

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA**



*Dissertação Apresentada na Área de Armazenamento e
Processamento de Produtos Agrícolas*

**CRIOCONSERVAÇÃO E SANIDADE DE SEMENTES DE
PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)**

MÍRIAM GOLDFARB

**Campina Grande-Paraíba
FEVEREIRO, 2008**

MÍRIAM GOLDFARB

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CRIOCONSERVAÇÃO E SANIDADE DE SEMENTES PINHÃO
MANSO (*Jatropha curcas* L.)

*Dissertação apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Engenharia Agrícola da
Universidade Federal de Campina Grande,
como parte dos requisitos necessários para
obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola*

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Armazenamento e Processamento de
Produtos Agrícolas

ORIENTADORES: Prof^a. Dra. Maria Elita Martins Duarte (UFCG)

Prof. Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata (UFCG)

XXXe

Goldfarb, Míriam

Crioconservação e sanidade de sementes pinhão manso
(*Jatropha curcas* L.)

p.: il.110folhas

Dissertação (Mestrado) DEAg/CCT/UFCG/, 2008

1. Armazenamento - Engenharia Agrícola.
 2. Crioconservação de sementes.
 3. Engenharia Agrícola – Crioconservação de sementes.I.
- Título.

CDU:

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AGRÍCOLA**



PARECER FINAL DO JULGAMENTO DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

MÍRIAM GOLDFARB

BANCA EXAMINADORA

PARECER

Prof.ª Dra. Maria Elita Martins Duarte
DEAg/CCT/UFCG

Orientadora

Prof. Dr. Mário Eduardo R.M.Cavalcanti Mata
DEAg/CCT/UFCG

Orientador

Prof.Dr. Francisco de Assis Santos e Silva
DEAg/CCT/UFCG

Examinador Interno

Prof.ª Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento
DF/CCA/UFPB

Examinador (a) Externo

FEVEREIRO, 2008

“Ninguém pode prever o que acontecerá em algumas décadas ou séculos; por exemplo, qual o impacto que o desflorestamento terá sobre o clima, o solo, as chuvas. Temos muitos problemas porque as pessoas estão centradas em seus próprios interesses, em ganhar dinheiro e não estão pensando no bem-estar da comunidade como um todo. Não estão pensando na Terra a longo prazo, nos efeitos ambientais adversos sobre o homem. Se nós, da atual geração, não refletirmos sobre estas questões agora, as gerações futuras não terão como lidar com elas”.

(Dalai Lama)

A DEUS,

A meu pai Júlio Goldfarb (*in memoriam*) que esteve sempre presente contribuindo na minha formação educacional, apoiando-me e respeitando as minhas escolhas.

A minha mãe, Walberlena Goldfarb, minha grande amiga, sempre me ajudando em tudo.

A meu irmão, Moisés Goldfarb, pelos conselhos e ajuda. Serei eternamente agradecida a minha família por ter me ensinado a viver com dignidade

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter nos dado uma natureza, com tantas possibilidades de pesquisas que só venham ajudar a humanidade.

Aos meus orientadores, Dra. Maria Elita Martins Duarte e Dr. Mário Eduardo R. M. Cavalcanti Mata, pela orientação, amizade e apoio na realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Campina Grande, que me proporcionou a realização dessa pós-graduação.

A Capes, pela oportunidade e concessão da bolsa de estudo.

Aos professores do curso de pós-graduação em Armazenamento e Processamento dos Produtos Agrícolas, em especial aos professores Francisco de Assis Cardoso Almeida, Francisco de Assis Santos e Silva, Rossana Maria F. de Figueiredo, Juarez Paz Pedroza e Josivanda Palmeira Gomes.

A secretária de pós-graduação do DEAg/UFCG, Rivanilda Diniz Sobreiro de Almeida, pela amizade e ajuda, que foram fundamentais durante o curso.

A todos os funcionários do Laboratório de Armazenamento e Processamento dos Produtos Agrícolas–LAPPA, em especial a Jasiel, Silas, Luciene e Luizinho.

A Embrapa Algodão, pela contribuição na realização deste trabalho.

Ao pesquisador da Embrapa Algodão, Liv Soares Severino, pelo apoio durante a realização deste trabalho e obtenção da matéria-prima.

Aos pesquisadores Vicente de Paula Queiroga e Napoleão E. de Macêdo Beltrão pela ajuda e atenção durante a realização desta pesquisa.

A prof^ª. Dra. Luciana Cordeiro do Nascimento, do programa de pós-graduação em Agronomia da Universidade Federal da Paraíba pela atenção, sobretudo na ajuda durante a execução desta pesquisa.

A todos os que fazem parte do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal da Paraíba, em especial à funcionária Francisca Maria Souto, pela amizade, atenção e ajuda.

A Noelma Miranda de Brito, pela amizade, ajuda, apoio e atenção neste trabalho.

A Lívia Wanderley Pimentel, pela convivência, amizade, incentivo e ajuda durante o curso de Mestrado. Meus sinceros agradecimentos.

A todos os meus amigos do curso de Mestrado em especial a Tereza Bárbara, Viviane, Siumara, Priscila, Camila, Márcia, Aleksandra, Regilane, Sckaymenn, João Carlos, José Carlos, Robert e Clóvis.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta pesquisa.

ÍNDICE

	Página
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiv
CAPÍTULO I: Introdução Geral e Revisão de Literatura	18
1 Introdução Geral	18
1.1 Objetivos gerais	20
2 Revisão de Literatura.....	21
2.1 Considerações gerais sobre a cultura do pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.)..	21
2.2 Histórico e distribuição geográfica.....	22
2.3 Propriedades e importância econômica.....	22
2.4 Botânica.....	23
2.4.1 Frutos e sementes.....	25
2.5 Aspectos agronômicos.....	26
2.5.1 Propagação.....	27
2.6 Generalidades sobre sementes.....	27
2.6.1 Teor de água	28
2.6.2 Sementes Ortodoxas, Intermediárias e Recalcitrantes.....	29
2.6.3 Germinação.....	30
2.6.4 Vigor.....	31
2.6.5 Sementes de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	32
2.7 Considerações sobre os métodos de conservação de germoplasma vegetal.....	32

2.7.1 Crioconservação.....	34
2.7.2 Teor de água limite para crioconservação.....	34
2.7.3 Fatores que influenciam à crioconservação.....	36
2.7.4 Vitrificação e crioprotetores.....	37
2.7.5 Crioconservação de sementes	38
2.8 Cinética de congelamento.....	39
2.8.1 Difusividade térmica.....	41
2.9 Microorganismos em produtos agrícolas armazenados.....	43
2.9.1 Fungos de campo e fungos de armazenamento.....	44
2.9.2 Fungos em sementes.....	46
3. Referências Bibliográficas.....	48
CAPÍTULO II: Teor de água limite para crioconservação das sementes de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	57
1.Introdução	57
2. Material e Métodos	59
3. Resultados e Discussão.....	64
4. Conclusões.....	69
5. Referências Bibliográficas.....	69
CAPÍTULO III: Cinética de criocongelamento de sementes de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	73
1.Introdução	73
2. Material e Métodos.....	74
3. Resultados e Discussão.....	76
4. Conclusões.....	80
5. Referências Bibliográficas.....	80

CAPÍTULO IV: Aspectos fisiológicos das sementes de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) durante o armazenamento criogênico.....	82
1.Introdução.....	82
2. Material e Métodos.....	84
3. Resultados e Discussão.....	84
4. Conclusões.....	89
5. Referências Bibliográficas.....	89
CAPÍTULO V: Avaliação da incidência de fungos em sementes de pinhão manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) após o crioarmazenamento.....	92
1.Introdução	92
2. Material e Métodos.....	94
3. Resultados e Discussão.....	95
4 Conclusões	102
5 Referências bibliográficas.....	102
CONCLUSÕES GERAIS	108
ANEXOS.....	109

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

		Página
Figura 1	Formas herbáceas e arbóreas do pinhão manso.....	24
Figura 2	Caule com camada cerosa.....	24
Figura 3	Folhas e pecíolo do pinhão manso	25
Figura 4	Frutos verdes (estádio inicial).....	26
Figura 5	Sementes com presença da carúncula na parte inferior.....	26
Figura 6	Fases da germinação epígea.....	32

CAPÍTULO II

Figura 7	Semente de trevo – High moisture freezing limit – HMFL	59
Figura 8	Estufa utilizada para a secagem das sementes de pinhão manso.....	61
Figura 9	Etapas para umedecimento das sementes.....	62
Figura 10	Canister colocado no interior do botijão criogênico.....	63
Figura 11	Plântulas de pinhão manso em casa de vegetação.....	64

CAPÍTULO III

Figura 12	Curvas experimentais calculadas pela equação de Fick das sementes de pinhão manso submetidas ao congelamento em nitrogênio, na fase de vapor (-170°C).....	77
Figura 13	Curvas experimentais calculadas pela equação de Fick das sementes de pinhão manso submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido (-196°C).....	78

CAPÍTULO IV

Figura 14	Plântulas das sementes crioconservadas de pinhão manso..	88
-----------	--	----

CAPÍTULO V

Figura 15	Câmara de Fluxo Laminar.....	95
-----------	------------------------------	----

Figura 16	Sementes em placas de Petri.....	95
Figura 17	Dados do percentual de incidência dos gêneros de fungo encontrados nas sementes não armazenadas(testemunha) e nas sementes armazenadas por 30 dias em temperaturas criogênicas.....	100
Figura 18	Dados do percentual de incidência dos gêneros de fungo encontrados nas sementes crioconservadas por 60 e 90 dias.....	102
Figura 19	Dados do percentual de incidência dos gêneros de fungo encontrados nas sementes crioarmazenadas por 90 dias à temperatura de -196°C (nitrogênio líquido).....	102
Figura 20	Esporos dos gêneros de fungos observados em microscópio estereoscópio.....	103

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

		Página
Tabela 1	U.R. mínima para a sobrevivência dos principais fungos de armazenamento em condições ótimas de temperatura.....	45
Tabela 2	Teor de umidade mínimo em equilíbrio com diferentes níveis de U.R. para a sobrevivência das principais espécies de fungos de armazenamento.....	46

CAPÍTULO II

Tabela 3	Resumo da análise de variância da germinação e vigor (peso da matéria seca e comprimento de plântula) de sementes de pinhão manso submetidas ao armazenamento nas temperaturas de -196 °C e 23°C por 5 dias.....	65
Tabela 4	Valores médios de germinação e vigor (comprimento de plântulas – C.P. e peso de matéria seca P.M.S) das sementes de pinhão manso em função do teor de água e temperaturas de conservação, pelo período de cinco dias.....	67
Tabela 5	Valores médios de vigor (comprimento de plântulas) das sementes de pinhão manso para interação teor de água e temperaturas de conservação, pelo período de cinco dias.....	69

CAPÍTULO III

Tabela 6	Valores dos coeficientes de difusão e difusividade efetiva das sementes de pinhão manso submetidas ao congelamento nas temperaturas criogênicas	79
----------	---	----

CAPÍTULO IV

Tabela 7	Resumo da análise de variância da germinação e vigor (peso da matéria seca e comprimento de plântula) de sementes de pinhão manso submetidas ao criarmazenamento nas temperaturas de -196 °C e -170°C por 0, 30, 60 e 90 dias.....	85
Tabela 8	Valores médios de germinação e vigor (comprimento de plântulas – C.P. e peso de matéria seca P.M.S) das .	86

sementes de pinhão manso em função das temperaturas e períodos de armazenamento.....

CAPÍTULO V

Tabela 9	Percentual de incidência de fungos obtidos no teste de sanidade das sementes armazenadas nas temperaturas criogênicas de -170°C na fase de vapor de nitrogênio e a -196°C fase de nitrogênio líquido.....	96
Tabela 10	Resumo da análise de variância do percentual de incidência fúngica nas sementes pinhão manso submetidas ao criarmazenamento às temperaturas de -196°C e -170°C por 0,30, 60, e 90 dias.....	98
Tabela 11	Percentual de incidência de patógenos em função dos dias de criarmazenamento e temperaturas	99

CRIOCONSERVAÇÃO E SANIDADE DE SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L)

RESUMO: Atualmente, o pinhão manso está em processo de domesticação e só nos últimos trinta anos começou a ser mais pesquisado agronomicamente. Esta espécie apresenta inúmeras propriedades, como a utilização como erva medicinal, produção de sabão e iluminação de casas. O óleo presente nas sementes está sendo estudado como uma alternativa para a produção de biocombustível. Acerca das sementes, pesquisas demonstram diminuição do potencial germinativo durante o período de armazenamento a temperatura ambiente; um outro fator é que seu teor de óleo varia entre 30 e 40%, podendo ocorrer a rancificação dos ácidos graxos durante a estocagem. Ante o exposto, se objetivou neste trabalho, avaliar o armazenamento em temperaturas criogênicas de -196°C (nitrogênio líquido), e a -170°C (vapor de nitrogênio), como método de conservação das sementes desta espécie; estabelecer a curva de congelamento nessas temperaturas e analisar a incidência de patógenos durante a criopreservação. (i) Inicialmente, determinou-se o teor de água ideal para criopreservar as sementes; neste propósito, as sementes de pinhão manso foram secas e reidratadas para alcançar os teores de água de 4, 6, 8, 10, 12, e 14% em base úmida; logo após, foram criopreservadas a -196°C durante cinco dias e, em seguida, descongeladas gradativamente nas temperaturas de -196 , -170 , -80 , 0 e 10°C com intervalo de 3 horas para cada temperatura, para serem realizados os testes de germinação e vigor; (ii) depois de determinado o teor de água limite para criopreservação (TALC), procedeu-se ao estudo da cinética de congelamento das sementes com teor de água em torno de 8% b.u. As sementes foram submetidas às temperaturas criogênicas de -196°C (nitrogênio líquido) e a -170°C (vapor de nitrogênio) com intervalo de 5 segundos até alcançar a temperatura de equilíbrio. (iii) Após esses procedimentos, as sementes foram criopreservadas por 0, 30, 60 e 90 dias em nitrogênio líquido e na fase de vapor; decorrido cada período de armazenamento criogênico, realizaram-se as avaliações de qualidade fisiológica e incidência fúngica. As sementes apresentaram teor de água ideal para criopreservação dentro da faixa de estudo de 4 a 14% em base úmida, escolhendo-se o teor de água em que as sementes foram colhidas no campo, em torno de 8% em base úmida; nas curvas de congelamento foi constatado que quanto maior o gradiente térmico, maiores eram os valores da velocidade de congelamento e a difusividade térmica. Com relação aos períodos de criopreservação, não houve diferença estatística com os percentuais germinativos e os índices mais satisfatórios com relação ao vigor foram obtidos durante o período de criopreservação. Neste trabalho pode-se concluir que as sementes podem ser criopreservadas tanto no vapor de nitrogênio (-170°C) como na fase líquida (-196°C). Os gêneros de fungo mais encontrados nas sementes após cada período de criopreservação foram *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Fusarium*, comumente encontrados em sementes armazenadas.

Palavras-chave: criogenia, qualidade fisiológica, fitossanidade

CRYOCONSERVATION AND SANITY OF SEEDS OF PHYSIC NUT (*Jatropha curcas* L.)

ABSTRACT:The physic nut currently is in domestication process, and just in last thirty years started more to be searched in agronomy. This species presents innumerable properties, among these, the use as medicinal grass, soap production and illumination of houses. The oil in the seed has been currently studied as an alternative for the biodiesel production. About the seeds, researches show that a reduction of the potential of germination occurs during the period of storage in the environment temperature. Another factor, is that these seeds have an oil content between 30 and 40%, it may occur the degradation of greasy acid during the stockage. Ahead of this discussion, the objectives of this work were the following ones: to evaluate the storage to the cryogenic temperatures of -196°C (liquid nitrogen), and -170°C (vapor of nitrogen), as a method of conservation of the seeds of this species; to establish the curve of freezing in these temperatures and to analyse the incidence of pathogens during the cryoconservation. (i) Initially the ideal water content was determined to cryopreserve the seeds. In this purpose, the seeds of physic nut were dried and humidified, until reach water contents of 4, 6, 8, 10, 12 and 14% in humid base, then they were cryogenic stored (-196°C) for a period of five days, and after that were gradually defrosted, the temperatures of -196 , -170 , -80 , 0 e 10°C with intervals of 3 hours for each temperature. Then, the tests of germination and vigor were made. (ii) After that it was determined the water limit content for cryoconservation (TALC), the study was proceeded of the kinetic of freezing of the seeds with water content around 8% b.u. The seeds were submitted to the cryogenic temperatures of -196°C (liquid nitrogen) and -170°C (nitrogen vapor) with intervals of 5 seconds until reach the temperature of equilibrium. (iii) After these, the seeds were stored by 0,30, 60 and 90 days in liquid nitrogen and in the vapor phase, finished each period of cryogenic storage were made the evaluations of physiological quality and pathogens incidence. The seeds had an ideal water content for cryoconservation on a scale that was of 4 a 14% in the field, around 8% in humid base. The freezing curves were evidenced as much bigger is the thermal gradient, bigger was the values of the freezing speed and thermal difusivity. About the periods of cryoconservation, it did not occur difference statistics with the percentagens of germination, the indices most satisfactory about to the vigor were gotten during the periods of cryoconservation. So in the seeds can be stored in the nitrogen vapor (-170°C) as in the liquid phase (-196°C). The sorts of fungus more found in the seeds each period of cryoconservation had after been *Aspergillus*, *Cladosporium* and *Fusarium*, which are sorts found in stored seeds.

Key word: cryogenic, physiological quality, sanity of seeds

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO GERAL

Com a crise atual do petróleo, os estudos com combustíveis alternativos, intensificaram-se e o biodiesel reaparece como uma das soluções imediatas, podendo ser produzido através de óleos vegetais e óleos de origem animal.

O biodiesel faz parte do ciclo ecológico e pode ser utilizado puro ou associado ao diesel (BELTRÃO, 2002). Produtos alternativos ao petróleo, seja o etanol ou o biodiesel, são capazes de diminuir a poluição na atmosfera por emitir CO₂ em menor quantidade quando comparado com a emissão de CO₂ pelos combustíveis fósseis.

Devido à dimensão continental do Brasil e da sua diversidade de clima e solo, estima-se que existam mais de duzentas espécies de oleaginosas com potencial para produzir óleo como fonte de matéria-prima para a produção de biocombustível (energia); um dos destaques deste setor, é uma planta que até então não era estudada agronomicamente, o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) (BELTRÃO e CARTAXO, 2006).

Dentre as oleaginosas o pinhão manso se tem destacado como planta rústica, perene, adaptável a diversos ambientes e condições edafoclimáticas, é tolerante à seca, sendo cultivado como cerca viva, em quase todas as regiões tropicais. Outros atributos estão relacionados ao óleo, pois não é comestível e, portanto, não seria desviado para a alimentação humana (SATURNINO et al., 2005). No Brasil, o pinhão manso vem sendo cultivado por produtores do Nordeste, Centro Oeste e Sudeste, com produção anual de 1.100 a 1.700 litros de biodiesel/óleo/ha (NUNES, 2007).

Com relação ao tema deste trabalho, pesquisas a respeito da crioconservação de espécies de interesse econômico estão sendo cada vez mais estudadas. Haja vista que a crioconservação de sementes, tem por função a preservação dos recursos genéticos dessas espécies para seleção, melhoramento genético e manutenção de estoques para o futuro. O método consiste em submeter o material biológico, desde sua temperatura fisiológica

normal até ultra-baixas temperaturas (geralmente em nitrogênio líquido, a -196°C) (COELHO, 2006). O desenvolvimento de protocolos de crioconservação tem permitido que sementes de diversas espécies possam ser armazenadas a um custo relativamente baixo, em um ambiente que possibilite a preservação da integridade física e biológica do produto agrícola (TOUCHELL e DIXON, 1994).

Em referência às sementes de pinhão manso, SATURNINO et al. (2005) afirmam que ocorre uma diminuição da capacidade germinativa durante o período de armazenamento a temperatura ambiente. Isso é devido a um processo de deterioração que ocorre gradativamente durante o tempo de estocagem. Então, a crioconservação consiste em uma opção de armazenamento desta oleaginosa, pois um ambiente com temperaturas criogênicas proporcionará a redução do metabolismo, resultando na conservação das sementes, por períodos considerados indefinidos.

O segundo capítulo trata da determinação do teor de água limite na semente do pinhão manso para viabilizar o processo de crioconservação, uma vez, que este teor de água ideal não for determinado, as sementes podem perder sua viabilidade durante a crioarmazenagem, ocorrendo então o insucesso da técnica.

O terceiro capítulo se refere à cinética de congelamento criogênico das sementes, nas temperaturas de -170 e -196°C , ou seja, em nitrogênio na fase de vapor e na fase líquida, respectivamente. O objetivo da cinética de congelamento é conhecer a influência que estas temperaturas provocam na estrutura física da semente.

O quarto capítulo é com relação ao período de crioconservação, ou seja, o armazenamento das sementes por um período de tempo prolongado. Os períodos estudados foram de 0, 30, 60 e 90 dias em nitrogênio a -170 e -196°C ; analisaram-se as qualidades fisiológicas, para só então permitir avaliar a viabilidade do armazenamento criogênico.

O último capítulo se trata de um aspecto pouco pesquisado a respeito da crioconservação isto é, a incidência de fungos nas sementes armazenadas às temperaturas ultra-baixas, razão por que se analisaram os gêneros de fungo presentes nas sementes após o período de crioconservação. De acordo com ZORATO e HENNING (2001) e LUZ (2003) a presença de patógenos nas sementes pode afetar o vigor e o rendimento em

campo. Por esta razão é importante estudar o efeito do crioarmazenamento com relação à incidência de fungos patogênicos.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

- ❖ Determinar o teor de água limite para crioconservação (TALC) das sementes de pinhão manso.
- ❖ Determinar as curvas de congelamento das sementes de pinhão manso submetidas às temperaturas criogênicas.
- ❖ Avaliar a qualidade fisiológica das sementes após os períodos de 0, 30, 60 e 90 dias de crioarmazenamento.
- ❖ Avaliar a incidência de fungos nas sementes após os períodos de armazenamento criogênico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre a cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L) é uma espécie oleaginosa que, por suas potencialidades, vem sendo considerada importante cultura agrícola e tem, como característica principal resistência à seca. Este vegetal produz óleo com todas as qualidades necessárias para ser transformado em óleo diesel (ARRUDA et al., 2004).

A espécie, pertence à família Euforbiaceae, provém de um grande arbusto ou arvoreta decídua, usado antigamente na fabricação caseira de sabão e, mais recentemente, como cerca viva; seu maior atributo, entretanto, é o alto teor de óleo produzido pelas sementes, superando 30%. A espécie pode frutificar durante mais de 40 anos (NUNES, 2007).

De acordo com PURCINO e DRUMMOND (1986) o pinhão manso é uma espécie perene e de fácil cultivo, podendo ser utilizado na conservação do solo reduzindo, dessa forma, o processo de erosão, além de tradicionalmente utilizado como cerca viva para pastos no Norte de Minas Gerais, com a vantagem de não ocupar áreas importantes para outras culturas, favorecendo, assim, o plantio consorciado.

A cultura é considerada uma opção agrícola para a região Nordeste, pois apresenta resistência à seca, podendo-se desenvolver no semi-árido. Segundo CARNIELLI (2003) é planta oleaginosa, viável para a obtenção do biodiesel, visto que produz no mínimo duas toneladas de óleo por hectare, levando de três a quatro anos para atingir a idade produtiva.

Por todas essas potencialidades e principalmente por esta espécie fornecer matéria-prima para a produção de biocombustível, torna-se cultura importante, haja vista que expandiria a economia da região Nordeste, através da oferta de emprego e renda, nos mais diversos setores de produção.

2.2 Histórico e distribuição geográfica

Popularmente, a *curcas*. é conhecida como: physic nut (inglês), pinhão manso, pinhão paraguaio, pinhão-de-purga e pinhão de cerca (Brasil). Ainda não foi definida a origem desta planta, mas existem relatos afirmando ser oriunda da América do Sul; outros afirmam que é proveniente do estado do Ceará no Brasil (PEIXOTO, 1973).

Atualmente, o pinhão manso é encontrado em quase todas as regiões intertropicais, em menor proporção nas regiões temperadas; tem destaque pela sua importância econômica no Arquipélago de Cabo Verde, em Angola, Guiné, Moçambique, nas Antilhas Britânicas, sempre ao lado de outras culturas. Cabo Verde era um dos maiores produtores e exportadores mundiais de sementes de pinhão manso; sua introdução naquelas ilhas é atribuída ao interesse dos portugueses em aproveitar as terras inaptas daquele Arquipélago, cujos solos, de pouca fertilidade, dificilmente poderiam ser utilizados para outras culturas (BRASIL, 1985).

De acordo com CORTESÃO (1956) e PEIXOTO (1973) a distribuição geográfica desta planta é muito vasta no Brasil, dada à resistência a longos períodos de estiagem, e às pragas e doenças, sendo adaptável às condições edafoclimáticas muito variáveis, desde o Nordeste até algumas regiões do Sudeste. Segundo esses autores, o pinhão manso se desenvolve bem tanto nas regiões tropicais secas como nas zonas equatoriais úmidas, sendo encontrado em terrenos áridos e pedregosos.

2.3 Propriedades e importância econômica

De acordo com NUNES (2007) a planta do pinhão manso é utilizada desde tempos antigos, no emprego medicinal, na iluminação de casas e produção de sabão. Atualmente, o óleo extraído da semente tem sido utilizado para fins energéticos. A torta (co-produto) da *Jatropha*, é tóxica, e, portanto, inadequada para alimentação animal; as propriedades tóxicas do pinhão são atribuídas a uma globulina, a curcasina, ao ácido jatrópico de toxicidade igual ou superior a da ricina; entretanto, a torta tem potencial como adubo orgânico, pois o farelo residual apresenta elevados teores de nitrogênio, fósforo e potássio.

As raízes são consideradas diuréticas e antileucêmicas, e as folhas utilizadas para combater doenças de pele. O óleo pode ser aplicado no tratamento de eczema e reumatismo e o látex tem propriedades anti-microbianas, além de ser usado como cicatrizante (HELLER, 1996).

A planta do pinhão manso, também utilizada como cerca viva, evita que animais se aproximem devido ao látex cáustico presente nas folhas. Atualmente é fixador de dunas marítimas (PEIXOTO, 1973). Em virtude das suas características morfológicas e resistência à seca, esta espécie pode ser usada para combater a erosão do solo e em programas de reflorestamento (PROJECT ZÂMBIA, 2000).

No período da segunda Guerra Mundial, em razão das necessidades militares, outras utilidades para o pinhão manso além da saboaria, começaram a ser estudadas. O óleo do pinhão poderia ser utilizado como combustível nos motores diesel, porém não pode ser utilizado como lubrificante devido à sua baixa viscosidade e elevados teores de ácidos graxos impróprios, que podem provocar resinificação (CORTESÃO, 1956). Outras utilizações para o óleo é na composição de tintas para impressão e na indústria de fiação de lã; quando cozido e misturado com óxido de ferro, é útil para envernizar móveis, mas seu maior emprego continua sendo nas saboarias (NUNES, 2007).

Esta oleaginosa tem importância agrícola, por fornecer matéria-prima para a produção de biocombustível, isto é, devido ao seu teor de óleo que varia entre 30 e 40%, com produção anual de 1.100 e 1.700 litros por hectare (NUNES, 2007). Com essas características e por apresentar tolerância à seca, a cultura seria uma alternativa agrícola para a região Nordeste.

2.4 Botânica

O pinhão manso pertence à família Euforbiaceae; os portugueses distinguem duas variedades: catártica medicinal, a mais dispersa no mundo, apresentando amêndoas muito amargas e purgativas, e a variedade árvore de coral, medicinal-de-espanha, árvore de nozes purgativas, com folhas eriçadas de pêlos glandulares que secretam látex amargo, viscoso e caústico (CORTESÃO, 1956).

Apresenta como arvoreta ou arbusto grande (Figura 1), podendo alcançar 5 m de altura. O diâmetro do tronco é de aproximadamente 20 cm; as raízes são pivotantes (KOBILCKE, 1989); o caule é liso, macio, esverdeado, com xilema pouco resistente e o floema encerra em canais compridos, que se prolongam até as raízes; o tronco e os ramos são recobertos por uma camada cerosa que após sua secagem, se desprende em lâminas delgadas (Figura 2) (PEIXOTO, 1973); as folhas são decíduas, alternadas e sub-opostas, filotaxia em espiral, cordatas na base, 3-5 lobadas; a coloração esverdeada e brilhante se expande; quando jovens, apresentam folhas de coloração vermelho-vinho; as nervuras são esbranquiçadas e salientes em sua face inferior; o pecíolo é longo e esverdeado (Figura 3) (NUNES, 2007).



Figura 1. Formas herbáceas e arbóreas do pinhão manso



Figura 2. Caule com camada cerosa

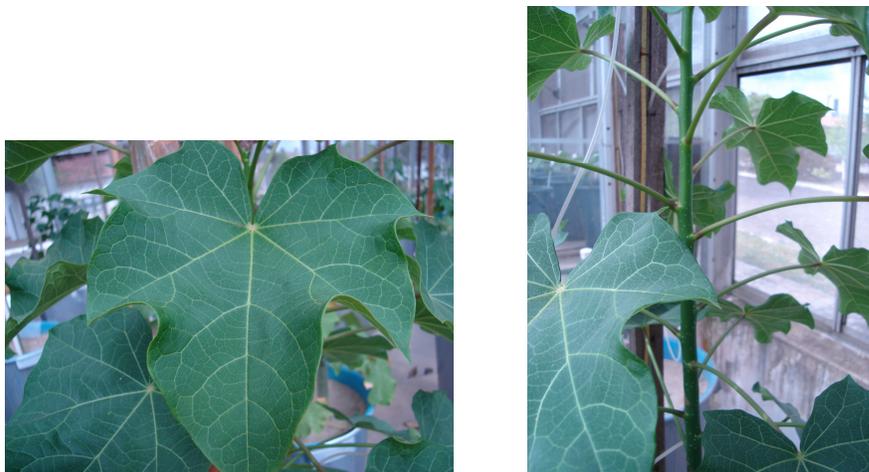


Figura 3. Folhas e pecíolo do pinhão manso

2.4.1 Frutos e sementes

O fruto é tipo cápsula trilocular, com uma semente por lóculo, composta de um pericarpo ou casca lenhosa, deiscente; inicialmente o fruto é verde (Figura 4), tornando-se amarelo a castanho, no estágio de maturação, em que o fruto se torna preto. As dimensões dos frutos são de 2,5 a 4,0 cm de comprimento por 1,5 a 3,0 cm de diâmetro (NUNES, 2007).

A semente apresenta formato ovalado, com tegumento rijo e quebradiço. Na parte superior, presença de uma proeminência carnuda, a carúncula (Figura 5). As dimensões das sementes, quando secas, são de 1,5 a 2,0 cm de comprimento e 1,0 a 1,5 cm de largura; no interior da semente, presença de uma película branca cobrindo a amêndoa. A amêndoa é albuminosa, branca e oleaginosa, contendo o embrião com formato reto, cotilédones foliáceos e arredondados (SATURNINO et al., 2005). A semente possui 45 % de casca e 55% de amêndoa; essas proporções dependem da variedade, condições ambientais e tratamentos culturais; contêm 25 a 40% de óleo inodoro, incolor, fluido, precipita a frio e é de fácil extração por pressão (PEIXOTO, 1973; BRASIL, 1985)



Figura 4. Frutos verdes (estádio inicial)



Figura 5. Sementes com presença da carúncula na parte superior

2.5 Aspectos agronômicos

Segundo PEIXOTO (1973) o pinhão manso prospera desde a orla marítima, no nível do mar, até altitudes de cerca de 1.000 m. De acordo com o autor, esta espécie se adapta com facilidade a diversas condições climáticas, revelando-se como espécie rústica, tanto nas regiões equatoriais úmidas como nas tropicais secas; é tolerante a longos períodos de estiagem nas regiões de solos de baixa fertilidade, apresentando produção satisfatória tanto em rendimento cultural como em relação ao teor de óleo.

Este vegetal pode tolerar extremos de temperatura, mas não geadas. O mecanismo de resistência aos períodos de seca é a paralisação de sua vegetação, com desfolha total, sobrevivendo às custas da água armazenada em seu caule. Sob irrigação, o pinhão manso pode florescer e produzir frutos o ano inteiro. As sementes produzidas em climas mais seco apresentam aumento no teor de óleo porém, sob condições de extrema seca, o vegetal perde suas folhas para conservar umidade (SATURNINO et al., 2005).

Conforme BRASIL (1985) a produtividade desta espécie é consideravelmente afetada pela distribuição irregular de chuvas e pela ação prolongada de ventos na época da floração. AKER (1997) observou que o florescimento do pinhão manso tende a ser episódico e a responder à variação de chuva, assim como o crescimento e a reprodução são influenciados pelo estágio nutricional da planta. Ocorrendo deficiência nutricional, este vegetal apresentou tamanho menor, mesmo antes do término do período chuvoso e, em se tratando de espécie caducifolia, a melhor época de plantio é no final do inverno e no início da primavera, ou no começo da estação de chuvas.

2.5.1 Propagação

A propagação do pinhão manso ocorre por via vegetativa ou clonal (estaquia, micropropagação ou cultura de tecidos e/ou estaquia) ou por via seminal. Comumente, nas comunidades rurais o pinhão manso é multiplicado via estaquia e, às vezes, via sementes. Plantas oriundas de sementes florescem nove meses depois de semeadas enquanto as multiplicadas via estaquia aos seis meses depois deste processo de propagação vegetativo. Além da precocidade no início da produção, a multiplicação clonal permite o aumento do número de indivíduos geneticamente iguais, o que favorece o aumento da população de indivíduos de qualidade superior (SATURNINO, et al., 2005); no entanto, PEIXOTO (1973) afirma que plantas oriundas de sementes são mais robustas, e de maior longevidade. A produção inicial ocorre depois de quatro a cinco anos e, segundo HELLER (1996), desenvolvem raízes laterais típicas enquanto nas estacas a raiz pivotante não se desenvolve e, conseqüentemente, as plantas oriundas de estacas toleram menos a seca, devido ao sistema radicular superficial.

2.6 Generalidades sobre sementes

A semente representa o início de uma nova geração esporofítica e a primeira etapa na sua formação é a abertura do botão floral, que corresponde à maturidade sexual da planta (esporófito). Os elementos básicos da estrutura da semente são o tegumento, embrião e tecido de reserva. Sob o ponto de vista funcional, a semente é composta de uma cobertura protetora, um eixo embrionário e um tecido de reserva. A estrutura externa, ou camada protetora, delimita a semente e pode constituir apenas do tegumento e, em alguns casos, também do pericarpo, e é composta por camadas celulares originárias dos

integumentos ovulares. As funções da cobertura externa são de proteção, barreira contra entrada de microorganismos, regular as trocas gasosas, hidratação e germinação, e manter unidas as partes internas da semente. O eixo embrionário é a parte vital da semente, capaz de iniciar divisões celulares e crescer; esta estrutura depende de uma fonte de energia e de substâncias orgânicas para assim iniciar o processo germinativo até que a plântula se torne autotrófica, esta fonte é o tecido de reserva que pode ser os cotilédones, e ou endosperma (POPINIGIS, 1977).

A maturação da semente compreende em transformações morfológicas, fisiológicas e funcionais que sucedem no óvulo fertilizado e culminam com o ponto de máximo peso de matéria seca; neste ponto, a semente atinge, também, máximo poder germinativo e máximo vigor. As principais modificações durante a maturação ocorrem no teor de água, tamanho, peso da matéria seca, poder germinativo e vigor da semente (POPONIGIS, 1977).

2.6.1 Teor de água

O teor de água, ou a quantidade de água contida nos grãos, e/ou sementes, influencia acentuadamente as características necessárias aos processos, como colheita, armazenagem, germinação entre outros (SILVA et al., 1995). A importância do teor de água nos produtos agrícolas, especificamente nos grãos e sementes durante a colheita, consiste em evitar perdas que ocorrem no campo durante a colheita mecânica, provocadas pelas máquinas colhedoras. Pesquisas realizadas em Nebraska (E.U.A), sobre os efeitos do atraso da colheita mecânica, mostraram que as perdas no campo aumentam à medida em que diminui o teor de água dos grãos na época de colheita devido a água contida nesses produtos funcionar como amortecedores contra choques mecânicos; entretanto, o atraso na colheita dos grãos maduros contribui consideravelmente para a sua deterioração. O retardamento na colheita após a maturação, é igual a “armazenar” sementes no campo, sob condições desfavoráveis, haja vista que as sementes em estágio avançado de maturação já se desligaram da planta-mãe e a relação entre ambas consiste apenas de uma ligação mecânica estando, assim, suscetíveis ao ataque de fungos e insetos, ou seja, expostas a fatores que contribuem para a perda de suas qualidades (PUZZI, 2000).

Durante o armazenamento, altos teores de água deterioram as sementes, causando perda do seu vigor e poder germinativo (ALMEIDA et al., 1997). Para se obter um armazenamento eficiente, deve-se ter em vista que o principal fator reside no quantitativo de água presente no produto armazenado, isto é, esta quantidade deve permanecer em um nível que não propicie o desenvolvimento de microorganismos, insetos e ácaros. A atividade respiratória também é amplamente controlada pelo grau de umidade; em todas as tentativas de armazenamento de grãos úmidos constata-se um notável incremento no metabolismo. A massa de grãos é aquecida, torna-se mofada, apresentando grãos germinados na superfície e, finalmente, terminando sua atividade vital, sobrevêm as podridões. Grãos mantidos com baixo teor de água podem ser armazenados durante muitos anos, apresentando pequenos prejuízos com relação às suas qualidades fisiológicas e composição química (PUZZI, 2000)

Segundo POPINIGS (1977) o teor de água do óvulo por ocasião da fertilização, é cerca de 80%, após a fertilização, ele aumenta ou se mantém aproximadamente o mesmo; a medida em que a semente se desenvolve ocorre um decréscimo desse teor de água, até entrar em equilíbrio com o meio ambiente, entre 14 e 20% de umidade. O tempo necessário para que o teor de água das sementes diminua de 80% para um nível entre 14 e 20%, varia entre as espécies. O conhecimento das modificações da quantidade de água nas sementes durante a maturação, é importante para o planejamento da colheita.

2.6.2 Sementes Ortodoxas, Intermediárias e Recalcitrantes

O armazenamento das sementes deve ser iniciado na fase de maturidade fisiológica cujo maior desafio é conseguir com que as sementes, após certo período, ainda apresentem elevada qualidade fisiológica; assim sendo, o objetivo é manter a qualidade das sementes durante o período de armazenamento. Quanto ao comportamento em relação a este período, as sementes são classificadas em recalcitrantes, intermediárias e ortodoxas (VILLELA e PERES, 2004).

Embora a maioria das sementes seja tolerante à dessecação na maturidade, sementes de muitas espécies não o são; elas têm, em geral, períodos de vida muito limitados durante o armazenamento, morrendo devido à secagem. Essas sementes, são denominadas “recalcitrantes” devido à dificuldade de armazená-las. Grande número de

espécies florestais possui sementes recalcitrantes, o que complica na conservação do germoplasma pela dificuldade de armazenamento; tais sementes podem apresentar alta ou baixa recalcitrância. Sementes de alta recalcitrância apresentam tolerância à retirada de poucos pontos percentuais de água e muita sensibilidade a baixas temperaturas, porém, as de baixa recalcitrância exibem tolerância à retirada de elevados pontos percentuais de água, reduzida sensibilidade a baixas temperaturas e baixa germinação, quando umedecidas (CASTRO et al., 2004).

As sementes classificadas como “intermediárias”, apresentam um tipo de comportamento em que podem ser desidratadas a conteúdos de baixo teor de água mas ainda assim apresentam longevidade mas podem, ser altamente sensíveis a danos de embebição ou baixas temperaturas (CASTRO et al. 2004).

As sementes ortodoxas podem ser secadas até baixos teores de água (5 a 7%) e armazenadas em ambientes com baixas temperaturas. Após a colheita podem sofrer secagem artificial e serem armazenadas durante longos períodos, preferencialmente a baixas temperaturas; são resistentes às adversidades no período de latência e, em condições adequadas, germinam (VILLELA e PERES, 2004).

2.6.3 Germinação

De acordo com CARVALHO e NAKAGAWA (1980) do ponto de vista agrônomico, a germinação é o processo que se inicia quando a semente seca é semeada em solo úmido, e termina quando a plântula emerge do solo. Acerca do conceito fisiológico, a germinação consiste no processo que se inicia com o suprimento de água à semente seca e termina quando o crescimento da plântula se inicia.

As sementes germinam quando as condições para o crescimento são favoráveis e elas não apresentam algum tipo de dormência. A primeira exigência para a germinação é a água; além disso, a germinação ocorre em determinada faixa de temperatura. Existem temperaturas mais apropriadas para a germinação, assim como temperaturas limitantes, dependendo da espécie (CARDOSO, 2004). As sementes podem, também, requerer luz e nutrientes para que a germinação seja bem sucedida; logo, a exigência de um conjunto específico de condições para a germinação está relacionada às características particulares

de cada espécie. Os processos fisiológicos do crescimento do embrião exigem atividades metabólicas aceleradas e a fase inicial de germinação consiste na ativação desses processos pelo aumento do teor de água e da atividade respiratória da semente (POPINIGIS, 1977).

Em teste de laboratório, a germinação de sementes é a emergência e desenvolvimento das estruturas iniciais do embrião, demonstrando sua aptidão para produzir uma planta normal, sob condições favoráveis de campo; para este fim, a plântula deve apresentar sistema radicular normal (com raiz primária e raízes secundárias), parte aérea (hipocótilo e epicótilo), cotilédones e coleóptilo. O objetivo principal do teste de germinação é obter e fornecer para fins de semeadura, dados que possam ser usados para comparar o valor de diferentes lotes de sementes (BRASIL, 1992).

2.6.4 Vigor

De acordo com HEYDECKER (1972) vigor é a condição de uma semente que está no auge de seu potencial, quando todos os fatores que possam prejudicar sua qualidade estão ausentes, e aqueles que constituem uma “boa” semente estão presentes nas proporções certas, promovendo um desempenho satisfatório na variação máxima das condições ambientais. A semente vigorosa origina uma plântula que cresce vigorosamente na fase de crescimento autotrófico. LIN (1982) afirma que o vigor das sementes varia com a espécie e dentro de uma mesma espécie, algumas cultivares são mais vigorosas que outras. Lotes diferentes de sementes de uma mesma cultivar poderão ter níveis de vigor diferentes.

Vigor e deterioração estão correlacionados pois o ponto de máximo vigor da semente é o de mínima deterioração; todavia, a deterioração inclui toda e qualquer mudança degenerativa e irreversível na qualidade, é a manifestação mais comum de queda de vigor (POPINIGIS, 1977).

As Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992) se referem aos testes de vigor baseados na avaliação das plântulas, em que são realizados em laboratório sob condições controladas ou em condições de campo; os testes de laboratório são instalados, em sua maioria, nas mesmas condições e metodologia do teste padrão de germinação.

2.6.5 Sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.)

Atualmente não se estabeleceram padrões internos para a produção e comercialização de sementes de pinhão manso no Brasil, e estas ainda não foram padronizadas pelas Regras para Análise de Sementes. Os parâmetros internacionais estabelecidos para a comercialização dessas sementes, são os seguintes: pureza, 100%; teor de óleo, 32,55 % e germinação, 60-80% (SATURNINO et al., 2005).

JOCKER e JEPSEN (2003) relatam que as sementes de pinhão manso são ortodoxas e, portanto, toleram a secagem até o teor de água de 5-7% b.u. e devem ser armazenadas em recipientes arejados. A temperatura ambiente, as sementes podem permanecer viáveis pelo menos por um ano, mas devido ao seu alto conteúdo de óleo, não devem ter um armazenamento prolongado, como em outras espécies ortodoxas. As sementes secas germinam, normalmente, sem necessitar de um pré-tratamento. Quando recém-colhidas e, em seguida semeadas, as sementes apresentam alta percentagem de germinação, em torno de 80%, a qual se inicia aos 10-30 dias após o semeio; normalmente, a emergência começa com 5 a 10 dias, de acordo com as condições ambientais. A germinação é epígea e o hipocótilo emerge acima da superfície do solo (Figura 6).

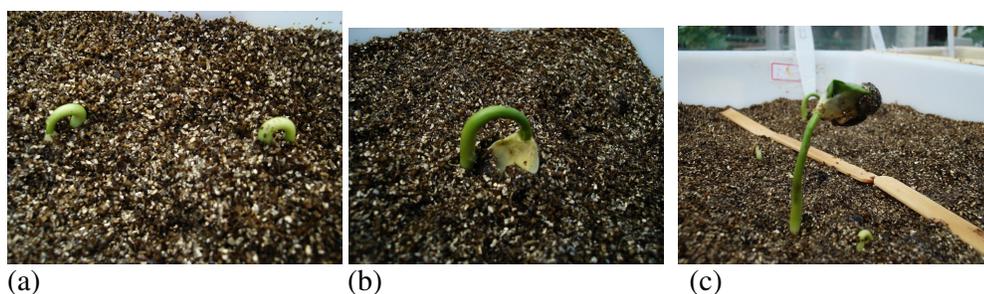


Figura 6. Fases da germinação do pinhão manso, destacando a germinação epígea

2.7 Considerações sobre os métodos de conservação de germoplasma vegetal

Com o aumento da população mundial, as fronteiras agrícolas e urbana se expandem, ocupando o habitat natural de numerosas espécies de plantas e animais. Este fenômeno vem causando profunda erosão genética da diversidade de espécies de plantas

nativas, ou mesmo provocando a sua total extinção (SANTOS, 2000). A erosão genética também tem ocorrido devido à substituição de cultivares domésticas e raças locais (“landraces”) selecionadas por agricultores e povos indígenas em virtude de seu valor nutricional, alta produtividade, resistência a doenças e estresses ambientais por cultivares melhoradas que possuem diversidade genética mais restrita (VILLALOBOS et al.,1991). A conservação de germoplasma de raças locais, cultivares domésticas e parentes silvestres de espécies agronômicas, tem sido uma das mais importantes áreas de pesquisa botânica, cujo principal objetivo é o desenvolvimento de técnicas para conservação a longo prazo, dos caracteres genéticos de espécies vegetais com a máxima integridade genética e biológica (BAJAJ, 1995).

Existem duas formas de conservação: conservação *in situ* e *ex situ*: conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas. *Ex situ* é a conservação de espécies vegetais fora do seu ambiente natural, através de coleções de plantas no campo, de sementes em bancos de sementes ou de coleções de plântulas em bancos *in vitro* (SANTOS, 2000).

Sementes é a forma mais comum de conservação *ex situ*, já que esta é a unidade de propagação natural para a maioria das espécies de plantas superiores; entretanto, é importante saber qual o tipo de semente, ou seja, se são ortodoxas, intermediárias ou recalcitrantes, para se estabelecer uma metodologia de armazenamento ou estratégias de conservação alternativa, se necessários (ENGELMANN, 1997). As espécies de plantas que se propagam exclusivamente por propagação vegetativa, necessitam de procedimentos de conservação especiais; essas espécies tem sido mantidas em bancos no campo ou em bancos de germoplasma *in vitro*. No primeiro caso, as plantas são mantidas como plantações no campo; este é um tipo de conservação eficiente para a manutenção de coleções por curto e médio prazo (ENGELMANN,1997; STUSHNOFF,1987). A obtenção de plantas se dá a partir de células isoladas, tecidos e órgãos de plantas, usando-se técnicas de cultura de tecidos, tecnologia esta denominada bancos de germoplasma *in vitro*. Este método de conservação foi concebido para ser uma alternativa na conservação de espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias ou aquelas propagadas vegetativamente. Existem desvantagens relacionadas à cultura de tecidos, pois assegura a conservação do germoplasma vegetal por curtos períodos de tempo (seis a doze meses) (SANTOS, 2000).

Portanto, um sistema de conservação a longo prazo para estruturas organizadas com alta estabilidade genética e biológica, precisa ser desenvolvido a fim de possibilitar o armazenamento de espécies propagadas vegetativamente e espécies com sementes recalcitrantes ou intermediárias. Atualmente, a criopreservação é a única técnica capaz de atender a esses pré-requisitos (SANTOS, 2000).

2.7.1 Criopreservação

A técnica de criopreservação consiste em conservar o material biológico em temperaturas ultra-baixas, em nitrogênio líquido, a -196°C , ou em seu vapor, em torno de -170°C . A esta temperatura, a divisão celular e os processos metabólicos cessam ou são paralisados e mantidos em estado latente, podendo o material permanecer armazenado por tempo indefinido sem alterações em sua estrutura (COELHO, 2006).

Quando se demonstrou, pela primeira vez, há quarenta anos, a possibilidade de criopreservar eficientemente esperma animal, a técnica se tem difundido para armazenar células vivas por longos períodos. A criopreservação é, então, importante para armazenar esperma, embriões humanos, eritrócitos e diversidade microbiana. Em vegetais, esta técnica é utilizada para a preservação de células de órgãos, da mesma forma para conservação de germoplasma e de material gerado em condições de laboratório (ABDELNOUR, 1999; ENGELMANN e ENGELS, 2002; SANTOS, 2000).

A capacidade de tecidos vegetais sobreviverem à criopreservação depende da sua tolerância à desidratação e à temperatura do nitrogênio líquido (-196°C), em razão disto, o desenvolvimento de um protocolo para criopreservação requer um conhecimento de mecanismos bioquímicos e biofísicos com a resposta dos tecidos à desidratação e ao congelamento (STUSHNOFF e SEUFFERHED, 1995).

2.7.2. Teor de água limite para criopreservação

De acordo com CAVALCANTI MATA (2001) as melhores condições de armazenagem de sementes são, até agora, desconhecidas. Os autores ressaltaram que experimentos iniciados em meados dos anos sessenta, mostraram que a temperatura e o

teor de água são importantes mas a exata relação entre essas variáveis não foi devidamente elucidada.

Estabeleceu-se, ao longo dessas últimas décadas de pesquisa em crioconservação em sementes, que existiria um limite máximo de teor de água para seu congelamento (High Moisture Freezing Limit-HMFL ou Teor de água Limite para Crioconservação-TALC), acima do qual a viabilidade da semente é reduzida; este limite crítico, é normalmente uma faixa relativamente estreita de teor de água dentro da espécie, mas pode variar entre espécies. Comumente, um aumento no teor de água da semente resulta em um declínio na sobrevivência da semente após o armazenamento em nitrogênio líquido; para que se possa viabilizar um armazenamento seguro em nitrogênio líquido, o TALC deve ser obtido, embora isto não possa ser possível para aquelas espécies cuja a viabilidade declina quando a semente é submetida ao processo de secagem (sementes recalcitrantes); nessas espécies, métodos de congelamento alternativos (congelamento de embriões) devem ser considerados (STANWOOD, 1985; TOUCHELL e DIXON, 1994; CAVALCANTI MATA, 2001). MEDEIROS et al. (1992) mencionam que as temperaturas criogênicas provocam danos às células por ocasião do congelamento rápido e esses danos podem ser devido à formação de cristais de gelo no espaço confinado intracelular, o que provoca a ruptura mecânica, tanto da estrutura mecânica quanto da estrutura citoplasmática, resultando em degradação celular, porém, de acordo com STANWOOD (1980), se as sementes são crioarmazenadas com teores de água entre 4 e 6%, o sucesso da crioconservação estará garantido. O pesquisador apresentou valores de teor de água críticos para o congelamento de diversas sementes (feijão, alho e gergelim entre outros) ressaltando a queda drástica do percentual de germinação quando da utilização de teores de água acima do nível crítico.

ROOS e STANWOOD (1981) pesquisaram sementes de alface e concluíram que a qualidade fisiológica era afetada quando as sementes eram crioconservadas com teores de água acima de 18% em base úmida. De acordo com STANWOOD (1987) igual resultado também ocorreu com a crioconservação de sementes de *Sesamum indicum* para teores de água acima de 12%. CASTRO et al. (2001) estudando o teor de água limite para sementes de urucum, observaram que entre os valores estudados de 6 a 12% em base úmida, não existia uma alteração significativa nos percentuais de germinação que foram de 87%, sendo recomendados para uso na crioconservação, teores de água dentro desta faixa. OSPINA et al. (2000) trabalhando com duas espécies do gênero

Passiflora, chegaram a valores diferentes para o TALC de cada uma das espécies, que variaram de 11% em *P. edulis*, e em torno de 9% para *P. ligularis*. Esta diferenciação em sementes de uma mesma espécie demonstra uma das mais marcantes características para o estabelecimento dos protocolos de criopreservação, ou seja, a especificidade dos fatores de cada protocolo em particular, sendo necessários estudos e avaliações para cada espécie.

2.7.3 Fatores que influenciam à criopreservação

De modo geral, estruturas de tamanho reduzido são mais apropriadas para o congelamento uma vez que a desidratação e o congelamento ocorrem de forma mais rápida e uniforme em estruturas menores. Material jovem, em estágio meristemático, é mais apropriado porque suas células são pequenas e contêm citoplasma denso com poucos vacúolos (ENGELMANN, 1991).

Os sistemas experimentais usados na criopreservação (calos, embriões zigóticos e somáticos, gemas apicais e laterais, sementes e suspensões celulares) são organismos hidratados com altos teores de água nas células; esta água precisa ser removida para evitar injúria causada pela formação de gelo durante o congelamento; a desidratação, no entanto, é uma etapa crítica uma vez que a água tem muitas funções biológicas nas células dos organismos vivos (SANTOS, 2000).

Quando a água é removida das células, os solutos se tornam mais concentrados aumentando, possivelmente, a taxa de reações químicas destrutivas; alguns solutos podem cristalizar-se mudando o potencial iônico e o pH da solução intracelular alterando, assim, o status metabólico da célula (KRAMER e BOYER, 1995). Estudos de ultra-estrutura de tecidos desidratados revelaram que as membranas celulares são o primeiro local de injúria. Em seu estado hidratado, as membranas celulares são formadas por uma dupla camada de fosfolipídios que está em estado cristalino líquido a temperaturas fisiológicas. Estes lipídios podem passar para uma fase de gel na mesma temperatura; se a água é removida dos seus grupos polares esta transição é completamente reversível após a reidratação. Um tipo de alteração letal e irreversível das membranas em consequência da desidratação é a mudança na sua composição lipídica (SANTOS, 2000).

A injúria decorrente do congelamento é, primariamente, conseqüência de alterações na semi-permeabilidade ou lises da membrana plasmática, resultando de desidratação induzida pelo congelamento, isto é, o dano mais significativo causado pelo congelamento às células vivas que está relacionado ao déficit hídrico (STEPONKUS, 1984).

O descongelamento é uma etapa crítica no desenvolvimento de um protocolo de criopreservação; durante esta fase pode haver formação de cristais de gelo e, em conseqüência, as células podem ser danificadas; esses cristais de gelo por sua vez, podem formar-se pelo congelamento da água liberada pela de-vitrificação, ou seja, a água que estava presente nas células e não se congelou durante a redução da temperatura mas sofreu vitrificação. Com o aumento da temperatura ocorre de-vitrificação, liberando água na forma líquida, que se pode congelar antes que a temperatura ambiente seja atingida; outra maneira é quando cristais de gelo diminutos, que podem ser formados durante o congelamento, têm a oportunidade de crescer, devido ao aumento da temperatura, formando cristais grandes os quais causam rompimento e morte das células (SANTOS, 2000).

2.7.4 Vitrificação e crioprotetores

As técnicas de criopreservação desenvolvidas mais recentemente se baseiam na vitrificação. Vitrificação, ou formação do estado vítreo, é o processo através do qual a água sofre uma transição da fase líquida para um estado sólido amorfo e meta-estável. O sólido assim formado é, na verdade, uma solução supersaturada e de alta viscosidade, o que lhe confere as propriedades mecânicas de um sólido, embora não haja a formação de uma estrutura cristalina. A transição para o estado vítreo não envolve mudanças químicas, mas apenas mudanças físicas na viscosidade do líquido (FAHY et al., 1984; FRANKS, 1982).

A vitrificação do citoplasma é obtida experimentalmente, através da desidratação dos tecidos para um teor de água em que não exista água livre para cristalização antes de mergulhar em nitrogênio líquido. Com isto, a solução celular se torna muito concentrada e pode passar pela transição de vitrificação quando uma velocidade de congelamento apropriada é utilizada evitando, deste modo, a formação de gelo durante a exposição a temperatura subzero (SANTOS, 2000).

A desidratação pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com uma solução altamente concentrada de crioprotetores químicos (solução de vitrificação) tais como dimetilsulfóxido, etileno glicol, metanol, glicerol e propileno-glicol; entretanto, esses crioprotetores podem causar citotoxicidade, provocando a morte das células (KARTHA, 1985; SAKAI, 1995). Recentemente, pesquisas demonstraram que açúcares como a sacarose, trealose e glucose, têm sido utilizados como substâncias crioprotetoras porque elas são excelentes agentes vitrificadores e, além disto, não apresentam toxicidade para as células vegetais, mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma (LEOPOLD, 1990).

2.7.5 Crioconservação de sementes

Segundo PITA VILLAMIL (1997) quando as sementes são congeladas a temperaturas inferiores a -130°C , o metabolismo é paralisado impedindo, deste modo, sua deterioração. Desta maneira, as sementes crioconservadas não necessitam ser periodicamente multiplicadas em campo. O conhecimento acerca do comportamento das sementes, deve ser levado em consideração para ocorrer uma crioarmazenagem adequada, ou seja, se a semente for ortodoxa ou intermediária, ela resistiria ao processo de conservação à temperatura subzero. De acordo com ROBERTS (1973) as sementes ortodoxas podem passar por um processo de secagem e serem conservadas a baixas temperaturas, durante longos períodos, mas as recalcitrantes perdem a viabilidade quando são secadas abaixo de um nível crítico de umidade (12-13% b.u).

Um vez definida a possibilidade de crioconservação das sementes, torna-se necessário conhecer o teor de água para a crioconservação (FARIAS, 2003). Segundo STANWOOD (1985) os quantitativos de água no interior do produto devem ser analisados pois a água a determinadas temperaturas negativas, entre 0 e -4°C se expande, podendo provocar o rompimento de determinadas células; assim, o mesmo autor afirma que é necessário determinar o teor de água limite que as sementes devem apresentar, a fim de que sua qualidade fisiológica não seja afetada. O teor de água limite para crioconservação pode variar de acordo com a espécie. Segundo o autor, o TALC vai desde 9,3 % base úmida para sementes de gergelim e 27, 2% para sementes de feijão.

TOUCHELL e DIXON (1994) armazenaram, em nitrogênio líquido, espécies de sementes nativas australianas, em que 40% foram de espécies raras ameaçadas de extinção no oeste da Austrália e verificaram que após a crioconservação as propriedades físicas e químicas das sementes foram preservadas. Pesquisas realizadas por STANWOOD e SOWA (1995) consistiram em crioconservar 14 variedades de sementes de alho (*Allium cepa* L) com um percentual médio de 92% de água, a temperatura de -196°C pelo tempo de 10 anos, os resultados demonstraram que não houve redução da germinação.

GONZALEZ-BENITO et al. (1994) estudaram a crioconservação de seis espécies leguminosas (*Bituminaria bituminosa*, *Colutea arborescens* subsp. *gallica*, *C. istria*, *Onobrychis eriophora* e *Prosopis juliflora*) com e sem dessecação em sílica gel por 30 dias, a maioria das espécies não apresentou diferenças significativas na percentagem de germinação. PENCE (1991) pesquisou a viabilidade das sementes de duzentas plantas (incluindo gramíneas, leguminosas, arbóreas e arbustivas) em processo de extinção em Ohio (USA) quanto à sua exposição em nitrogênio líquido e concluiu que 25% dessas espécies poderiam ser crioarmazenados em nitrogênio líquido.

2.8 Cinética de congelamento

O método geralmente usado para aumentar ou diminuir a temperatura de corpo, é colocá-lo em contato com outro que está aquecido ou frio, para que o movimento das moléculas do corpo quente, ou frio, possa acelerar o choque direto e constante das moléculas do corpo adjacente, e em razão da sua inércia abaixar a taxa de movimento das moléculas mais rapidamente, resfriando-o ou aquecendo; esta interação pode ser concebida como transferência de um pouco de energia (calor) de um corpo para outro (INCROPERA e DE WITT, 1992). Os três estados da matéria, sólido, líquido e gasoso, são caracterizados principalmente por taxas muito diferentes de mobilidade e o grau de ordem no arranjo das moléculas. No estado de gás as moléculas em agitação estão caoticamente distribuídas no espaço; no estado sólido (cristalino) elas são organizadas regularmente em posições relativamente fixas e, no estado líquido, as moléculas são compreendidas por ter uma ordenação em uma faixa estreita (COELHO, 2006).

Sempre que se provoca a redução da temperatura, se retardam consideravelmente os fenômenos promovidos pela ação de agentes deteriorantes, como microorganismos,

enzimas e reações químicas; assim e ainda segundo o mesmo autor, tempo maior de preservação do produto é obtido quando se utilizam baixas temperaturas. Como previsto, o estado de conservação da matéria-prima, manuseio e o método de resfriamento ou congelamento adotado, irão influenciar na qualidade do produto final (COELHO, 2006). GRUDA e POSTOLSKI (1996) reforçam que a velocidade de congelamento de um produto depende de diferentes fatores, dentro os quais se encontram os de congelamento, tamanho do produto, composição química, propriedades físicas (densidade, calor específico e difusividade térmica) e o tipo de embalagem ou envoltório). De acordo com COELHO (2006) o aspecto mais destacado do congelamento é a mudança de estado líquido a sólido, que sofre uma parte da água presente nos alimentos e produtos agrícolas. Isso permite a conservação durante longos períodos; contudo, a formação de cristais de gelo é uma das principais causas de certas modificações indesejáveis durante o congelamento.

De acordo com PEREDA et al. (2005) a associação de moléculas de água para formar uma pequena partícula ordenada e estável, é denominada nucleação; trata-se de um fenômeno difícil, porque as moléculas de água em estado líquido não se associam facilmente entre si para formar um sólido, e para que isto ocorra, é necessário que a temperatura seja inferior à do ponto em que se inicia o congelamento. É provável que, durante este super-resfriamento se formem agregados cristalinos de tamanho diminuto e de caráter instável, que não chegam a alcançar tamanho crítico. A nucleação terá início quando a temperatura alcançar o valor crítico (N) característico de cada amostra. Quanto maior for a velocidade com que se elimina o calor do produto, maior também será o número de núcleos formados.

O crescimento dos cristais de gelo depende da difusão e da orientação de moléculas de água na superfície do núcleo. O número de moléculas de água que se unem ao núcleo deve ser maior das que se afastam dele. Diferentemente da nucleação, o crescimento dos cristais pode ocorrer em temperaturas muito próximas ao ponto de fusão. A velocidade de crescimento dos cristais também depende da velocidade de resfriamento. A presença de diversos solutos nos alimentos, por exemplo, pode dificultar o crescimento dos cristais de gelo. (FENEMMA, 1996; FELLOWS, 1994).

A diminuição da temperatura durante o congelamento se divide em três etapas, em que a primeira consiste no resfriamento do produto até a temperatura em que se inicia seu congelamento (eliminação de calor sensível); na etapa seguinte, produz a cristalização de maior parte da água presente no produto (subtração de calor latente correspondente à formação de cristais de gelo); esta etapa é justamente a que requer mais energia pelo elevado calor latente de fusão da água (335 KJ kg a 0°C e pressão atmosférica); na terceira etapa, ocorre posterior redução da temperatura até a temperatura final desejada (é preciso eliminar novamente o calor sensível) (PEREDA et al., 2005; COELHO, 2006).

2.8.1 Difusividade térmica

De acordo com FARIAS (2003) o estudo da difusividade térmica é necessário para se determinar as curvas de temperatura dos produtos agrícolas, durante processos de transferência de calor, para a delimitação dos próprios procedimentos usados nessas operações. Quando um processo de transferência de calor satisfaz uma condição transiente, a propriedade térmica principal é a difusividade térmica (α). Permite estabelecer a rapidez com que o calor se difunde no material que esfria ou aquece (KASAHARA et al., 1986).

Segundo ROSS e ROA (1980) para a determinação das mudanças de temperaturas internas do produto sujeito aos processos de refrigeração faz-se necessário a determinação da difusividade térmica α , sendo que, para sementes, são supostas duas condições, ou seja, a determinação da difusividade de grãos ou sementes individuais é realizada colocando-se termopares no interior desses produtos; os termopares são inseridos nos espaços intergranulares.

Segundo NEVES FILHO (1991) para determinar a difusividade térmica de um produto obtidos a condutividade térmica e o calor específico, os cálculos são realizados de acordo com a seguinte equação (1):

$$\alpha = \frac{k}{\rho \cdot Cp} \quad (1)$$

em que,

α = difusividade térmica, $m^2.s^{-1}$

k = condutividade térmica, $W.m^{-1}.^{\circ}C^{-1}$

ρ = massa específica, $Kg.M^{-3}$

Cp = calor específico, $J.Kg^{-1}.^{\circ}C^{-1}$

A difusividade térmica é utilizada em situações em que a transferência de calor ocorre em regime transiente, e é expressa pela segunda Lei de Fourier (PARK et al., 2001).

Dada por:

$$\frac{\alpha^2 T}{\alpha x^2} \quad (2)$$

em que,

T = temperatura, K

X = comprimento ou espessura, m

θ = tempo, s

α = difusividade térmica, $m^2.s^{-1}$

Os valores de difusividade variam consideravelmente para um determinado produto, alcançando diferenças de 25% ou mais para produtos com alto teor de água (QUEIROZ, 1994). Os materiais com difusividade térmica alta podem ser aquecidos ou resfriados rapidamente, enquanto com baixa difusividade térmica são propriedades significativas quando se consideram situações de calor em estado não estacionário (LEWIS, 1993).

YANG e ZHAO (2001) estudando sementes de nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L) e de alfafa (*Medicago sativa* L) com temperatura ambiente variando de 30 a 80°C e teores de água de 4,6 a 6,5% para sementes de nabo e 5,0 a 7,3% para sementes de alfafa, observaram que a difusividade térmica aumentou de $25,13 \times 10^{-8}$ para $34,47 \times 10^{-8} m^2/s$ nas sementes de nabo e de $27,14 \times 10^{-8}$ para $29,73 \times 10^{-8}$ em sementes de alfafa. MUNDE (1998) pesquisou a difusividade térmica calculada pelo método transiente para sementes de soja, em que observou que a difusividade aumentou com o aumento do teor de água de

9,5 a 30,62%. FASIN e SOKHANSANJ (1995) estudando a difusividade térmica em sementes de alfafa peletizada cujo teor de água variando entre 7,5 a 18% b.u., constataram aumento da difusividade de 1,05 para $2,50 \times 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$.

JEKENDRA et al. (1995) estudaram a difusividade térmica com diferentes teores de água para trigo, milho, sorgo e gergelim e concluíram que ocorreu diminuição da difusividade com aumento do teor de água, ao observarem uma difusividade mínima de $2,46 \times 10^{-3} \text{ m}^2/\text{h}$ para o milho, com 28,4%, e uma difusividade térmica máxima de $3,77 \times 10^{-3} \text{ m}^2/\text{h}$ para sorgo, com 8,35% de água.

2.9 Microorganismos em produtos agrícolas armazenados

Os fungos são os principais microorganismos presentes nos produtos agrícolas armazenados, especificamente em grãos e sementes; esses microorganismos constituem a principal causa das deteriorações constatadas nestes produtos durante o período de armazenamento (PUZZI, 2000).

De acordo com BARRETO (2001), os fungos são organismos que preferem ambientes ou substratos com elevado teor de água e, para se alimentarem, têm de absorver substâncias elaboradas, especialmente carboidratos. A atividade destes seres vivos durante o seu desenvolvimento, consiste em metabolizar carboidratos, proteínas e matérias graxas. Estes microorganismos são responsáveis pelo aumento do processo respiratório dos grãos e sementes úmidos, processo este formulado por meio de um carboidrato, a glicose, ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) apresentado pela equação:



Segundo BARRETO (2001), os índices de deterioração causados pelos fungos podem ser estimados pela taxa de gás carbônico (CO_2) produzido por unidade de massa do produto, aumento do teor de água (em função da água metabólica produzida) e da quantidade de calor desprendido.

Atualmente, os fungos são considerados os principais causadores de danos em grãos, sementes e outros produtos agrícolas, pois os insetos e roedores são combatidos por

meio de técnicas modernas. As perdas dos produtos, provocados por patógenos durante o armazenamento inadequado, podem alcançar o total da massa armazenada (SILVA et al., 1995).

2.9.1 Fungos de campo e fungos de armazenamento

Os fungos são os principais agentes causadores de doenças em plantas cultivadas; os que atacam sementes e grãos, são classificados fungos de campo e fungos de armazenamento (SILVA et al., 1995).

Fungos de campo são aqueles que atacam sementes e grãos antes da colheita, ou seja, durante o período de crescimento e maturação. Para crescer, estes patógenos requerem uma umidade relativa em torno de 90 a 95% o que, para a maioria dos cereais, corresponde a um teor de água em torno de 25% em base úmida; esses agentes patogênicos têm o crescimento paralisado quando o teor de umidade e a temperatura dos produtos biológicos atingem valores baixos, em torno de 12% e 10°C (SILVA et al., 1995). Os esporos desses fungos podem sobreviver durante muito tempo em produtos úmidos, mas, não conseguem desenvolver-se nos produtos, grãos e sementes armazenados com teor de água em equilíbrio com a umidade relativa inferior a 75% (CHRISTENSEN, 1972; POPINIGIS, 1977).

A predominância de determinadas espécies fúngicas depende das condições climáticas da área geográfica em que é implantada determinada cultura. Com relação aos cereais (trigo, arroz, cevada e aveia) cultivados em diversas regiões do mundo, os fungos de campo mais importantes pertence às espécies dos gêneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Helminthosporium*. Os patógenos de campo alteram as propriedades organolépticas dos produtos; em sementes, além de reduzirem o potencial germinativo e o vigor, esses organismos causam podridões nas raízes e outras doenças de plantas (PUZZI, 2000).

Segundo SILVA et al. (1995) fungos ecologicamente denominados fungos de armazenamento são aqueles que se desenvolvem nos produtos agrícolas armazenados, especificamente em grãos e sementes cujo teor de água está em equilíbrio com umidades relativas entre 65-90%. Esses fungos, sobretudo os dos gêneros *Aspergillus*

e *Penicillium*, se adaptam a ambientes com baixa umidade relativa e raramente atacam produtos com teor de água superior a 25% em base úmida. Os fungos mais comumente encontrados causando deterioração de grãos e sementes em condições de armazenamento são: *Aspergillus repens*, *A. amstelodami*, *A. ruber*, *A. restrictus*, *A. glaucus*, *A. halophilicus*, *A. candidus*, *A. ochraceus*, *A. flavus*, *A. parasiticus* e algumas espécies do gênero *Penicillium*.

A umidade relativa e a temperatura são fatores decisivos no desenvolvimento de fungos nos produtos armazenados, visto que cada espécie apresenta um limite mínimo de umidade relativa, abaixo do qual não se desenvolve; há, também, temperaturas mínimas e máximas para o desenvolvimento das várias espécies e uma temperatura ótima (POPINIGIS, 1977). PUZZI (2000) menciona que sob condições ótimas de temperatura, e limites mais baixos de umidade relativa, permitem a sobrevivência de diversas espécies de fungos que são encontrados com frequência nos grãos e sementes armazenados. Esses dados são relatados na Tabela 1.

Tabela 1. Umidade relativa. mínima para a sobrevivência dos principais fungos de armazenamento, sob condições ótimas de temperatura (26 – 30°C).

Fungos	U.R. Mínima %
<i>Aspergillus restrictus</i> e <i>Aspergillus halophilicus</i>	70
<i>Aspergillus glaucus</i>	73
<i>Aspergillus candidus</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i>	80
<i>Aspergillus flavus</i>	85
<i>Penicillium</i> (depende da espécie)	80 - 90

Fonte: PUZZI (2000)

Em condições de umidade relativa de equilíbrio acima de 70%, os fungos se desenvolvem durante o armazenamento, e o aquecimento da massa de grãos ocorrerá com conseqüente deterioração do produto. A umidade relativa de equilíbrio apresenta as condições de vapor de água para o desenvolvimento dos fungos associados a grãos e sementes e, assim, indica o potencial de conservação do produto. A Tabela 2 contém os níveis mínimos de água de diversos grãos, em equilíbrio com a umidade relativa, para o desenvolvimento das principais espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* (PUZZI, 2000)

Tabela 2. Teor de umidade mínimo, em equilíbrio com diferentes níveis de umidade relativa para a sobrevivência das principais espécies de fungos de armazenamento

Grãos	<i>Aspergillus</i>				<i>Penicillium</i>
	<i>A. restrictus</i>	<i>A. glaucus</i>	<i>A. candidus</i>	<i>A. flavus</i>	Diversas espécies
	<i>A. ochraceus</i>				
	70% U.R	73% U.R	80% U.R	85% U.R	80-90% U.R.
Milho	13,5 - 14,5%	14,0 - 14,5%	15,0 - 15,5%	18,0 - 18,5%	16,5 - 19,0%
Trigo	13,5 - 14,5	14,0 - 14,5%	15,0 - 15,5%	18,0 - 18,5%	16,5 - 19,0%
Sorgo	14,0 - 14,5%	14,5 - 15,0 %	16,0 - 16,5%	19,0 - 19,5%	17,0 - 19,5%
Soja	12,0 - 12,5%	12,5 - 13,0%	14,5 - 15,0%	17,0 - 17,5 %	16,0 - 18,5%

Fonte: PUZZI (2000)

De acordo com SILVA et al. (1995) as principais condições que alteram o desenvolvimento de microorganismos patogênicos nas unidades de armazenamento, são o teor de água, temperatura, grau de contaminação, impurezas, tempo de armazenamento, ataque de insetos, taxa de oxigênio na atmosfera do armazém, danos físicos durante a colheita e beneficiamento. Os principais danos causados por esses microorganismos aos produtos biológicos, são: a redução na germinação, descoloração, produção de toxinas, aquecimento, transformações bioquímicas, emboloramento, mofo e apodrecimento, especificamente nos grãos e sementes.

2.9.2 Fungos em sementes

Segundo ALVES et al. (2006) a semente é um meio de sobrevivência de fitopatógenos por longos períodos de tempo. Patógenos associados a sementes causam redução na germinação, vigor e deterioração nesses produtos em condições de estocagem e podem introduzir patógenos em novas áreas e aumentar o inóculo em lavouras já estabelecidas.

CASAROLI et al. (2006) relataram que danos decorrentes da associação dos patógenos com as sementes não se limitam a perdas diretas da população em campo, mas envolvem outras implicações que podem provocar sérios danos em todo o sistema de produção. Para um grande número de doenças, as sementes portadoras de seus agentes causais constituem sua única forma de perpetuação de disseminação na natureza; assim, avaliar a qualidade sanitária e fisiológica de sementes é imprescindível para a obtenção de mudas e de plantas sadias (MARCOS FILHO, 2001).

Esporos e micélios de fungos patogênicos normalmente já estão presentes na superfície da semente quando esta é colocada na unidade de estocagem (BARRETO, 2001). POPINIGIS (1977) relata que sementes de milho, trigo e sorgo armazenados, são invadidas por patógenos quando seu teor de água é de 14% ou superior, enquanto na soja o teor de água é em torno de 12% ou superior. Com teores de água mais baixos em sementes, próximos ao limite mínimo para o crescimento dos fungos, o ataque é lento; todavia, a medida em que o teor de água da semente se eleva, torna-se mais propícia a redução de sua qualidade fisiológica em virtude do rápido crescimento do microorganismo responsável pela ação patogênica.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELNOUR, A. Crioconservation de plants, estado actual de la investigacion em Costa Rica. **Agronomia Costarricense**, San José, Costa Rica, v.23, n.2, p.205-214,1999.

AKER, C.L. Growth and reproduction of *Jatropha curcas* L. In: Symposium “Jatropha 97”, 1997, Managua, Nicarágua. **Abstract...** Biofuels and industrial products form *Jatropha curcas*. Graz, Austria: University of Technology, 1997
Disponível em: <http://www.jatropha.de/conferences/abstracts-jatropha97.htm>.
Acesso em:05.dez.2007.

ALMEIDA, F. de A.C.; MATOS, V.R.; CASTRO, J.R.de.; DUTRA, A.S. Avaliação da qualidade e conservação de sementes em nível de produtor. In: ALMEIDA, F.de A.C.; HARA, T.; CAVALCANTI, MATA, M.E.R.M. (ed). **Armazenamento de grãos e sementes nas propriedades rurais**. Campina Grande: UFPB/SBEA, 1997. cap1, p.4-34.

ALVES, M.C.; POZZA, E.A.; MACHADO, J.C.; ARAÚJO, D.V.; TALAMINI, V.; OLIVEIRA, M.S. Geoestatística como metodologia para estudar a dinâmica espaço-temporal de doenças associados a *Colletotrichum* spp. transmitidos por sementes. **Revista Brasileira de Fitopatologia**, Brasília, v.36, n(6), nov-dez, 2006, p.557-573.

ARRUDA, F.P.de.; BELTRÃO, N.E.de M.; ANDRADE, A.P.de A.; 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, 2004.

BAJAJ, Y.P.S. Criopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. In: BAJAJ, Y.P.S. (Ed.) **Biotechnology in agriculture**

and forestry. v.32. Cryopreservation of plant germplasm I. Berlin, Heidelberg, Springer-Verlag, 1995.p.3-28.

BARRETO, R. W. **Fungos Fitopatogênicos.** Viçosa: Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2001. 48p.

BELTRÃO, N.E. de M. **Informações sobre o biodiesel, em especial com o óleo de mamona.** Campina Grande, PB: EMBRAPA Algodão, 2002. 44p. (Embrapa Algodão. Documento, 97).

BELTRÃO, N.E. de M.; CARTAXO, W.V. 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. 3º CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS e BIODIESEL, 3, 2006, Varginha. **Anais...**Varginha, 2006.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais.** Brasília, 1985.364p. (Documentos, 16).

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes.** Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CARDOSO, V.J.M. Dormência: Estabelecimento do Processo. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (ed). **Germinação do básico ao aplicado.** São Paulo: ed. Artmed, 2004. cap5, p.96-108.

CARNIELLE, F. O combustível do futuro. 2003. **Disponível em:** www.ufmg.br/boletim/bul1413. Acesso em: 01 de dezembro de 2007.

CARVALHO, N.M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: Ciência, tecnologia e produção.** Campinas: Fundação Cargil, 1980. 424p

- CASAROLI, D.; GARCIA, D.D.; MUNIZ, M.F.B.; MENEZES, de L.N. Qualidade sanitária de sementes de abóbora variedade menina brasileira. **Fitopatologia Brasileira**. v.32, n.2, p.158-163, 2006.
- CASTRO, R.D. de.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (ed). **Germinação do básico ao aplicado**. São Paulo: ed. Artmed, 2004, cap.3, p.53-65.
- CASTRO, A.A.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; BRAGA, M.E.D. Teor de umidade limite para criopreservação de sementes de urucum (*Bixa orella* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**. Viçosa, v.5, n.1, p.17-22, 2001.
- CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. **Tecnologia de criopreservação de sementes de urucum**. Campina Grande, 2001. 68p. (Projeto de Pesquisa).
- CHRISTENSEN, C.M. Microflora and seed deterioration. In: ROBERTS, E.H. (ed). **Viability of seeds**. Syracuse, USA, Syracuse Univ.Press, 1972. p.59-93.
- COELHO, R.R.P. “**Protocolo de criopreservação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. raça *Latifolium* Hutch.) cultivares BRS 200 marrom e BRS verde**”. 2006. 89p. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia, PB.
- CORTESÃO, M. **Culturas tropicais: plantas oleaginosas**. Lisboa: Clássica,1956. 231p.
- ENGELMANN, F. *In vitro* conservation of tropical plant germplasm-a review. **Euphytica**, v. 87, p.227-243, 1991.
- ENGELMANN, F.; ENGELS, J.M.M. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In: ENGELS, J.M.M.; RAO, V.R.; BROWN, A.H.D.; JACKSON, M.T. (eds). **Managing Plant Genetic Diversity**, cap 9, International Plant Genetic Resources Institute, Rome Italu, p.89-103, 2002.

ENGELMANN, F. Importance of desiccation for the cryopreservation of recalcitrant seed and vegetatively propagated species. **Plant Genetic Resources Newsletter**, v.112, p.9-18, 1997.

FAHY, G.M.; MACFARLANE, D.R.; ANGELL, C.A.; MERYMAN, H.T. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, p. 407-426, 1984.

FARIAS, D.C. de. **Desenvolvimento de um protocolo para criopreservação de sementes de sementes de jatobá: fitossanidade e cinética de congelamento**. 2003. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia Agrícola, Campina Grande, PB.

FASIN, O.O.; SOKHANSANJ, S. Bulk thermal properties of alfalfa pellets. **Canadian Agricultural Engineering**, v.37, n.2, p.91-95, 1995.

FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y prácticas**. Acribia: Zaragoza, 1994. 504p.

FENEMMA, O.R. **Food Chemistry**. Marcel Drecker: New York, 1996, 1024p.

FRANKS, F. The properties of aqueous solutions at subzero temperature. In: FRANKS, F. (ed). **Water: comprehensive treatise**. New York, Plenum Press, p.215-218, 1982.

GONZALEZ-BENITO, M.E.; CAZE FILHO, J.; PEREZ, C. **Cryopreservation of seeds of several legume species**. Departamento de Biología, Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Ciudad Universitaria, Madrid, Spain. *Plant Varieties & Seeds*, vol .7(1).1994, p.23-27.

GRUDA, Z.; POSTOLSKI, J. **Tecnología de la congelación de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1996, 631p.

HELLER, J. **Physic nut, *Jatropha curcas*: promotion and of underutilized and neglected crops**. Rome: IPGRI, 1996. 66 p.

HEYDECKER, W. Vigour. In: ROBERTS, E.H. (ed). **Viability of seeds**. Syracuse, USA. Syracuse University Press, 1972, p.52-209.

INCROPERA, F.P.; DE WITT, D.P. **Fundamentos de transferência de calor e Massa**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992, 455p.

JEKENDRA, Y.; RAO, V.V.; SHERIF, T.; THOMAS, R.; SREENARAYANAN, V.V. Effect of moisture content on thermal diffusiveness of grains. **Agricultural Mechanization in Asia, Africa and Latin America**, v.26, n.3, p.49-50,1995.

JOKER, D.; JEPSEN, J. *Jatropha curcas* L. Seed Leaflet, **Humbleback**, Denmark, n.83, p.1-2, Aug, 2003.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. (ed). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1985, p.115-134.

KASAHARA, G.I.; GARRIDO, B.F.; SIMPSON, R.R.; ALDUNARTE, M.M.I.; CORNEJO, F.F. Cinética de congelacion y propiedades termofísicas em dos espécies de frutales menores. In: KASAHARA, G.J. **Tópicos de calor y propiedades termofísicas en: refrigeración y congelación de alimentos**. Santiago de Chile: Maval, 1986, cap.4, p.81-109.

KOBILKE, H. **Untersuchungen zur bestandesbegrundung purgiernub (*Jatropha curcas* L.)**. Stuttgart: University Hohenheim, 1989. p.37-40.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. San Diego, CA, Academic Press, 1995.

LEOPOLD, A.C. Coping with desiccation. In: ALSCHER, J.G.; CUMMING, J.R. (eds). **Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms**. New York, Wiley-Liss, 1990. p.37-56.

LEWIS, M. J. **Propriedades físicas de los alimentos y de los sistemas de procesado.** Zaragoza: Acribia, 1993, 494p.

LIN, S.S. Efeito do vigor da semente no desempenho da planta de soja (*Glycine max* L.) no campo. **Agronomia Sulriogradense.** Porto Alegre, v.18, n.1, p.37-46, 1982.

LUZ, W.C. da. Combinação de tratamentos biológico e químico de sementes de milho. **Fitopatologia Brasileira,** v.28, p.37- 40, 2003.

MARCOS FILHO, J. Pesquisa sobre vigor de sementes de hortaliças. **Informativo ABRATES,** v(11), p.63-75, 2001.

MEDEIROS, A. C. de S.; CZARNESKI, C.M.; FREITAS, G.F.de. Criopreservation de aroeira (*Astronium urundeuva* Fr. All.). In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2, **Anais...**, São Paulo-SP. 1992, p.544-547.

MUNDE, A.V. Effect of moisture content on thermal properties of soybean. **Journal of Maharashtra, Agricultural-Universities,** v.23,n.3, p.291-294, 1998.

NEVES FILHO, L. de C. **Refrigeramento, congelamento e estocagem de Alimentos.** São Paulo-SP. IBF/ABRAVA/SINDRATOR,1991, 176 p.

NUNES. L.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, Lavras, MG.

OSPINA, J.A.; GUEVARA, C.L.; CAICEDO, L.E.; BARNEY, V. Effects fo moisture contento on *Passiflora seed* viability after immersion in liquid nitrogen. In: ENGELMANN, F.and TAKAGI, H. (eds). **Cryopreservation of tropical plant germplasm-Posters.** Japan International Centre FOR Agricultural Sciences, Tsukuba/International Plant Genetic Resource Institute, Rome, Italy, p.384-388, 2000.

PARK, K.J.; YADO, M.K.M.; BROD, F.P.R. Estudo de secagem de pêra barllett (*Pyrus* sp.) em fatias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.21, n.3,p.288-292, 2001.

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

PENCE, V.C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. **Seed Science and Technology**, Zurich-Suíça, v.19, n.2, p.235-351, 1991.

PEREDA, J.A.O.; RODRIGUES, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L. de la. H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnologia de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. v.1, Porto Alegre: Artmed, 2005. 245p.

PITA VILLAMIL, J. Crioconservación de semillas In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 26, Campina Grande, 1997. **Minicurso**. Campina Grande: UFPB/sbea, 1997, 55p.

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Ministério da Agricultura, AGIPAN, 1977, 289p.

PROJECT ZÂMBIA GTZ-ASSP. **The *Jatropha* Booklet**. A Guide to *Jatropha* Promotion in Zambia. 2000. 34p.

PURCINO, A.A.C.; DRUMMOND, O.A. **Pinhão manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986.7p.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campinas. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2000, 666p.

QUEIROZ, A.J. de M. **Propriedades físicas e pré-resfriamento de umbu (*Spondias tubersa* Arruda Câmara)**. 1994. 108f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola)-Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande.

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

ROOS, E.E.; STANWOOD, P.C. Effects of low temperature, cooling rate and moisture content on seed germination of lettuce. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.106, p.30-34,1981.

ROSS, S.J.; ROA, G. **Secagem e armazenamento de produtos agropecuários com uso de energia solar e ar natural**. Academia de Ciências do Estado de São Paulo. Publicação ACIESP n. 22, 1980, 295 p.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v.12, (Edição Especial): p.70-84, 2000.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of wood plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). **Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 32. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer- Verlag, 1995. p.53-69.

SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. Produção de oleaginosas para o biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n.229, p.44-74, 2005.

SILVA, J.de S.; DONZELES, S.M.L.; AFONSO, A.D. Qualidade dos grãos. In: SILVA, J.de S. (ed). **Pré- processamento de produtos agrícolas**. Instituto Maia, 1995. cap2, p.24-29.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation In: KARTHA, K.K (ed). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Rotan: CRC Press, 1985, p.199-225

STANWOOD, P.C. Tolerance of crops seeds cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). **Journal of seed Technology**, v.5, n.1, p.26-3, 1980.

STANDWOOD, P.C. Survival of sesame seeds at the temperature (-196°C) of liquid nitrogen. **Crop Science**, v.27, p.327-331, 1987.

STANWOOD, P.C.; SOWA, S. Evaluation of onion (*Allium cepa* L.) seed after years of storage 10 years of storage at 5, -18 and -196°C. **Crop Science**. v.35, p.852-856, 1995.

STEPONKUS, P.L. Role of the plasma membrane in freezing injury and cold acclimation. **Annual Review of Plant Physiology**, v.35, p.543-584, 1984.

STURSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic resources. In: BAJAJ, Y.P.S.(ed). **Biotechnology in Agriculture and Forestry, Cryopreservation of Plant Germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1995. p.87-101.

STUSHNOFF, C. Cryopreservation of apple genetic resources. **Canadian Journal of Plant Science**, v.67, p.1151-1154, 1987.

TOUCHELL, D.H.; DIXON, K.W. Cryopreservation for seedbanking of Australian species. **Annals of Botany**, London, v.74, p.541-546, 1994.

VILLALOBOS, V.M.; FERREIRA, P.; MORA, A. The use of biotechnology in the conservation of tropical germplasm. **Biotech Advances**, v.9, p.197-215, 1991.

VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta e beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. (ed). **Germinação do básico ao aplicado**. São Paulo: ed. Artmed, 2004, cap.17, p.265-271.

YANG, J.; ZHAO, Y. Thermal properties of radish and alfalfa seeds. Department of Food Science & Technique, University Corvallis, USA. **Journal of Food Process Engineering**, v.24, n.5, p.291-313, 2001.

ZORATO, M.F.; HENNING, A.A. Influência de tratamentos com fungicidas antecipados, aplicados em diferentes épocas de armazenamento, sobre a qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, p.236-244, 2001.

CAPÍTULO II

TEOR DE ÁGUA LIMITE PARA CRIOCONSERVAÇÃO DAS SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)

1. INTRODUÇÃO

O ciclo de vida em plantas superiores compreende o desenvolvimento de uma semente por sua germinação e o desenvolvimento pós-germinativo, por meio do crescimento vegetal. Ambos os períodos são marcados por eventos fisiológicos específicos relacionados às mudanças distintas no peso fresco, no peso seco e no teor de água.

As sementes são seres vivos constituídos de água e matéria seca. O termo teor de água se refere à quantidade de água existente na semente em relação à sua massa total. Na matéria seca das sementes se encontram os carboidratos, as proteínas, os óleos, as cinzas e as vitaminas (ALMEIDA et al., 2006).

A água exerce papel importante em todos os processos fisiológicos que ocorrem com as sementes, desde sua formação até senescência. A semente muda de um estado metabolicamente ativo para um estado inativo após a maturação, por efeito da dessecação e retorna a um estado metabolicamente ativo durante a germinação, por efeito de uma sorção de água (CASTRO et al., 2004).

De acordo com ALMEIDA et al. (2006) o estado inativo de uma semente, após a maturação, é função da umidade relativa do ar e da temperatura do ambiente, pois essas condições ambientais definem o teor de água de equilíbrio das sementes.

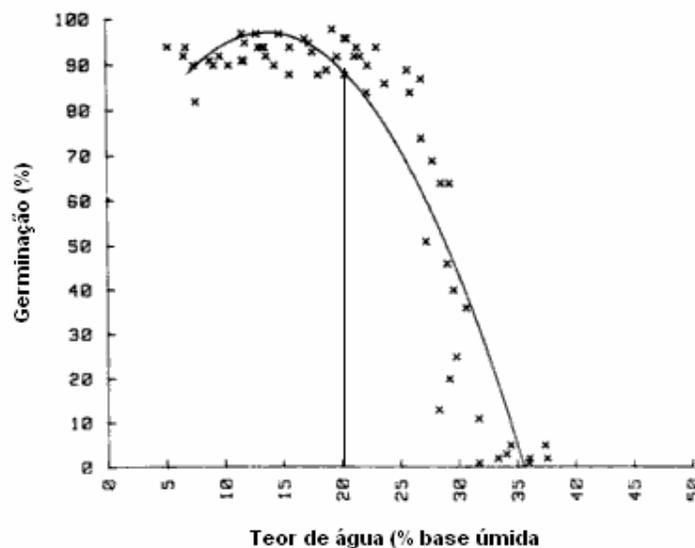
Quando as condições ambientais são inadequadas e o teor de água de equilíbrio das sementes se eleva a determinados níveis que passam a ser impróprios para a conservação desse material, inicia-se, nessas condições, a perda acentuada da qualidade fisiológica.

Em função desses fatores, a conservação das sementes é feita em Bancos de Germoplasma sob condições controladas. Na maioria dos bancos, as sementes são mantidas a uma temperatura de 10°C e umidade relativa do ar de 40%. No entanto, segundo GONZAGA et al. (2003) este tipo de banco de germoplasma não evita a erosão genética das espécies e recomendam a utilização de bancos criogênicos para a conservação das espécies vegetais.

De acordo com KARTHA (1985), dentre as técnicas de armazenamento de sementes a criopreservação, isto é, o armazenamento das sementes a baixas temperaturas (vapor do nitrogênio -170°C ou no nitrogênio líquido a -196°C) proporciona o potencial para uma preservação sem limites de tempo com redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração biológica é praticamente paralisada

Diversos autores têm descrito que o percentual de teor de água das sementes interfere no processo de criopreservação (DINIZ, 1999; COELHO e CAVALCANTI MATA, 2005). De acordo com CUNHA (1996) o teor de água da semente é, provavelmente, o fator mais crítico para o sucesso da criopreservação, pois se este teor for muito alto, ocorre morte instantânea da semente durante o processo de congelamento e/ou descongelamento. Convencionou-se, desta forma, adotar um limite máximo do teor de água das sementes no processo de congelamento (High Moisture Freezing Limit-HMFL ou Teor de Umidade Limite para a Criopreservação-TULC), acima do qual a viabilidade da semente é reduzida (STANWOOD, 1985). Normalmente este limite crítico é, segundo o autor, uma faixa relativamente estreita de teor de água que pode variar entre espécies e dentro da própria espécie.

Na Figura 7 se encontram os resultados descritos por STANWOOD (1985) em que se observa que as sementes de trevo passam a ser afetadas quando são criopreservadas a temperatura de -196°C com teores de água acima de 20% b.u. Nesta figura, ao se considerar a equação quadrática que representa o teor de água limite, verifica-se que este valor pode ser alterado, uma vez que o ponto de máxima inflexão dessa equação está em torno de 14% base úmida.



Fonte: STANWOOD (1985)

Figura 7 – Semente de trevo – High moisture freezing limit – HMFL

DINIZ (1999) estudou o Teor de Umidade Limite para a Crioconservação – TULC de sementes de milho e observou que teores de água das sementes inferiores a 4 % b.u. também afetavam a sua qualidade fisiológica e estabeleceu uma faixa de teor de água para a crioconservação dessas sementes. De acordo com CAVALCANTI MATA (2001), a qualidade das sementes, aliada às suas características de armazenabilidade às temperaturas criogênicas, permite viabilizar a crioconservação dos produtos; no entanto é necessário determinar Teor de Umidade Limite para a Crioconservação e o quantitativo inferior de água das sementes para este processo, pois o autor menciona que se o teor de água das sementes for muito baixo as sementes poderão perder a plasticidade, ocasionando fissuras de sua estrutura física e rompimento das estruturas celulares.

Objetivou-se, portanto, neste trabalho determinar o teor de água limite para crioconservação (TALC), das sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, PB, em conjunto com o setor de Manejo Cultural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, Unidade Algodão, localizada em Campina Grande.

Utilizaram-se sementes (material ainda não padronizado pelas Regras para Análise de Sementes) recém-colhidas de pinhão manso, safra 2007, provenientes da Embrapa Semi-Árido, em Petrolina, PE.

2.1 Determinação do teor de água inicial das sementes

Para obtenção do teor de água inicial das sementes utilizou-se o método padrão da estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, que se baseia no processo de extração de água do produto durante a sua permanência por 24 horas na estufa. Utilizaram-se quatro sub-amostras de 5g de sementes, segundo as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

O teor de água foi estabelecido como sendo a média aritmética das quatro repetições e os resultados foram obtidos conforme Equação 3:

$$X\% = \frac{P_i - P_f}{P_i} \times 100 \quad (3)$$

em que:

P_i = peso inicial da amostra (gramas)

P_f = peso final da amostra (gramas)

X = teor de água em percentagem de base úmida (b.u), %

2.2 Caracterização dos teores de água para crioconservação

Determinado o teor de água inicial das sementes, elas foram submetidas ao processo de hidratação ou secagem, até alcançarem os teores de água estabelecidos para a determinação do TALC (4, 6, 8, 10, 12 e 14 % b.u). Duzentas sementes foram utilizadas para cada teor de água. A perda ou ganho de água pelas sementes foi determinado pela Equação 4, recomendada pelas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992).

$$P_f = P_i \left(\frac{100 - TA_i}{100 - TA_f} \right) \quad (4)$$

em que:

P_f = peso final da amostra, g

P_i = peso inicial da amostra, g

TA_i = teor de água inicial das sementes (b.u), %

TA_f = teor de água desejada das sementes (b.u), %

2.3 Secagem das sementes

No processo de secagem das sementes as amostras foram colocadas em uma estufa, com temperatura ajustada para $33 \pm 3^\circ\text{C}$ (Figura 8), e pesadas a cada 1 hora, até que alcançassem os pesos referentes aos teores de água desejados; para este fim foi utilizada uma balança eletrônica com precisão de 0,001g.



Figura 8. Estufa utilizada para secagem das sementes de pinhão manso

2.4 Umedecimento das sementes

Para o aumento do teor de água, as sementes foram colocadas de forma uniforme em cesta de arame com as seguintes dimensões: 35 cm de comprimento, 23 cm de largura e 4 cm de altura. A cesta continha quatro suportes em sua base; este material foi colocado no interior de uma bandeja plástica com dimensões de 38 cm de comprimento, 25,5 cm de largura e 6,4 de altura. No interior da bandeja foi colocada água destilada; em seguida, a cesta foi colocada na bandeja, a água foi mantida em um nível em que alcançou os suportes, sem atingir as sementes. O material completo (bandeja com cesta) foi envolvido por um saco plástico de alta densidade, que foi vedado, e em seguida, levado a uma câmara de refrigeração com temperatura de 10°C (Figura 9). O peso das sementes foi determinado a cada 2 horas, até a umidade desejada.



Figura 9. Etapas para umedecimento das sementes

2.5 Teor de água limite para criopreservação das sementes

As sementes cujos teores de água eram de 4, 6, 8, 10, 12, 14% b.u, foram acondicionadas em tubos cilíndricos de alumínio (canister), separadas por teor de água e colocadas em botijões criogênicos isolados com vácuo parcial, o que confere, ao botijão, a capacidade de manter o nitrogênio em estado líquido (-196°C) (Figura 10) (CAVALACANTI MATA et al., 2004).

Após 5 dias de criopreservação, as sementes foram submetidas a um descongelamento gradativo (-196; -170; -80; 10°C e ambiente) com intervalo de três horas para cada temperatura, de acordo com metodologia proposta por ALMEIDA et al. (2002). Com as sementes descongeladas realizaram-se os testes de qualidade fisiológica.



Figura 10. Canister colocado no interior do botijão criogênico

2.5.1 Testemunha

Empregaram-se para uma análise comparativa, sementes de pinhão manso armazenadas cinco dias a temperatura ambiente de 23°C e umidade relativa média de 70%.

2.6 Análise da qualidade fisiológica

2.6.1 Teste de germinação

Após crioconservadas cinco dias e descongeladas, as sementes de pinhão manso foram submetidas ao teste de germinação. Como não existe, na literatura, um protocolo que descreva a metodologia para avaliar a germinação das sementes de pinhão manso, adotou-se nesta pesquisa, o teste de germinação (T.G) e não o teste padrão de germinação (T.P.G). Foram utilizadas quatro repetições de 50 sementes por tratamento. Para este teste, as sementes foram semeadas em bandejas de plástico com 56 cm de comprimento, 31,5 cm de largura e 7,0 cm de altura. O substrato utilizado foi a vermiculita de acordo com metodologia proposta por PIÑA-RODRIGUES et al. (2004) adaptada das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992). A vermiculita foi umedecida com água destilada e repostada sempre que o substrato era ressecado pelo ar do ambiente.

Como o teste padrão para germinação de sementes de pinhão manso não foi descrito pelas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 1992), consideraram-se germinadas as sementes que emitiram 30 mm de radícula no 14^o dia depois da semeadura. Este ensaio foi realizado em casa de vegetação com temperatura média de 24,1°C e umidade relativa de 63% (Figura 11).



Figura 11. Plântulas de pinhão manso em casa de vegetação

2.6.2 Teste de vigor

Os testes de vigor foram realizados pelo comprimento de plântula e peso de matéria seca, realizado no 14º dia de avaliação. Consideraram-se para a determinação do peso seco das plântulas, as plântulas normais de cada repetição, retirando-as do substrato e colocando-as em sacos de papel separados por tratamento; em seguida, foram colocadas para secar em estufa a $70 \pm 3^\circ\text{C}$, até peso constante; decorrido este período, foram colocadas para resfriar em dessecador, durante 15 minutos e, logo após, pesadas em balança eletrônica, com precisão de 0,01g. O peso seco foi calculado através da fórmula proposta por VIEIRA e CARVALHO (1994).

Os resultados da avaliação do comprimento de plântula normal foram expressos em centímetros (VIEIRA e CARVALHO, 1994).

2.7 Análise estatística

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de duas temperaturas (23 e -196°C) e seis teores de água (4, 6, 8, 10, 12, 14% b.u), empregando-se quatro repetições por tratamento. A análise de variância e comparação das médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey. O programa computacional utilizado foi ASSISTAT, versão 7.4 (SILVA, 1996).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água inicial das sementes de pinhão manso foi de 8% base úmida, que foi o teor de água da colheita.

Na Tabela 3, se encontra a análise de variância dos valores médios de germinação e vigor das sementes de pinhão manso, em função dos seis teores de água (4, 6, 8, 10, 12, 14% b.u) em que as sementes foram armazenadas durante cinco dias, nas temperaturas de -196°C e 23°C.

Tabela 3. Resumo da análise de variância da germinação e vigor (peso da matéria seca e comprimento de plântula) de sementes de pinhão manso submetidas ao armazenamento nas temperaturas de -196 °C e 23°C, durante cinco dias.

Germinação				
F.V.	G.L.	S.M.	Q.M.	F
Teor de água (Ta)	5	985.34750	197.06950	1.9340 ns
Temperatura (T)	1	461.2800	461.2800	4.5269*
Ta x T	5	216.3300	43.26600	0.4246 ns
Resíduo	36	3668.31500	101.89764	
Total	47	5331.27250		
Vigor – Comprimento de plântulas				
F.V.	G.L.	S.M.	Q.M.	F
Teor de água (Ta)	5	12.84704	2.56821	6.6503**
Temperatura (T)	1	66.97688	66.97688	173.4341**
Ta x T	5	8.88937	1.77787	4.6037**
Resíduo	36	13.90250	0.38618	
Total	47	102.60979		
Vigor – Peso de matéria seca de plântulas				
F.V.	G.L.	S.M.	Q.M.	F
Teor de água (Ta)	5	25.07854	5.01571	1.2166 ns
Temperatura (T)	1	353.71021	353.71021	85.7985**
Ta x T	5	5.11854	1.02371	0.2483 ns
Resíduo	36	148.41250	4.12257	
Total	47	532.31979		

F = estatística do teste F; ** = significativo a nível de 1% de probabilidade; * = significativo a nível de 5% de probabilidade; ns = não significativo.

Os resultados da análise de variância para a germinação indicam efeito significativo a nível de 5% de probabilidade pelo teste F, para o fator temperatura de armazenamento.

Não houve significância para o fator teor de água e a interação entre os fatores teor de água e temperatura. Com relação ao vigor, a análise do comprimento de plântulas evidencia a ocorrência de efeito significativo em nível de 1% de probabilidade para todos os fatores estudados: teor de água, temperatura e interação entre o teor de água e temperatura de armazenamento. O peso da matéria seca foi significativo a nível de 1% de probabilidade para o fator temperatura, mas não foi significativo para os fatores teor de água e interação entre o teor de água e temperatura de armazenamento.

A Tabela 4 contém a comparação entre médias dos resultados de germinação das sementes de pinhão manso, após a crioconservação por cinco dias, em função do teor de água e temperatura. Observa-se que a média de germinação para os valores que correspondem aos seis teores de água, foi de 59,8%. Segundo SATURNINO et al. (2005) as sementes de pinhão manso apresentam um percentual de germinação em torno de 60-80%; desta forma, os resultados estão de acordo com a literatura para os índices de germinação das sementes desta oleaginosa. Conforme o autor, esta espécie se encontra em processo de domesticação e ainda não foram estabelecidos padrões internos para a produção e comercialização das sementes, razão por que se deve ressaltar a importância de mais pesquisas sobre os aspectos fisiológicos das sementes de pinhão manso.

Como indicado na Tabela 3 e observado na Tabela 4, não existem diferenças significativas entre os resultados da germinação em função dos seis teores de água estabelecidos, que foram de 4 a 14% b.u.; no entanto, os percentuais germinativos das sementes de pinhão manso crioconservadas a -196°C foram estatisticamente superiores aos das sementes armazenadas a temperatura ambiente. CASTRO et al. (2001) obtiveram resultados semelhantes quando estudaram o teor de água limite para crioconservação de sementes de urucum (*Bixa orella* L.) e observaram que entre os valores estudados de 6 a 12% em base úmida, não existia alteração significativa nos percentuais de germinação, que foram de 87%, sendo recomendados para uso na crioconservação, teores de água dentro desta faixa. Segundo pesquisa realizada por ALMEIDA et al. (2002) para determinar o TALC de sementes de duas variedades de mamona crioconservadas a -196°C por três dias, conclui-se que não houve diferença do ponto de vista estatístico entre os teores de água estudados, de 4-12% b.u., porém, por se tratar de uma espécie rica em óleo, os menores teores de água, 4 a 8% b.u., devem ser preferidos para a crioconservação.

Na Tabela 4 se encontra, ainda, a comparação entre médias do vigor (comprimento de plântulas e peso da matéria seca) das sementes de pinhão manso e se constata que não houve diferença estatística entre os valores de peso da matéria seca de plântulas para os teores de água estudados. Observa-se também, nesta tabela que, os índices mais elevados de vigor das sementes de pinhão manso são encontrados nas sementes submetidas ao armazenamento criogênico em temperatura de -196°C , em comparação com as sementes armazenadas a temperatura ambiente de 23°C , sendo estas estatisticamente diferentes. Por outro lado os índices de vigor das sementes de pinhão manso com relação ao comprimento de plântulas, diferiram estatisticamente entre si e que os valores que correspondem aos teores de água de 4 a 6% b.u são estatisticamente superiores aos de 10 e 14%; entretanto, a semente de pinhão manso, com teor de água de 8% b.u., não difere estatisticamente dos índices de vigor das sementes crioconservadas com teores de água entre 10 e 14% b.u. e de 4 a 6 % b.u..

Tabela 4. Valores médios de germinação e vigor (comprimento de plântulas – C.P. e peso de matéria seca P.M.S) das sementes de pinhão manso em função do teor de água e temperaturas de conservação, pelo tempo de cinco dias.

Fatores	Germinação (%)	Vigor	
		C.P (cm)	P.M.S (g)
Temperatura ambiente (23°C)	56,8 b	7,7 b	7,2 b
Temperatura criogênica (-196°C)	63 a	10 a	12,6 a
DMS	5,91369	0,36406	1,18949
Teor de água (%)			
4	67,2 a	9,5 a	11,3 a
6	59,9a	9,5 a	9,7 a
8	64,4a	8,9 ab	10,3 a
10	54,7a	8,2 b	9,2 a
12	57,5a	8,6 ab	9,2 a
14	55,8 a	8,4 b	9,7 a
Média	59,8	8,8	9,9
DMS	15,17982	0,93450	3,05329
CV %	16,84863	7,01030	20,53946

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

CAVACANTI MATA et al. (2004), realizando pesquisas para determinar o teor de água limite para crioconservação de sementes de algodão variedade 6M, concluíram que as sementes com teor de água de 12 ou 14% b.u., quando armazenadas a temperatura de 23°C, iniciam o processo de aumento da taxa de respiração que provoca diminuição de sua germinação. Os autores constataram que os melhores índices de germinação e vigor se encontravam entre 4 e 8%; então, ao se realizar uma análise mais acurada, conclui-se que as sementes de algodão apresentam teor de água ideal para a crioconservação, em torno de 6% b.u. STANWOOD (1987) por sua vez, realizou pesquisas com crioconservação de sementes de *Sesamum indicum* e verificou que teores de água acima de 12% b.u, propiciaram uma redução na qualidade fisiológica das sementes.

Constata-se, ainda na Tabela 4, que o coeficiente de variação (CV %) apresenta percentual elevado para a germinação e peso de matéria seca atribuído, provavelmente, ao fato do pinhão manso ser, ainda, uma espécie a ser domesticada e suas sementes são consideradas “selvagens” necessitando, portanto, de melhoramento genético.

Na Tabela 5, se encontram os valores médios do vigor (comprimento de plântulas) da semente de pinhão manso armazenadas durante cinco dias, a temperatura de -196°C e 23°C com teores de água de 4, 6, 8, 10, 12, e 14% base úmida. Observa-se, nesta tabela, que o vigor das sementes armazenadas a temperatura de -196°C é estatisticamente superior ao vigor das sementes armazenadas a temperatura ambiente. Como este fato ocorre para todos os teores de água estudados, pressupõe-se que não só o teor de água esteja interferindo nesta queda de vigor, pois existem valores de teor de água indicados para armazenagem das sementes em Bancos de Germoplasma (6 a 10% b.u.); portanto, uma hipótese a ser considerada seria a ocorrência de modificações fisiológicas na estrutura interna da semente durante a exposição a temperaturas ultra-baixas, originando quebra de dormência e resultando em aumento da viabilidade dessas sementes.

Tabela 5. Valores médios de vigor (comprimento de plântulas) das sementes de pinhão manso para interação teor de água e temperaturas de conservação, pelo tempo de cinco dias.

Temperatura	Teor de Água (% b.u.)					
	(4)	(6)	(8)	(10)	(12)	(14)
23°C	9,1 bA	8,2 bAB	7,2 bBC	6,6 bC	7,3 bBC	7,6 bBC
-196°C	10 aAB	10,8 aA	10,5 aA	9,8 aAB	9,9 aAB	9,1aB

Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. $DMS_{colunas}=0,8918$; $DMS_{linhas}=1,3216$

Analisando-se conjuntamente os resultados das Tabelas 4 e 5, nas quais se constata que pela germinação e o vigor (peso da matéria seca), que as sementes de pinhão manso podem ter um armazenamento criogênico, dentro da faixa de teor de água estudada: 4-14%b.u. e que o vigor das sementes (comprimento de plântulas) não é afetado significativamente até um teor de água de 8% b.u., conclui-se que as sementes desta espécie podem ser crioarmazenadas entre os teores de água de 4 a 8% e seu teor de água limite para crioconservação pode ser considerado de 8% b.u.

ALMEIDA et al. (2002) afirmam que a umidade com que as sementes oleaginosas são colhidas nas regiões produtoras do Nordeste do Brasil, é em torno de 6% b.u. e, pelo que foi discutido anteriormente, a faixa de umidade de 4-8% b.u. deve ser a preferida para crioconservação desse material. Pesquisas realizadas por BATISTA (2000), com *Sesamum indicum*, mostram que para esta faixa de umidade a crioconservação é um método adequado, porém é importante ressaltar que, segundo IRIONDO et al. (1992) não está claro a existência de uma correlação entre a sensibilidade das sementes com a crioconservação e o seu conteúdo de óleo.

Diante do que foi discutido e analisado nesta pesquisa, as sementes de pinhão manso podem ser crioconservadas com um teor de água entre 4 e 8% b.u; entretanto, como se trata de espécie oleaginosa, o teor de água escolhido foi de 8%, ou seja, o teor de água da colheita.

4. CONCLUSÕES

As sementes de pinhão manso podem ser crioconservadas a temperatura de -196°C com um teor de água entre 4 a 8% base úmida em que sua germinação e o seu vigor não são alterados significativamente.

O teor de água limite para crioconservação das sementes foi 8 % base úmida.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. de A.C.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M.C. Teor de água na semente e sua relação com a tecnologia do armazenamento. In: ALMEIDA, F.A.C.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M.C. (ed). **Tecnologia de armazenamento em sementes**, 2006. C. Grande: UFCG, p.144-174.

ALMEIDA, F. de A.C.; MORAIS, A.M de.; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G.. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v.6, n.2, p.295-302, 2002.

BATISTA, R.C. **Cultivo *in vitro* e criopreservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. 2000. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Departamento de Engenharia Agrícola/CCT/UFPB. Universidade Federal da Paraíba. Campina Grande.

BRASIL. Ministério da Agricultura. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNDA/DNDV/CLAV, 1992. 365p.

CASTRO, A.A.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; BRAGA, M.E.D. Teor de umidade limite para crioconservação de sementes de urucum (*Bixa orella* L.). **Revista Brasileira de Corantes Naturais**. Viçosa, v.5, n.1, p.17-22, 2001.

CASTRO, R.D. de.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W. Desenvolvimento de sementes e conteúdo de água. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (ed). **Germinação do básico ao aplicado**. São Paulo: ed. Artmed, 2004, cap.3, p.53-65.

CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. **Tecnologia de criopreservação de sementes de urucum**. Campina Grande, 2001. 68p. (Projeto de Pesquisa).

CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; ROCHA, M. do S.; DUARTE, M.E.M. Teor de água limite para criopreservação de sementes de algodão arbóreo variedade 6M. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.6, n.2, p.179-189, 2004.

COELHO, R.R.P.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M. Teor de umidade limite para criopreservação de sementes de algodão colorido. In: CONGRESSO BRASILEIRO DO ALGODÃO, 5, 2005. **Anais...** Salvador: EMBRAPA, 2005. CDRom.

CUNHA, R. da. Métodos alternativos para conservação de germoplasma-semente. In: PUIGNAU, J. P. (Ed.) **Conservación de germoplasma vegetal**. Montevideo: IICA, 1996. p. 123-128. (Dialogo, 45).

DINIZ, P.S. **Análise de diferentes métodos de criopreservação na preservação de sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 1999. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande.

GONZAGA, T.W.C.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; SILVA, H.; DUARTE, M.E.M. Criopreservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.2, p.145-154, 2003.

IRIONDO, J.M.; PEREZ, C.; PEREZ-GARCIA, F. Effect of seed storage in liquid nitrogen on germination of several crop and wild species. **Seed Science and Technology**. Zurich, Suíça. v.20, n.1, p.165-171, 1992.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. (ed). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1985, p.115-134.

PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B.; PEIXOTO, M.C. Testes de qualidade. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (ed). **Germinação do básico ao aplicado**. São Paulo: ed. Artmed, 2004, cap.3, p.53-65.

SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. Produção de oleaginosas para o biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n.229, p.44-74, 2005.

SILVA, F. de A. S. e. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 6, Cancun, 1996. **Proceedings...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996.p.294-298.

STANWOOD, P. C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation In: KARTHA, K. K.(ed.). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Rotan: CRC Press, 1985. p.199-225.

STANWOOD, P.C. Survival of sesame seeds at the temperature (-196°C) of liquid nitrogen. **Crop Science**, Medison-WI, v.27, p.327-331, 1987.

VIEIRA, R.D.; CARVALHO, N.M. **Teste de vigor em sementes**. São Paulo - SP: Editora Afiliada, 1994, 164p.

CAPÍTULO III

CINÉTICA DE CRIOCONGELAMENTO DE SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.)

1. INTRODUÇÃO

A armazenagem dos produtos agrícolas se inicia após a colheita e, a partir desse período, os produtos perdem a qualidade. Quando o produto agrícola é bastante perecível, um método viável de conservá-lo por períodos prolongados, é o congelamento (CAVALCANTI MATA et al., 2003).

De acordo com CAVALCANTI MATA et al. (2003) a velocidade de congelamento é um dos fatores mais importantes, visto que, de maneira geral, os produtos biológicos têm teor de água elevado e o tamanho e a forma dos cristais de gelo dependem das velocidades de congelamento. Segundo GRUDA e POSTOLSKI (1996) a forma dos cristais de gelo depende da temperatura de congelamento.

SANTOS (2000) explica que quando a velocidade de congelamento ocorre de forma lentamente, a célula do organismo biológico supercongela e então perde água porque a pressão de vapor da água no meio intracelular excede aquela do exterior congelado e, com a redução progressiva da temperatura, a água se difunde do interior das células para a solução extracelular e é convertida em gelo na superfície das células ou entre o protoplasto e a parede celular. Como resultado, a concentração da solução celular aumenta e a célula perde o turgor, este fenômeno é chamado de desidratação induzida por congelamento (“freeze-induced desiccation”). Quando o potencial hídrico das células parcialmente hidratados se iguala àquele do gelo extracelular, um equilíbrio é estabelecido e a desidratação adicional não ocorrerá, contanto que a temperatura permaneça constante. No entanto, se a célula é congelada rapidamente, a desidratação por congelamento não ocorre e, eventualmente, a solução intracelular, que contém alto teor de água livre, se congela, formando cristais de gelo que, por sua vez, causam injúria às células.

KARTHA (1985) e SAKAI (1995) afirmam que em condições experimentais adequadas, quando as células atingem a temperatura de pré-congelamento, a maior parte da água congelável já escapou para se tornar gelo no meio externo e a exposição à temperatura do nitrogênio líquido tem muito pouco efeito.

Portanto, ante o exposto se objetivou através do presente trabalho, determinar a cinética de congelamento criogênico das sementes de pinhão manso.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, PB.

O teor de água nas sementes de pinhão manso determinado para a crioconservação, se situou em torno de 8% b.u., umidade esta em que as sementes foram colhidas; assim, as sementes com este teor de água foram submetidas ao processo de congelamento criogênico nas temperaturas de -170°C na fase de vapor de nitrogênio e a -196°C nitrogênio na fase líquida.

Efetuuou-se, de início um furo no centro geométrico de cada semente escolhida, o qual foi determinado através de valores de comprimento, espessura e largura de cada semente; para monitorar a temperatura no interior desse produto, conectou-se um termopar a um registrador multicanal; da mesma forma, outro termopar foi afixado no interior do ambiente em que se realizaram as leituras, ou seja, no nitrogênio líquido e nitrogênio a vapor. Esses procedimentos tiveram por objetivo verificar a temperatura de equilíbrio, ponto final do processo; as leituras foram feitas em intervalo de 5 segundos, até a conclusão o experimento.

Para execução do tratamento matemático com os valores experimentais das curvas de congelamento das sementes de pinhão manso, empregou-se a equação de Fourier :

$$RT = \frac{T - T_{\infty}}{T_0 - T_{\infty}} = \sum_{n=1}^{\infty} A_n \text{Exp}(\sigma_n^2 \cdot Fo) \quad (5)$$

$$\frac{(T - T_{\infty})}{(T_0 - T_{\infty})} = RT \quad (6)$$

$$A_N = \frac{2 \cdot \text{sen} \sigma_1}{\sigma_1 + \text{sen} \sigma_1 \cdot \cos \sigma_1} \quad (7)$$

$$Fo = \left(\frac{\sigma}{L^2}\right) \cdot t \quad (8)$$

em que:

RT = Razão de temperatura, adimensional

T = Temperatura em cada momento, °C

T_{∞} = Temperatura do meio de congelamento, °C

T_0 = Temperatura inicial do produto, °C

F_0 = Número de Fourier, adimensional

A_n = Constante que depende do produto

σ_n = Raiz transcendental

F_0 = Número de Fourier, adimensional

α = Difusividade térmica efetiva, $\text{mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$

L = Espessura da semente/2

t = Tempo, s

Com os dados de razão de temperatura em função do tempo, foi realizada uma análise de regressão não-linear, através do programa computacional Statistica, versão 7.0, para obtenção dos coeficientes da equação (5).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 12 e 13 se encontram as curvas de congelamento das sementes de pinhão manso, nas temperaturas de -170°C (vapor de nitrogênio) e a -196°C (nitrogênio na fase líquida). O comportamento das curvas de congelamento é semelhante as das curvas de resfriamento. Segundo KASHARA et al. (1986) os produtos agrícolas com teores de água em torno de 70 a 90%, base úmida, apresentam as três fases características da curva de congelamento da água pura, isto é: Fase 1 corresponde ao resfriamento do produto; esse período é caracterizado por uma curva típica exponencial; Fase 2 constituída pelo congelamento do produto, cuja fração de água que é a maior parte do produto, consome a energia para formar os cristais de gelo; a curva é uma reta e a Fase 3 é caracterizada por uma curva exponencial relativa, que corresponde ao pós-congelamento do produto.

Observa-se, no presente estudo, que as sementes de pinhão manso, em razão de apresentarem teores de água em torno de 8% b.u, ou seja, baixo percentual de água, apresentam as três fases descritas anteriormente, no entanto na curva de congelamento não se distingue esses três fases, sendo uma curva exponencial típica. De acordo com FARIAS (2003) que estudou as curvas de congelamento de sementes de jatobá com teor de água em 13% b.u, as curvas para este produto não apresentavam as três fases típicas de congelamento, embora ocorressem as três fases distintas. O teor de água no interior do produto era baixo para formar uma curva sigmóide, tendo predominância a curva característica da matéria seca, que é uma exponencial. COELHO (2006) afirma que não se distinguem as três fases nas curvas de congelamento das sementes por imersão em nitrogênio líquido (-196°C). Isso é devido à maior velocidade de congelamento e um maior gradiente térmico a que estão expostas às sementes.

Nas Figuras 12 e 13, são sementes que foram congeladas em nitrogênio na fase de vapor, a -170°C , o tempo para alcançar a temperatura de equilíbrio foi aos 220 segundos; para as sementes imersas em nitrogênio líquido a -196°C , o tempo para ocorrer o congelamento foi de 200 segundos; conclui-se, então que quanto maior o gradiente térmico a que o produto está exposto, maior também velocidade de congelamento.

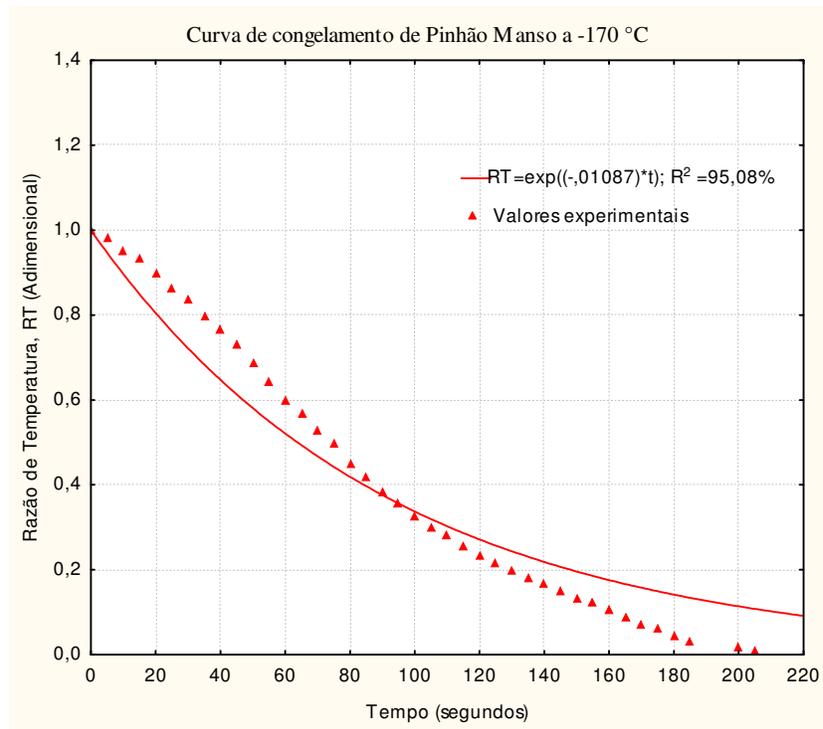


Figura 12. Curvas experimentais e calculadas das sementes de pinhão manso submetidas ao congelamento em nitrogênio na fase de vapor (-170°C)

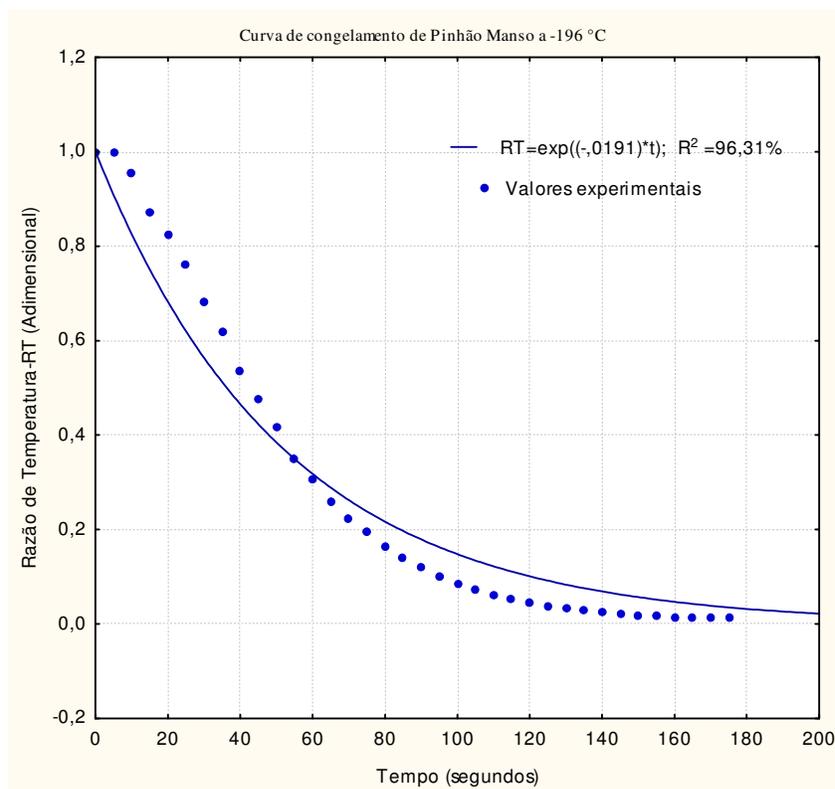


Figura 13. Curvas experimentais e calculadas das sementes de pinhão manso submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido (-196°C)

Na Tabela 6 se encontram os valores calculados para os coeficientes de difusão e difusividade efetiva para as sementes de pinhão manso submetidas ao congelamento nas temperaturas criogênicas de -170°C e a -196°C. A difusividade térmica para as sementes congeladas a -170°C, foi de $2,10443 \times 10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ e, para as sementes imersas em nitrogênio líquido, a -196°C, a difusividade foi de $3,25787 \times 10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Tem-se que a difusividade efetiva é maior quando o produto é submetido a um gradiente térmico maior, ou seja, a difusividade térmica aumenta com a diminuição de temperatura. FARIAS (2003) constatou, em sua pesquisa com difusividade térmica de sementes de jatobá com 13% de teor de água em base úmida, que na temperatura de congelamento a -150°C a difusividade foi de $16,72452 \times 10^{-7}$ e a -196°C a difusividade aumentou para $181,7532 \times 10^{-7}$. ARAÚJO et al. (2000) concluíram em sua pesquisa com a polpa de acerola, que a difusividade térmica efetiva média aumentou com a diminuição da temperatura de -22,6°C para -196°C; no entanto, para COELHO (2006) que trabalhou com sementes de algodão com diferentes teores de água, afirma que a difusividade térmica aumentou com o teor de água em todas

as temperaturas estudadas e, com relação à difusividade térmica dentro de um mesmo teor de água, o autor observou oscilação desses valores, sem constituir um padrão definido de aumento ou diminuição, com a conseqüente variação da temperatura.

Tabela 6. Valores dos coeficientes de difusão e difusividade efetiva das sementes de pinhão manso submetidas ao congelamento a temperaturas criogênicas.

Difusividade		
Curvas de congelamento (T = -170°C)		
Coeficiente de difusão	L (mm): espessura /2	Difusividade efetiva (mm²/seg)
1,087x10 ⁻⁴	4,40	2,10443 x 10 ⁻³
Curvas de congelamento (T = -196°C)		
Coeficiente de difusão	L (mm): espessura /2	Difusividade efetiva (mm².seg⁻¹)
1,91x10 ⁻⁴	4,13	3,25787 x 10 ⁻³

Não se distinguem as três fases típicas que caracterizam as curvas de congelamento da água pura nas sementes de pinhão manso com teor de água de 8% b.u. e congeladas às temperaturas de -170°C e -196°C. Isso ocorre porque este produto apresenta as características de matéria seca. A difusividade efetiva média de sementes de pinhão manso, com 8% de umidade, quando submetidas ao congelamento em vapor de nitrogênio a -170°C foi $2,10 \times 10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$ e quando imersas em nitrogênio líquido (-196°C) foi de $3,25 \times 10^{-3} \text{ mm}^2 \cdot \text{seg}^{-1}$. Quanto maior o gradiente térmico maior a difusividade térmica nas sementes de pinhão manso.

4. CONCLUSÕES

As curvas de congelamento criogênico das sementes de pinhão manso com teor de água em torno de 8% b.u., são exponenciais e não se distinguem as três fases de congelamento.

Quanto maior o gradiente térmico a que as sementes são expostas, maior a difusividade térmica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, M.S.O de.; BRAGA, M.E.D.; CAVALCANTI MATA, M.E.M. Cinética de congelamento de polpa de acerola a baixas temperaturas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, Especial, n.1, p.55-62, 2000.

CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; BRAGA, M.E.D.; SILVA, M. Curvas de congelamento de frutos de cajá (*Spondias lutea* L.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, Especial, n.1, p.55-62, 2003

COELHO, R.R.P. “**Protocolo de criopreservação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. raça *Latifolium* Hutch.) cultivares BRS 200 marrom e BRS verde**”. 2006. 89p. Tese (Doutorado em Agronomia), Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências Agrárias, Areia, PB, 2006.

FARIAS, D.C. de. **Desenvolvimento de um protocolo para criopreservação de sementes de sementes de jatobá: fitossanidade e cinética de congelamento**. 2003. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia Agrícola, Campina Grande, PB, 2003.

GRUDA, Z.; POSTOLSKI, J. **Tecnología de la congelación de los alimentos**. Zaragoza: Editorial Acribia, 1986. 631p.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. (ed). **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida, CRC Press, 1985, p.115-134.

KASAHARA, G.I.; GARRIDO, B.F.; SIMPSON, R.R.; ALDUNARTE, M.M.I.; CORNEJO, F.F. Cinética de congelacion y propiedades termofísicas em dos espécies de frutales menores. In: KASAHARA, G.J. **Tópicos de calor y propiedades termofísicas en: refrigeración y congelación de alimentos**. Santiago de Chile: Maval, 1986, cap.4, p.81-109.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, vol.12, (Edição Especial): p.70-84, 2000.

SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of wood plants. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed). **Biotechnology in agriculture and forestry. Vol 32. Cryopreservation of plant germplasm I**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer- Verlag, 1995. p.53-69.

CAPÍTULO IV

ASPECTOS FISIOLÓGICOS DAS SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) DURANTE O ARMAZENAMENTO CRIOGÊNICO

1. INTRODUÇÃO

O aumento da ameaça à diversidade das plantas, está associado às perdas de seus habitats pela expansão das atividades da agricultura e pecuária, à exploração predatória e à exigência de mais terras para moradia, indústria e estradas; entretanto, com o surgimento da biotecnologia, vêm à necessidade de preservação do patrimônio genético vegetal, através de métodos que permitam a conservação desse material biológico, durante longos períodos.

Segundo GONZAGA et al. (2003) a forma mais correta de conservar os recursos genéticos é preservá-los no meio no qual se encontram em estado de equilíbrio cuja probabilidade de rompimento seja pequena. De acordo, porém, com BACHILLER (1997) isto nem sempre é possível; ele relata que a semente é a forma pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica. Por isso, a forma mais fácil de armazenar os recursos fitogenéticos é a conservar suas sementes.

Os bancos de sementes constituem um método de conservação de recursos genéticos vegetais *ex situ*, amplamente empregado. Em geral, o armazenamento de muitas espécies se faz em temperaturas e umidades baixas podendo, desta forma, serem preservados por décadas e, mais tarde, germinadas, sem prejuízo de sua viabilidade (BÜTTOW, 2005).

Diversos métodos têm sido empregados para conservação dos organismos biológicos e, dentre esses, está a técnica de crioconservação ou armazenamento criogênico; este método consiste em armazenar o material biológico em nitrogênio na fase líquida a

-196°C ou -170°C na fase de vapor; nessas temperaturas, todos os processos metabólicos, como respiração e atividade enzimática, são inativados.

A conservação de sementes em nitrogênio líquido oferece inúmeras vantagens sobre os demais métodos de conservação por garantir preservação indefinida do germoplasma armazenado. O uso de nitrogênio líquido a -196°C tem sido recomendado como meio de conservação potencial para germoplasma-semente a longo prazo (MEDEIROS et al.,1992).

Segundo pesquisas realizadas por JOCKER e JEPSEN (2003) as sementes de pinhão manso são ortodoxas e a temperatura ambiente podem permanecer viáveis por, pelo menos um ano; contudo, devido ao seu conteúdo de óleo não é recomendado um armazenamento prolongado porque as sementes oleaginosas são mais suscetíveis ao ataque de patógenos e pode ocorrer a rancificação dos ácidos graxos que compõem o óleo. É uma espécie que encontra-se em processo de domesticação, e tem sido freqüente a ocorrência de problemas relacionados às sementes que apresentam germinação irregular e perda do poder germinativo após alguns meses de armazenamento (SEVERINO et al.,2006). Então é relevante investigar sobre a crioconservação das sementes dessa espécie como uma alternativa ao armazenamento convencional, e prolongar os períodos de crioarmazenagem.

Assim, objetivo-se, neste estudo, avaliar a qualidade fisiológica de sementes de pinhão manso submetidas ao armazenamento criogênico.

2.MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola, da Universidade Federal de Campina Grande, PB, em conjunto com o setor de Manejo Cultural da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária- EMBRAPA, Unidade Algodão, localizada em Campina Grande.

Crioconservação das sementes

Após o estabelecimento do teor de água limite, que foi de 8% em base úmida as sementes foram crioarmazenadas em nitrogênio líquido a -196°C e no vapor a -170°C , durante 0, 30, 60 e 90 dias. Decorridos esses períodos, elas foram descongeladas pelo método gradativo descrito no item 2.5 do Capítulo II; em seguida, realizaram-se os testes de germinação e vigor, seguindo-se a metodologia do item 2.6 do Capítulo II.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Apresenta-se, na Tabela 7, a análise de variância dos valores médios de germinação e vigor das sementes de pinhão manso, em função do tempo de armazenamento criogênico (0, 30, 60 e 90 dias) e temperaturas (-170°C e -196°C). Os resultados da análise de variância indicam efeito significativo a nível de 1% de probabilidade pelo teste F, para o fator período de armazenamento (F_1) com relação ao vigor (comprimento de plântulas e peso da matéria seca). Não houve significância para os fatores: períodos de armazenamento (F_1), temperaturas de armazenamento (F_2) e interação ($F_1 \times F_2$) indicados para a germinação; nos fatores (F_2) e ($F_1 \times F_2$) para o vigor (peso de matéria seca) não ocorreu efeito significativo.

Tabela 7. Resumo da análise de variância da germinação e vigor (peso da matéria seca e comprimento de plântula) de sementes de pinhão manso submetidas ao crioarmazenamento nas temperaturas de -196 °C e -170°C por 0, 30, 60 e 90 dias

Germinação				
F.V.	G.L.	S.M.	Q.M.	F
Períodos de armazenamento (F₁)	3	169.23094	56.41031	0.3158 ns
Temperaturas de armazenamento (F₂)	1	24.67531	24.67531	0.1382 ns
F₁ x F₂	3	86.69094	28.89698	0.1618 ns
Resíduo	24	4286.65250	178.61052	
Total	31	4567.24969		
Vigor – Comprimento de plântulas				
F.V.	G.L.	S.M.	Q.M.	F
Períodos de armazenamento (F₁)	3	30.46844	10.15615	7.4183**
Temperaturas de armazenamento (F₂)	1	0.75031	0.75031	0.5480 ns
F₁ x F₂	3	1.11594	0.37198	0.2717 ns
Resíduo	24	32.85750	1.36906	
Total	31	65.19219		
Vigor – Peso de matéria seca de plântulas				
F.V.	G.L.	S.M.	Q.M.	F
Períodos de armazenamento (F₁)	3	155.73625	51.91208	8.5186 **
Temperatura de armazenamento (F₂)	1	0.18000	0.18000	0.0295 ns
(F₁) x (F₂)	3	1.78750	1.02371	0.0978 ns
Resíduo	24	146.25500	6.09396	
Total	31	303.95875		

F = estatística do teste F; ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade; * = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns = não significativo.

A Tabela 8 contém os resultados da análise estatística da germinação e do vigor das sementes de pinhão manso, dos períodos de crioarmazenamento, em função das temperaturas. Observa-se que a média de germinação foi de 63,2%; não houve diferença do ponto de vista estatístico entre os períodos de armazenamento e as temperaturas; acerca do vigor, notou-se diferença estatística entre o período zero (testemunha) em comparação com os períodos de armazenamento criogênico, sendo os valores que correspondem aos períodos de crioconservação estatisticamente superiores.

Esses resultados são devidos, provavelmente, às mudanças de temperatura e à expansão do nitrogênio líquido durante o reaquecimento, que originaram quebra de dormência. Comportamento similar foi observado por ALMEIDA et al. (2002) com a criopreservação de duas variedades de sementes de mamona; segundo os autores, para o fator período de criopreservação verifica-se maior germinação aos 30 dias retornando ao nível inicial, aos 60 dias da criopreservação.

Tabela 8. Valores médios de germinação e vigor (comprimento de plântulas – C.P. e peso de matéria seca P.M.S) das sementes de pinhão manso em função das temperaturas e períodos de armazenamento.

Fatores	Germinação (%)	Vigor	
		C.P (cm)	P.M.S (g)
Temperatura criogênica -170°C	64 a	9,3 a	10,5 a
Temperatura criogênica -196°C	62,3 a	9,5 a	10,6 a
DMS	9,75610	0,85415	1,80207
Períodos de armazenamento (dias)			
0	60,4 a	7,7 b	6,9 b
30	66,6 a	9,8 a	12,8 a
60	63,3 a	10 a	11,4 a
90	62,3 a	8,4 a	11,9 a
Média	63,2	8,9	10,7
DMS	18,42779	1,61336	3,40384
CV %	21,14745	12,40219	23,2749

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

Resultado semelhante foi obtido por TRESENA (2004) que estudou a criopreservação de sementes de ipê amarelo e ipê rosa; este material biológico foi submetido a igual período de criopreservação (0, 30, 60 e 90 dias), e se concluiu que não houve alteração com os índices de germinação e vigor para a interação períodos versus temperatura de criopreservação. De acordo com esta pesquisa, não houve diferença estatística entre as temperaturas criogênicas de -170°C e -196°C com relação aos valores de viabilidade e acúmulo de matéria seca, para as duas variedades de ipê estudadas.

Ainda relação aos períodos de exposição de sementes ao nitrogênio, tanto na fase líquida como na fase de vapor, ressalta-se a pesquisa realizada por STANWOOD (1980)

testando a tolerância de sementes de diversas espécies de leguminosas em temperaturas ultra-baixas. O autor obteve valores significativamente distintos entre si e observou que, na maioria dos casos, extensão do tempo de exposição ao nitrogênio líquido aumentou o percentual de germinação. ROCHA (2004) estudou os períodos de 5, 30, 60, e 90 dias de criarmazenamento de sementes de algodão e constatou que, com o aumento do período de permanência das sementes expostas as temperaturas criogênicas, a germinação e o vigor também aumentam. DINIZ (1999) que pesquisou a criopreservação de sementes de *Zea mays*, notou que os percentuais germinativos depois das sementes permanecerem 90 dias em nitrogênio líquido e na fase de vapor, são superiores a 75%. GONZÁLEZ-BENITO et al. (1998) estudando a viabilidade de sementes criarmazenadas de algodão, verificaram aumento do potencial germinativo das sementes de algumas cultivares, após imersão em nitrogênio líquido; fato semelhante ocorreu com BATISTA (2000) que obteve, para duas variedades de *Sesamum indicum*, maior percentual germinativo depois de 60 dias das sementes imersas em nitrogênio líquido.

CHANDEL et al. (1995) todavia, afirmam que ocorre um decréscimo do percentual germinativo durante a criarmazenagem devido à sensibilidade de algumas sementes ao frio, caracterizado por injúrias durante o período de criopreservação. Segundo COELHO (2006) que trabalhou a qualidade fisiológica de sementes de diferentes cultivares de algodão durante a exposição as temperaturas ultra-baixas, observou que a germinação e o vigor das sementes da cultivar BRS 200 marrom são afetados negativamente pela utilização da criopreservação, constatando um decréscimo nesses valores, com o decorrer do armazenamento.

As sementes de pinhão manso não sofreram injúrias durante a exposição ao nitrogênio líquido a -196°C e nem na fase de vapor a -170°C . Este material é tolerante ao armazenamento as temperaturas ultra-baixas. Após a criopreservação, durante os períodos de 30, 60 e 90 dias, as sementes mantêm a viabilidade (Figura 14). Quanto aos parâmetros que caracterizam o vigor, altura e peso de matéria seca de plântulas, constata-se que os valores mais elevados de altura de plântulas, ocorreram durante os três períodos de criarmazenagem: 30, 60 e 90 dias. Com relação ao peso da matéria seca, os períodos de 30, 60 e 90 dias proporcionaram os melhores índices, mas ALMEIDA et al. (2000) pesquisaram a criopreservação de algumas sementes de leguminosas e obtiveram respostas heterogêneas; para os autores, nem o teor de água, tamanho das sementes e velocidade de

resfriamento ou de reaquecimento, parecem justificar as respostas observadas para a imersão em nitrogênio líquido das sementes avaliadas.



Figura 14. Plântulas das sementes crioconservadas de pinhão manso

De acordo com JOCKER e JEPSEN (2003) as sementes de pinhão manso são ortodoxas, ou seja, toleram a desidratação até um teor de água em torno de 5 a 7% b.u. SANTOS (2000) afirma que alguns materiais vegetais ainda se mostram sensíveis ao congelamento, como é o caso das sementes recalcitrantes. A diversidade de resposta entre as diferentes espécies de plantas, ou mesmo entre diferentes tecidos de uma mesma espécie, dificulta a generalização e o desenvolvimento de um protocolo de criopreservação de caráter universal.

Em referência à criação de um banco de germoplasma, é importante estabelecer critérios para definir as espécies prioritárias, baseado na importância econômica e social, potencial de mercado e erosão genética (VIEIRA, 2001). O pinhão manso contém sementes ricas em óleo e com potencialidades para fornecer matéria prima para a síntese de biodiesel, ou seja, uma fonte de energia alternativa; imprescindível, portanto, criação de bancos de germoplasma para esta oleaginosa a fim de se analisar os recursos genéticos e conservar fontes de genes para uso nos programas de melhoramento genético.

4. CONCLUSÕES

As sementes de pinhão manso podem ser crioconservadas tanto no vapor (-170°C) como na imersão (-196°C) em nitrogênio líquido.

As sementes de pinhão manso manteve a viabilidade durante os períodos de crioconservação.

Os melhores resultados de vigor das sementes de pinhão manso foram obtidos durante a crioconservação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, F. de A.C.; PITA VILLAMIL, J.M.; GOUVEIA, J.P.G. de.. Efeito de la crioconservación sobre la germinación de semillas de leguminosas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.2, n.1, p.67-71, 2000.

ALMEIDA, F. de A.C.; MORAIS, A.M de.; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G.. Crioconservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, PB, v.6, n.2, p.295-302, 2002.

BACHILLER, C.G. **Semillas de arboles y arbustos florestales**. Madri, ICONA (M.A.P.A.), 1997, 992p.

BATISTA, R.C. **Cultivo *in vitro* e criopreservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. 2000. 83f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Departamento de Engenharia Agrícola/CCT/UFPB. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande.

BÜTTOW, V.M. **Sistematização dos bancos ativos de germoplasma da Embrapa Clima temperado em um sistema gerenciador de banco de dados georreferenciado**.

2005. 49 f. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

CHANDEL, K.P.S.; CHAUDHURY, R.; RADHAMANI, J.; MALIK, S.K. Desiccation and freezing sensitivity in recalcitrant seed of tea, cocoa and jackfruit. **Annals of Botany, London**, v.76, p.443-450, 1995.

COELHO, R.R.P. “**Protocolo de criopreservação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. raça *Latifolium* Hutch.) cultivares BRS 200 marrom e BRS verde**”. 2006. 89f. Tese (Doutorado em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia.

DINIZ, P.S. **Análise de diferentes métodos de criopreservação na preservação de sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 1999. 80f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola). Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande.

GONZAGA, T.W.C.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; SILVA, H.; DUARTE, M.E.M. Criopreservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* Engl.), e baraúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.5, n.2, p.145-154, 2003.

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; CARVALHO, J.M.F.C.; PÉREZ, C. Effect of desiccation and cryopreservation on the germination of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.33, n.1, p.17-20, 1998.

JOKER, D.; JEPSEN, J. *Jatropha curcas* L. seed leaflet, **Humbleback**, Denmark, n.83, p.1-2, Aug., 2003.

MEDEIROS, A. C. de S.; CZARNESKI, C.M.; FREITAS, G.F.de. Criopreservação de aroeira (*Astronium urundeuva* Fr. All.). In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2, **Anais...**, São Paulo-SP. 1992. p.544-547.

ROCHA, M. do S. **Crioconservação e cultivo *in vitro* de sementes de algodão colorido.** 2004. 112f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

SANTOS, I.R.I. Criopreservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v.12, (Edição Especial): p.70-84, 2000.

SEVERINO, L.S.; LIMA, R. de L.S.; BELTRÃO, N.E. de M. **Germinação e crescimento inicial de plântulas de pinhão manso em função do peso da semente.** Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2006. 3p. (Comunicado Técnico Nº309)

STANWOOD, P.C. Tolerance of crops seeds to cooling and storage in liquid nitrogen (-196°C). **Journal of Seed Technology**, v.5, n.1, p.26-31, 1980.

TRESENA, N.de.L. **Crioconservação de sementes de ipê amarelo (*Tatebuia chrysotrica* Mart. ex. DC.) Standl.) e de ipê rosa (*Tatebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo).** 2004. 54f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) Departamento de Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande.

VEIRA, M.T.S. Conservação de germoplasma na forma de sementes *in vitro* e criopreservação. In: SIRGEALC - SIMPÓSIO DE RECURSOS GENÉTICOS PARA AMÉRICA LATINA Y EL CARIBE. 3, 2001, **Anais...** Londrina: IAPAR, 2001. p. 30-32.

CAPÍTULO V

AVALIAÇÃO DA INCIDÊNCIA DE FUNGOS EM SEMENTES DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) APÓS O CRIOARMAZENAMENTO

1. INTRODUÇÃO

As condições ambientais em que as sementes são produzidas e as condições de armazenamento são os principais fatores que favorecem o desenvolvimento de determinadas espécies de microrganismos. A microflora das sementes armazenadas é constituída por muitas espécies de fungos e bactérias (PUZZI, 2000).

Os fungos são os principais microrganismos que compõem a microflora das sementes em condições de armazenamento sendo os principais causadores de deteriorações e perdas durante este período (PUZZI, 2000). As espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* se encontram entre os principais agentes deterioradores de sementes (POPINIGIS, 1977).

Segundo AGUIAR et al. (2001) as sementes são eficientes meios de disseminação e de transmissão de patógenos em áreas isentas. O inóculo inicial de epidemias pode depender da transmissão do patógeno pela semente, assim como reduzir a qualidade fisiológica das mesmas. MACHADO (1994) relata que danos decorrentes da associação dos microrganismos patogênicos com sementes, não se limitam a perdas diretas da população em campo mas envolvem outras implicações que podem provocar sérios danos em todo o sistema de produção. MARCOS FILHO (2001) ressalta que a produção de mudas e plantas sadias depende, em grande parte, da utilização de sementes de boa qualidade.

Sementes colhidas com 25 a 30% de umidade em base úmida e o tempo decorrido entre a colheita e a secagem deste produto, podem ser suficientes para a colonização de fungos de armazenamento (PINTO, 2004). De acordo com SCOTT et al. (1982), grãos e sementes armazenados com teor de água acima de 13%, podem apresentar

desenvolvimento fúngico e o aquecimento da massa de grãos. Todos os fungos de armazenamento têm a capacidade de reduzir o poder germinativo da semente e causar a morte do embrião. Teores de água mais baixos na semente, próximos ao limite mínimo para o crescimento dos fungos, propiciam um ataque lento; todavia, a medida em que o teor de água da semente se eleva, ocorrem reduções no percentual germinativo em virtude do rápido crescimento do fungo (POPINIGIS, 1977).

FREITAS et al. (2000) afirmam que as sementes ricas em óleo (25-40%), exigem cuidados especiais durante o período de conservação, devido à degradação dos ácidos graxos, expressa pela rancificação do óleo, o que torna as sementes oleaginosas mais suscetíveis ao ataque de patógenos durante a estocagem; desta forma, o nível de deterioração em sementes armazenadas depende das condições ambientais durante esta fase. POPINIGIS (1977) menciona que os fungos patogênicos se desenvolvem em sementes com teores de água em equilíbrio com umidade relativa do ar superior a 68%; neste contexto, o material biológico, quando armazenado às baixas temperaturas e umidades, pode ser conservado por períodos prolongados.

A técnica de criopreservação consiste em manter os produtos biológicos armazenados a temperaturas ultra-baixas, em geral a -170°C , na fase de vapor de nitrogênio, e a -196°C na fase de nitrogênio líquido, condições em que o metabolismo do organismo biológico é inativado reduzindo os processos degradativos que resultam na deterioração do mesmo (COELHO, 2006). Com relação às sementes, este tipo de material pode ser criopreservado sem ocorrer alterações nas qualidades fisiológicas.

Segundo SATURNINO et al. (2005) o pinhão manso é uma espécie considerada resistente a diversas doenças; no entanto, alguns patógenos já foram registrados, entre os quais, o agente causal do Oídio ou Mofo-Branco (*Sphaerotheca fuliginea* (Slecht. Et. Fr.) Poll.) que provoca danos em folhas e flores. Acerca das patologias em sementes desta oleaginosa, MELO et al. (2007) mencionam a presença dos fungos *Alternaria* sp., *Colletotrichum* sp. e *Fusarium* sp em sementes de pinhão manso sob condição de armazenamento em câmara fria (temperatura de $6-8^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de 60-65%). Existem poucos relatos de doenças nesta espécie, tornando-se relevantes pesquisas sobre o tema.

Diante do exposto, se propôs, neste, avaliar a incidência de fungos em sementes de pinhão manso armazenadas as temperaturas criogênicas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande-PB, e no Laboratório de Fitopatologia, da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, PB.

2.1 Crioarmzenamento das sementes

As sementes de pinhão manso, com teor de água em torno de 8% b.u., foram armazenadas em nitrogênio, a -170°C na fase de vapor e -196°C na fase líquida. Os períodos de armazenamento foram 0, 30, 60 e 90 dias. Decorrido cada período, as sementes foram descongeladas pelo método gradativo descrito no item 2.5 do Capítulo II; em seguida, realizou-se o teste de sanidade.

2.2 Teste de sanidade

Utilizou-se o método de papel-filtro (*blotter test*), de acordo com metodologia proposta por NEEDGAARD (1979). Distribuíram-se 200 sementes em 20 placas de Petri (10 sementes por placa) para cada temperatura estudada. As sementes foram submetidas a uma pré-lavagem em solução de álcool etílico a 70% por 3 minutos, hipoclorito de sódio a 1% por 5 minutos e duas lavagens em água destilada esterilizada (ADE) por 1 minuto. Este ensaio foi realizado em Câmara de Fluxo Laminar (Figura 15). Após a desinfestação, as sementes foram postas sob papel-filtro esterilizado, em placas de Petri e incubadas a temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, durante sete dias, sob fotoperíodo de 12 horas (Figura 16). A avaliação da incidência dos fungos foi realizada através de microscópio estereoscópio e óptico, sendo os dados expressos em percentagem de sementes infectadas. O delineamento estatístico empregado foi inteiramente casualizado, com arranjo fatorial de duas

temperaturas (-170°C e -196°C) e quatro períodos de armazenamento (0, 30, 60 e 90 dias). A análise de variância e comparação das médias dos tratamentos foi realizada pelo teste de Tukey. O programa computacional utilizado foi ASSISTAT, versão 7.4 (SILVA, 1996)



Figura 15. Câmara de Fluxo Laminar



Figura 16. Sementes em placas de Petri

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observa-se, através da Tabela 9, que a micoflora das sementes de pinhão manso submetidas ao armazenamento a temperaturas ultra-baixas é composta por fungos que são usuais em grãos e sementes; entretanto, é importante ressaltar a presença de alguns gêneros, como *Chalara* e *Diplodia*, os quais não são usualmente encontrados em sementes armazenados. Segundo PINTO (2006) o gênero *Diplodia* sobrevive na forma de micélio dormente na superfície das sementes e os conídios são disseminados pela ação do vento ou da chuva. O gênero *Chalara* é um fungo de solo e agente causal de podridões em raízes de plantas cultivadas (DALBOSCO et al., 2004).

Observa-se na Tabela 9 que as incidências mais elevadas foram obtidas com os gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium* e *Fusarium*, dentre os quais, apenas *Aspergillus* não foi identificado nas sementes não crioarmazenadas (Testemunha). Para os períodos de 30, 60 e 90 dias e para as temperaturas de -170°C (vapor de nitrogênio) e -196°C (nitrogênio líquido) esse gênero foi o predominante.

O gênero *Aspergillus* sp. é o mais comumente encontrado em grãos e sementes armazenados, deteriorando-os; desenvolvem-se em sementes e grãos cujo teor de água está em equilíbrio com umidades relativas entre 65-90%, correspondendo a 13-14% b.u.; esses

microorganismos se adaptam a ambientes com baixa umidade relativa e raramente atacam produtos com grau de umidade superior a 25% b.u (SILVA et al., 1995).

Tabela 9. Percentual de incidência de fungos obtidos no teste de sanidade das sementes armazenadas a temperaturas criogênicas de -170°C na fase de vapor de nitrogênio e a -196°C fase de nitrogênio líquido.

Fungos	Incidência (%)							
	0		30		60		90	
			-170°C	-196°C	-170°C	-196°C	-170°C	-196°C
<i>Alternaria</i> sp.	2	2	–	1,5	–	–	2,7	–
<i>Aspergillus</i> sp.	–	–	29,2	31,9	0,6	8,9	0,5	7,6
<i>Chalara</i> sp.	0,5	0,5	–	–	–	–	–	–
<i>Cladosporium</i> sp.	–	–	11,7	11,5	2,4	7,4	5,5	–
<i>Curvularia</i> sp.	–	–	–	1,5	–	–	–	–
<i>Colletotrichum</i> sp.	3	3	–	–	–	–	–	–
<i>Diplodia</i> sp.	–	–	–	–	–	–	8,3	2
<i>Fusarium</i> sp.	14	14	7,4	7,3	4,8	3,7	5	–
<i>Nigrospora</i> sp.	0,5	0,5	–	–	–	–	–	–
<i>Rhizopus</i> sp.	1	1	1,5	4,7	1,8	6,7	5	1,3
<i>Rhizoctonia</i> sp.	6	6	–	–	–	0,7	0,5	–

Os gêneros *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. ocorrem sobre inúmeras espécies vegetais, especialmente como componente da microflora das sementes, ainda no campo e durante a estocagem. *Cladosporium* sp. produz descolorações em grãos e sementes e algumas linhagens são transmitidas através destas últimas; quando parasitam plantas, permanecem longos períodos no interior dos tecidos (KIMATI et al., 1997).

Fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* sp. causam murcha e o amarelecimento das folhas de plantas cultivadas, sendo as espécies patogênicas transmitidas por sementes. (FARIAS, 2003 e SALLIS et al., 2001).

O gênero *Rhizopus* sp. foi detectado nas sementes crioarmazenadas e nas que não foram armazenadas; no entanto, apresentaram baixos percentuais de incidência; tais microorganismos são causadores de podridões em frutos e vegetais armazenados e produzem mofo em diversos produtos agrícolas. É considerado um fungo com pouca importância econômica com relação às sementes; porém, sementes com elevada incidência desse patógeno devem ser desinfestadas (BARRETO, 2001). FASSEL e BARRETO (2000) que estudou a qualidade fisiológica e sanitária de sementes de amendoim durante as etapas de beneficiamento, constatou maior incidência de *Rhizopus* sp., enquanto LIMA et al. (1982); KABEERE e TALIGoola (1983) observaram que este organismo ocorre frequentemente ocorre em sementes de algodão e soja, prejudicando a germinação e o vigor e causando tombamento de plântulas.

Na Tabela 10, é apresentada a análise de variância dos valores médios do percentual de incidência de fungos nas sementes de pinhão manso após os períodos de 0, 30, 60 e 90 dias de armazenamento criogênico, às temperaturas de -170°C (vapor de nitrogênio) e -196°C (nitrogênio líquido). Os resultados da análise de variância para os períodos de armazenamento (F_1) indicam efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade pelo teste F. Não houve efeito significativo para os fatores temperaturas de armazenamento (F_2) e a interação entre os fatores períodos de armazenamento (F_2) e temperaturas de armazenamento (F_2). O modelo linear e quadrático foram os que apresentaram efeito significativo.

Tabela 10. Resumo da análise de variância do percentual de incidência fúngica nas sementes de pinhão manso submetidas ao criarmazenamento às temperaturas de -196°C e -170°C por 0,30,60 e 90 dias .

F.V.	G.L	Q.M. % Fungos
Temperaturas de armazenamento (F₁)	1	0,3750ns
Períodos de armazenamento (F₂)	2	4833,3750**
Linear	1	7056,0000**
Quadrática	1	2610,7500**
Interação F₁ x F₂	2	422,3750 ns
Tratamento x Testemunha	6	1761,70**
C.V		39,89

F = estatística do teste F; ** = significativo ao nível de 1% de probabilidade; * = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns = não significativo.

Observa-se na Tabela 11, que não houve diferença estatística com os valores médios de incidência de fungos com relação às temperaturas criogênicas em que as sementes foram expostas durante o armazenamento. Para os períodos de armazenamento criogênico, após 30 dias, foi detectado maior incidência de patógenos nas sementes com relação aos períodos de 0 (testemunha) 90 e 60 dias. Uma provável hipótese, é que os esporos dos fungos já estavam presentes na superfície da semente, e alguns poderiam estar em estado latente. Dessa forma, durante o período de descongelamento gradativo, em que as sementes foram submetidas às temperaturas de -80°C, 10°C e temperatura ambiente, as mesmas tornaram-se um meio ideal para ocorrer quebra de dormência e assim promover a germinação dos esporos.

Tabela 11. Percentual de incidência de patógenos em função dos dias de crioarmazenamento e temperaturas.

Fatores	Percentual de incidência (%)
Temperatura criogênica -170°C	31 a
Temperatura criogênica -196°C	31,2 a
DMS	8,87427
Períodos de armazenamento (dias)	
0	28 b
30	60,5a
60	17,4 b
90	18,5 b
DMS	16,76213
CV%	39,09638

Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste Tukey de Tukey a 5% probabilidade.

De acordo com ZAMBENEDETTI et al. (2007) ao estudaram diferentes métodos de armazenamento de urediniósporos da espécie *Puccinia pachyrhizi*, concluíram que o método que promoveu maior porcentagem de germinação foi após 60 dias de armazenamento em nitrogênio líquido. CAMPOS et al. (2004) mencionam que o método de conservação em nitrogênio líquido é considerado um dos métodos mais efetivos na preservação de fungos por períodos prolongados. FARIAS (2003) estudou a crioconservação de sementes de jatobá e observou, que em sementes crioconservadas sete dias, a presença de *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Rhizopus* sp.

Segundo os dados observados na Figura 17, as sementes que não foram crioconservadas apresentaram incidência de *Fusarium* sp. (14%), seguida de *Rhizoctonia* sp. (6%) e *Colletotrichum* sp. (3%); aos 30 dias de crioarmazenagem a -170 °C, foi observada maior incidência dos gêneros *Aspergillus* sp. (30%), *Cladosporium* sp. (11%) e *Fusarium* sp. (7%) enquanto, as sementes que foram conservadas imersas em nitrogênio líquido (-196°C) por igual período de tempo, apresentaram os mesmos gêneros de fungos, com os mesmos índices percentuais.

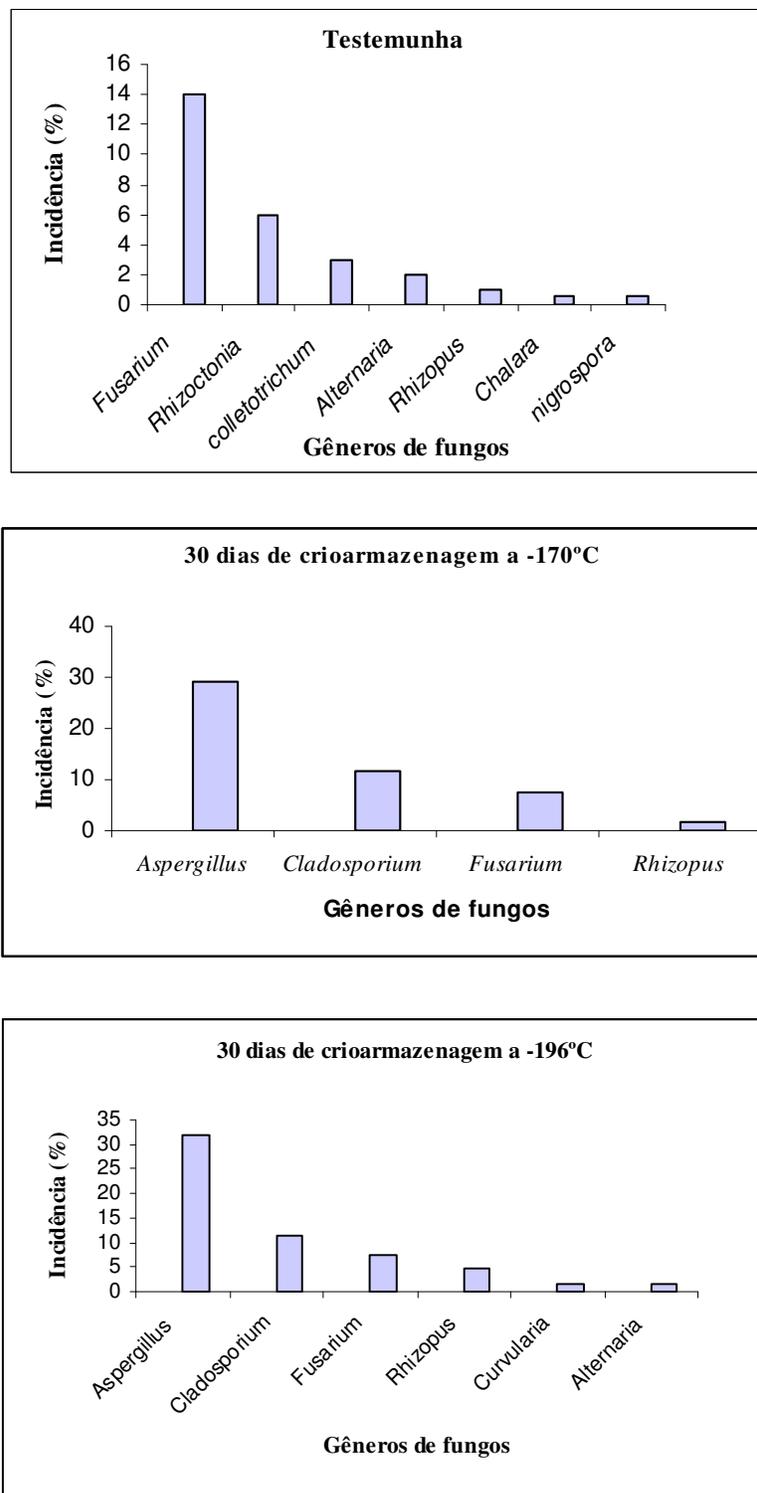
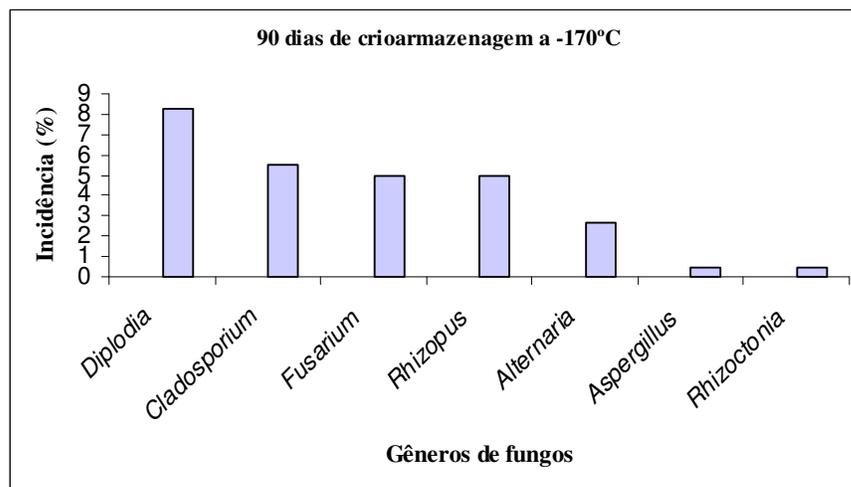
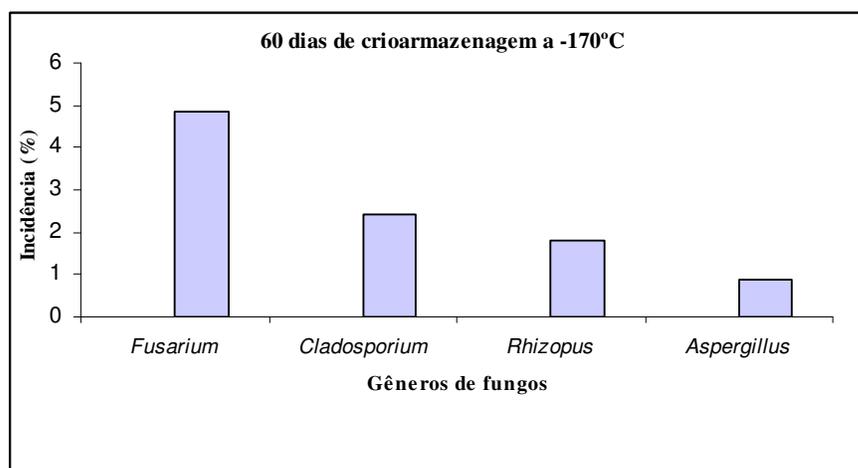


Figura 17. Dados do percentual de incidência dos gêneros de fungo encontrados nas sementes não armazenadas (testemunha) e nas sementes armazenadas por 30 dias às temperaturas criogênicas.

Foi observado na Figura 18, para 60 dias de armazenamento criogênico a -170°C , foram detectados os gêneros *Fusarium* sp. (5%), *Cladosporium* sp. (2%) e *Rhizopus* sp. (1,2%) e a -196°C foram encontrados os gêneros *Aspergillus* sp. (8,9%), *Cladosporium* (7,4%) e *Rhizopus* sp. (6,7%). Aos 90 dias de crioconservação das sementes a -170°C , foram observados os gêneros *Diplodia* sp. (8,3%), *Cladosporium* sp. (5,5%) e *Fusarium* (5%).



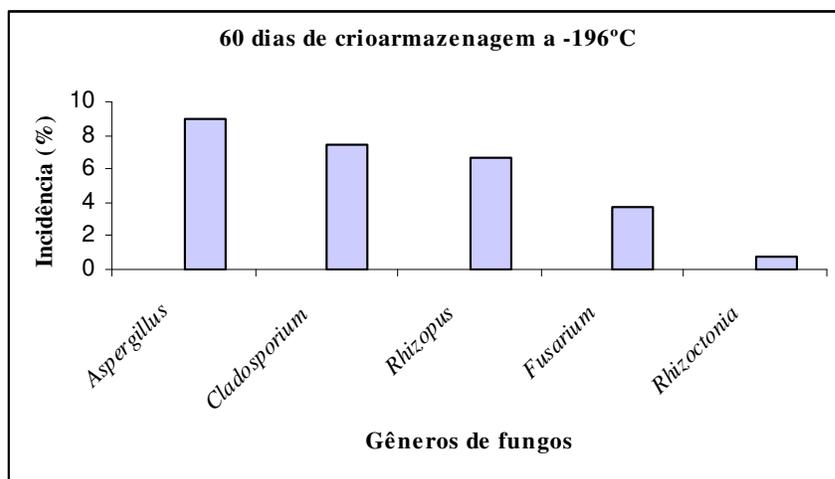


Figura 18. Dados do percentual de incidência dos gêneros de fungo encontrados nas sementes crioconservadas por 60 e 90 dias.

Na Figura 19, são observados os gêneros presentes a -196°C de crioarmazenamento, que foram *Diplodia* sp. (8,3%), *Aspergillus* sp. (7,6%) e *Rhizopus* sp.(1,3%).

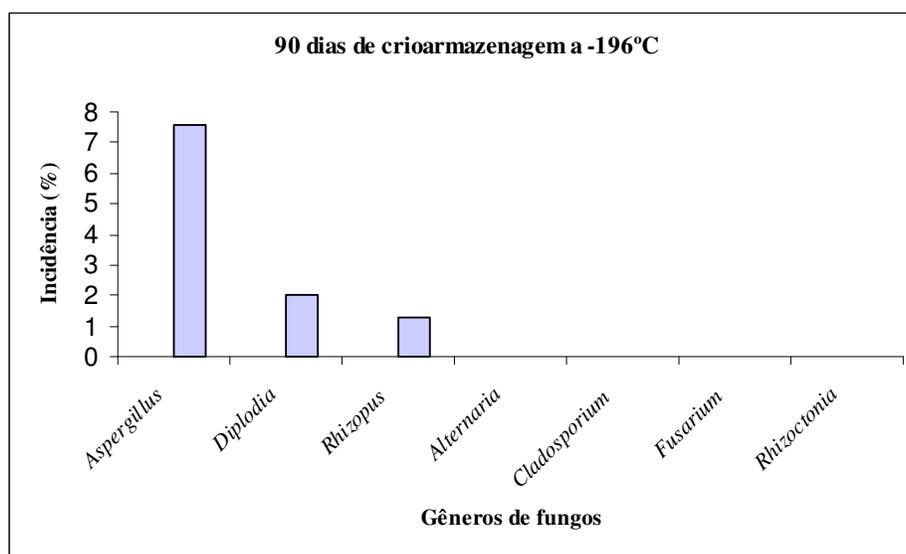


Figura 19. Dados do percentual de incidência dos gêneros de fungo encontrados nas sementes crioarmazenadas por 90 dias à temperatura de -196°C (nitrogênio líquido)

Observa-se na Figura 20, os esporos dos gêneros de fungos encontrados nas sementes de pinhão manso, estruturas essas, observadas em microscópio estereoscópio, em que definido cada gênero foi definido através das características dos esporos.

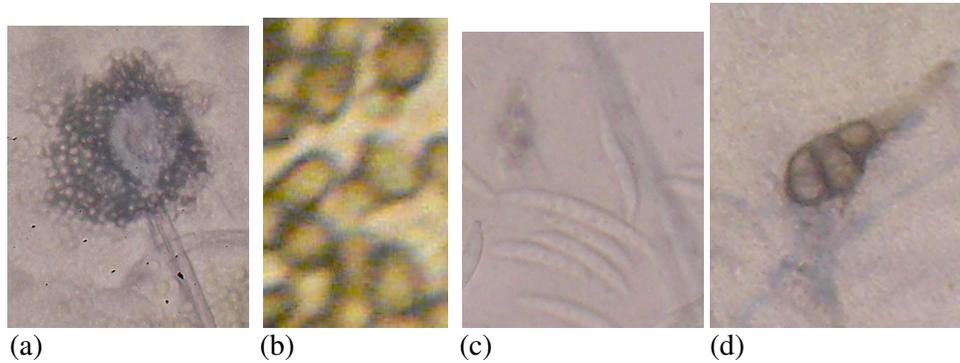


Figura 20. Esporos dos gêneros de fungos observados em microscópio estereoscópio: (a) *Aspergillus* sp.(b) *Diplodia* sp.(c) *Fusarium* sp.e (d) *Alternaria* sp.

Constatou-se então, nesta pesquisa, que a crioconservação não reduz os índices de patógenos presentes nos produtos agrícolas armazenados; os fungos de armazenamento dos gêneros *Aspergillus* sp. foram os mais detectados nas sementes de pinhão manso, seguidos de *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp..

4. CONCLUSÕES

A maior incidência de patógenos detectados nas sementes foi aos 30 dias de armazenamento criogênico.

Os gêneros de fungos mais encontrados nas sementes crioconservadas foram *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp..

A crioconservação não reduziu a incidência de fungos fitopatogênicos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, R.H.; FANTINATTI, J.B.; GROTH, D.; USBERTI, R. Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de girassol de diferentes tamanhos. **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n° 1, p.134-139, 2001.

BARRETO, R. W. **Fungos Fitopatogênicos**. Viçosa: Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa, UFV, 2001. 48p.

CAMPOS, A.K.; MOTA, M.de.A.; ARAÚJO, J.V.; CECON, P.R. Atividade predatória, crescimento radial e esporulação de fungos predadores de nematóides *Monacrosporium* spp, submetidos à criopreservação. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.2, p.465-469, mar-abr, 2004

COELHO, R.R.P. “**Protocolo de crioconservação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L. raça *Latifolium* Hutch.) cultivares BRS 200 marrom e BRS verde**”. 2006. 89f. Tese (Doutorado em Agronomia). Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia.

DALBOSCO, M.; EL TASSA. S.O.M.; DUARTE, V. Ocorrência de Podridão Negra, causada por *Chalara elegans*, em raízes de cenoura no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, n.3, maio – jun, 2004.

FARIAS, D.C. de. **Desenvolvimento de um protocolo para criopreservação de sementes de sementes de jatobá: fitossanidade e cinética de congelamento**. 2003. 93p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia, Departamento de Engenharia Agrícola, Campina Grande, PB, 2003.

FASSEL, S.A.; BARRETO, M. Avaliação da qualidade fisiológica e sanitária de sementes de amendoim durante o beneficiamento. **Revista Brasileira de Sementes**, v.22, n.2, p.126-130, 2000.

FREITAS, R.A.de.; DIAS, D.C.F.S.; CECON, P.R.; REIS, M.S. Qualidade fisiológica e sanitária de sementes de algodão durante o armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**. v.22, n.2, p.94-101, 2000.

KABEERE, F.; TALIGoola, H.K. Microflora and deterioration of soybean seeds in Uganda. **Seed Science and Technology**. Zürich, v.11, n.2, p.381-392, 1983.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN-FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia. Doenças das plantas cultivadas**. Piracicaba: Ceres, 1997.v.2, p.376-398.

LIMA, E.F.; CARVALHO, L.P.; CARVALHO, J.M.F.C. Comparação de métodos de análise sanitária e ocorrência de fungos em sementes de algodoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.7, n.3, p.401-406, 1982.

MACHADO, J.C. Podridões de tolerância de patógenos associados a sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. V.2. p.229-263, 1994.

MARCOS FILHO, J. Pesquisa sobre vigor de sementes de hortaliças. **Informativo ABRATES**, vol.11, p.63-75, 2001.

MELO, M.F.de V.; SANTOS, H.O.dos.; SILVA-MANN, R.; MESQUITA, J.B. Fungos associados a sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: II CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 2007, Brasília, DF. **Anais...**Brasília, 2007.

NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London: The Macmillan, 1979.v.1, 839p.

PINTO, N.F.J.A. Preservação da qualidade sanitária de grãos úmidos de milho através do controle químico da atividade fúngica. **Revista Brasileira de Armazenamento**, MG, v.29, n.2, p.159-164, 2004

PINTO, N.F.J.A. **Podridão branca da espiga de milho**. Sete Lagoas, MG,:Embrapa Milho e Sorgo. 1ed, 2006. (Comunicado Técnico).

POPINIGIS, F. **Fisiologia da semente**. Brasília: Ministério da Agricultura, AGIPAN, 1977, 289p.

PUZZI, D. **Abastecimento e armazenamento de grãos**. Campinas. Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 2000, 666p.

SALLIS, M.G.V.; LUCCA-FILHO,O.A.;MAIA,M.de.S. Fungos associados às sementes de feijão-miúdo (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) produzidas no município de São José do Norte (RS). **Revista Brasileira de Sementes**, v.23, n.1, p.36-39, 2001.

SATURNINO, H.M.; PACHECO, D.D.;KAKIDA, J.;TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. Produção de oleaginosas para o biodiesel. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.26, n.229, p.44-74, 2005.

SCOTT, M.L.; NESHEIM, M.C.; YOUNG, R.J. **Nutrition of the chicken**. 3ed., New York, 1982, 562p.

SILVA, J.de.S.; DONZELES, S.M.L.; AFONSO, A.D. Qualidade dos grãos. In:

SILVA, J.de.S. (ed). **Pré- processamento de produtos agrícolas**. Instituto Maia, 1995. cap2, p.24-29.

SILVA, f.de A.S. E. The ASSISTAT Software: statistical assistance. In: International Conference on Computers in Agriculture, 6, Cancun,1996. **Proceedings...** Cancun: American Society of Agricultural Engineers, 1996.p.294-298.

ZAMBENEDETTI, E.B.; ALVES, E.; POZZA, E.A.; ARAÚJO, D.V. Germinação de urediniósporos de *Phakopsora pachyrhizi* em diferentes métodos de armazenamento. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, v. 33, n. 1, p. 83-85, 2007.

CONCLUSÕES GERAIS

- ❖ As sementes de pinhão manso podem ser crioconservadas dentro da faixa de teores de água de 4 a 8% b.u. O teor de água limite para a crioconservação foi de 8% b.u., sendo este o teor de água em que as sementes foram colhidas no campo.
- ❖ As curvas de congelamento criogênico das sementes de pinhão manso com 8% de teor de água em base úmida, são exponenciais e não se distinguem as três fases de congelamento. Quanto maior o gradiente térmico a que as sementes são expostas, maior a difusividade térmica.
- ❖ As sementes de pinhão manso mantiveram a qualidade fisiológica durante os períodos de crioconservação.
- ❖ Os gêneros de fungos mais encontrados nas sementes após os períodos de crioconservação, foram os *Aspergillus* sp. , *Cladosporium* sp. e *Fusarium* sp. A crioconservação não reduziu a incidência de fungos fitopatogênicos.

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](#)