. V de. **Meios e condições de incubação para a cultura de tecidos de plantas**: formulações de meio de cultura de tecidos de plantas. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2001. 19p. (Embrapa Hortaliças. Circular Técnica, n. 24).

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE. **Planta do mês março de 2008**: pinhão-manso. Disponível em: <[http://www.uff.br/labes/pdm/mar\\_2008\\_jatropha.htm](http://www.uff.br/labes/pdm/mar_2008_jatropha.htm)> Acesso em: 10 fev. 2009.

WEI, Q.; LU, WD.; LIAO, Y.; PAN, SL; XU, Y.; TANG, L.; CHEN, F. Plant regeneration from epicotyl explant of *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Physiology and Molecular Biology**, v.30, n.4, p. 475-478, 2004.

WIKIBOOKS. **Bioquímica/Ácidos Gordos: Tipos de ácidos graxos** Disponível em: <[http://pt.wikibooks.org/wiki/Bioqu%C3%ADmica/%C3%81cidos\\_gordos](http://pt.wikibooks.org/wiki/Bioqu%C3%ADmica/%C3%81cidos_gordos)> Acesso em: 30 mar.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)