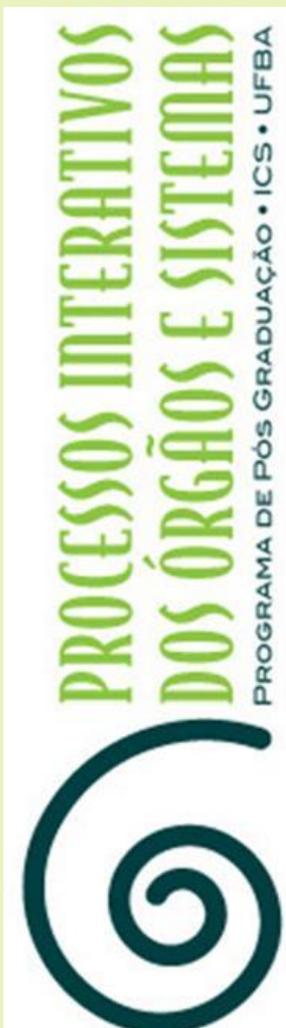


UFBA

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde

IVANA OLIVEIRA VIRGENS



**Morfofisiologia, radiografia e bioquímica
de sementes de *Jatropha curcas* L. sob
estresses abióticos.**

SALVADOR

2014

IVANA OLIVEIRA VIRGENS

**MORFOFISIOLOGIA, RADIOGRAFIA E BIOQUÍMICA DE SEMENTES DE
Jatropha curcas L. SOB ESTRESSES ABIÓTICOS.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Dr^a Luzimar Gonzaga Fernandez

SALVADOR

2014

V816m

Virgens, Ivana Oliveira

Morfofisiologia, radiografia e bioquímica de sementes de *Jatropha curcas* L. sob estresses abióticos. / Ivana Oliveira Virgens. - Salvador, 2014.

154f., Il.: color.

Orientação: Prof^a Dr^a Luzimar Gonzaga Fernandez

Tese (Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas) – Universidade Federal da Bahia, 2014.

1. Fisiologia. 2. Pinhão-manso. 3. Radiografia. 4. Atividade antioxidante. 5. Enzimas antioxidantes.

CDD – 633.85098142

IVANA OLIVEIRA VIRGENS

**MORFOFISIOLOGIA, RADIOGRAFIA E BIOQUÍMICA DE SEMENTES DE
JATROPHA CURCAS L. SOB ESTRESSES ABIÓTICOS**

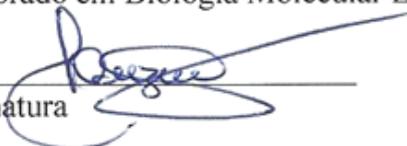
Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em
Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas da
Universidade Federal da Bahia como requisito
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Dr^a Luzimar Gonzaga Fernandez

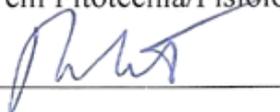
Aprovada em: 18/12/2014.

Banca Examinadora

Luzimar Gonzaga Fernandez – Orientação
Doutorado em Biologia Molecular Estrutural - Universidade Federal da Bahia

Assinatura 

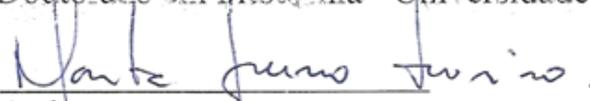
Renato Delmondez de Castro
Doutorado em Fitotecnia/Fisiologia Molecular Vegetal - Universidade Federal da Bahia

Assinatura 

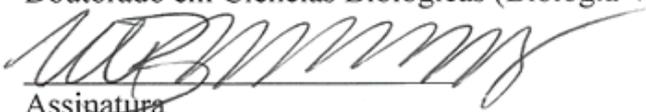
Renata Silva-Mann
Doutorado em Agronomia (Fitotecnia) - Universidade Federal de Sergipe

Assinatura 

Marta Bruno Loureiro
Doutorado em Fitotecnia - Universidade Federal da Bahia

Assinatura 

Nelson Barbosa Machado Neto
Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal) - Universidade do Oeste Paulista

Assinatura 

Á Deus e a Meishu-Sama, meu mentor espiritual, pela força e proteção espiritual e aos meus pais pela credibilidade depositada e permanente presença durante a realização do doutorado.

AGRADECIMENTOS

À Deus e a *Meishu-Sama* pela força e proteção espiritual.

À toda minha família, em especial a minha mãe e ao meu pai, pelo apoio, incentivo, dedicação, credibilidade, paciência e amor incondicional. Sem o amor de vocês seria completamente impossível chegar até aqui.

Ao meu namorado Antônio Amorim de Matos, pelo amor, paciência e palavras de fortalecimento.

Novamente e sempre à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Luzimar Gonzaga Fernandez, minha mãe científica, pela sua valiosa orientação, confiança, incentivo, amizade, credibilidade e pela oportunidade de cada vez mais contribuir para o meu amadurecimento e aprendizado. Sempre confiando que eu seria capaz de superar minhas limitações e atender as suas expectativas. Sua contribuição foi muito importante. Te adoro Luzi.

Ao Prof^o Dr. Renato Delmondez de Castro pela confiança, oportunidade e amizade de sempre, além do empenho incondicional para resolver assuntos burocráticos pertinentes ao meu estágio de doutoramento, além de sempre me ajudar e incentivar na realização dos estudos e por proporcionar meu encontro com pessoas maravilhosas. Obrigada por tudo.

À minha madrinha científica e sempre amiga Prof^a. Dr^a. Marta Bruno Loureiro por continuar ajudando e contribuindo no meu crescimento profissional. Serei sempre grata pelos seus ensinamentos, que determinaram e me prepararam para estar aqui hoje. Obrigada pelas orientações (pessoais e profissionais) e pela maravilhosa convivência.

Ao Dr. Peter Toorop, meu coorientador no exterior, que me recebeu com toda atenção, confiança, humanidade e antes de tudo acreditou no meu trabalho e que sempre disponível contribui mais ainda para meu crescimento profissional.

Ao Royal Botanic Gardens-Kew que me recebeu no Millennium Seed Bank, durante meu doutorado sênior e disponibilizou toda estrutura necessária para o desenvolvimento das minhas atividades.

Às grandes amizades construídas neste período do doutorado sênior e que foram indispensáveis na minha feliz permanência no Kew. Em especial aos amigos que de alguma forma se tornaram a minha família nesta temporada, Nelson Machado Neto, Ceci Castilho Custódio, Manoel Lima Junior e Simone Pohl. Muito Obrigada!!

Aos estagiários, professores e pós-doutores do LBBB, muitos hoje grandes amigos, pelo acompanhamento nas análises experimentais sempre que necessário. Em especial aos pós-doutores Cimille, Rafael e Marília, que contribuíram experimentalmente de forma essencial na finalização dos trabalhos nesta etapa final, pela necessidade de me ajudar em função de todos os problemas pessoais que tive que enfrentar. A contribuição de vocês foi muito importante para mim.

À minha amiga-irmã Patrícia Campos Santos, pela grande, sincera e eterna amizade e por sempre me incentivar, ajudando sempre que necessário e estar ao meu lado mesmo que virtualmente em pensamento. Graças à Deus, agora, ao final deste doutorado tivemos o prazer de estarmos juntas novamente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB), pela bolsa Concedida durante todo curso e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de doutorado sanduíche por meio do Programa Institucional de Doutorado Sanduíche no Exterior – PDSE.

À todos os que de alguma forma contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Meu muito obrigada!

À todos os meus sinceros agradecimentos...

homem depende de seu pensamento

É realmente verdade que gratidão gera gratidão e lamúria gera lamúria. Isto acontece porque o coração agradecido comunica-se com Deus, e o queixoso relaciona-se com Satanás. Assim, quem vive agradecendo, torna-se feliz; quem vive se lamuriando, caminha para a infelicidade.

A frase “Alegram-se que virão coisas alegres”, expressa uma grande verdade.

Ensinaamentos de Meishu-Sama. 3/09/1949.

RESUMO GERAL

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), espécie de uso múltiplo, popularmente conhecida como pinhão-mansão, é uma planta difundida em todas as regiões tropicais áridas e semiáridas do mundo, sendo atualmente apontada como promissora para produção de biodiesel por apresentar sementes ricas em óleo, além de ser utilizada na medicina popular por constituir uma fonte de metabólitos secundários de importância medicinal, cultivada como cerca viva, usada para recuperação de terrenos baldios e na fabricação de sabão e tinta. Neste contexto, acredita-se que alguns aspectos relacionados à sua biologia ainda necessitam ser elucidados, como o seu potencial antioxidante e respostas do metabolismo, a exemplo das enzimas antioxidantes em sementes e plântulas sob diferentes condições, cujas informações poderão contribuir para estudos biotecnológico com a espécie. Desta forma, objetivou-se estudar três diferentes genótipos de *J. curcas*, visando a caracterização morfométrica e fisiológica de sementes e plântulas, bem como a sua correlação com variações observadas em imagens radiográficas e variações bioquímicas. Para tanto, realizou-se *screening* fitoquímico, análise da atividade antioxidante e determinação de compostos fenólicos, além de avaliar a atividade de enzimas antioxidantes (Catalase, Superóxido Dismutase e Ascorbato Peroxidase) em extratos de sementes e plântulas de pinhão-mansão cultivadas sob diferentes temperaturas, selecionadas a partir dos ensaios fisiológicos conduzidos. Os genótipos avaliados apresentaram boa qualidade e verificou-se que a redução do teor de água promoveu a melhoria da germinabilidade. A semente de *J. curcas* apresentam em média 627.52 mm³, 0.65 g e 646.48 g de peso de mil sementes. A remoção do tegumento das sementes acelerou a germinação, porém produziu mais plântulas anormais quando comparadas às sementes germinadas com tegumento. A temperatura ótima de germinação para a espécie foi de 30°C, entretanto germinaram bem na faixa de 25 à 35°C, sendo 40°C uma temperatura de estresse. No ensaio de restrição hídrica verificou-se a espécie demonstrou sensibilidade pelo menos nos estádio inicial do seu desenvolvimento. A técnica de *priming* não promoveu melhoria da germinação nas condições testadas, porém houve melhoria em termos de desenvolvimento de plântula. Os resultados radiográficos demonstraram a eficácia das imagens de raios X para a avaliação do estado físico, características morfológicas e fisiológicas e da qualidade de sementes e mudas de *J. curcas*. Flavonas, xantonas e flavonóis foram detectados em extratos de sementes secas e esta mostrou maior atividade antioxidante e concentração do composto fenólico que os extratos de sementes embebidas, os quais apresentaram apenas a presença de compostos fenólicos livres e esteróides. A mudança

de temperatura não promoveu diferenças na atividade antioxidante e dos compostos fenólicos durante a embebição. A atividade das enzimas foi diferente nos compartimentos analisados. Amostras de sementes embebidas e mantida a 30°C apresentaram atividade da CAT superior. A atividade mais elevada da SOD foi verificada em sementes embebidas a 30 e 35°C e nas raízes das plântulas cultivadas a 35°C. A atividade da APX foi maior em plântulas inteiras e raízes crescidas a 30°C e 35°C, respectivamente. As temperaturas testadas não proporcionaram uma condição de estresse térmico a ponto de desencadear uma resposta antioxidante diferenciada, demonstrando assim que as espécies reativas de oxigênio podem ter atuado apenas como atores de vias de sinalização celular dentro da “janela oxidativa para a germinação”.

Palavras-chave: Fisiologia. Pinhão Manso. Atividade antioxidante. Enzimas antioxidantes.

GERAL ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), a multiple use species, popularly known as physic nut, is a widespread plant in all arid and semi-arid tropical regions of the world, and is currently identified as promising for biodiesel production by presenting rich seeds oil, besides being used in popular medicine as a source of secondary metabolites of medicinal importance, grown as hedges, used for recovery of vacant lots and for making soap and ink. In this context, it is believed that some aspects of its biology still need to be clarified, as its antioxidant potential and metabolic responses, like the antioxidant enzymes in seeds and seedlings under different conditions, whose information can contribute to biotechnological studies with species. Thus, the objective was to study three different genotypes of *J. curcas*, aiming to morphometric and physiological characterization of seeds and seedlings, as well as its correlation with changes observed in radiographic images and biochemical variations. To this end, there was screening phytochemical, analysis of antioxidant activity and determination of phenolic compounds, as well as evaluating the activity of antioxidant enzymes (catalase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase) in seed extracts and jatropha seedlings grown at different temperatures, selected from the conducted physiological tests. The genotypes showed good quality and it was found that reducing the water content promoted improved germination. The *J. curcas* seed have averaged 627.52 mm³, 0.65 g and 646.48 g weight of a thousand seeds. The re-motion of the seedcoat accelerated the germination, but produced more abnormal seedlings compared to seeds germinated with integument. The optimum temperature for germination of the species was 30 ° C, however germinated well in the range of 25 to 35 ° C, 40 ° C and a temperature stress. The water restriction test verified the species showed sensitivity at least in the early stage of development. The priming technique did not promote improvement of germination under the conditions tested, but there was an improvement in terms of developing seedling. The radiographic results demonstrated the effectiveness of X-ray images for evaluating the physical state, morphological and physiological characteristics and the quality and *J. curcas* seed seedlings. Flavones, flavonols and xanthones were detected in seed extracts dried and this showed a higher antioxidant activity and concentration of phenolic compound that extracts of seeds soaked, which showed only the presence of free phenolic compounds and steroids. The change in temperature did not cause differences in antioxidant activity and phenolic compounds during soaking. The enzyme activity was analyzed in different compartments. Samples of seeds soaked and held at 30 ° C showed higher CAT activity. The

highest SOD activity was detected in imbibed seeds 30 and 35 ° C and roots of the seedlings grown at 35 °C. The APX activity was higher in whole seedlings and roots grown at 30 °C and 35 °C respectively. The tested temperatures did not provide thermal stress conditions to trigger a different point antioxidant response, thereby showing that reactive oxygen species can be actuated only as cell signaling pathways of players within "oxidative window for germination."

Keywords: Physiology. Radiography. Antioxidant Activity. Antioxidant enzymes.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – *Jatropha curcas* L.: CARACTERÍSTICAS, POTENCIAL MEDICINAL E BIOTECNOLÓGICO.

Figura 1	Mapa de distribuição da <i>Jatropha curcas</i> L. (regiões destacadas de cinza escuras) no mundo.	27
Figura 2	Descrição taxônomica e ilustração botânica contendo características morfológicas das partes botânicas de <i>Jatropha curcas</i> L. (Pranchas 1 e 2).	29
Figura 3	Características morfológicas da <i>Jatropha curcas</i> L. <i>in natura</i>	31
Figura 4	Estrutura dos novos diterpenos descobertos, isolados a partir de extrato metanólico de raízes de <i>J. curcas</i> . (1) Jatrophalactona; (2) jatrophalona e (3) jatrophadiquetona.	39
Figura 5	Perfil cromatográfico e eletroforético da curcina extraída das sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. (A) Cromatografiado extrato bruto. A fração correspondente ao pico II foi isolada, liofilizada, e analisada por SDS-PAGE. (B) Gel da Curcina. Proteína corada com Coomassie (esquerda) e proteína corada com reagente de Schiff (direita), (M: marcador de proteína; C: curcina).	43

CAPÍTULO II – Fisiologia da germinação de sementes de *Jatropha curcas* L.

Figura	Regiões de coleta dos genótipos de <i>Jatropha curcas</i> L. utilizados no estudo. (▲) Genótipo Alagoinhas 2012; (●) Genótipo Minas Gerais 2012 e (◆) Genótipo Alagoas 2013.	64
Figura 2	Teor de água e germinação dos genótipos de <i>Jatropha curcas</i> L. (A) Teor de água ao longo do armazenamento*; (B) Germinação inicial e após diminuição do teor de água de cada lote.	71
Figura 3	Influência do teor de água na germinabilidade de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. (Genótipo Alagoas 2013). (A) Teor de água ao longo do tempo; (B) Germinação com diferentes teores de umidade. Condições de armazenamento: 15°C e 15% UR. Teste de germinação conduzido a 30°C com fotoperíodo de 8 horas.	73
Figura 4	Curva de embebição de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. com e sem tegumento. Genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012. (A) e (B), curva conduzida com sementes sem tegumento: Fases de embebição: Fase I - de 0 a 11 horas de embebição; Fase II - de 11 a 35 horas e Fase III - a partir de 35 horas; (C) e (D), curva conduzida com sementes com tegumento; (E) Curva Padrão (sementes com tegumento) para os dois genótipos: fases de embebi-	

	ção: Fase I - de 0 a 20 h; Fase II - entre 20 e 60 horas; Fase III - a partir de 60 horas.	77
Figura 5	<i>Screening</i> térmico conduzido com sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. sem tegumento. (A) e (C) - Curvas de Germinação; (B) e (D) - Germinação Total (G%), Taxa de Germinação (T50) e Uniformidade (T80-20) em cada genótipo. (E) Análise geral para a espécie.	80
Figura 6	Plântulas desenvolvidas durante <i>Screening</i> térmico conduzido com sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. sem tegumento. Plântulas normais (acima) após o 7º dia de semeadura e anormais (abaixo) após o 10º dia de semeadura nas diferentes temperaturas testadas.	81
Figura 7	<i>Screening</i> térmico conduzido com sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. com tegumento. Genótipos Alagoinhas 2012, Minas Gerais 2012 e Alagoas 2013. (A), (C) e (D) - Curvas de Germinação; (B), (D) e (F) - Germinação Total (G%), Taxa de Germinação (T50) e Uniformidade (T80-20) em cada genótipo. (F) Análise geral para a espécie.	84
Figura 8	Germinação Total (G%), Taxa de Germinação (T50) e Uniformidade (T80-20) das sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. durante <i>screening</i> térmico conduzido em sementes com tegumento.	85
Figura 9	Plântulas normais registradas durante <i>screening</i> térmico conduzido com sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. com tegumento. Plântulas após 7 dias de semeadura nas diferentes temperaturas testadas.	86
Figura 10	Padrões de anormalidades verificados nas plântulas durante <i>screening</i> térmico conduzido com sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. com tegumento. Plântulas anormais após 10 dias de semeadura nas diferentes temperaturas testadas.	87
Figura 11	<i>Screening</i> osmótico conduzido com sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. Genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012. Restrição hídrica simulada com soluções de polietilenoglicol 8000 (PEG 8000) nos potenciais 0.0; - 0.2; - 0.4; -0.6; -0,8; -1.0 e -1.2 MPa. (A) e (B) Curva de germinação nos diferentes potenciais testados; (C) Germinação total (%) nos diferentes potenciais por genótipos analisados.	89
Figura 12	Curva de germinação de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. com e sem <i>priming</i> nas temperaturas de 20, 30 e 40°C. (A) Genótipo Alagoinhas 2012 e (B) Minas Gerais 2012.	91
Figura 13	Plântulas de <i>Jatropha curcas</i> L. germinadas com e sem <i>priming</i> nas temperaturas de 20, 30 e 40°C. Genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012. ..	92

CAPÍTULO III – Morfometria e Fisiologia de Sementes de *Jatropha curcas* L. Associadas às Variações de Imagens de Raios X.

Figura 1	Ilustração do método de análise por coordenadas de Pixels utilizada para análise das imagens radiográficas das sementes de <i>Jatropha curcas</i> L.	105
Figura 2	Metodologia para as análises morfométricas, fisiológicas e radiográficas em sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. (A) Biometria; (B) Pesagens individualizadas; (C) Montagem das sementes na placa acrílica; (D) Máquina de Raios X; (E) Imagens radiográficas digitais obtidas; (F) Teste de germinação em Agar 1%; (G) e (H) Desenvolvimento das plântulas; (I) Plântulas ao 10º dia após semeadura.	106
Figura 3	Morfologia de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. (1) Imagem fotográfica da semente; (2) imagem fotográfica (em lupa) da semente destacando as estruturas internas; (3) Imagem radiográfica da semente destacando as partes internas visíveis por raios X.	110
Figura 4	Sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. com peso diferenciado em função do conteúdo interno da semente. Sementes de menor peso em relação à média estimada para a espécie podem corresponder a sementes não viáveis. Semente Padrão (germinou); Sementes (1) a (6), com pesos inferiores (não germinaram).	111
Figura 5	Análise geral dos parâmetros avaliados nas amostras de sementes dos três genótipos utilizados para análise de raios X (Alagoinhas 2012, Minas Gerais 2012 e Alagoas 2013) categorizados pelos grupos de sementes que germinaram e originaram plântulas normais ou anormais e as sementes não germinadas. n=300 (sementes), 100 sementes por genótipo. (A) Média do valor modal obtido a partir das imagens radiográficas de cada semente; (B) Valor médio do Máximo pixels obtidos a partir das imagens radiográficas de cada semente; (C) Peso médio das sementes; (D) Volume médio das sementes; (E) Comprimento médio das sementes; (F) Largura média das sementes; (G) Espessura média das sementes e (H) Área média das sementes.	114
Figura 6	Padrão de imagens radiográficas das sementes dos três genótipos de <i>Jatropha curcas</i> L. que germinaram e originaram plântulas normais (Alagoinhas 2012, Minas Gerais 2012 e Alagoas 2103).	117
Figura 7	Padrão de imagens radiográficas das sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. que originaram plântulas anormais. (1) a (4) Má formação da raiz; (4) Hipocótilo atrofiado e necrosado; (5) a (10) Presença de raízes necrosadas e (11) e (12) Hipocótilo necrosado.	118
Figura 8	Padrão de imagens radiográficas das sementes dos três genótipos de <i>Jatropha curcas</i> L. avaliados (Alagoinhas 2012, Minas Gerais 2012 e	

	Alagoas 2013) que não germinaram durante o teste de germinação. Sementes parcialmente vazias, com defeito no embrião ou presenças de manchas.	118
Figura 9	Dados do teste de germinação das sementes dos três genótipos teste de raios X. (A) Curva de germinação; (B) Curva de frequência relativa da germinação; (C) Germinação total e Taxa de germinação (T50); (D) Porcentagem de plântulas normais, anormais e de se sementes não germinada.	120

CAPÍTULO IV – Atividade Antioxidante de Sementes e Plântulas de *Jatropha curcas* L. em Resposta à Diferentes Temperaturas

Figura 1	Sementes e plântulas de <i>Jatropha curcas</i> L. semeadas a 25, 30 e 35°C utilizadas para análises bioquímicas. (A) Semente Seca; (B) Sementes embebidas por 42 horas; (C) Plântula com cotilédones expandidos após 10 dias de semeadura e Plântulas compartimentadas (parte aérea e raiz) e (D) Plântulas fotografadas e utilizadas para cálculo da estimativa de área.	132
Figura 2	Análise fisiológica e da atividade das enzimas antioxidantes em sementes, plântulas e diferentes compartimentos de plântulas de <i>Jatropha curcas</i> L. submetidas à germinação sob diferentes temperaturas (25, 30 e 35°C). (A) Germinação Final (%), Plântulas normais (%), Área de Plântula (cm ²); (B) Catalase (CAT); (C) Superóxido Dismutase (SOD); (D) Ascorbato Peroxidase (APX).	143

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – *Jatropha curcas* L.: CARACTERÍSTICAS, POTENCIAL MEDICINAL E BIOTECNOLÓGICO.

Tabela 1	Teor de Açúcares solúveis totais, proteínas, lipídeos totais, relativo de água e condutividade elétrica de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. coletadas na Mata Atlântica e regiões semiáridas (Alagoas) do Brasil.	39
Tabela 2	Rendimento de extração de óleo em sementes, incremento de proteína bruta e fibra alimentar nas tortas, composição química (% da matéria seca) e composição mineral ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$) de sementes e tortas de <i>Jatropha curcas</i> L. obtidas a partir de acesso selecionado na Fazenda Paraíso, Itaum, Município de Dourados, MS. Adaptação da tabela original.	40
Tabela 3	Composição química, compostos tóxicos, fatores anti-nutricionais e proteína isolada da torta detoxificada de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. (na base de massa seca – w/w).	41
Tabela 4	Composição de óleo e características de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. ..	44

CAPÍTULO II – Fisiologia da germinação de sementes de *Jatropha curcas* L.

Tabela 1	Dados de coleta para diferentes genótipos de <i>Jatropha curcas</i> L. e informações das estações meteorológicas próximas às áreas de coleta.	65
Tabela 2	Caracterização de sementes de genótipos de <i>Jatropha curcas</i> L.	70
Tabela 3	Germinação total das sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. submetidas a embebição controlada durante 2 e 7 dias em solução osmótica a -0.6 MPa a 30°C. Genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012.	90

CAPÍTULO III – Morfometria e Fisiologia de Sementes de *Jatropha curcas* L. Associadas às Variações de Imagens de Raios X.

Tabela 1	Caracterização de sementes de genótipos de <i>Jatropha curcas</i> L.	107
Tabela 2	Matriz de correlação com valores do coeficiente de Spearman das variáveis morfométricas (peso, comprimento, largura, espessura, área e volume da semente), radiográficas (Moda e Máximo pixel) e fisiológi-	111

cas (tempo para protrusão radicular) analisadas.

CAPÍTULO IV – Atividade Antioxidante de Sementes e Plântulas de *Jatropha curcas* L. em Resposta à Diferentes Temperaturas

Tabela 1	Perfil fitoquímico de extratos etanólicos obtidos a partir de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. embebidas 42 horas em água nas temperaturas de 25, 30 e 35°C.	138
Tabela 2	Rendimento (%) dos extratos etanólicos brutos de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. embebidas por 42h em água nas temperaturas de 25, 30 e 35°C.	139
Tabela 3	Concentração eficiente (EC ₅₀) de extratos etanólicos brutos de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. embebidas 42 horas em água nas temperaturas de 25, 30 e 35°C.	139
Tabela 4	Compostos fenólicos (mg EAG/g) em extratos etanólicos de sementes de <i>Jatropha curcas</i> L. embebidas 42 horas em água nas temperaturas de 25, 30 e 35°C.	140
Tabela 5	Tabela 5. Análise de variância dos diferentes tratamentos analisados para a atividade da superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em sementes e plântulas de <i>Jatropha curcas</i> L.	142

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	20
REFERÊNCIAS	22
OBJETIVOS	23
OBJETIVO GERAL	23
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23

CAPÍTULO I: *Jatropha curcas* L.: CARACTERÍSTICAS, POTENCIAL MEDICINAL E BIOTECNOLÓGICO

RESUMO	24
ABSTRACT	25
1 INTRODUÇÃO	26
2 DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE	27
3 BOTÂNICA E MORFOLOGIA DA ESPÉCIE	28
4 FISIOLOGIA DA ESPÉCIE	32
5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	37
5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE SEMENTES E TORTA	37
5.2 IMPORTÂNCIA DO ÓLEO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	43
6 ETNOFARMACOLOGIA E EFEITOS BIOLÓGICOS DA ESPÉCIE	44
7 MARCADORES MOLECULARES EM <i>Jatropha curcas</i>	46
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	48
REFERÊNCIAS	49

CAPÍTULO II - FISIOLOGIA DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Jatropha curcas* L.

RESUMO	58
ABSTRACT	59
1 INTRODUÇÃO	60
2 METODOLOGIA	63
2.1 MATERIAL BIOLÓGICO E ÁREAS DE COLETA	63
2.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE INICIAL DE SEMENTES	65

2.3	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEOR DE ÁGUA NA GERMINAÇÃO	66
2.4	CURVA DE EMBEBIÇÃO	67
2.5	SCREENING TÉRMICO E SCREENING OSMÓTICO	67
2.5.1	SCREENING TÉRMICO	68
2.5.2	SCREENING OSMÓTICO.....	69
2.6	2.6 EMBEBIÇÃO CONTROLADA (<i>priming</i>)	69
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS.....	70
3.2	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEOR DE ÁGUA NA GERMINAÇÃO	72
3.3	CURVA DE EMBEBIÇÃO	74
3.4	SCREENING TÉRMICO	78
3.4.1	Ensaio 1: <i>Screening</i> térmico conduzido com sementes sem tegumento	78
3.4.2	Ensaio 2: <i>Screening</i> térmico conduzido com sementes com tegumento	81
3.5	SCREENING OSMÓTICO.....	87
3.6	EMBEBIÇÃO CONTROLADA (<i>PRIMING</i>).....	90
4	CONCLUSÕES	93
	REFERÊNCIAS	93

CAPÍTULO III - MORFOMÉTRIA E FISIOLOGIA DE SEMENTES DE *Jatropha curcas* L. ASSOCIADAS ÀS VARIAÇÕES DE IMAGENS DE RAIOS X.

RESUMO	98	
ABSTRACT	99	
1	INTRODUÇÃO	100
2	METODOLOGIA	103
2.1	MATERIAL VEGETAL	103
2.2	CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS E MORFOMÉTRIA	103
2.3	TESTE DE RAIOS X	104
2.4	TESTE DE GERMINAÇÃO APÓS RAIOS-X	105
2.5	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	106
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS E MORFOMETRIA	107
3.2	MORFOMETRIA, RAIOS-X E FISIOLOGIA DAS SEMENTES	109

3.3	ANÁLISE DA GERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS (Dados Complementares) ..	119
4	CONCLUSÕES	121
	REFERÊNCIAS	122

CAPÍTULO IV - ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SEMENTES E PLÂNTULAS DE *Jatropha curcas* L. EM RESPOSTA Á DIFERENTES TEMPERATURA

	RESUMO	126
	ABSTRACT	127
1	INTRODUÇÃO	128
2	MATERIAIS E METÓDOS	131
2.1	MATERIAL VEGETAL E AMOSTRAGEM	131
2.2	PREPARO DOS EXTRATOS	132
2.2.1	Extrato Etanólico Bruto (EEB)	132
2.2.2.	Extrato Proteico (EP)	133
2.3	<i>SCREENING</i> FITOQUÍMICO	133
2.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	135
2.5	COMPOSTOS FENÓLICOS	135
2.6	ENZIMAS ANTIOXIDANTES	136
2.6.1	Determinação de Proteínas Totais	136
2.6.2.	Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidante	136
2.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	137
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
3.1	<i>SCREENING</i> FITOQUÍMICO.....	137
3.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	138
3.3	COMPOSTOS FENÓLICOS.....	140
3.4	ENZIMAS ANTIOXIDANTES	141
4	CONCLUSÕES	146
	REFERÊNCIAS	147
	ANEXO (Capítulo IV)	152
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	153

INTRODUÇÃO GERAL

A família Euphorbiaceae, uma das maiores Angiospermas Eudicotiledôneas, está representada nas regiões tropicais e temperada de todo o planeta por um total de 8.000 espécies, distribuídas em 317 gêneros, agrupadas em 49 tribos e cinco subfamílias. No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies, difundidas em todos os tipos de vegetação. O gênero *Jatropha* contém aproximadamente 170 espécies e uma das espécies mais estudadas deste gênero é *Jatropha curcas* L., espécie investigada neste trabalho (BARROSO et al., 1991; JOLY, 1998; SOUZA e LORENZI, 2008; JUDD et al., 2009; FROHLICH et al., 2010).

Jatropha curcas L. é considerada uma espécie de uso múltiplo, apesar de apresentar um grande potencial como fonte alternativa parabiodiesel. Entretanto, é utilizada muitas vezes como cerca viva, na recuperação de terrenos baldios e terras secas, empregada na fabricação de sabão e tinta, bem como na medicina popular onde é frequentemente usada como purgativo, no tratamento de doenças da pele, hidropisia, gota, paralisia e reumatismo. Em função dessas múltiplas potencialidades da planta, acredita-se ser de grande relevância novos estudos sobre a espécie a fim de se ampliar o conhecimento científico sobre a mesma.

Quando se pensa em estudar ou até explorar sustentavelmente uma espécie vegetal e suas potencialidades é necessário o conhecimento básico sobre morfologia e fisiologia da espécie de interesse. O conhecimento morfofisiológico, além de outras importâncias, possibilita a identificação precisa e o conhecimento do ciclo biológico da planta de interesse. Conhecer a fisiologia viabiliza a compreensão do desenvolvimento da planta e seu comportamento diante das condições ambientais, sejam elas naturais ou induzidas. Desta forma, é possível o uso das informações adquiridas tanto ecologicamente quanto como meio de utilização do recurso vegetal para novas necessidades. Sob tais condições, é uma espécie que já vem sendo estudada, tendo algumas dessas temáticas já elucidadas.

Alguns estudos fisiológicos têm sido conduzidos com sementes de *J. curcas* como: estudos de armazenamento, análises de crescimento e desenvolvimento, teste de envelhecimento acelerado, teste de tetrazólio, avaliação da germinação e do vigor em condições ótimas e alguns quando submetidos aos fatores abióticos (salinidade, *deficit* hídrico), entre outros. Entretanto, ainda não foram estabelecidas normas para condução de testes padrão com a espécie, sendo esta uma lacuna importante a ser preenchida.

Estudos têm sido desenvolvidos para determinação dos componentes tóxicos da *J. curcas*, assim como a descoberta de compostos que possam ser úteis para outras finalidades,

como nutricionais ou medicinais. Sendo assim, igualmente a outras Euphorbiaceae, *J. curcas* tem tido um papel muito significativo nas pesquisas fitoquímicas, em especial na determinação de novos compostos farmacologicamente ativos. Atualmente, diversos grupos de pesquisa se dedicam ao estudo da atividade biológica de uma determinada classe de compostos com princípios ativos semelhantes, utilizando a estratégia de modificação molecular para compreender seu mecanismo de ação, de maneira a permitir o desenvolvimento de medicamentos sintéticos mais seguros. Assim, torna-se importante a ampliação do conhecimento científico sobre a espécie, na qual se acredita que estudos acerca da caracterização bioquímica e da atividade antioxidante podem contribuir de forma significativa, visando uma melhor compreensão das condições que possam promover diferenças na concentração de diferentes metabólitos bioativos, assim como na atividade antioxidante, frente a estresses abióticos.

Diante do exposto, este trabalho foi desenvolvido buscando englobar alguns dos aspectos citados, que seguem estruturados em quatro capítulos.

No capítulo I, apresenta-se revisão de literatura sobre estudos relacionados com os à botânica, fisiologia e agronomia que podem auxiliar na compreensão do comportamento da planta, além de informações sobre a composição química, etnofarmacológica, efeitos biológicos e aspectos moleculares já estudados, contribuindo com informações aos que pretendem conhecer e explorar o potencial farmacológico, toxicológico ou biotecnológico da espécie.

No capítulo II é feita abordagem sobre a caracterização de sementes de diferentes genótipos, além de análises experimentais que abordam aspectos fisiológicos, como a influência do grau de umidade das sementes na germinação; avaliação da absorção de água pelas sementes através do estudo de curvas de embebição; condução de *screening* térmico e osmótico para determinação das condições ótimas de germinação e resposta germinativa aos diferentes potenciais osmóticos, bem como estudo do condicionamento osmótico por meio de embebição controlada (*priming*).

No capítulo III descreve-se sobre a análise de raios X realizadas nas sementes de *J. curcas* de diferentes genótipos a fim de correlacionar-se os dados morfométricos com as imagens radiográficas obtidas e a análise da germinação, assim como construir padrões de imagens radiográficas relacionadas ao desenvolvimento inicial.

No capítulo IV demonstram-se os estudos bioquímicos realizados para investigar o potencial antioxidante das sementes de *J. curcas* e a atividade de enzimas antioxidantes em sementes e plântulas cultivadas em diferentes condições térmicas, visando iniciar estudos que

contribuam nas futuras investigações sobre o comportamento quando em diferentes temperaturas de germinação e do potencial biotecnológico da espécie.

Este estudo proposto teve suporte técnico científico e recurso financeiro, uma vez que corresponde ao subprojeto do projeto de pesquisa intitulada “Caracterização de sistemas de produção e de acessos de mamona (*Ricinus communis*) e pinhão-manso (*Jatropha curcas*) no semiárido com foco na agricultura familiar” do projeto aprovado pela CAPES/PNPD junto ao Programa de Pós-graduação Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas.

REFERÊNCIAS

- BARROSO, G.M. et al.. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universitária, v.3, p.237-258, 1991.
- FROHLICH, K. A. et al.. Composto Isolado de *Jatropha isabelli* (Muellarg.) com atividades gastroprotetora. **Saúde**, Santa Maria, v.36, n.2, p. 19-28, jul./dez. 2010.
- JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.
- JUDD, W. S. et al.. **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 355-359.
- SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG 11. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. p.358-368.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Realizar caracterizações morfofisiológicas e bioquímicas de sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. e correlacionar imagens radiográficas de diferentes genótipos durante a germinação.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar as sementes dos diferentes genótipos de *Jatropha curcas* L. por meio de variáveis morfométricas, determinação do teor de água e germinação inicial dos lotes;
2. Avaliar o efeito do teor de água na germinação de sementes de *J. curcas* e determinar a curva de embebição de sementes com e sem tegumento dos diferentes genótipos;
3. Conduzir *screening* térmico com sementes com e sem tegumento dos diferentes genótipos de *J. curcas*;
4. Conduzir *screening* osmótico com sementes dos diferentes genótipos de *J. curcas*;
5. Avaliar a germinação de sementes dos diferentes genótipos de *J. curcas* através da embebição controlada (*priming*);
6. Correlacionar imagens radiográficas com parâmetros morfométricos e a germinação em sementes de *J. curcas* dos diferentes genótipos e determinar padrões de imagens radiográficas e sua relação com o desenvolvimento germinativo;
7. Realizar *screening* fitoquímico de sementes de *J. curcas*, submetidas a diferentes temperaturas;
8. Determinar o perfil metabólico de sementes de *J. curcas*, quanto à atividade antioxidante, quando submetidas a diferentes temperaturas;
9. Quantificar compostos fenólicos totais em sementes de *J. curcas* submetidas a diferentes temperaturas;
10. Determinar a atividade de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, ascorbato peroxidase e catalase) em sementes e plântulas de *J. curcas* submetidas a diferentes temperaturas.

CAPÍTULO I

***Jatropha curcas* L.: CARACTERÍSTICAS, POTENCIAL MEDICINAL E BIOTECNOLÓGICO**

RESUMO

Este manuscrito trata de uma revisão de literatura sobre *Jatropha curcas* L., onde são abordados os aspectos botânico, fisiológicos e agrônômicos, assim como informações sobre a composição química, etnofarmacologia, efeitos biológicos e moleculares visando uma maior compreensão do comportamento da planta e do potencial farmacológico, toxicológico e/ou biotecnológico da espécie. A partir deste estudo conclui-se que alguns conhecimentos básicos relacionados à espécie já estão elucidados e amplamente disponíveis, no entanto, estudos fisiológicos ainda necessitam ser melhor desenvolvidos e se possível agregando informações bioquímicas e moleculares que possibilitariam uma compreensão mais consistente sobre o comportamento da planta. Em termos bioquímicos e moleculares seria interessante a continuidade de estudos que investiguem, por exemplo, o estresse oxidativo, como a expressão de enzimas antioxidante sob efeito de agentes abióticos induzidos, assim como em genes responsivos ao estresse. A expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo para determinados fatores abióticos são essenciais para compreender os fatores genéticos que regulam a seu metabolismo, assim como, fornecer informações relevantes que possam ser úteis na elaboração de estudos com foco em programas de melhoramento genéticos da planta, assim como estudos que visem sua aplicação biotecnológica.

Palavras-chave: Pinhão manso. Composição química. Etnofarmacobotânica. Estresse abiótico.

***Jatropha curcas* L.: CHARACTERISTICS, MEDICAL AND BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL**

ABSTRACT

This literature review describes botanical, physiological and agronomic aspects of *Jatropha curcas* L. and contains information on chemical composition, ethnopharmacology and molecular biology, summarising and providing records to those who want to explore the pharmacological potential, toxicology or biotechnology of this species. From this study it is concluded that basic knowledge regarding the species is widely available and already elucidated. However, more physiological studies are required and generating biochemical and molecular data would create a better understanding of the plant. This would include oxidative stress, such as the expression of antioxidant enzymes induced by abiotic agents, as well as stress response genes. Such gene expression studies would contribute to understanding the genetic factors that regulate the biosynthesis of antioxidants; as well as provide relevant information that may be useful in designing future projects focusing on genetic improvement programs of the plant, or biotechnological applications.

Keywords: Physiology. Chemical composition. Ethnopharmacology. Stress.

1 INTRODUÇÃO

A família Euphorbiaceae, constitui uma das maiores das Angiospermas Eudicotiledôneas, inclui ervas, arbustos, árvores e lianas, geralmente com látex branco e, por vezes, espinhosas e de aspecto áfilo, semelhante às Cactáceas. São espécies com um único óvulo por lóculo, sementes geralmente ariladas, flores unissexuais, estiletes mais ou menos divididos e frutos esquizocárpicos (SOUZA e LORENZI, 2008; JUDD et al., 2009).

A família está representada nas regiões tropicais e temperada de todo o planeta por um total de 8.000 espécies, distribuídas em 317 gêneros, agrupados em 49 tribos e cinco subfamílias, segundo o sistema de classificação proposto por Webster (1994). No Brasil ocorrem 72 gêneros e cerca de 1.100 espécies, distribuídas em todos os tipos de regiões e vegetação. O gênero *Jatropha* contém aproximadamente 170 espécies conhecidas e uma das mais estudadas deste gênero é a *Jatropha curcas* L. (BARROSO et al., 1991; JOLY, 1998; FROHLICH et al., 2010), espécie abordada neste manuscrito.

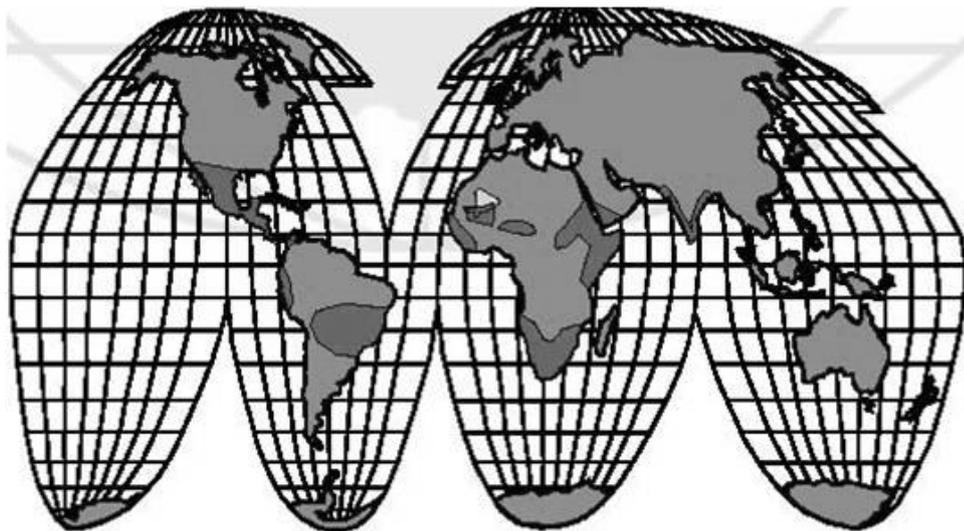
Jatropha curcas L., dentre outros nomes, popularmente conhecida como pinhão-mansinho ou pinhão manso, tem seu verdadeiro centro de origem ainda desconhecido. É considerada uma espécie de uso múltiplo, apesar de apresentar um grande potencial como alternativa de fonte para biodiesel. Entretanto, é cultivada muitas vezes como cerca viva, usada para a recuperação de terrenos baldios e terras secas, utilizada na fabricação de sabão e tinta, bem como na medicina popular onde é frequentemente usada como purgativo, no tratamento de enfermidades da pele, hidropisia, gota, paralisia e reumatismo.

A revisão apresentada a seguir buscou compilar estudos acerca dos aspectos botânico, fisiológicos e agrônômicos que auxiliem na compreensão do comportamento de *J. curcas*, visando fornecer informações para subsidiar a produção e exploração comercial desta. Acrescentando-se ainda informações sobre a composição química, aspectos moleculares já elucidados, etnofarmacologia e efeitos biológicos, com maior enfoque no seu potencial farmacológico, toxicológico e biotecnológico.

2 DIVERSIDADE E DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE

Jatropha curcas L. tem seu centro de origem indeterminado, porém a partir da maioria dos relatos e estudos acredita-se que ela pode ter sido disseminada por navegadores portugueses da América Central e do México através das ilhas de Cabo Verde e Guiné-Bissau para outros países da África e da Ásia. Por esta razão, vários autores citam as Américas do Sul e Central como centros de origem prováveis para a espécie. Atualmente está difundida nos trópicos e sub-tropicais (Figura 1), sendo encontrada de forma espontânea em quase todas as regiões intertropicais, ocorrendo em maior escala nas regiões tropicais e em número bastante reduzido nas regiões temperadas (DOVEBIOTECH, 2005; SATO et al., 2009; BRITTAINE e LUTALADIO, 2010).

Figura 1 - Mapa de distribuição da *Jatropha curcas* L. (regiões destacadas de cinza escuro) no mundo.



Fonte: (DOVEBIOTECH, 2005).

No Brasil, sua distribuição geográfica é bastante vasta, devido à sua rusticidade, resistência a longas estiagens, sendo adaptável a condições edafoclimáticas muito variáveis, desde a região Nordeste, Sudeste até o estado do Paraná (ARRUDA et al., 2004; SATURNINO et al., 2005).

No Compêndio sobre Espécies Invasoras disponível no site da Commonwealth Agricultural Bureaux - CABI International é possível encontrar uma ampla lista dos locais de ocorrência da espécie (<http://www.cabi.org/isc/datasheet/28393>).

3 BOTÂNICA E MORFOLOGIA DA ESPÉCIE

Jatropha curcas L. foi descrita pela primeira vez pelo botânico sueco Carl Linnaeus em 1753. É uma das muitas espécies do gênero *Jatropha*, um membro da família Euphorbiaceae, muitas das quais são conhecidas por sua produção de fitotoxina e uma seiva branca leitosa, o látex (BRITTAINE e LUTALADIO, 2010).

A espécie apresenta uma extensa lista de sinonímias, entre elas, *Curcas adansoni*, *Curcas curcas* (L.), *Curcas indica*, *Curcas purgans*, *Jatropha acerifolia*, *Jatropha edulis*, *Jatropha yucatanensis*, *Ricinus americanos* e *Ricinus jarak*. É conhecida internacionalmente por diferentes nomes: *physic nut*, *purging nut* (inglês); *arbol santo* (espanhol); *Grand médicinier*, *Grand pignon d'Inde*, *Gros ricin*, (francês); *dandebbarri*, *dandenahri*, *habb el meluk* (árabe); *ma fong chou* (chinês) e grão malucco, grão muluco, pinhão, pinhão de purga, purgueira e ricino maior (português). Localmente ainda é possível encontrar diferentes nomes, como no Brasil, que se pode encontrar com o nome de pinhão-manso, pinhão manso, pinheiro de purga, pinheiro do inferno, figo do inferno mandubiguasu, e ainda pinhão paraguay (CAB INTERNATIONAL, 2013).

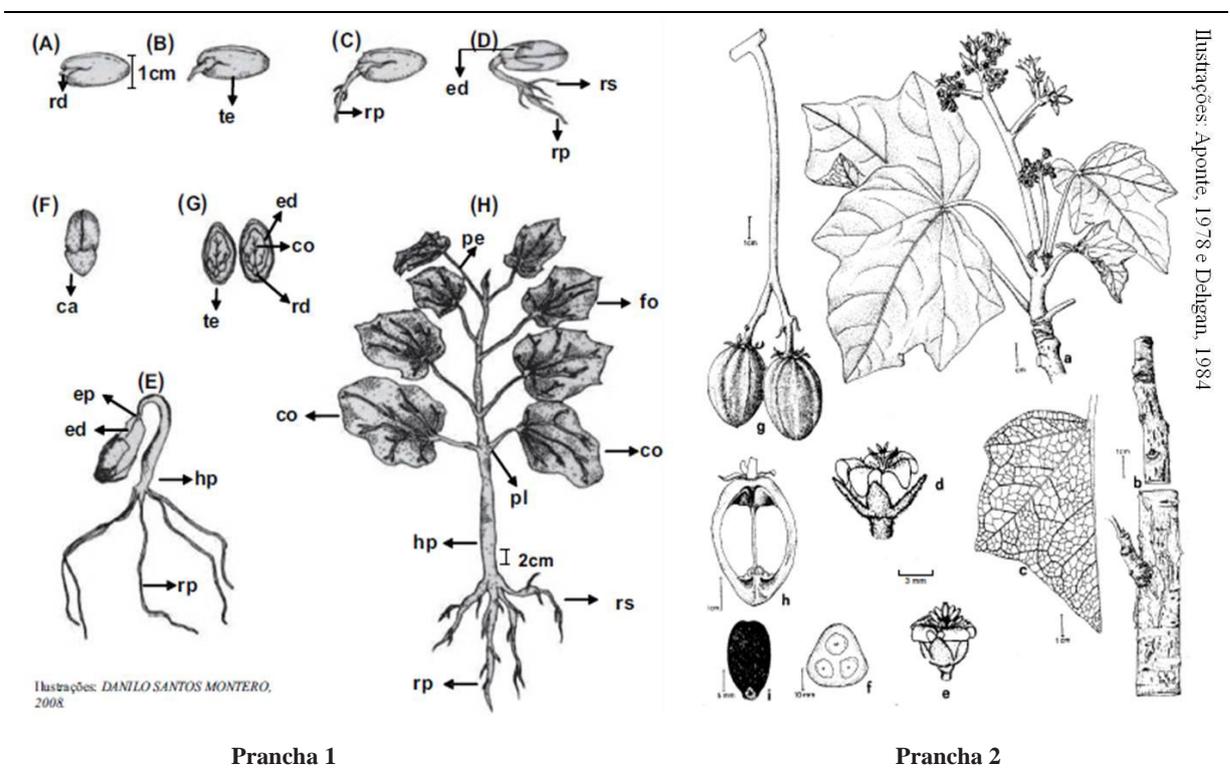
Quando se pensa em estudar ou até explorar agricamente uma espécie vegetal e suas potencialidades, é necessário o conhecimento básico de aspectos morfológicos e fisiológicos da espécie. A descrição morfológica além de outras importâncias possibilita a identificação precisa e o conhecimento do ciclo biológico da planta de interesse. Conhecer a fisiologia viabiliza a compreensão do desenvolvimento da planta e seu comportamento diante das condições ambientais, sejam elas naturais ou induzidas. Desta forma, é possível o uso do conhecimento adquirido tanto ecologicamente quanto como meio de utilização do recurso vegetal para novas necessidades.

Existem basicamente três principais variedades cultivadas no mundo: (1) Nicarágua: apresentam menos frutos por planta, porém são maiores; (2) Cabo Verde: é a mais comum, encontrada em diversos países, provavelmente levada pelos portugueses para a África e Ásia; e (3) Mexicanas: algumas variedades não apresentam toxicidade e são consumidas, previamente assadas, pela população local (HENNING, 2004).

J. curcas é uma espécie diplóide com $2n=22$ cromossomos, sendo cinco pares de cromossomos metacêntricos (1, 2, 5, 6 e 11) e 6 pares de cromossomos submetacêntricos (3, 4, 7, 8, 9 e 10). A planta adulta é uma arvoreta suculenta, de crescimento rápido, cuja altura é de 2-3 metros, podendo alcançar até cinco metros. O diâmetro do tronco é de aproximadamente 20

cm e dividido desde a base, em ramos compridos. As folhas têm de 10-15 cm de comprimento e 7,5-12,5 cm de largura são verdes, esparsas e brilhantes, largas e alternas, em forma de palma, com três a cinco lóbulos, pecioladas e com nervuras esbranquiçadas e salientes na face inferior (Figura 2). Os pecíolos são redondos, lisos, com 4-6 centímetros de comprimento e estípulas ausentes (HELLER, 1996; SATURNINO et al., 2005; SATO et al., 2009; BRASILEIRO et al., 2012; MARGONAR et al., 2012; PESSOA et al., 2012; SANTANA et al., 2013; CAB INTERNATIONAL, 2013; LUCENA et al., 2014).

Figura 2 - Descrição taxônômica e ilustração botânica contendo características morfológicas das partes botânicas de *Jatropha curcas* L. (Pranchas 1 e 2)¹



Fonte: Adaptado de Loureiro et al. (2013) e Heller, (1996)

As flores tem coloração amarela e a floração é monóica, mas comsexos separados, com flores masculinas, em maior número, localizadas nas extremidades das ramificações e as

¹Prancha 1: Morfologia da semente e do desenvolvimento da plântula de *J. curcas*. Fonte: Loureiro et al., 2013. (A) – Protrusão da radícula; (B-D) – Desenvolvimento da plântula; (F) Semente com carúncula; (G) – Aspecto interno da semente; (H) – Corte longitudinal das sementes detalhando o endosperma, os cotilédones e o eixo embrionário; Ca – Carúncula; co – Cotilédone; ed – Endosperma; ep - Epicótilo; fl – Folha; h – Hipocótilo; te – Tegumento; pe – Pecíolo; pl – Pulvino; rp – Raiz primária; e rs – Raiz secundária.

Prancha 2: Importantes partes botânicas de *Jatropha curcas* L. Fonte: Heller, 1996. (a) Ramo floral; (b) casca do caule; (c) folha; (d) flor pestilada (feminina); (e) Flor estaminada (masculina); (f) corte transversal do fruto imaturo; (g) Frutos; (i) semente.

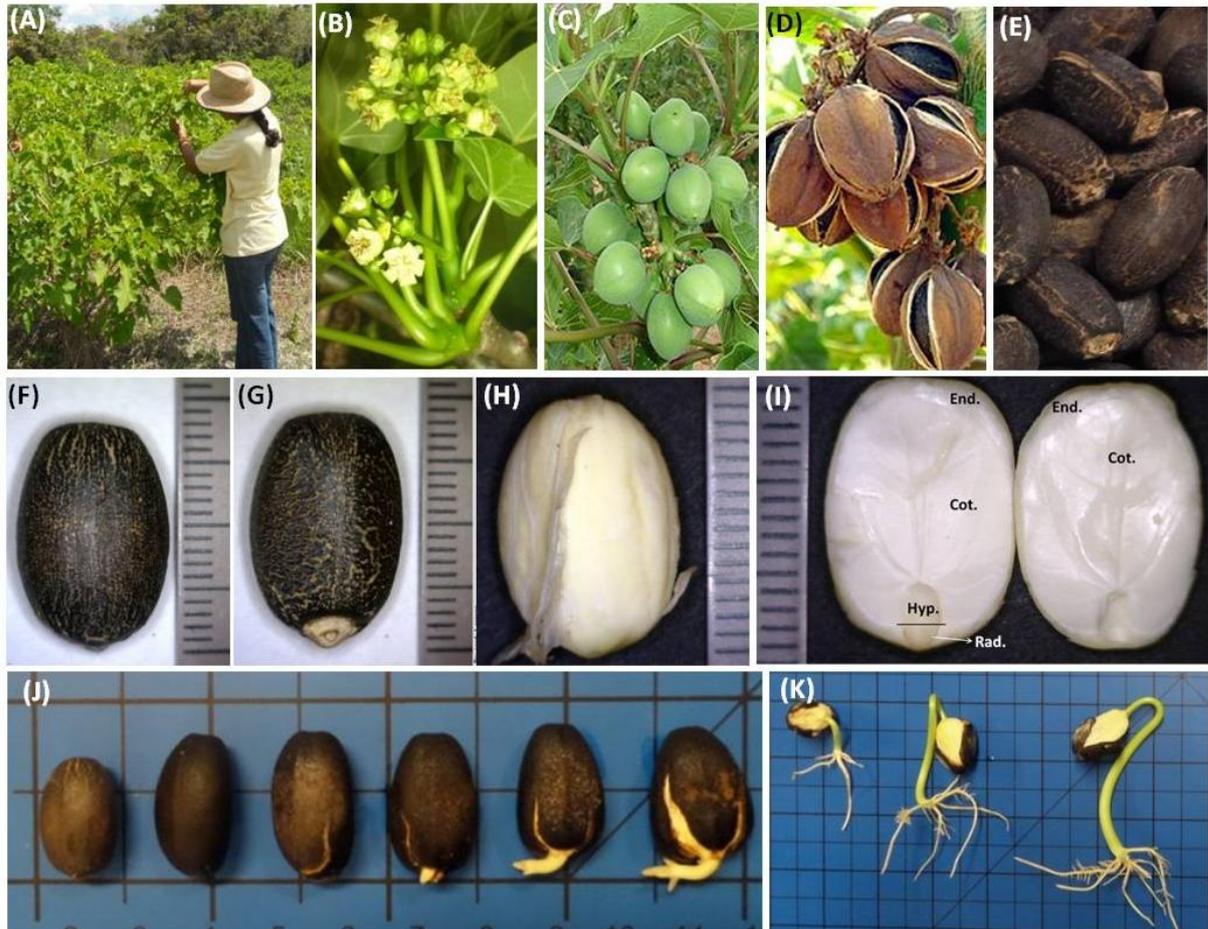
femininas logo abaixo das masculinas (Figuras 2 e 3). As flores masculinas são amarelas esverdeada se sesséis diferenciando-se das femininas que são largamente pedunculadas. Há uma pequena bráctea abaixo de cada subdivisão dapanícula, egeralmenteumapressão sobreocálice. As flores masculinas apresentam cálice com5 sepálas, corola com5pétalas, campanuladas, com pêlos, discode 5 corpos glandulares e 10 anterasiguais. As flores femininas apresentam cálice, corolaediscocomo asmasculinas. O ovário é oblongo, liso, apresenta 3estilletescurtos; estigmabífido e um pouco piloso. Apresenta polinização cruzada, primordialmente entomófi-la, entre diferentes flores da mesma planta ou de plantas diferentes, sendo parcialmente auto-compatível (ALBUQUERQUE et al., 2008; SATO et al., 2009; PESSOA et al., 2012; CAB INTERNATIONAL, 2013).

O fruto é seco, deiscente, coriáceo, capsular, ovóide, com diâmetro de 1,5 a 3,0 cm, trilocular, com uma semente por cavidade. É formado por um pericarpo ou casca dura e le-nhosa, inicialmente verde, passando a amarelo, castanho e por fim preto, quando atinge a ma-turação (PESSOA et al., 2012). Contém de 53 a 62% de sementes e de 38 a 47% de casca, pesando cada uma de 1,53 a 2,85 g. Com dimensões de cerca 2.5-4 cm de comprimento por 2-2.5 cm de largura (SATURNINO et al., 2005; NUNES et al., 2009; SATO et al., 2009).

A semente seca mede de 1,5-2 cm de comprimento e 1,0-1,3 cm de largura, pesando de 0,55 a 0,79 g, podendo ter, dependendo da variedade e dos tratos culturais, entre 33,7 e 45% de casca e de 55 a 66% de amêndoa. Debaixo do invólucro da semente (testa) existe uma película branca cobrindo a amêndoa (o tegme). É constituída de um albúmen (endosperma) abundante, branco, oleaginoso, contendo o embrião provido de dois largos cotilédones achatados. São endospermáticas, apresentam forma ovalada e dorso convexo, a rafe é bem visível e a carúncula possui formato cônico, coloração castanho-clara e encontra-se revestindo a regi-ão do hilo. O tegumento possui coloração marrom-escurauniformemente distribuída, é glabro com textura porosa e apresenta fissuras em sua superfície. O endosperma possui coloração esbranquiçada, característica de outras espécies da mesma família. Possui dois cotilédones foliáceos, inteiramente envolvidos pelo endosperma, de coloração esbranquiçada e formato cordifome, em que o ápice é atenuado e a base ampla, escavada e arredondada. Os cotilédones possuem nervuras visíveis tanto na região adaxial quanto na abaxial, classificadas como tri-nérvias, sendo duas laterais que partem da base. No início doprocesso germinativo, são for-madas cinco raízes, uma principal e quatro adventícias, que surgem da região do colo. A raiz principal é curta e glabra e de formato cilíndrico. As raízeslaterais possuem o mesmo padrão de desenvolvimento da raiz principal, sendo menos espessas. A espécie apresenta germinação do tipo epígea fanerocotiledonar. O processo germinativo com desenvolvimento da plântula

varia de 15 a 30 dias (Figuras 2 e 3) (NUNES et al., 2009; SATO et al., 2009; LOUREIRO et al., 2013).

Figura 3 - Características morfológicas da *Jatropha curcas* L. in natura².



Fonte: Fotos do autor.

A morfologia de sementes e plântulas de *J. curcas* foi descrita identificando-se as diferentes fases do processo de germinação através da curva de embebição das sementes, bem como a anatomia das sementes, relacionando às mudanças que ocorrem nos tecidos durante as fases de embebição. Anatomicamente as sementes são bitegumentadas e exotégmicas, sendo o tégmen dividido em três camadas. Nas células parenquimáticas é possível verificar corpos lipídicos como principal substância de reserva dessas sementes. No início do processo de embebição é possível verificar que há diminuição das gotículas delipídeos neste tecido, e durante

² (A) Planta adulta em campo, (B) ramo florido, (C) fruto verde, (D) fruto seco, (E) semente, (F) e (G) aspecto externo da semente (parte superior e inferior), (H) Semente sem o tegumento externo, (I) Parte interna da semente (visualização do endosperma, cotilédone e eixo embrionário), (J) sementes em diferentes estádios germinativo, (K) Desenvolvimento inicial (plântula com 10 dias após embebição da semente).

as fases pode-se observar que as células se tornaram, conforme a mudança de fases, mais túrgidas e vazias. Durante o processo de embebição também são observadas modificações nos feixes vasculares encontrados na radícula e parte do endosperma e durante a protrusão da radícula (fase III), sendo possível visualizar o alongamento dos feixes, além de expansão e crescimento sobre o tecido (LOUREIRO et al., 2013).

Agronomicamente, caracterizações morfológicas também são realizadas utilizando descritores morfológicos como: folhas (pilosidade; cor de folhas jovens e adultas; cor das nervuras; cerosidade; tipos de ramificação; nº lóbulos, comprimento de folhas; largura de folhas; e, relação entre o comprimento e a largura de folhas) aspectos vegetativos da planta (altura de planta e diâmetro do caule). Informações como estas são úteis para serem catalogadas em banco de dados e utilizadas, juntamente outras ferramentas, na escolha de genitores em cruzamentos em programas de melhoramento genético. Diferentes estudos de variabilidade genética sejam por meio de caracteres morfológicos ou utilizando as técnicas de marcadores isoenzimáticos e moleculares tipo RAPD, AFLP, ISSR em diferentes acessos de *J. curcas* tem sido obtidas por grupos especializados no Brasil, onde são utilizados para análise tanto de acessos comerciais, como acessos disponíveis em banco ativos de germoplasma (BAG) do país, a exemplo dos BAG das diferentes unidades da Embrapa e universidade federais (SILVA-MANN et al., 2007; GOIS et al., 2008, ABREU et al., 2009; DA ROCHA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2010; SOARES, 2010; BRESSAN et al., 2011; NUCCI, 2011; PESSOA, 2011; REDONDO et al., 2011; VASCONCELOS et al., 2011).

4 FISIOLÓGIA DA ESPÉCIE

Alguns estudos fisiológicos têm sido conduzidos com sementes de *J. curcas* como: estudos de armazenamento, análises de crescimento e desenvolvimento, teste de envelhecimento acelerado, de tetrazólio, germinação e vigor em condições ótimas e em condições de estresses abióticos (salinidade, déficit hídrico, temperatura), entre outros. Entretanto, ainda não foi estabelecido um padrão para condução de testes com a espécie, sendo estes aspectos relevantes a serem elucidados.

Sementes de plantas oleaginosas, como *J. curcas* são muito propensas à degradação e assim são de difícil conservação durante o armazenamento. Quando comparadas as sementes amiláceas, a conservação das oleaginosas é mais difícil, uma vez que lipídios são quimicamente menos estáveis do que as moléculas do amido. Por esta razão, a peroxidação de

lipídios é frequentemente relatada como um das principais causas de deterioração destas sementes (PEREIRA et al., 2013).

Estudos visando estabelecer as condições mais adequadas para o armazenamento das sementes de *J. curcas* foram conduzidos durante um ano (PEREIRA et al., 2013; JOKER e JEPSEN, 2003; RATREE, 2004). Verificou-se que há uma redução natural na germinação e vigor das sementes durante o armazenamento, independente de condições ambientais (temperatura e umidade) e do tipo de embalagem utilizada. A qualidade fisiológica das sementes foi maior após o armazenamento em câmara fria ($\pm 5^{\circ}\text{C}$ e 60% UR), em embalagens de saco de papel Kraft ou polipropileno trançado ou quando mantidas em ambiente não controlado (condições de laboratório, a $\pm 25^{\circ}\text{C}$ e $\pm 76\%$ UR) dentro de tambor de papelão. O teor de água das sementes verificado no início do armazenamento estava em cerca de 7,2 % (PEREIRA et al., 2013). Entretanto, existem relatos de que sementes de *J. curcas* são capazes de manter sua viabilidade durante um ano quando armazenadas em condições naturais (ambiente), sem controle de temperatura e umidade (JOKER e JEPSEN, 2003), ao passo que em outro estudo concluiu-se que a germinação diminuiu de 90% para 43% após 112 dias de armazenamento mantidas em condições ambientais (RATREE, 2004).

Quando se armazenou sementes de *J. curcas* a 0° e 20°C , as temperaturas não foram determinantes para a manutenção da qualidade fisiológica ao longo do período de armazenamento, mas sim o teor de água, o qual influenciou na redução de germinação e vigor. Sementes com teor de água mantido entre 4% e 5% não perderam a qualidade, enquanto que o teor de água de 9,5% foi prejudicial para a qualidade das sementes de *J. curcas* (GUZMAN e AQUINO, 2009). Um monitoramento durante 6 meses de armazenamento das sementes mantidas sob condições ambientais normais (laboratório) em embalagens plásticas, evidenciaram que as sementes apresentaram decréscimo na porcentagem de germinação de 89% para 53% após o 6º mês do armazenamento. As sementes armazenadas apresentavam teor de água de 7,9% no início do armazenamento e 8,2% ao final (WORANG et al., 2008). Outro estudo realizado durante oito meses de armazenamento testou a condição ambiente (armazém) e câmara fria ($12\pm 3^{\circ}\text{C}$ e 45% UR) e três tipos de embalagem (saco de algodão, de polietileno e de papel multifoliado). Os dados indicaram que quando armazenadas com boa qualidade inicial, as sementes apresentam conservação da viabilidade até oito meses, independente da embalagem, sendo que o teor de água das sementes no momento do armazenamento era de 7,4% (MORAIS, 2008).

A técnica de criopreservação também já foi testada como forma de preservar sementes de *J. curcas*. Ao se testar duas condições, -170°C (vapor de nitrogênio líquido) e -196°C (i-

mersão no nitrogênio líquido) em quatro períodos de criopreservação, 0, 30, 60 e 90 dias. Verificou-se que as sementes podem ser criopreservadas tanto no vapor como na imersão em nitrogênio líquido, pois mantiveram a sua viabilidade e índices de vigor durante o período de estudo (GOLDFARB et al., 2010).

Em termos de propagação, *J. curcas* pode ser cultivada por meio de sementes ou estacas. Por ser uma planta dióica de fecundação cruzada entomófila, resulta numa grande variação entre indivíduos da espécie. Plantas oriundas de sementes florescem nove meses depois de semeadas, enquanto as multiplicadas por estaquia, aos seis meses depois de plantadas. Relata-se que informações técnicas acerca da cultura ainda são escassas e por vezes conflitantes, tanto em seus aspectos produtivos e econômicos como sociais, ambientais, políticos e energéticos (SATURNINO, 2005; SATO et al., 2009; HORBACH et al., 2014).

Sabe-se que a semente tem função imprescindível no êxito da cadeia produtiva de uma cultura. Sendo assim, quando se trabalha com sementes seja como instrumento de propagação em campo ou para fins de pesquisa, a qualidade é um componente essencial, considerando que ela transporta todo o potencial genético do cultivar e é responsável pela perfeita distribuição espacial das plantas no terreno, caso o cultivo seja feito com fins de comercialização. No caso de investigações científicas, um bom genótipo de sementes garante e possibilita a obtenção de melhores resultados, ao passo que a resposta das sementes a qualquer efeito que se pretenda estudar se dá por comparação de uma condição controle que na maioria dos casos é a resposta de uma semente de qualidade.

Agronomicamente, o cultivo de *J. curcas* pode ser realizado utilizando como sistema de plantio e/ou semeadura, o plantio convencional, ou plantio consorciado. Esta espécie também tem sido usada como cercas-vivas. Nos plantios convencionais e consorciados a utilização de semeadura e plantio direto são técnicas possíveis de serem utilizadas, entretanto, utiliza-se mais comumente mudas pré-cultivadas de sementes. No plantio de cercas-vivas geralmente são utilizadas estacas, devido ao rápido crescimento vegetativo, entretanto, também são utilizadas mudas pré-cultivadas de sementes. A escolha do sistema irá depender das condições locais e dos objetivos do agricultor (SATO et al., 2009).

Em estudos experimentais, comumente utiliza-se as sementes, seja para experimentos em campo, em casa de vegetação ou em laboratório. Porém, para estes ensaios utilizam-se condições pré estabelecidas em publicações já existentes ou analisam-se as melhores condições para o genótipo em estudo. No Brasil, é comum utilizar-se inicialmente as recomendadas das “Regras para Análises de Sementes (RAS)” (BRASIL, 2009) ou até mesmo as regras da “International Seeds Testing Association” (ISTA), reconhecida internacionalmente por

estabelecer o padrão para a qualidade das sementes. Como não existem nas RAS recomendações para avaliação de sementes de *J. curcas*, apesar da espécie já ser considerada comercial segundo Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, tem-se utilizado a metodologia preconizada para sementes de *Ricinus communis* (mamona). Vale ressaltar que isso se aplica a estudos voltados para área de tecnologia de sementes. Análises experimentais que visem outra abordagem utilizam metodologias especializadas e ajustadas para o estudo (BRITO, 2010; LEAL, 2011; LOUREIRO et al., 2013).

Quando se trabalha com testes de germinação, por exemplo, um aspecto muito importante a ser definido são as condições ótimas para germinação da espécie em estudo. Para *J. curcas* esta informação ainda é muito controversa, pois diferentes autores relatam diferentes condições para a germinação ótima da espécie. Estudos afirmam que *J. curcas* é adaptável a uma ampla faixa climática, temperaturas entre 18 a 28,5°C, altitudes ao nível do mar a cerca de 1.000 metros e precipitação média de 480 a 2.380 mm (BELTRÃO e CARTAXO, 2006). Isto pode justificar a variação de resultados encontrados na literatura referente à temperatura ideal para condução de testes de germinação em laboratório.

Dos diferentes resultados encontrados temos que o teste de germinação de sementes de *J. curcas* deve ser realizado a temperatura alternada entre 25 a 30°C (MORAIS, 2008), porém existem estudos que recomendam que seja realizado sob temperatura alternada de 20 a 30°C utilizando como substrato areia ou papel (MARTINS et al., 2008).. Entretanto, condições ótimas foram registradas a 30°C quando sementes foram semeadas em substrato vermiculita, onde se obteve média total de germinação de 85% (GAIROLLA et al., 2011). Em propagação de sementes *in vitro*, após a inoculação as mesmas podem ser mantidas em sala de crescimento a 27°C (NUNES et al., 2009). Avaliou-se o efeito de diferentes temperaturas e tratamentos pré-germinativos sobre a germinação e vigor de plântulas de *J. curcas* e, foi verificado que o potencial máximo de germinação e maior vigor de plântulas foram obtidos a 25°C em sementes que não foram pré-embebidas em água quando o tegumento foi mantido (MOTA et al., 2012). Em outra investigação, foi registrada uma porcentagem de germinação final máxima a 25°C (82%), porém apesar da redução da porcentagem de germinação final, sementes incubadas a 30°C germinaram mais rápido do que em qualquer outra temperatura, incluindo a 25 °C (WINDAUER et al., 2012).

Um aspecto a ser considerado nesta análise, é que a validade dos resultados dos testes de germinação é, às vezes, questionada, pois, no laboratório, as condições são controladas, a fim de possibilitar a máxima capacidade germinativa das sementes. Portanto, a germinação no

laboratório nem sempre é igual ao desempenho no campo, onde as condições ambientais não são controladas e, às vezes, adversas ao processo de germinação e desenvolvimento do vegetal. No entanto, as discrepâncias entre os resultados do laboratório e campo podem ser reduzidas, quando as sementes apresentam alto vigor (LIMA JUNIOR, 2010).

O fornecimento de água é outro aspecto a ser considerado e constitui condição essencial para que as sementes iniciem a germinação e as plântulas se desenvolvam normalmente. No processo de germinação, a água é o fator que exerce a maior determinante influência, pois, da absorção de água resulta a reidratação dos tecidos com consequente intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que culminam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada do crescimento, por parte do eixo embrionário (NASSIF et al., 1998; LIMA JUNIOR, 2010).

Com relação ao cultivo de sementes de *J. curcas* em campo, verifica-se que sob déficit hídrico, as sementes podem germinar, porém não emergem. Isso demonstra que apesar de ser considerada uma planta de elevada resistência a períodos de estiagem, têm-se verificado que a disponibilidade de água é um fator limitante, sendo essencial na fase inicial, principalmente na emergência das plântulas. Esse comportamento foi verificado quando em laboratório simulou-se a deficiência hídrica com uso de solução de Polietileno Glicol 6000 (PEG 6000) e tanto a porcentagem, quanto a velocidade de germinação de sementes de *J. curcas* foram afetadas a partir do potencial osmótico de $-0,2$ MPa, com limite de tolerância verificado no potencial de $-0,6$ MPa (1% de germinação), demonstrando assim uma sensibilidade das sementes desta espécie ao estresse hídrico (LOUREIRO et al., 2007; ALBUQUERQUE et al., 2008; DOS SANTOS et al., 2010, PESSOA, 2011).

Para analisar as respostas de crescimento de *J. curcas* ao estresse hídrico NIU et al. (2012), em experimentos em casa de vegetação, as plantas foram irrigadas diariamente com solução nutriente diluída em água a 100%, 70%, 50%, e 30% da capacidade de campo. A irrigação com *deficit* hídrico reduziu o crescimento das plantas e desenvolvimento foliar. A massa seca de folhas e raízes foi reduzida em 70%, 50%, e 30% do uso diário de água, quando comparados com o tratamento controle.

A condição de estresse salino também interfere nos processos fisiológicos das sementes de *J. curcas*. As sementes sofrem atraso no processo germinativo, devido a condições de salinidade, com redução no crescimento das plântulas. Isto foi verificado quando sementes de *J. curcas* tanto em condições de laboratório como em campo foram submetidas a diferentes concentrações de cloreto de sódio (NERY et al., 2009; ANDRÉO-SOUZA et al., 2010).

Ao avaliar as respostas de crescimento de *J. curcas* ao estresse salino foi verificado amarelamento das bordas das folhas em todos os tratamentos onde a salinidade foi elevada. O peso secototal de plantas foi reduzido em 30%, 30% e 50%, respectivamente, quando irrigados com solução salina com condutividade elétrica de 3,0; 6,0 e 9,0 dSm⁻¹, em comparação com o controle. Constataram-se também alterações nos teores de Na⁺ e Cl⁻ (NIU et al., 2012).

Efeitos comparativos de salinidade e estresse hídrico, correlacionando as relações hídricas, a fotossíntese e o crescimento de plantas *J. curcas* foram analisados por SILVA et al., (2010). Verificaram que apesar de ambos os estresses aplicados causarem reduções significativas no teor de clorofila, a atividade fotoquímica não foi afetada. As plantas submetidas ao estresse hídrico e salino mostraram uma recuperação rápida e quase completa. Essas alterações fisiológicas podem indicar mecanismos adaptativos utilizados pela espécie para lidar com essas condições estressantes. Os panoramas apresentados demonstram que o estresse hídrico e salino podem reduzir o crescimento e o desenvolvimento de plantas *J. curcas*, pelo menos nos estádios iniciais do desenvolvimento, mas que após estabelecida no ambiente a espécie é capaz de suportar tais condições adversas.

5 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

5.1 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE SEMENTES E TORTA

Sabe-se que o óleo extraído de sementes de *J. curcas* pode ser usado para produção de biodiesel e outras finalidades industriais. Contudo, se pensarmos em uma escala comercial a produção de plantas com esta finalidade resultaria em um grande montante de resíduos, neste caso a torta, que em função de suas características e toxicidade, não pode ser largamente utilizada, e, portanto, em termos de sustentabilidade e preservação ambiental necessita de correto destino final.

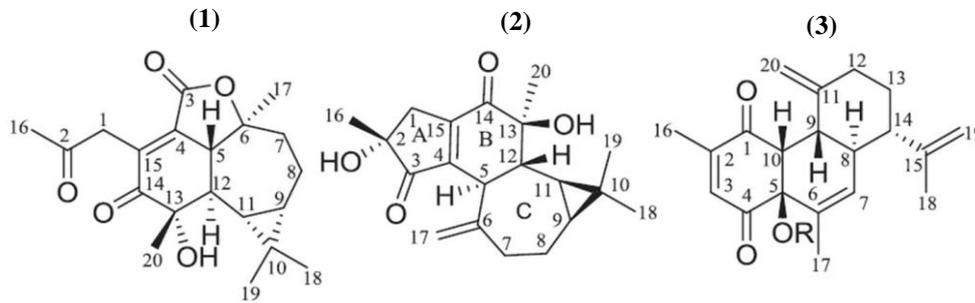
No Brasil, a principal matéria prima para a produção de óleo é a soja, responsável por mais de 70% do biodiesel produzido no país. Porém, além da *J. curcas*, culturas como crame (*Crambe abyssinica*), nabo-forrageiro (*Raphanus sativus*), despontam como potenciais alternativas interessantes para a produção de biodiesel (DE SOUZA et al., 2009). Em se tratando da *J. curcas* e outras espécies, como a mamona (*Ricinus communis*), espécie também de gran-

de potencial para biodiesel, porém bastante utilizada comercialmente e altamente concorrida pela indústria ricinoquímica, a destoxificação dessa torta é de extrema necessidade, seja para descarte do resíduo como para o aproveitamento como adubo e/ou fonte alimentar para animais.

Estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de se determinar os componentes tóxicos da *J. curcas*, assim como a descoberta de compostos que possam ser úteis para outras finalidades, como nutricionais ou medicinais. A partir desses estudos foram encontrados inibidores de proteases e outras substâncias como a saponina, lectinas, fitato e éster de forbol, todos na torta que normalmente é gerada como resíduo da extração do óleo.

A toxicidade das sementes de *J. curcas* tem sido atribuída, em parte, ao óleo que contém o composto irritante éster de forbol e, em parte, a uma proteína tóxica, a curcina. Contudo, os ésteres de forbol são os principais componentes tóxicos presentes no óleo da espécie (MAKKAR et al., 1997). Estes compostos são derivados de diterpenos tetracíclicos, restritos às famílias *Euphorbiaceae* e *Thymelaceae*. Recentemente três novos diterpenos foram descobertos, isolados a partir de extrato metanólico de raízes de *J. curcas*, são eles: Jatrophalactona, jatrofalona e jatrofadiquetona (LIU et al., 2012) (Figura 4). Menos conhecido era a curcina, a qual foi associada com a ricina e a abrina, as proteínas tóxicas de *Ricinus communis* (mamona) e *Abrus precatorius* (olho-de-cabra), respectivamente (LIN et al., 2010).

Figura 4 – Estrutura dos novos diterpenos descobertos, isolados a partir de extrato metanólico de raízes de *J. curcas*. (1) Jatrophalactona; (2) jatrophalona e (3) jatrophadiquetona.



Fonte: LIU et al., 2012.

Ainda em se tratando de caracterização físico-química e bioquímica, em investigações realizadas com frutos e sementes de *J. curcas* cultivadas na Mata Atlântica brasileira e no clima semiárido da Caatinga (POMPELLI et al., 2010). As sementes do semiárido da caatinga superaram significativamente as provenientes da Mata Atlântica em 28%, 23%, 32% e 94%, para teores de açúcares solúveis, proteínas, teor relativo de água e condutividade elétrica, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Teor de Açúcares solúveis totais, proteínas, lipídeos totais, relativo de água e condutividade elétrica de sementes de *Jatropha curcas* L. coletadas na Mata Atlântica e regiões semiáridas (Alagoas) do Brasil.

Parâmetro	Sementes de cultivar de Mata Atlântica	Sementes de cultivar do semiárido
Açúcares solúveis totais (gkg ⁻¹ MS)	13,62±0,42	17,49±0,32
Proteínas (gkg ⁻¹ MS)	50,09±2,29	61,57±3,74
Lipídeos (g kg ⁻¹ DW)	314,00±5,87	275,03±5,85
Teor relativo de água (g kg ⁻¹ FW)	154,14±1,94	203,58±7,60
Condutividade elétrica (DSM-1 g-1FW)	0,65 ±0,04	1,26±0,06

Fonte: adaptado de Pompelli et al. (2010).

Em estudo que determinou a composição bromatológica e o perfil de minerais de sementes e de tortas de *Jatropha curcas* (pinhão-mansão), *Raphanus sativus* (nabo-forrageiro) e *Crambe abyssinica* (crambe), verificou-se que a torta de sementes de *J. curcas* apresentou altos teores de proteína bruta, carboidratos e fibras alimentares, embora tenha apresentado como componente principal as fibras, com cerca de 1/3 de sua composição total e ricas em potássio, magnésio, cálcio, sódio, manganês, ferro, zinco e boro (Tabela 2). Relata-se que os teores de minerais presentes na torta de *J. curcas* é compatível com sua utilização na alimentação animal e humana, e a presença de metais pesados encontra-se em teores que não oferecem riscos para esse fim. No entanto, é evidente que para incorporação desses coprodutos

como fonte alimentar só será possível mediante a complementação dos estudos referente à toxicidade e a fatores antinutricionais presentes nas tortas (DE SOUZA et al., 2009).

Existem dados disponíveis também de estudos desenvolvidos com espécies de *J. curcas* oriundas de quatro diferentes regiões do México, onde num estudo mais amplo, além das propriedades físicas das sementes, se determinou também a composição centesimal, teores de açúcares solúveis totais e amido, aminoácidos, composição de ácidos graxos, fenóis totais, ácido fítico e saponina, e determinou-se a atividade do inibidor de tripsina e de fitohemaglutinação, como também realizou-se a extração e estimativa de esteres de forbol e digestibilidade da proteína *in vitro* (MARTINEZ-HERRERA et al., 2006).

Tabela 2 - Rendimento de extração de óleo em sementes, incremento de proteína bruta e fibra alimentar nas tortas, composição química (% da matéria seca) e composição mineral (mg 100g⁻¹) de sementes e tortas de *Jatropha curcas* L. obtidas a partir de acesso selecionado na Fazenda Paraíso, Itaum, Município de Dourados, MS. Adaptação da tabela original.

Variáveis	Sementes	Torta
Rendimento de extração de óleo em sementes (%)	74,46	****
Incremento de proteína bruta nas tortas (%)	****	36,85
Fibra alimentar nas tortas (%)	****	98,03
Composição química (% da matéria seca)		
Matéria seca	93,76	91,73
Lipídeos	40,33	14,21
Proteína bruta	20,95	28,66
Cinzas	4,95	5,94
Glicose	0,18	0,25
Sacarose	1,35	1,83
Amido	9,85	12,00
Fibra alimentar	20,45	36,68
Composição mineral Mineral (mg 100 g-1)		
Potássio (K)	487,58	526,52
Magnésio (Mg)	446,54	502,00
Cálcio (Ca)	444,07	495,78
Sódio (Na)	77,24	30,80
Ferro (Fe)	4,30	3,52
Boro (B)	4,41	5,37
Zinco (Zn)	1,69	2,18
Manganês (Mn)	1,01	1,23
Cobre (Cu)	0,68	0,86
Bário (Ba),	0,91	0,34
Alumínio (Al)	0,49	0,40
Níquel (Ni)	0,24	0,03
Mercúrio (Hg)	0,0004	0,0010

Fonte: De Souza et al. (2009).

Nas últimas duas décadas pesquisadores do grupo do Instituto de Produção Animal nos trópicos e subtropicais da Universidade de Hohenheim, na Alemanha, vêm desenvolvendo juntamente com seus colaboradores vários estudos, com *J. curcas*, sendo o foco das análises voltado para a descrição da composição química, caracterização de compostos tóxicos, fatores

anti-nutricionais, investigando assim, a possibilidade de utilização da torta de espécimes não tóxicas na alimentação animal e humana, assim como estudos de propagação desses espécimes (MAKKAR et al., 1997; MAKKAR e BECKER, 1997; MAKKAR et al., 1998; SUJATHA et al., 2005).

Uma investigação recente que teve por objetivo detoxificar a torta oriunda de sementes de *J. curcas* e estudar as toxinas, os fatores anti-nutricionais e propriedades funcionais da proteína isolada da torta detoxificada (SAETA E SUNTORNSUK, 2010). De acordo com os achados, o teor de proteína da torta bruta e da torta detoxificada foi semelhante, sugerindo que o método de extração utilizado (etanol) não afetou a concentração de proteínas. Entretanto, as concentrações dos outros constituintes foram bastante diferentes. A porcentagem de proteínas isoladas de proteína (89,0%) da torta bruta foi cerca de quatro vezes maior do que o da torta de semente detoxificada (23,0%). Após detoxificação da torta o éster de forbole e a lectina não foram detectados. A concentração de ácido fítico, os inibidores de tripsina e a saponina na torta detoxificada também foram muito menores que às encontradas na torta bruta. Os autores sugeriram com isso que a extração com etanol pode ser um método eficaz para remoção completa dos ésteres de forbol e lectina e remoção parcial do ácido fítico, do inibidor de tripsina e da saponina, normalmente presentes na torta das sementes. O ácido fítico detectado no isolado de proteína da torta bruta foi muito mais baixo do que o da torta detoxificada, possivelmente devido ao processo de isolamento das proteínas (Tabela 3).

Tabela 3³ - Composição química, compostos tóxicos, fatores anti-nutricionais e proteína isolada da torta detoxificada de sementes de *Jatropha curcas* L. (na base de massa seca – w/w).

Composição	Torta ¹	Torta Detoxificada ¹	Proteína Isolada da torta detoxificada ¹
Gordura bruta(% , w/w)	14.8 ± 0.5	8.6 ± 1.6	7.1 ± 0.4
Fibra bruta (% , w/w)	11.0 ± 1.7	8.2 ± 0.3	0.7 ± 0.1
Cinzas brutas (% , w/w)	7.8 ± 0.1	6.4 ± 0.2	1.8 ± 0.1
Proteína bruta (% , w/w)	23.5 ± 1.5	23.0 ± 1.0	89.0 ± 1.8
Carboidratos disponíveis (% , w/w)	42.9	53.8	1.4
Ésteres de forbol (mg/g de amostra seca) ^a	0.73 ± 0.06	ND ²	ND ²
Ácido fítico (% , w/w)	8.55 ± 0.51	1.87 ± 0.11	0.03 ± 0.00
Inibidor de tripsina (TIU ^b /g de amostra seca)	7.42 ± 1.64	1.12 ± 0.09	8.36 ± 0.03
Atividade de lectina (HU ^c /mg de proteína)	13.15 ± 0.45	ND ²	ND ²
Saponina ^d (µg / g de amostra seca)	27.82 ± 0.68	10.04 ± 0.60	2.04 ± 0.01

Fonte: adaptação de Saeta e Suntornsuk (2010).

3-acetato; ^b Unidades Inibidora de Tripsina; ^c Unidades Hemaglutinante; ^d equivalentes Diosgenin

Concluiu-se neste estudo que a torta de sementes pinhão-mansão detoxificada tem potencial para ser explorada como uma nova fonte de proteína funcional para aplicações alimentares. Porém sugeriram que estudos e testes com animais devem ser investigados para confirmar a segurança da proteína isolada da torta de pinhão detoxificada antes de suas aplicações em alimentos (SAETAE e SUNTORNSUK, 2010).

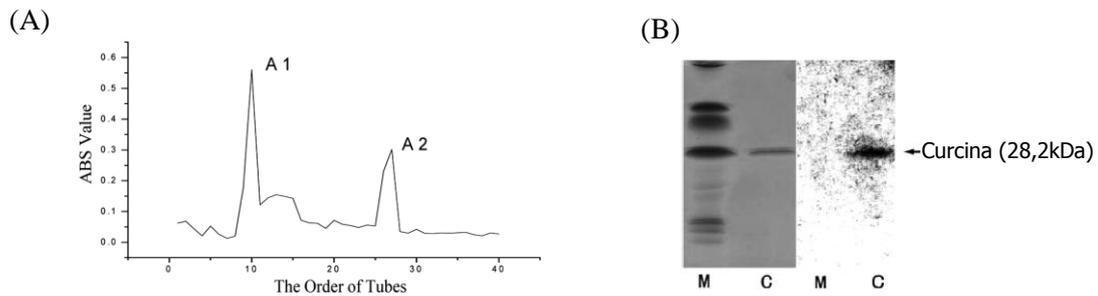
Em outro estudo interessante se investigou as propriedades funcionais das proteínas isoladas da torta de semente de *J. curcas*. O isolamento da proteína foi realizado por extração alcalina seguida por uma precipitação isoelétrica, teve propriedades funcionais únicas na capacidade de ligação à água, a atividade de emulsão, e a estabilidade da emulsão, indicando assim um papel importante em sistemas alimentares. Assim, sugeriu-se a possibilidade de aplicação do produto como molho de salada, maionese, salsicha e produtos à base de carne. A pesquisa demonstrou que a torta das sementes de *J. curcas* tem um potencial a ser explorado como uma nova fonte de proteína funcional para aplicações na alimentação humana ou animal. Outras informações e dados referentes aos estudos das propriedades funcionais de proteínas isoladas a partir de tortas de sementes de *J. curcas* livre de éster de forbol também podem ser encontradas na publicação original (SAETAE e SUNTORNSUK, 2012).

A toxina "curcina" é considerada uma RIPs (Proteína de Inativação de Ribossomos) do tipo I, uma proteína de cadeia simples; com massa molecular de 28,1 kDa, com rendimento de 1,4 mg=100g. A descrição da purificação da curcina e o estudo da sua composição química preliminar foram realizados com sementes de *J. curcas* oriundas da cidade de Panzihua, na China, onde se descreveu a curcina como uma proteína básica principal que constitui cerca de 20% do total de proteínas solúveis extraídas (BARBIERI, 1993). Estudos mais recentes determinaram que o peso molecular da curcina é 28,2 kDa (Figura 4B) e o PI de 8.54 (LIN et al., 2010). A curcina purificada apresentou 251 aminoácidos com a seguinte composição: Asx31, Thr15, Ser16, Glx22, Pro9, Gly15, Ala22, Val26, Met2, Ile14, Leu24, Tyr14, Phe12, Lys18, His2, Arg7, Cys1 e Trp1. A sequência de aminoácidos N-terminal da curcina purificada pelos pesquisadores foi determinada como A-G/Y-S/K-T/A-P/D-T-L-T-I-T-Y-D-A-T/A-A-D-K-K-N-Y-A-Q-F-I-K-D-L-R-E-A-F/A-G (aminoácidos de 1 a 32)

Géis de SDS-poliacrilamida da proteína isolada, corados com azul brilhante de Coomassie R-250 e reagente de Schiff, respectivamente permitiram identificar a curcina, que foi corada com o reagente de Schiff. O marcador não pôde ser corado quando o gel foi revelado com o reagente de Schiff, concluindo-se assim que a curcina é uma glicoproteína. Os teores de açúcar total de glicoproteínas foram 4,91%, quando quantificados utilizando o método

colorimétrico com ácido sulfúrico-fenol e empregando a manose como um padrão (Figura 5) (LINet al., 2010).

Figura 5 - Perfil cromatográfico e eletroforético da curcina extraída das sementes de *Jatropha curcas* L. (A) Cromatografiado extrato bruto. A fração correspondente ao pico II foi isolada, liofilizada, e analisada por SDS-PAGE. (B) Gel da Curcina. Proteína corada com Coomassie (esquerda) e proteínacorada com reagente de Schiff (direita), (M: marcador de proteína; C: curcina).



Fonte: Lin et al. (2010).

5.2 IMPORTÂNCIA DO ÓLEO E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As sementes de *J. curcas* não são apenas uma fonte de matéria prima para produção de biodiesel. No passado, o óleo foi utilizado em lâmpadas de iluminação, sendo também extraído para a produção de sabão, no entanto com o desenvolvimento de detergentes sintéticos mais baratos a produção diminuiu. Hoje, existem comunidades rurais que continuam a usá-lo por seu valor medicinal e para produção local de sabão. Índia e países da África usam muito *J. curcas* como cerca viva para criação de gado. Em Madagascar e Uganda é plantada para fornecer suporte físico para as plantas de baunilha. Porém, seu potencial como um substituto do combustível de petróleo tem sido reconhecido, pois ele foi usado durante a Segunda Guerra Mundial como substituto do diesel em Madagascar, Benine Cabo Verde, enquanto o seu coproduto, a glicerina, foi valiosa para a fabricação de nitroglicerina. O óleo de *J. curcas* possui ainda atividade lipásica, a qual pode catalizar reações de transesterificação para a preparação de biodiesel. (GÜBITZ et al., 1999; BRITTAINE e LUTALADIO, 2010; FROHLICH et al., 2010).

A semente de *J. curcas* apresenta em torno de 50 a 60% de teor de óleo, mais do que outras oleaginosas não comestíveis a exemplo da *Madhuca indica* (Mahua), *Pongamia pinnata* (Pongamia), *Ricinus communis* (mamona), *Linum usitatissimum* (Linhaça), que apresentam em torno de 35-40, 30-40, 45-50 e 35-45%, respectivamente (KOH e MOHD GHAZI, 2011). Entretanto, esta composição pode variar de cultivar para cultivar, assim como com o método de extração utilizado. No Brasil ao se quantificar o teor de lipídeos totais de sementes de *J.*

curcas, procedente do município de Alagoinhas (BA), em diferentes estádios de maturação, verificaram um aumento de 14% no teor de lipídios totais durante a maturação, sendo as maiores porcentagem encontradas nas sementes de coloração marrom-amarelo (26.00%) e secos (23.28%) (PESSOA et al., 2012; SOUZA-JUNIOR et al., 2013).

Em termos de composição e características do óleo de *J. curcas*, uma publicação, onde 15 dos artigos utilizados para a revisão apresentavam alguma informação em termos de composição e caracterização do óleo, possibilitou uma visão geral da qualidade do óleo para produção de biodiesel. Os autores interpretaram estatisticamente os achados e disponibilizaram uma planilha com o resultado das análises (Tabela 4) (ACHTEN et al., 2008).

Tabela 4⁴ - Composição de óleo e características de sementes de *Jatropha curcas* L.

Parâmetros quantificados	Variação	Média
Densidade (g cm ⁻³)	0,860–0,933	0,914
valor calórico (MJkg ⁻¹)	37,83–42,05	39,63
Ponto de inflamação (°C)	210–240	235
Valor de cetano	38,0–51,0	46,3
Número saponificação (mg g ⁻¹)	102,9 – 209,80	182,8
Viscosidade a 30 °C (cSt)	37,00 – 54,80	46,82
Ácidos graxos livres % (Kg Kg ⁻¹ * 100)	0,18 – 3,40	2,18
Insaponificáveis % (Kg Kg ⁻¹ * 100)	0,79 – 3,80	2,03
Índice de iodo (mg iodine g ⁻¹)	92 - 112	101
Índice de acidez (mg KOH g ⁻¹)	0,92 – 6,16	3,71
Monoglicéridos % (Kg Kg ⁻¹ * 100)	SD – 1,7	***
Diglicéridos % (Kg Kg ⁻¹ * 100)	2,50 – 2,70	***
Triglicéridos % (Kg Kg ⁻¹ * 100)	88.20 – 97,30	***
Resíduo de carbono % (Kg Kg ⁻¹ * 100)	0,07 – 0,64	0,38
Teor de enxofre % (Kg Kg ⁻¹ * 100)	0 – 0,13	***

Fonte: adaptação de Achten et al. (2008)

6 ETNOFARMACOLOGIA E EFEITOS BIOLÓGICOS DA ESPÉCIE

O látex de *J. curcas* possui tanto atividade pró-coagulante, como anticoagulante. As raízes são consideradas diuréticas, anti-inflamatórias e antileucêmicas, e as folhas são utilizadas para combater doenças de pele. São eficazes também contra o reumatismo e possuem poder anti-sifilítico (SALAS et al., 1994; OSONIYI e ONAJOB, 2003; SHETTY et al., 2006).

⁴ Desvio padrão e número de observações estão disponíveis na tabela original (ver publicação).

*** Dados não constam na tabela original; SD – sem dados.

Atividade molusquicida e larvicida dos diferentes extratos de *J. curcas* frente à *Schistosoma mansoni* e *S. haematobium* também foi verificada. Extratos de *J. curcas* possuem efeito abortivo. A atividade antiinflamatória do extrato metanólico das raízes na prevenção do edema de pata induzido por carragenina também foi testada e comprovada. Uma enzima proteolítica extraída do látex apresentou atividade cicatrizante em feridas de ratos. (FROHLICH et al., 2010).

As sementes são utilizadas como purgativo, verificando-se casos de intoxicação em crianças e adultos quando ingerida em excesso, o que pode ser perigoso e até fatal. Atribui-se as propriedades tóxicas do pinhão a globulina, curcina, e também ao ácido jatrópico de toxicidade igual ou superior a ricinina. A ingestão de uma única semente fresca pode causar vômito e diarreia (PEIXOTO, 1973; NUNES, 2007).

Tem sido investigada uma possível atividade antitumoral em função da presença da curcina, onde já se evidenciou a atividade antimetastática desta em doses não citotóxicas para o controle de neoplasias. O efeito antitumoral da curcina foi sugerido num estudo como um mecanismo relacionado com a atividade da N-glicosidase. Pesquisadores isolaram o látex de *J. curcas*, um composto também com atividade antitumoral (curcaciclina A). Esta atividade foi investigada e comprovada em extratos etanólicos secos de raiz, caule e folhas testados sobre células tumorais da linhagem HEPG-2. Os mesmos extratos não foram citotóxicos quando avaliados em macrófagos peritoneais (LIN et al., 2002, 2003; MUANGMAN et al., 2005; LUO et al., 2006; FROHLICH et al., 2010; ROCHA; 2013).

A citotoxicidade dos novos triterpenos descoberto em *J. curcas* (jatrophalactona, jatrophalona e jatrophadiquitona) também foi testada contra linhagens celulares selecionadas. Entre eles, a jatrophalactona exibiu citotoxicidade contra HL-60, SMMC-7721, A-549, MCF-7, e as linhagens de células SW480 com valores de IC₅₀ de 8,5; 20,6; 19,7; 20,1 e 19,2 μM, respectivamente. As possíveis vias biossintéticas para jatrophalactona, e jatrophadiquitona são propostas na publicação (LIU et al., 2012).

J. curcas também é utilizada como hipoglicemiante. Estudos relacionados com esta funcionalidade da planta relataram que o extrato alcoólico desta espécie vegetal pode ativar o PPAR (*peroxisome proliferator activated receptors*) que possuem importante função na homeostasia da glicose e do lipídeo, o que permite relacionar uma possível função no tratamento da diabetes e da dislipidemia (RAU et al., 2006).

Na China, exploraram-se os métodos de purificação da curcina extraída de sementes de *J. curcas* de Xiamen e analisou a atividade antifúngica (HUANG et al., 1991), assim como ao isolar a curcinadas sementes de *J. curcas* de Sichuan, revelou-se que ela teve atividade de

RNA N-glicosidas e quando rRNAs de fígado de rato foram tratados simultaneamente com curcina e anilina (LIN, 2002). Outros estudos mostraram que a curcina exibiu várias atividades farmacológicas e biológicas, tais como atividade pesticida, antifúngica e antioxidante (WEI et al., 2004; LIANG et al., 2005; EL DIWANI et al., 2009; GALLEGOS-TINTORE et al., 2011; ROCHA, 2013;).

7 MARCADORES MOLECULARES EM *Jatropha curcas*

A *J. curcas* tem sido muito mais estudada por suas propriedades químicas e seus empregos medicinais e biocidas, do que agronomicamente (SATURNINO et al., 2005). No contexto molecular, como citado anteriormente, estudos com marcadores isoenzimáticos e de RAPD, por exemplo, podem auxiliar em programas de melhoramento genético. O conhecimento da variabilidade genética de diferentes acessos de *J. curcas*, procedentes de diferentes locais, é a base para a seleção de materiais mais produtivos em quantidade e qualidade de óleo, que apresentem resistência a pragas e doenças e possam ser utilizados em estudos de melhoramento genético para a espécie (ABREU et al., 2009).

Alguns estudos sobre a variabilidade genética já têm sido desenvolvidos, porém ainda necessitam ser ampliados. Na Índia, avaliaram o desenvolvimento de mudas em sementeira (três meses) e plantas no campo (dois anos), oriundas de sementes coletadas em dez locais representativos da região central da Índia, onde foram verificadas variações no conteúdo de óleo das sementes, a depender da procedência (GINWAL et al., 2004). Na Tailândia, sementes procedentes de dez províncias diferentes, apresentaram diferenças altamente significativas para o número médio de folhas de quatro diferentes acessos e para altura de planta em um acesso de pinhão-manso (RATREE, 2004). No Brasil estudo desse tipo utilizando diferentes genótipos, provenientes de diferentes localidades do país também já vem sendo desenvolvidos (ABREU et al., 2009; SANTOS, 2011; PESSOA, 2011; PAZETO, 2013).

Pesquisa desenvolvida no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da USP, em Piracicaba, caracterizou a variabilidade genética de acessos de *J. curcas* depositados no Banco de Germoplasma da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) utilizando marcadores genéticos (microsatélites). Durante este estudo foram coletadas plantas de *J. curcas* em todas as regiões do Brasil e em alguns países como Colômbia, México, China, entre outros (BRESSAN et al., 2012; 2013).

Variedades tóxicas e não-tóxicas foram caracterizadas ao nível molecular e foram desenvolvidos marcadores moleculares baseado em PCR para distinguir variedades não-tóxicas de tóxicas ou vice-versa. Os marcadores polimórficos foram identificados utilizando-se as técnicas de RAPD e AFLP. Um total de 371 marcadores RAPD e 1.442 AFLP foram analisados. Foram encontrados para cada uma das variedades 56 (15,09%) marcadores RAPD, 238 AFLP (16,49%) específicos. A similaridade genética entre variedades não-tóxicas e tóxicas foi de 0,92 por RAPD e 0,90 por AFLP (SUDHEER PAMIDIMARRI et al., 2009).

O tamanho do genoma de *J. curcas* é relativamente pequeno (C=416 Mb) (CARVALHO et al., 2008) e dentro do contexto molecular um dos estudos que vem sendo bem desenvolvidos são os relacionados com a expressão de genes. Com o advento das coleções de Etiquetas de Sequências Expressas (ESTs - Expressed Sequence Tags), os estudos de expressão gênica tornaram-se muito importantes na prospecção de genes que atuam diretamente na proteção contra o estresse, transdução de sinal e regulação da expressão gênica (SEKI et al., 2002). Nesse contexto, alguns estudos de análise transcriptoma utilizando etiquetas de sequência expressas (EST) têm sido desenvolvidos com *J. curcas* (CARVALHO et al., 2008; YANG et al., 2009; XU et al., 2011; KING et al., 2011; CHEN et al., 2011; JIANG et al., 2012; GU et al., 2012; ESWARAN et al., 2012).

É possível encontrar estudos que investigam o aspecto molecular durante o desenvolvimento de sementes de *J. curcas*, porém muitos deles estão relacionados com os genes que estão envolvidos com ácidos graxos e sua vias biossintéticas (GOMES et al., 2010; CHEN et al., 2011) ou acúmulo de reservas nas sementes (JIANG et al., 2012). XU et al., 2011) investigaram perfis de expressão temporal de 21 genes de lipídeos no desenvolvimento de sementes de *J. curcas* e descobriram que 17 genes exibiram expressão elevada. Um estudo recente identificou 7009 unigenes a partir de uma biblioteca de cDNA normalizada de sementes *J. curcas* em diferentes estádios de desenvolvimento, dos quais, 17 genes que codificam as enzimas para a biossíntese de ácidos graxos e lipídios e que foram ainda caracterizados por qRT-PCR (GU et al., 2012).

Buscando-se hoje nos diferentes bancos de dados disponíveis on line referências sobre “*Jatropha curcas*” já é possível encontrar vários estudos com a espécie. Nos bancos de dados do National Center for Biotechnology Information - NCBI (Estados Unidos, National Library of Medicine) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), por exemplo, ao pesquisar por “*Jatropha curcas*” é possível encontrar mais de 165 mil ocorrências para a espécie. Destes, mais de 80.000 está relacionado com a categoria “genoma”, quase 41.000 a “genes” e mais de 33.000 relacio-

nadas na categoria “proteínas”. Isso pode ser interpretado como o interesse da comunidade científica em torno das potencialidades da espécie e suas aplicações biotecnológicas.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos fisiológicos ainda necessitam ser melhor elucidado os quais podem ser agregadas informações bioquímicas e moleculares que sempre possibilitam uma explicação mais consistente sobre o comportamento da planta.

Estudos de armazenamento de sementes, ainda necessitam ser continuados para que se possa estabelecer um consenso das melhores condições levando em consideração parâmetros para a manutenção da viabilidade das sementes em longo prazo, pois estas informações serão bastante úteis programas que visam a produção da cultura.

A procura por substâncias farmacologicamente ativas tem aumentado consideravelmente em *J.curcas*. Atualmente diversos grupos de pesquisa se dedicam ao estudo da atividade biológica de uma determinada classe de princípios ativos, utilizando a estratégia de modificação molecular para compreender seu mecanismo de ação, de maneira a permitir o desenvolvimento de medicamentos sintéticos mais seguros.

A continuidade de estudos bioquímicos e moleculares como, por exemplo, a investigação do estresse oxidativo, a expressão de enzimas antioxidantes sob efeito de agentes abióticos induzidos, assim como de genes responsivos a estresse podem ser muito uteis para a compreensão do mecanismo de ajuste desta espécie a condições adversas. Além do mais a investigação da expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo de determinados fatores abióticos induzidos são essenciais para compreender os fatores genéticos que regulam a biossíntese deles, assim como, fornecer informações relevantes que possam ser úteis na elaboração de futuros projetos com foco em programas de melhoramento genético da espécie, assim como estudos que visem sua aplicação biotecnológica.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de pinhão-manso na fase juvenil. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 21, p. 36-40, 2009.
- ACHTEN WMJ, et al. *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and Bioenergy**, [S.l.],n.32, p.1063–84, 2008.
- ALBUQUERQUE, F.A. de. et al.. **Crescimento e Desenvolvimento do pinhão-manso: 1º ano agrícola**, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 21 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 197).
- ANDRÉO-SOUZA, Y. A. R. A. et al. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n.2, p. 83-92, 2010.
- ARRUDA, F. P. et al. 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.
- BARROSO, G.M. et al. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universitária UFV, v.3, p.237-258, 1991.
- BASKIN, C. S.; BASKIN, J.M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. Academic Press: London, 1998.
- BELTRÃO, N. E. M. de: 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. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha - MG, **Anais...** Varginha, 2006.
- BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: Physiology of development and germination**. 2.ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.
- BITTNER, M. et al.. Estudio químico de especies de la familia Euphorbiaceae em Chile.**Bol. Soc. Chil. Quim**, Concepción, v. 46, n. 4, p. 1-15, dez. 2001.
- BRASIL, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Secretaria Nacional de defesa Agropecuária. **Regras para análise de sementes**. Brasília, 2009. 365 p.
- BRASILEIRO, Beatriz Gonçalves et al. Floral biology and characterization of seed germination in physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 34, n. 4, p. 556-560, 2012.
- BRESSAN, E.A. et al. Development of microsatellite primers for *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) and transferability to congeners. **American Journal of Botany**, [S.l.], p. e237-e239, 2012.

_____. A. *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae) exhibits a mixed mating system, high correlated mating and apomixis. **Tree Genetics & Genomes** (Print), [S.l.], v. 10, p. 1-9, 2013.

BRESSAN, Eduardo de Andrade. **Variabilidade genética e estimativa da taxa de cruzamento do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) empregando marcadores moleculares**. 2011, 210f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tese de Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

BRITTAINE, R.; LUTALADIO, N. *Jatropha*: A Smallholder Bioenergy Crop – The Potential for Pro-Poor Development. **Integrated Crop Management**. Rome, FAO, v.8, 2010.

CAB INTERNATIONAL. **Compêndio de Espécies Invasoras do CAB International**. 2013. Disponível em: <<http://www.cabi.org/isc/datasheet/28393>>. Acesso em: 10 de set. 2014.

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

CARVALHO C. R. et al. Genome size, base composition and karyotype of *Jatropha curcas* L., an important biofuel plant. **Plant Science**, [S.l.],n.174,p.613-617, 2008.

CHEN, M. S. et al. Analysis of expressed sequence tags from biodiesel plant *Jatropha curcas* embryos at different developmental stages. **Plant Science**. [S.l.], n.181, p.696–700, 2011.

DA ROCHA, Geisenilma Maria Gonçalves et al. Caracterização molecular de genótipos de pinhão-mansão utilizando RAPD. In: Embrapa Algodão-Artigo em anais de congresso (ALICE). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. Inclusão social e energia: **anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

DEBNATH, M; BISEN, P. S. *Jatropha curcas* L., a multipurpose stress resistant plant with a potential for ethnomedicine and renewable energy. **Curr Pharm Biotechnol**. [S.l.], v.9, n.4, p.288-306, aug. 2008.

DE SOUZA, Anderson Dias Vieira et al. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansão, nabo-forrageiro e crambe. **Pesq. Agropec. Bras.,** Brasília, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

DOVEBIOTECH, ***Jatropha curcas* L.: an international botanical answer to biodiesel production and renewable energy**. In Total Renewable, Sustainable Solutions to the Global Energy and Water Needs. 2005. Disponível em: <http://www.globalbioenergy.org/uploads/media/05_Dovebiotech_-Jatropha_Curcas_L.pdf>. Acesso em: 14 de setembro de 2014.

DOS SANTOS, Claudiana Moura et al. Fenologia e crescimento do pinhão-mansão cultivado na zona da mata do Estado de Alagoas, Brasil. **Scientia Agraria**, v. 11, n. 3, p. 201-209, 2010.

EL DIWANI, G.; EL RAFIE, Sh.; HAWASH, S. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of nodes leaves stem and root of Egyptian *Jatropha curcas*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. [S.l.], v. 3, n.11, p.521-530, 2009.

- ESWARAN, N. et al. Generation of an expressed sequence tag (EST) library from salt-stressed roots of *Jatropha curcas* for identification of abiotic stress-responsive genes. **Plant Biology**, [S.l.], v. 14, n. 3, p. 428-437, 2012.
- FROHLICH, K. A. et al. Composto Isolado de *Jatropha isabelli* (Muellarg.) com atividades gastroprotetora. **Saúde**, Santa Maria, v.36, n.2, p.19-28, jul./dez. 2010.
- GAIROLA, K. C.; NAUTIYAL, A. R. E; DWIVEDI, A. K. Effect of Temperatures and Germination Media on Seed Germination of *Jatropha curcas* Linn. **Advances in Bioresearch**.v.2, issue 2, dec. 2011.
- GALLEGOS-TINTORÉ, S. et al. Santiago et al.. Antioxidant and chelating activity of *Jatropha curcas* L. protein hydrolysates. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, [S.l.], v. 91, n. 9, p. 1618-1624, 2011.
- GINWAL, H. S.; RAWAT, P. S.; SRVASTAVA, R. L. Seed source variation in growth performance and oil yield of *Jatropha curcas* Linn. in Central India. **Silvae Genetica**, Frankfurt, v. 53, n. 4, p.186-191, 2004.
- GOIS, I. B. et al. Descritores morfológicos de acessos de *Jatropha curcas* L. do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal de Sergipe. In: Congresso Brasileiro de plantas oleaginosas, óleos, gorduras e biodiesel, 5., 2008, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2008.
- GOLDFARB, M.; DUARTE, M.E.M.; MATA, M.E.R.M.C. Armazenamento criogênico de sementes de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) Euphorbiaceae. **Biotemas**, [S.l.], v.23, p.27-33, 2010.
- GOMES K.A. et al. ESTs from Seeds to Assist the Selective Breeding of *Jatropha curcas* L. for Oil and Active Compounds. **Genome Insights**, [S.l.], 3, 29–56, 2010.
- GU, K. et al. Expression of fatty acid and lipid biosynthetic genes in developing endosperm of *Jatropha curcas*. **Biotechnology for Biofuels**, [S.l.], v.5, n.47, 2012.
- GUBITZ, G.M.; MITTELBAACH, M.; TRABI, M. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, [S.l.], v.67; p.73–82, 1999.
- GUZMAN, L.E.P; AQUINO, A.L. Seed characteristics and storage behavior of physic nut (*Jatropha curcas* L.). **Philippine Journal of Crop Science**.(PJCS),[S.l.],v.34, n.1, p.13-21, 2009.
- HELLER, J. Physic nut (*Jatropha curcas* L.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. Roma: **International Plant Genetic Resources Institute - IBPGR**, [S.l.], 1996, 66p.
- HENNING, R.K. "The *Jatropha* System" – Economy & Dissemination Strategy. In: The *Jatropha* System at The International Conference, 2004. Bonn, Germany. Disponível em: <<http://www.betuco.be/agroforestry/Jatropha-economy-and-dissemination-strategy.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2014.
- HORBACH, Micheli Angélica et al. Propagation methods for physic nut (*Jatropha curcas*). **Advances in Forestry Science**, v. 1, n. 1, p. 53-57, 2014

- HUANG, D.R.; et al. Isolation and some characterization of a toxic protein from *Jatropha curcas*. **Prog.Biochem.Biophys.**[S.l.], v.18, p.149–151, 1991.
- JIANG, H. et al. Global Analysis of Gene Expression Profiles in Developing Physic Nut (*Jatropha curcas* L.)Seeds.**PLoS ONE**, [S.l.], v.7, n.5, 2012.
- JOKER, D.; JEPSEN, J. *Jatropha curcas* L. **Seed Leaflet**.Humbleback,n.83, p. 1-2, Aug. 2003.
- JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 12. ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998.
- JUDD, W. S. et al. **Sistemática vegetal**: um enfoque filogenético. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 355-359.
- KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 452, 2004
- KING, Andrew J.; LI, Yi; GRAHAM, Ian A. Profiling the developing *Jatropha curcas* L. seed transcriptome by pyrosequencing. **BioEnergy Research**, v. 4, n. 3, p. 211-221, 2011.
- KOH, M.Y.; MOHD GHAZI, Tinia Idaty. A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [S.l.], v. 15, n. 5, p. 2240-2251, 2011.
- LABOURIAU, L. G. **A germinação da semente**. Washington: OEA, 1983. 173 p.
- LIANG, Q. et al. Study on extracting the poisonous protein from the seed of *Jatropha*. **Chem. Res. Applic.** [S.l.], v.17, p.737–740, 2005.
- LIMA JUNIOR, M.J.V. **Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais**. Manaus: UFAM, 2010.
- LIN, J. et al. Anti-tumor effects of curcin from seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Pharmacol. Sin.** [S.l.], v.24, p.241–246, 2003.
- _____. F. Isolation, purification and functional investigation on the N-glycosidase activity of curcin from the seeds of *Jatropha curcas*. **High Techn.Lett.**[S.l.], v.12, p.36–40, 2002.
- _____. Purification and characterization of curcin, a toxic lectin from the seed of *Jatropha curcas*. **Preparative biochemistry & biotechnology**, [s.l.], v. 40, n. 2, p. 107-118, 2010.
- LIU, J.-Q et al. Three new diterpenes from *Jatropha curcas*. **Tetrahedron**. [S.l.], v.68, n.4, 2012.
- LOUREIRO M. B. et al. Caracterização Morfoanatomica e Fisiológica de sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v.37, n.6, p.1093-1101, 2013.
- _____. Efeito do Estresse Hídrico Sobre a Germinação de Sementes Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.). In: Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2., 2007. [S.l.]. **anais...**[S.l.], 2007.

LUCENA, Amanda Micheline Amador et al.. Características morfológicas de peças reprodutivas de acessos de *Jatropha curcas* L. **Scientia Plena**, v. 10, n. 4, 2014.

LUO, M.J. et al. Expression, purification and anti-tumor activity of curcuma, **Acta Biochim. Biophys. Sin. Shanghai**, v.38, n.9, p.663-8, 2006.

MAKKAR, H.P.S.; ADERIBIGBE A. O; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability, and toxic factors. **Food Chem.** [S.l.], v.62, p.207–215, 1998.

MAKKAR, H. P. S, et al. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **J. Agr. Food Chem.** [S.l.], v.45, p.3152–3157. 1997a.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER K. Potential of *Jatropha curcas* cake as a protein supplement in livestock feed, constraints to its utilization and possible strategies to overcome constraints. p. 190–205. In: *Biofuels and Industrial Products from Jatropha curcas*. Guebitz GM, Mittelbach M, Trabi M (eds). Dbv-Verlag für die Technische Universität Graz, Graz, Germany (1997).

MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. **J.Sci. Food Agric.**[S.l.], v.88, p.1542–1548, 2008.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: Fealq, 2005. 495p.

_____. Teste de envelhecimento acelerado. In: KRZYŻANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA-NETO, J.B. **Vigor de sementes: conceitos e testes**. Londrina: Abrates, 1999.

MARGONAR, M.A.S.; KARSBURG, I.V.; BONA, D.A.O. Identificação da região organizadora nucleolar de *Jatropha curcas* L. **Estudos**, Goiânia, v. 339, n. 2, p. 165-173, 2012.

MARTINEZ-HERRERA, J. et al. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food Chemistry**, [S.l.], v.96, p.80-89, 2006.

MARTINS, C.C.; MACHADO, G.M.; CAVASINI, R. Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de pinhão-mansão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.863-868, 2008.

MORAIS, Ellen Bárbara Santos Domingues. **Padronização do teste de germinação e qualidade de sementes de Pinhão-Mansão (*Jatropha curcas* L.) durante o armazenamento**. 2008, 103f. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal no Semi-árido). Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes. Janúba, MG: Unimontes, 2008.

MOTA, L.H.S. et al. Efeito da temperatura e tratamentos pré-germinativos na germinação e vigor de plântulas de *Jatropha curcas* L. **Biotemas**, Florianópolis, v.25, n.3, p.29-37, 2012.

MUANGMAN, S.; THIPPORNWONG, M.; TOHTONG, R. Anti-metastatic effects of curcusone B, a diterpene from *Jatropha curcas*. **In Vivo**. Bethesda, v.9, p.265–268, 2005.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNADES, G. D. Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes. **Informativo Sementes IPEF**. Abril 1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>> acesso em: 27 mar. 2007.

NERY, Aparecida R. et al. Crescimento do pinhão-manso irrigado com águas salinas em ambiente protegido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 5, p. 551-558, 2009.

NIU, G. et al. Responses of *Jatropha curcas* to Salt and Drought Stresses. **International Journal of Agronomy**, [S.l.], 2012.

NUCCI, Stella Maris. **Diversidade genética em germoplasma de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) identificada por marcadores SSR e ISSR**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

NUNES, C. F. **Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2001, 78f. Trabalho de conclusão de Curso (Dissertação - Mestrado em fitotecnia). Universidade Federal de Lavras. Lavras, MG, 2007.

NUNES, C.F.et al..Morfologia externa de frutos, sementes e plântulas de pinhão-manso. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Curitiba, v. 44, n. 2, p.207-210, 2009.

OSONIYI, O; ONAJOBI, F. Coagulant and anticoagulant activities in *Jatropha curcas* latex, **J. Ethnopharmacol**, [S.l.], v.89, n.1, p.101-5, 2003.

PAZETO, Mariana Silva Rosa. **Estudo da diversidade genética em acessos de *Jatropha* spp. por meio de caracteres morfológicos e marcadores moleculares ISSR**. 2013. ix, 63 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, 2013.

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

PEREIRA, M.D. et al. Physiological quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds during storage. **Journal of Seed Science**, [S.l.],v.35, n.1, p.21-27, 2013.

PESSOA, Angela Maria dos Santos. **Fenologia e caracterização morfológica floral, molecular e agrônômica de acessos de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas)-Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão.

PESSOA, Ângela Maria Santos et al.. Influência da maturação de frutos na germinação, vigor e teor de óleo de sementes de *Jatropha curcas* L. **Scientia Plena**, v. 8, n. 7, 2012.

PESSOA; A. M. S. et al. Morphological floral characterization in accessions of *Jatropha curcas* L. **Scientia Plena**, v. 8, n. 3, 2012.

POMPELLI, M.F. et al. Environmental influence on the physico-chemical and physiological properties of *Jatropha curcas* L. seeds. **Australian Journal of Botany**, [S.l.], v.58, p.421–427, 2010.

RATREE, S. A Preliminary Study on Physic Nut (*Jatropha curcas*L.) in Thailand. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [S.l.],v. 7, n. 9, p. 1620-1623,2004.

RAU, O. et al..Screening of herbal extracts for activation of the human peroxisome proliferator-activated receptor, **Pharmazie**, [S.l.], v.61, n.11, p.952-6, 2006.

REDONDO, Mariana Letícia Costa. **Caracterização molecular por AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) de acessos de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.)**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Tese de Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2011.

ROCHA, Nubia Ferreira. **Atividade antioxidante e antitumoral em extratos de *Jatropha curcas*L.** 2013.Trabalho de Conclusão de Curso(mestrado emProcessos Interativos dos Órgãos e Sistemas). Universidade Federal da Bahia. Salvador- BA. 2013.

SAETAE, Donlaporn; SUNTORNSUK, Worapot.Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. **International journal of molecular sciences**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 66-77, 2010.

_____.Functional Properties of Proteins Isolated from Phorbol Ester-free Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) Seed Cake.**Food Sci. Biotechnol.**[S.l.],v.21, n.4, p. 1179-1185, 2012.

SALAS, J. et al. Cicatrization effect of *Jatropha curcas* latex (Angiospermae: Euforbiaceae), **Rev Biol Trop.**[S.l.], v.42, n.1-2, p.323-6, 1994.

SANTANA, Ulisses Andrade et al. Capacidade combinatória e parâmetros genéticos de genótipos de pinhão-mansão quanto a caracteres morfoagronômicos. **Pesq. agropec. bras., Brasília**, v. 48, n. 11, p. 1449-1456, 2013.

SANTOS, ANGELA MARIA DOS. **Fenologia e caracterização morfológica floral, molecular e agrônômica de acessos de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.)**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação - Mestrado em Agroecossistemas) - Universidade Federal de Sergipe, 2011.

SATO, M.et al. A cultura de Pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.): *Uso para fins combustíveis e descrição agrônômica*. **Revista Varia Scientia**, Cascavel, v.07, n. 13, p. 47-62, 2009.

SATURNINO, H. M. et al. **Cultura do pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.)**.Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SEKI, M., NARUSAKA, M., ISHIDA, J. *et al.* (2002) Monitoring the expression profiles of ca. 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant J.** 31, 279–292.

SHETTY, S. et al.Wound healing activities of Bark Extract of *Jatropha curcas* Linn in albino rats, **Saudi Med. J.** [S.l.], v.27, n.10, p.1473-6, 2006.

SILVA E. N. et al.. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **J Arid Envv.**74, p.1130–1137, 2010.

SILVA-MANN, R. et al. **Caracterização de Genótipos de *Jatropha curcas* L. por Meio de Marcadores RAPD.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS. 4., 2007, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2007.

SOARES, Bruno Oliveira. **Diversidade genética de genótipos de pinhão-manso por meio de RAPD e ISSR.**2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação - Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes, Janauba-MG. 2010.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática:**guia ilustrado para identificação das farrulias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG 11. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

SOUZA, Y. A. et al. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n.2, p. 083-092, 2010.

SOUZA-JUNIOR, A. P. et al. Análise da biossíntese de lipídios durante a maturação de sementes de *Jatropha curcas* L.**Diálogos & Ciência**,[S.l.], v. 11, p. 31-34, 2013.

SUDHEER PAMIDIMARRI,D. V. N. et al.. Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers. **Molecular Biology Reports**.[S.l.], v.36, Issue 6, p.1357-1364, 2009.

SUJATHA, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. **Plant Growth Regulation**, v. 47, n. 1, p. 83-90, 2005.

VASCONCELOS, G. C. L.et al. Caracterização botânica de acessos de pinhão-manso do banco de germoplasma da Embrapa Algodão. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, SIMPOSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGETICAS, 2010, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: Embrapa Algodão, 2010. p. 1606-1611.

_____. Caracterização morfológica comparativa de *Jatropha curcas* L., *Jatropha mollissima* (Pohl.) Baill. e *Jatropha gossypifolia* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PESQUISAS DE PINHÃO-MANSO. 2011. Brasília. **Anais...**Brasília, 2011.

WEBSTER, G.L. Classification of the Euphorbiaceae, **Annals of Missouri Botanical Garden**, [S.l.], v.81, p.3-32, 1994.

WEI, Q. et al. Antifungal activity of curcin from seeds of *Jatropha curcas*.**Chinese J. of Oil Crop Sci.** [S. l.], v.26, p.71–75, 2004.

WINDAUER, L.B. et al. Germination responses to temperature and water potential in *Jatropha curcas* seeds: a hydrotime model explains the difference between dormancy expres-

sion and dormancy induction at different incubation temperatures. **Annals of Botany**, United Kingdom, v.109, p.265-273, 2012.

WORANG, R. L. et al. The quality of physic nut (*Jatropha curcas*L.) seeds packed in plastic material during storage. **Biotropica**, [S.l.], v.15, n.1, p.25-36, 2008. Disponível em: <<http://journal.biotrop.org/index.php/biotropia/article/view/3/5>>. Acesso em: 10 out. 2014.

XU, Ronghua; WANG, Ruling; LIU, Aizhong. Expression profiles of genes involved in fatty acid and triacylglycerol synthesis in developing seeds of *Jatropha* (< i>*Jatropha curcas*</i> L.). **Biomass and bioenergy**, [S.l.], v. 35, n. 5, p. 1683-1692, 2011.

YANG, M. F. et al. Proteomic analysis of oil mobilization in seed germination and postgermination development of *Jatropha curcas*. **Journal of proteome research**, [S.l.], v. 8, n. 3, p. 1441-1451, 2009.

CAPÍTULO II

FISIOLOGIA DA GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE *Jatropha curcas* L.

RESUMO

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), espécie de uso múltiplo utilizada na medicina popular por constituir uma fonte de metabólicos secundários de importância medicinal além de características desejáveis para a produção de biodiesel. É cultivada como cerca viva, para recuperação de terrenos baldios e na fabricação de sabão e tinta. No entanto, muitos aspectos relacionados à sua fisiologia ainda necessitam ser elucidados. O presente estudo objetivou caracterizar sementes de *J. curcas* de diferentes genótipos e conduzir diferentes ensaios, a fim de se obter informações fisiológicas que contribuíssem de forma experimental e aplicada nas investigações sobre a espécie. A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que sementes de *J. curcas* apresentam em média 627.52 mm³, 0.65 g por sementes e 646.48 g o peso de mil sementes. Os genótipos avaliados apresentaram boa qualidade e verificou-se que a redução do teor de água pode promover a melhoria da germinabilidade. A remoção do tegumento das sementes acelera a germinação, porém produzem plântulas anormais quando comparadas as plântulas oriundas de sementes germinadas com tegumento, podendo indicar que a embebição irrestrita é prejudicial para o desenvolvimento posterior. A temperatura ótima de germinação para a espécie é 30°C, entretanto as sementes germinam bem na faixa de 25 à 35°C, sendo que 40°C representou uma temperatura de estresse. As sementes demonstraram sensibilidade à restrição hídrica no estágio inicial do seu desenvolvimento. A técnica de *priming* não promoveu melhoria na germinação nas condições testadas, porém apresentou um indicativo de melhoria em termos de desenvolvimento de plântula.

Palavras-chave: Curva de embebição. *Screening* térmico. *Screening* hídrico. *Priming*.

GERMINATION PHYSIOLOGY OF *Jatropha curcas* L. SEEDS

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) is a species used for multiple purposes, being cultivated as hedges and recovery of waste land, as well as used in folk medicine, besides containing oil in its seeds for the production of soap, paint and biodiesel. However, many aspects of its physiology still need to be elucidated in order to develop the cultivation and its commercial exploitation. This study aimed to characterize and to obtain physiological information from different accessions of *J. curcas* seeds in order to assist the development of its cultivation and commercial use. The results show that seeds of *J. curcas* have in average 627.52 mm³, individual weigh of 0.65 g and 646.48 g in thousand seeds weight. The accessions showed seeds with good physiological quality, and it was possible to verify the effect of reduction of moisture content in improving germinability. While removal of the seed coat had accelerated germination, The removal of the seed coat accelerates germination, but produce abnormal seedlings when compared the seedlings grown from seeds germinated with coat, which may indicate that the imbibition unrestricted is detrimental for the further development.. The optimum temperature for the species was 30 °C, while seeds germinated well in the range 25 to 35 °C, whereas 40 °C indicated stress and significant detriment in germination. The seeds were sensitive to water restriction, and the 'priming' technique did not result in improvement of the germinability parameters in the tested conditions, although some indicative improvement effect on the development of seedlings.

Keywords: Imbibition curve. Thermal *screnning*. Hydric *screnning*. *Priming*.

1 INTRODUÇÃO

A *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae), popularmente conhecida como pinhão-mansão, apesar de ter seu verdadeiro centro de origem ainda desconhecido, aponta-se o México e América Central como possibilidade. É amplamente distribuída na América Central, África e Ásia e no Brasil, sua distribuição geográfica é bastante vasta, devido à sua rusticidade, resistência a longas estiagens, sendo adaptável a condições edafoclimáticas muito variáveis, ocorrendo desde a região Nordeste, Sudeste e no estado do Paraná. É uma planta perene de crescimento arbustivo, podendo chegar até quatro metros de altura (ARRUDA et al., 2004; SATURNINO et al., 2005; VANZOLINI et al., 2010).

É utilizada na medicina popular por constituir uma fonte de metabólitos secundários de importância medicinal. As suas sementes são ricas em ácidos graxos e possuem características desejáveis para a produção de biodiesel. É cultivada muitas vezes como cerca viva, para uso em recuperação de terrenos baldios e terras secas, é também utilizada na fabricação de sabão e tinta, popularmente é frequentemente usada como purgativo, no tratamento de pele, hidropisia, gota, paralisia e reumatismo. Por esta razão, a espécie apresenta alto potencial comercial, tanto para produção de bio-energia quanto para a indústria de biofármacos (MELO et al., 2006; DEBNATH e BISEN, 2008).

Alguns estudos fisiológicos têm sido conduzidos com sementes de *J. curcas* como: de armazenamento, análises de crescimento e desenvolvimento, teste de envelhecimento acelerado, e teste de tetrazólio, análise de raios X, avaliação da germinação e do vigor em condições ótimas e alguns quando submetidas a fatores de estresse (salinidade, *deficit* hídrico), entre outros. Entretanto ainda não foi estabelecido um padrão para condução de testes com a espécie, representando assim um aspecto relevante a ser elucidado.

Experimentalmente é comum se utilizarem as sementes, para estudos em campo, casa de vegetação ou laboratório. Inicialmente elas passam por caracterizações iniciais para se ter noção e um registro da qualidade inicial do genótipo ou acesso a ser estudado, onde são realizadas análises padrões como determinação do grau de umidade (teor de água), teste de condutividade elétrica, biometria, peso de mil sementes, teste de sanidade, teste de raios X, teste de germinação, entre outros. A depender do objetivo executam-se outras análises recomendadas pelas “Regras para Análises de Sementes (RAS)” (BRASIL, 2009) ou das regras da “International Seeds Testing Association” (ISTA), reconhecida internacionalmente por estabelecer o padrão para a qualidade das sementes. Como não existem nas RAS recomendações para

avaliar as sementes de pinhão-manso, apesar da espécie já ser considerada comercial segundo Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), tem-se utilizado muitas vezes a metodologia indicada para sementes de *Ricinus communis* (mamona), principalmente se os estudos forem voltados para área de tecnologia de sementes. Análises experimentais que visam outra abordagem utilizam metodologias especializadas e ajustadas para o estudo de interesse.

Estudos voltados para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes, ou relacionados à fisiologia da planta, utilizam frequentemente o teste de germinação como um dos principais parâmetros para análise, pois este permite conhecer o potencial de germinabilidade de um genótipo em condições favoráveis e os resultados do teste são utilizados para determinar a taxa de semeadura, comparar o valor de genótipos para possível comercialização, assim como possibilita a obtenção de resultados comparáveis entre laboratórios (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). O potencial de desempenho das sementes está expresso nas características genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias e os testes de germinação podem funcionar como um instrumento de resposta da expressão dessas características (MARCOS FILHO, 2005).

Classicamente, a germinação é conceituada como um fenômeno biológico que botanicamente pode ser considerado como a retomada do crescimento do embrião, com o consequente rompimento do tegumento pela radícula (LABOURIAU, 1983). De acordo com o critério fisiológico, a germinação é completada quando uma parte do embrião, em geral, a radícula, penetra e atravessa os tecidos que o envolvem. Existem outros critérios de germinação, como a curvatura gravitrópica da radícula ou a emergência da plântula através da superfície do solo (critério agrônomico ou tecnológico) (KERBAUY, 2004). A retomada do crescimento do embrião (germinação) é dependente de fatores bióticos, intrínsecos à própria semente, e abióticos, como luz, temperatura, água e oxigênio, afetam diferentemente a germinação (BASKIN e BASKIN, 1998; BEWLEY e BLACK, 1994).

Dentre estes fatores é importante destacar a temperatura e a água. A temperatura regula a germinação em várias formas: determina a capacidade de germinação (porcentagem final), a velocidade de germinação (tempo para primeira contagem e contagem final) e, em algumas espécies, pode superar uma dormência primária e/ou secundária ou induzir uma dormência secundária. As temperaturas cardiais limitam a faixa de temperatura onde a germinação ocorre e, definem as condições ótimas do processo. O fornecimento de água é condição essencial para que as sementes iniciem a germinação e as plântulas se desenvolvam normalmente. (LIMA JUNIOR, 2010).

Cada fator ambiental pode atuar por si ou em interação com os demais. No processo de germinação, a água é o fator que exerce a mais determinante influência, pois, da absorção de água resulta a reidratação dos tecidos com consequente intensificação da respiração e de todas as outras atividades metabólicas, que culminam com o fornecimento de energia e nutrientes necessários para a retomada do crescimento, por parte do eixo embrionário. (NASSIF et al., 1998).

Em termos germinativos, sabe-se que o pinhão-manso é adaptável a uma ampla faixa climática, temperaturas entre 18 a 28,5°C, altitudes do nível do mar a cerca de 1.000 metros e precipitação média de 480 a 2.380 mm (BELTRÃO e CARTAXO, 2006). Isto pode justificar a variação de resultados encontrados na literatura referente à ideal temperatura para condução de testes de germinação em laboratório. Estudos experimentais têm sido desenvolvidos com indicação dos testes a temperatura alternada entre 25-30°C (MORAIS, 2008), outros recomendam que seja realizado sob temperatura alternada 20-30°C (MARTINS et al., 2008) em substrato areia ou papel. Outras investigações obtiveram o potencial máximo de germinação e maior vigor de plântulas a 25°C sem necessidade de pré tratamento germinativo (MOTA et al., 2012), enquanto outras apontam que a temperatura ótima registrada no experimento foi de 30°C e o melhor substrato foi a vermiculita (GAIROLLA et al., 2011; WINDAUER et al., 2012).

Outro aspecto fisiológico importante e muito estudado pela comunidade científica é a capacidade de plantas se desenvolverem em condições de estresse. Com relação ao cultivo em campo de sementes de *J. curcas*, verifica-se que sob déficit hídrico, as sementes podem germinar, porém não emergem. Isso demonstra que apesar de ser considerada uma planta de elevada resistência a períodos de estiagem, têm-se verificado que a disponibilidade de água é um fator limitante, sendo essencial na fase inicial, principalmente na emergência das plântulas (ALBUQUERQUE et al., 2008). Esse comportamento foi investigado por alguns autores em *J. curcas*, os quais demonstraram uma sensibilidade das sementes desta espécie tanto ao estresse hídrico como ao estresse salino pelo menos nos estágios iniciais do desenvolvimento, (LOUREIRO et al., 2007; ANDRÉO-SOUZA et al., 2010; SILVA et al., 2010; NIU et al., 2012)

Diante do exposto é possível verificar que os estudos de germinação de sementes são bastante úteis seja para ampliar os conhecimentos fisiológicos sobre a espécie estudada, como, por exemplo, para verificar a resposta de germinação a fatores ambientais, causas de dormência e métodos de superação, obter conhecimentos morfológicos, acompanhar o desenvolvimento do embrião e da plântula, verificar estádios de maturação das sementes e do efeito

do processamento e armazenamento sobre a qualidade de sementes (BASKIN e BASKIN, 1998).

Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar sementes de *Jatropha curcas* L. de diferentes genótipos e conduzir diferentes ensaios fisiológicos como: avaliação do efeito do teor de água na germinação; curva de embebição; *screening* térmicos, *screening* osmótico, embebição controlada (*priming*), a fim de se obter informações fisiológicas relevantes que contribuam de forma experimental e aplicada nas investigações com a espécie.

2 METODOLOGIA

As análises foram conduzidas no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia, Bioprodutos – LBBB, localizado na Universidade Federal da Bahia (Salvador-BA / Brasil) e nos Laboratórios do *Millenium Seed Bank*, localizado no *Royal Botanic Gardens – Kew* (MSB Kew, Wakehurst Place), Inglaterra, UK.

2.1 MATERIAL BIOLÓGICO E ÁREAS DE COLETA

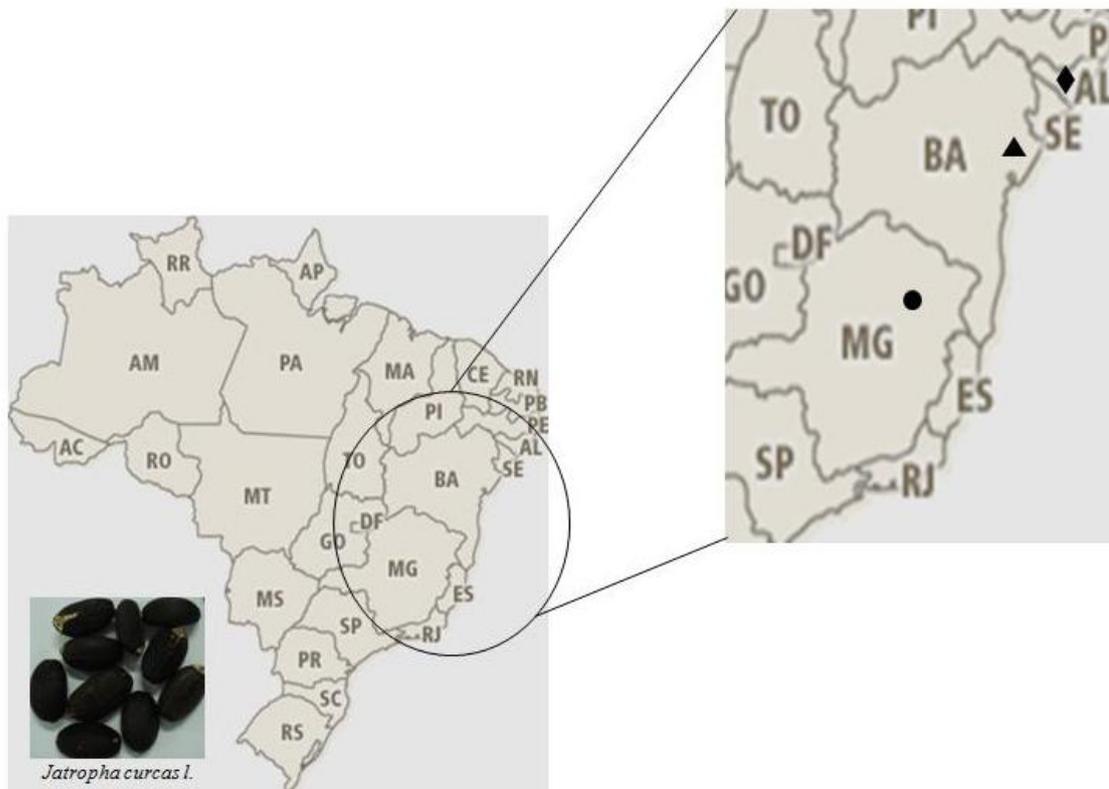
O estudo foi desenvolvido utilizando-se lotes de sementes de *J. curcas* (pinhão-manso) de três genótipos com diferentes procedências, sendo dois procedentes de estados da região nordeste (Bahia e Alagoas) e um da região sudeste (Minas Gerais) do Brasil (Figura 1).

Após recebimento dos lotes de sementes de cada localidade estas foram armazenadas em sacos de papel e mantidas a temperatura ambiente de laboratório ($21 \pm 2^\circ\text{C}$) até a caracterização inicial de cada lote, após este procedimento os lotes foram mantidos armazenadas em câmara seca sob condições controladas de 15°C e 15% de umidade relativa do ar.

O primeiro lote de trabalho recebido, constitui genótipos coletados a partir de matrizes cultivadas na estação experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola– EBDA (**Genótipo Alagoinhas 2012**), localizada no município de Alagoinhas–BA, Litoral Norte do estado da Bahia, situado entre as coordenadas 12.08° - 12.10° de latitude sul e 38.26° - 38.30° de longitude oeste (SANTOS et al., 2007). O segundo lote foi representado

por genótipos recebidos pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG (**Genótipo Minas Gerais 2012**), e as sementes foram coletadas em um campo experimental localizado na Fazenda Experimental do Vale do Piranga no município de Oratórios, zona da mata de Minas Gerais. As sementes foram enviadas em sublotes com a informação de serem sementes coletadas de plantas que foram cultivadas por diferentes formas de propagação (estaquia, enxertia, mudas e semeadura direta). Após chegar ao LBBB foi realizada caracterização do lote e como não havia muita diferenciação entre os sublotes em termos de teor de água e germinabilidade inicial, todas as sementes foram misturadas compondo um único lote de trabalho. Por fim, o terceiro lote de trabalho, representa os genótipos procedente do estado de **Alagoas (Genótipo Alagoas 2013)**, coletadas no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, Cidade de Rio Largo (AL), a partir de matrizes de um plantio experimental com 350 plantas com idade de sete anos, estando a área de coleta, segundo informação do remetente, situada nas coordenadas geográficas de 9,47°S e 35,83°W.

Figura 1- Regiões de coleta dos genótipos de *Jatropha curcas* L. utilizados no estudo. (▲) Genótipo Alagoas 2012; (●) Genótipo Minas Gerais 2012 e (◆) Genótipo Alagoas 2013.



Fonte: adaptado de: <http://portal.mte.gov.br/mte/images/imgs/sistemas/mapa.gif>. Acesso em: 20 jul. 2014

Para conhecer as condições climáticas das áreas de coleta foram utilizados informações do banco de dados meteorológicos do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (<http://www.inmet.gov.br>), no qual se coletaram às coordenadas geográficas, altitude da área e dados das medidas de temperatura e precipitação no período de um ano, de forma a incluir o ano da safra das sementes coletadas do período de coleta de cada genótipo. Estas informações correspondem às medidas coletadas das estações meteorológicas mais próximas das localidades de coleta dos genótipos (Tabela 1).

Tabela 1 – Dados de coleta para diferentes genótipos de *Jatropha curcas* L. e informações das estações meteorológicas próximas às áreas de coleta.

Dados coletados	Genótipos		
	Alagoinhas 2012	Minas Gerais 2012	Alagoas 2013
Período da coleta das sementes	Set./2012	Fev. a Abril/ 2012	Jun. a Jul./2013
Periodo de recebimento do lote	Set./2012	Out./2012	Set./2013
Período de coleta dos dados meteorológicos	Jan./12 à Jan./13	Jul./11 à Jul./12	Jul./12 à Jul./13
Estação meteorológica INMET	Alagoinhas 83249	Almenara A508	Macéio A303
Coordenadas geográficas informadas	12°10' S 38°30'W	NI*	9°47'S 35°83'W
Coordenadas geográficas da estação meteorológica INMET	12°15' S 38°43'W	16°16' S 40°68'W	9°55' S 35°77'W
Altitude (m)	131	189	84
Temperatura (°C)	Mínima	18	21
	Média	25	26
	Máxima	33	31
Precipitação Anual Total (mm)	591	409	1189

Fonte: Instituto Nacional de Meteorologia - INMET. <http://www.inmet.gov.br> . NI: Não Informado

Como as coletas foram realizadas em diferentes períodos, nem todas as análises foram realizadas com todos os genótipos. A metodologia específica para cada etapa do trabalho será descrita nos tópicos seguintes.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE INICIAL DE SEMENTES

Para a caracterização dos genótipos foram mensurados o peso de mil sementes, determinação do teor de água das sementes e teste de germinação. O teor de água e a

germinação foram novamente registrados em alguns períodos ao longo do armazenamento para verificação da viabilidade dos mesmos.

O peso individual e de mil sementes foi determinado por pesagens que foram realizadas em balança analítica. A determinação do teor de água (grau de umidade) foi realizada utilizando o método de secagem em estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas, sendo os resultados expressos em porcentagem de umidade calculada na base do peso úmido. O teste de germinação para caracterização inicial foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições de 20 sementes, conduzido em germinadores ajustados inicialmente à temperatura de 25°C sem fotoperíodo. Um *screening* térmico foi conduzido posteriormente para obtenção da temperatura ótima de germinação para cada genótipo. A determinação do teor de água e os testes de germinação foram realizados de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009).

A biometria das sementes foi realizada com auxílio de paquímetro digital, mensurando-se largura, altura e espessura e calculando-se o volume para obtenção da dimensão real da semente.

Tanto as pesagens das sementes individualizadas quanto a biometria foi realizada em amostras de 100 sementes por genótipo. O volume foi calculado aplicando-se a fórmula matemática:

$$V = \pi * (\text{comp.}/2) * (\text{larg.}/2) * (\text{espess.}/2).$$

2.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEOR DE ÁGUA NA GERMINAÇÃO

Devido à baixa germinabilidade verificada no início dos experimentos com os genótipos Alagoins 2012 e Minas Gerais 2012, quando o terceiro genótipo foi recebido (Alagoas 2013) em 2013 buscou-se monitorar o teor de água das sementes comparando-se com os dados de germinação. Após a caracterização inicial do lote, as sementes foram acondicionadas em sacos plásticos (mantidos abertos), acomodados em um caixote plástico, armazenadas em uma câmara seca com temperatura de 15°C e umidade relativa do ar de 15%.

2.4 CURVA DE EMBEBIÇÃO

O experimento foi conduzido com sementes, com e sem tegumento, dos genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012. Utilizaram-se 18 sementes de cada genótipo (amostra de conveniência), dispostas individualmente em placas de petri plástica (48 x 12 mm) sobre duas folhas de papel filtro umedecidas inicialmente com 3 mL de água ultrapura (Milli-Q). O germinador foi ajustado para temperatura constante de 25°C com fotoperíodo de 8 horas. Todas as sementes foram pesadas antes do início da embebição (semente seca) para obtenção do peso inicial (0h). As placas de petri com as sementes foram colocadas em caixas plásticas retangulares com tampa contendo papel toalha umedecidas na parte inferior da tampa para manutenção da umidade da caixa. As sementes foram pesadas diariamente de 7 às 20 h por um período total de aproximadamente 120 horas (5 dias). As pesagens foram realizadas individualmente tendo-se o cuidado de retirar cada genótipo por vez do germinador para minimizar o tempo de exposição das sementes a temperatura do laboratório. Nos dois primeiros dias, as pesagens foram realizadas de uma em uma hora durante 15 horas consecutivas, a partir do terceiro dia, de duas em duas horas e algumas vezes de três em três horas. Após iniciada a germinação as pesagens foram realizadas 4 vezes ao dia até estabelecimento da curva.

Foi gerado um gráfico por categorias: (1) sementes germinadas, (2) sementes que romperam o tegumento, mas não germinaram e (3) sementes que não romperam o tegumento (não germinadas), registradas durante as pesagens e plotadas no gráfico a partir das médias das pesagens obtidas em cada categoria nos períodos de embebição aferidos. A curva padrão trifásica para cada genótipo foi construída com os valores médios das pesagens das sementes que concluíram o processo germinativo em função das horas de embebição.

2.5 *SCREENING* TÉRMICO E *SCREENING* OSMÓTICO

Todos os testes de germinação dos ensaios que serão descritos a seguir foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com cinco repetições de 20 sementes por tratamento de cada genótipo. As sementes foram dispostas uniformemente sobre uma folha papel germitest em caixas plásticas retangulares e embebidas inicialmente com 25 mL de água destilada ou com as soluções de polietilenoglicol 8000 (PEG 8000).

As avaliações foram realizadas diariamente durante 10 dias registrando-se o tempo de embebição e contabilizando-se de forma acumulada as sementes germinadas. Considerou-se germinadas sementes com emissão de raiz a partir de 2 mm. Imagens fotográficas foram capturadas de uma amostragem de plântulas normais, retiradas do teste no 7º dia e das plântulas anormais ao final do teste, no 10º dia.

As plântulas foram avaliadas conforme descrição da RAS (BRASIL, 2009), onde se considera as plântulas normais, aquelas que apresentam as suas estruturas essenciais presentes e mostram potencial para continuar seu desenvolvimento e dar origem a plantas no campo, quando desenvolvidas sob condições favoráveis e estando de acordo com as categorias preconizadas pelas regras (plântulas intactas, com pequenos defeitos e as com infecções secundárias). As plântulas são classificadas como anormais quando estão: (1) danificadas, com qualquer uma das suas estruturas essenciais ausentes ou tão danificadas que não possa ocorrer desenvolvimento proporcional; (2) deformadas, com desenvolvimento fraco, ou com distúrbios fisiológicos, ou com estruturas essenciais deformadas, ou desproporcionais e (3) deterioradas, com qualquer uma de suas estruturas essenciais muito infectadas ou muito deterioradas, como resultado de uma infecção primária (da própria semente), que comprometa o seu desenvolvimento normal.

Os parâmetros avaliados estatisticamente foram: porcentagem de germinação (emissão de radícula), taxa de germinação (T50) e de uniformidade (T80-20).

2.5.1 Screening Térmico

As sementes foram semeadas em água a temperaturas constantes de 20, 25, 30, 35 e 40°C com fotoperíodo de 8 horas. Conduziram-se dois ensaios: (1) Ensaio 1, onde utilizou-se apenas os genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012 e o teste foi conduzido com sementes sem tegumento a temperatura de 15°C foi adicionada ao teste; (2) Ensaio 2, onde utilizaram-se além dos dois genótipos anteriores, o genótipo Alagoas 2013 e o teste foi conduzido com sementes com tegumento.

2.5.2. *Screening* Osmótico

O experimento foi conduzido com sementes com tegumento dos genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012, onde foram testados os potenciais osmóticos de 0.0 (controle), -0.2, -0.4, -0.6, -0.8, -1.0, -1.2 e -1.4 MPa, simulados com solução de polietilenoglicol 8000 (PEG 8000) diluída em água destilada para obtenção dos respectivos potenciais para a temperatura de 30°C (temperatura ótima estabelecida a partir do *screening* térmico) de acordo com Villela *et al.* (1991). Durante as avaliações, as sementes germinadas foram removidas do teste e a solução osmótica trocada a cada dois dias para manutenção do potencial osmótico e evitar contaminação por fungos.

2.6 EMBEBIÇÃO CONTROLADA (*priming*)

O experimento foi conduzido com sementes com tegumento dos genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012. A terminologia embebição controlada foi utilizada, pois o condicionamento osmótico foi realizado adicionando-se a solução osmótica sobre as sementes dispostas em caixas plásticas contendo papel germitest, não necessitando neste caso nenhum sistema de oxigenação utilizada em outras técnicas. Além disso, o experimento conduzido utilizou as etapas de embebição controlada (hidratação) e secagem (desidratação), preconizados pela técnica de *priming*, a qual se denominará a partir de agora.

Com base nos resultados obtidos a partir dos experimentos de *screening* térmico e osmótico, a embebição controlada foi realizada utilizando-se o potencial -0.6 MPa / 30 °C, simulada com solução de PEG 8000. Foram testados 2 tempo de condicionamento (2 e 7 dias). Após cada tempo de embebição as sementes foram retiradas da solução osmótica e submetidas à secagem até obtenção de peso constante. O procedimento de secagem foi realizado separando-se cinco sementes de cada repetição, as quais foram colocadas individualmente em envelopes de papel e pesadas diariamente até atingirem o peso constante. As outras sementes da repetição foram mantidas em placas de petri e também pesadas, porém em conjunto. Durante o período de secagem as sementes foram mantidas uma sala com temperatura e umidade controlada (15°C e 15% UR). Após a embebição e secagem foram conduzido teste de germinação

em água nas temperaturas constantes de 20, 30 e 40°C, todos com fotoperíodo de 8 horas e a germinação avaliada como descrito anteriormente.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS

Analisando-se as dimensões das sementes foi possível verificar diferenças estatisticamente significativas em relação ao comprimento das sementes para os três genótipos. Para largura não se verificou diferença estatística e para a espessura houve apenas diferença quando comparados ao genótipo Alagoinhas 2012. Analisando-se o volume das sementes, também se verificou diferenças significativas para as sementes do genótipo Alagoinhas 2012, em relação aos outros dois genótipos, sendo estas de menor volume e, conseqüentemente menor peso individual e menor peso de mil sementes. De forma geral para estes genótipos sementes de pinhão-manso apresentaram em média 627,5 mm³ de volume, cada semente pode pesar em média 0,7 g e o peso de mil sementes médio de 646,5 g (Tabela 2).

Tabela 2⁵ - Caracterização de sementes de genótipos de *Jatropha curcas* L.

Parâmetros	Genótipos			Média Geral	CV (%)
	Alagoinhas 2012	Minas Gerais 2012	Alagoas 2013		
Comprimento (mm)	Med. 17,3 ± 0,9c	18,0 ± 0,9 a	17,7 ± 1,0b	17,7	5,1*
Largura (mm)	Med. 10,8 ± 0,5a	10,7 ± 0,6 a	10,6 ± 0,5a	10,7	4,9 ^{ns}
Espessura (mm)	Med. 8,3 ± 0,4b	8,5 ± 0,5 a	8,5 ± 0,6a	8,4	6,1*
Volume (mm ³)	Min. 419,9	442,9	394,0	394,1	----
	Med. 605,9 ± 68,3 b	646,2 ± 74,8a	630,5 ± 89,2a	627,5	12,4*
	Max. 824,3	786,9	870,7	870,7	----
Peso / sementes (g)	Min. 0,4	0,3	0,3	0,3	----
	Med. 0,6 ± 0,1b	0,7 ± 0,1a	0,7 ± 0,1a	0,7	18,3*
	Max. 0,8	0,9	0,9	0,9	----
Peso de mil sementes (g)**	604,6 ± 1,4	663,5 ± 1,5	671,3 ± 1,3	646,5	5,6
Teor de água Inicial (%)	7,9 ± 0,2a	7,2 ± 0,2a	9,0 ± 0,2b	8,0	2,3*
Germinação Inicial (%) 25°C	33a	50a	56 ^a	45	25*

⁵*significativo a 5%, ns – não significativo para o teste F.

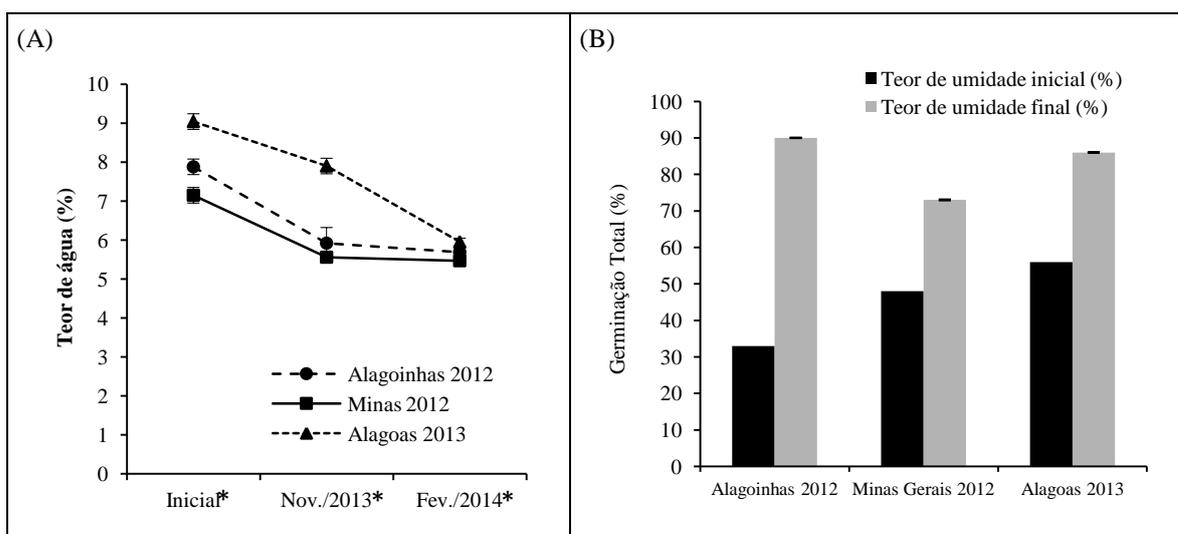
**Peso de mil não tem comparação de média, pois não foi realizada em repetições (seguiu recomendações das RAS). Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si pelo teste de *Scott-Knott* ao nível de 5% de significância.

Em relação à qualidade fisiológica das sementes, os genótipos quando recém chegados ao laboratório apresentavam germinabilidade baixa, conforme demonstrada na tabela 2, a qual foi melhorada após adiminuição do teor de água e quando mantidos em armazenamento com temperatura e umidade controlada (15°C e 15% UR). O genótipo Alagoinhas 2012 apresentava 33% de germinação quando as sementes tinham em média 7.9% de teor de água, o genótipo Minas Gerais 2012, 50% de germinação quando tinham 7.2% de teor de água e no genótipo Alagoas 2013 registrou-se 56% de germinação quando as sementes tinham 9.0% de teor de água. Após a diminuição do teor de água, os genótipos apresentaram 90, 73 e 86% quando atingiram respectivamente 5.7, 5.5 e 5.0% de teor de água (Figura 2). Apesar do teor de água inicial verificado ser considerado adequado para manter a qualidade de sementes ortodoxas, como são as de *J. curcas*, os dados apresentados indicam os teores de umidade mais baixo melhorou a germinabilidade e mantiveram a viabilidade das sementes.

Vale resaltar que a diferença do teor de água dos genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012 em relação ao do genótipo de Alagoas 2013 na determinação realizada em novembro de 2013 se dá devido ao tempo em que as sementes permaneceram nas condições de armazenamento controladas, relata anteriormente. Os dois primeiro genótipos já se encontravam armazenados a sete meses, ao passo que o genótipo Alagoas 2013 apenas um mês.

Figura 2 - Teor de água e germinação dos genótipos de *Jatropha curcas* L. (A) Teor de água ao longo do armazenamento*; (B) Germinação inicial e após diminuição do teor de água de cada lote.

* A Determinação do teor de água inicial para o genótipo Alagoinhas 2012 foi realizada em setembro de 2012, a do genótipo Minas Gerais 2012 foi outubro de 2012 e a do genótipo Alagoas 2013 foi setembro de 2013.



Experimentos que buscaram estabelecer as condições mais adequadas para o armazenamento das sementes de pinhão-mansão têm sido desenvolvidos e o que se relata é que há

uma redução natural na germinação e vigor das sementes durante o armazenamento (SEVERINO et al., 2006; JOCKER e JEPSEN, 2003; PEREIRA et al., 2013).

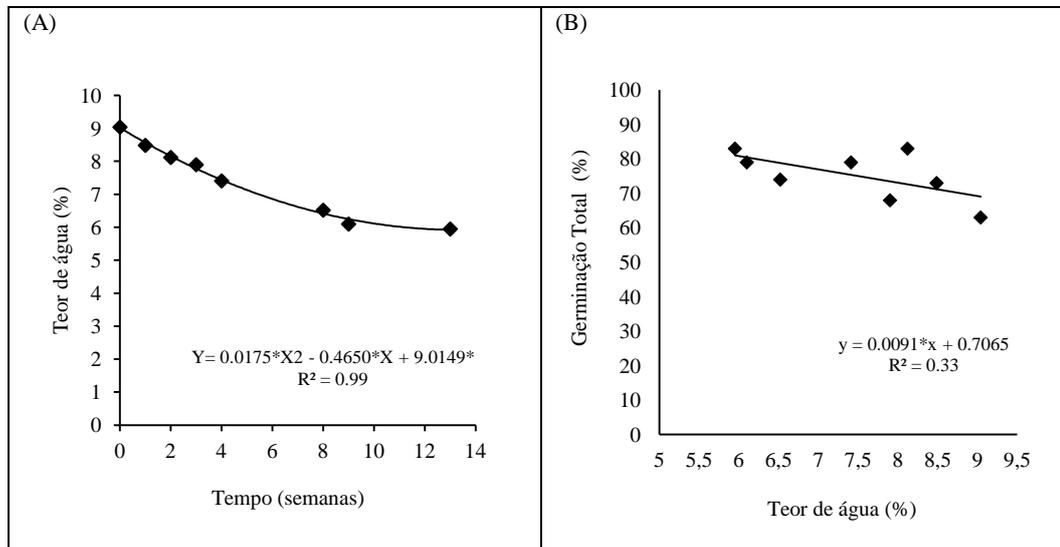
Para manter a qualidade de sementes ortodoxas as melhores condições são de baixa umidade relativa do ar e baixa temperatura, por reduzirem a atividade metabólica do embrião e a deterioração (CARVALHO e NAKAGAWA, 2000). Segundo Pereira et al. (2013), sementes de plantas oleaginosas, como a *J. curcas* são muito propensos à degradação e sendo assim de difícil preservação durante o armazenamento. A preservação é difícil em relação a outras sementes, uma vez que lipídios são quimicamente menos estáveis do que as moléculas do amido. Por esta razão, a peroxidação de lipídios é frequentemente relatado como uma dos principais causas de deterioração das sementes.

3.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO TEOR DE ÁGUA NA GERMINAÇÃO

Ao se verificar o possível efeito do teor de água sobre a germinabilidade dos genótipos, quando se iniciaram as análises com o genótipo Alagoas 2013, buscou-se monitorar a germinação das sementes associando ao teor de água após o armazenamento nas condições controladas (15°C e 15% RH) que propiciou a diminuição da umidade das sementes.

A partir dos dados obtidos, pôde se verificar que a relação entre o teor de água e o tempo de armazenagem em câmara seca apresentaram diferenças estatísticas significativas, demonstrando que o tempo de permanência em câmara seca nas condições controladas promoveu a redução do grau de umidade das sementes em torno de 33% (Figura 3A). A relação entre as taxa de germinação final e o teor de água durante os períodos avaliados também apresentaram diferenças estatisticamente significativa, principalmente quando comparado ao teor de água e germinação inicial (9.04% de teor de água e 63% de germinação), demonstrando assim que a redução do grau de umidade das sementes melhorou a germinação do genótipo estudado (Figura 3B).

Figura 3 - Influência do teor de água na germinabilidade de sementes de *Jatropha curcas* L. (Genótipo Alagoas 2013). (A) Teor de água ao longo do tempo; (B) Germinação com diferentes teores de umidade. Condições de armazenamento: 15°C e 15% UR. Teste de germinação conduzido a 30°C com fotoperíodo de 8 horas.



Fonte: Pesquisa da autora

Apesar deste não ser um experimento de armazenamentos os achados aqui apresentados corrobora com dados publicados encontrados neste tipo de estudo, ao passo que existe uma relação entre a viabilidade das sementes e a manutenção de teores de umidade baixo ao longo do armazenamento, o que, comocitada anteriormente, reduzirem a atividade metabólica do embrião e evitam efeitos bioquímicos que levam a deterioração de sementes, a exemplo da peroxidase lipídica.

Pereira et al. (2013), estudando as condições de armazenamento em sementes de *J. curcas* e verificaram que independente de condições ambientais e do tipo de embalagem a qualidade fisiológica das sementes foi maior após o armazenamento em câmara fria ($\pm 5^\circ\text{C}$ e 60% UR), em embalagens de saco de papel Kraft ou polipropileno trançado ou quando mantidas em ambiente (condições de laboratório, a $\pm 25^\circ\text{C}$ e $\pm 76\%$ UR) dentro de tambor de papelão. O teor de água das sementes verificado no início do armazenamento estava em cerca de 7%, mas após o terceiro mês de armazenamento até o 12º mês houve um aumento no conteúdo de umidade das sementes, em todos os tratamentos apresentando variações entre 8,8% e 9,6%. Isso pode nos deixar uma evidência de que a viabilidade pode ter sido perdida em função do aumento do teor de água nas sementes, assim como se verificou nas sementes de pinhão-manso do genótipo Alagoas 2013 no presente estudo.

Guzman e Aquino (2009) ao armazenar as sementes a 0° e 20°C , concluíram que as temperaturas não foram determinantes para a manutenção da qualidade fisiológica de

sementes ao longo do período de armazenamento, mas sim o teor de água, pois este foi o que mais influenciou na redução de germinação e vigor. Os autores evidenciaram ainda, que o teor de água de 9,5% foi prejudicial para a qualidade das sementes de *J. curcas*, e que afirmam que sementes com teor de água entre 4% e 5% mantidas em embalagens impermeáveis podem ser armazenadas durante um ano com pouca redução na porcentagem de germinação.

Este efeito pode ter ocorrido com o estudo desenvolvido por Worang et al. (2008) que monitoraram por 6 meses o armazenamento das sementes de *J. curcas* sob condições ambientais normais (condição de laboratório) mantidas em embalagens plásticas. Estes autores evidenciaram que as sementes apresentaram decréscimo na porcentagem de germinação de 89% para 53% após o 6º mês do armazenamento. As sementes armazenadas apresentavam teor de água de 7,9% no início do armazenamento e 8,2% ao final. Porém, os autores afirmam que este teor de água é seguro para armazenar sementes de pinhão-mansão, o que diverge com as evidências de Guzman e Aquino (2009) e Pereira et al. (2013)

Os dados apresentados demonstraram que conforme as sementes de pinhão-mansão reduziram o teor de água apresentaram melhoria na germinabilidade, corroborando com os estudos citados, o que sinaliza que este é um aspecto que necessita ser mais bem investigado.

3.3 CURVA DE EMBEBIÇÃO

De acordo com Bewley e Black (1994) a curva de embebição de água em sementes segue um padrão trifásico onde a fase I é caracterizada pela rápida absorção de água e aumento do peso das sementes, a fase II, na qual a absorção de água se dá em níveis baixos, sendo o momento em que a semente adquire condições físico-químicas para reativação de seu metabolismo e a fase III, período em que ocorre a protrusão da raiz primária. De acordo com este modelo proposto, a curva de embebição de água das sementes de *Jatropha curcas* L. no presente estudo também apresentou padrão trifásico nos dois genótipos e condições avaliadas (sementes com e sem tegumento). Nas sementes sem tegumento a embebição foi mais acelerada antecipando o período de início e término das fases, porém mesmo assim foi possível verificar o padrão trifásico no qual se estabeleceu a fase I entre 0 e 11 h, a fase II entre 11 e 35h e a fase III a partir de 35h (Figura 4A e 4B). Nas sementes embebidas com tegumento estabeleceu-se a fase I de 0 a 20 h de embebição, a fase II entre 20 e 60 horas e a fase III a partir de 60 horas. Verificou-se ainda que sementes que apenas romperam o tegumento e as que não germinaram até o final

das pesagens não conseguem atingir a fase III, caracterizada pela protrusão da radícula (Figura 4C a 4E). A porcentagem de germinação total foi baixa nas sementes da curva conduzida com sementes com tegumento, porém isto não invalidou os dados, pois estes foram gerados em função das sementes viáveis e que neste caso apresentaram o padrão trifásico conforme pode ser visto na figura 4. A curva conduzida com sementes sem tegumento apresentaram 100% de germinação em ambos os genótipos. Este efeito demonstra que algum fator fisiológico estava comprometendo a capacidade germinativa das sementes, porém as mesmas continuavam viáveis já que ao se remover o tegumento elas germinavam.

A primeira fase da embebição ocorre de forma rápida, constitui um processo físico relacionado com as propriedades dos colóides e ocorre devido à diferença de potencial hídrico, entre a semente e o seu ambiente (experimentalmente, o substrato), tanto para sementes vivas quanto mortas (DE CASTRO et al., 2004). Este efeito foi verificado presente estudo quando o padrão da fase I é bem semelhante nas sementes dos dois genótipos avaliados, nos três grupos de sementes categorizados (Figura 4C a 4E). No estudo desenvolvido por Evencio et al. (2011), onde se estabeleceram a curva de absorção de água em sementes *J. curcas* com sementes vivas (viáveis) e mortas (as sementes vivas foram autoclavadas por período de 20 minutos para perda da viabilidade) também foi verificado este efeito na fase I que foi comum nas sementes vivas e mortas.

Já a fase II, fase de preparação e ativação do metabolismo, é caracterizada pela redução drástica na velocidade de absorção com aumento da difusão de solutos para regiões de marcante metabolismo e, principalmente, na região do embrião (BRADFORD et al., 1995; BEWLEY e BLACK, 1994). Nesta fase as células não podem absorver mais água porque não podem mais expandir, neste caso o gradiente de potencial hídrico da semente é nulo e conseqüentemente, o potencial osmótico é igual ao potencial de pressão (DE CASTRO, et al., 2004). Isso pode ser causado pela rigidez das paredes celulares das células embrionárias ou pelo impedimento da sua expansão pelas estruturas que cercam o embrião, o que pode ser o caso da *J. curcas*, que por apresentar um tegumento rígido, apesar de poroso, fazendo com que a capacidade de expansão do embrião se esgote e então promova a ruptura do tegumento e assim a germinação da semente dando início assim a fase III.

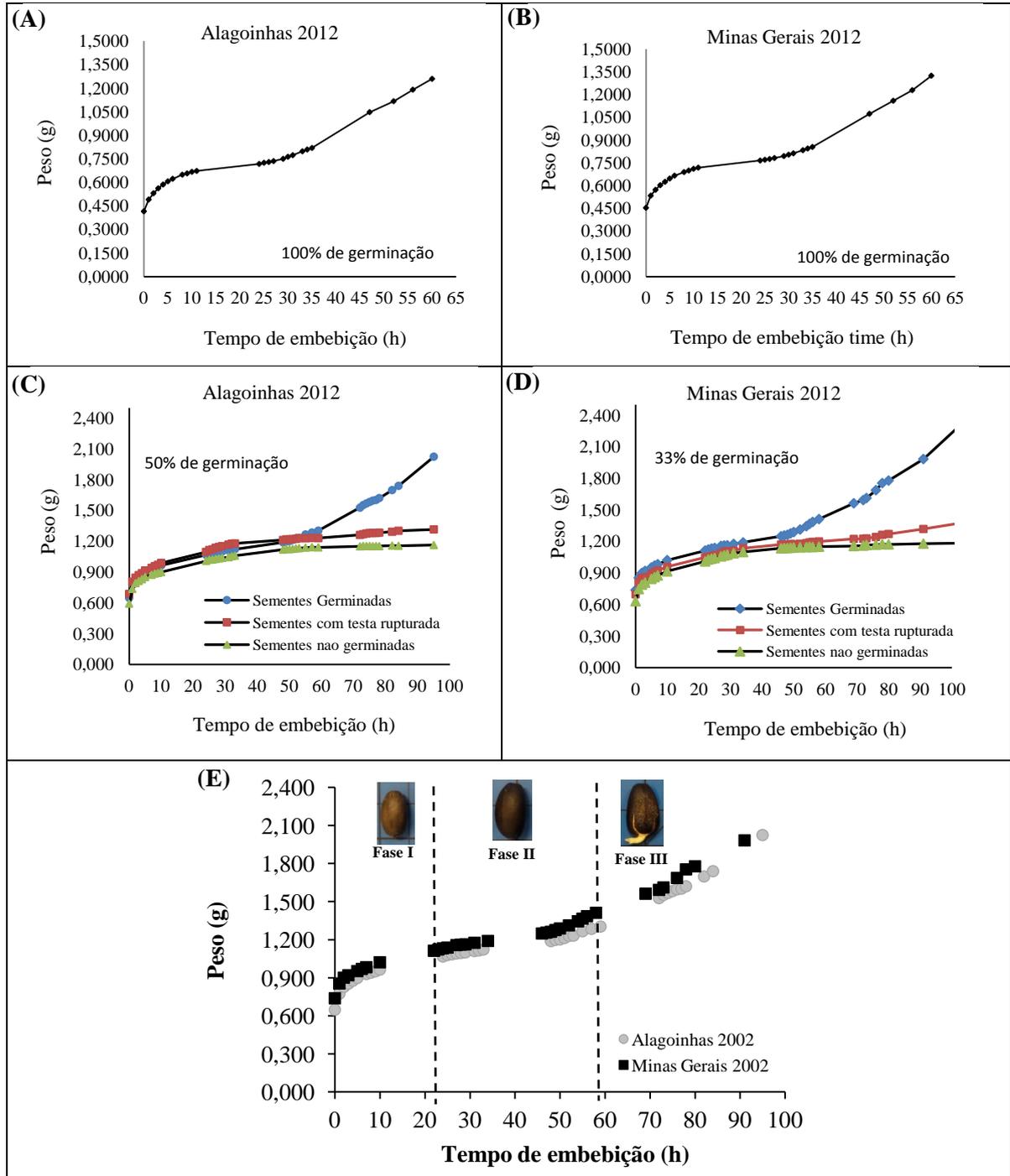
Loureiro et al. (2013) também descreveram as diferentes fases do processo de germinação através da curva de embebição em sementes de *J. curcas* e caracterizaram a fase I de 0 a 12 h, a fase II entre 12 e 48 h de embebição e a fase II a partir de 48 horas. Dantas et al. (2007) também verificaram um padrão trifásico na curva de germinação de *J. curcas*, porém a fase I foi completada em 48 h, a fase II entre 48 e 88h e a fase III teve início após 88 h de em-

bebição. As diferenças verificadas entre sementes da mesma espécie podem ser atribuídas às condições e metodologias utilizadas na condução dos diferentes experimentos, principalmente em relação aos tempos de pesagens realizadas ou até mesmo possivelmente pela procedência e vigor de cada genótipo analisado.

Segundo o padrão estabelecido por Evencio et al. (2011) a fase I foi comum para as sementes vivas e mortas, estendendo-se por 15 horas. Apenas sementes vivas ingressaram na fase II, que se deu entre 15 até 60 horas de embebição, assim como somente sementes vivas também ingressaram na fase III, após 60 horas de embebição, quando foi possível visualizar a emissão da radícula. Entretanto, estes autores estabeleceram a curva apenas a partir de 16 períodos de embebição, o que não é comum metodologicamente. Pimenta et al. (2014), utilizando metodologia igual a de Evencio et al. (2011), inclusive no número de pesagens (15 períodos de pesagem), descreveram os mesmos períodos para cada fase.

Os dados do presente estudo corroboram em partes com os achados dos dois autores citados anteriormente, diferindo apenas em relação ao intervalo de término da fase I e início da fase II, que neste foi de 20h e nos trabalhos apresentados na discussão foi de 15h. No entanto, é possível considerar a variação aceitável, em se tratando de uma fase de transição e considerando a quantidade de pesagens (pontos na curva) realizadas em cada estudo. Nos estudos citados foram realizadas 15 e 16 pesagens e a curva construída neste estudo utilizou pontos oriundos de 41 pesagens, o que aumenta a confiabilidade dos dados gerados.

Figura 4 - Curva de embebição de sementes de *Jatropha curcas* L. com e sem tegumento. Genótipos Alagoínhas 2012 e Minas Gerais 2012. (A) e (B), curva conduzida com sementes sem tegumento: Fases de embebição: Fase I - de 0 a 11 horas de embebição; Fase II - de 11 a 35 horas e Fase III - a partir de 35 horas; (C) e (D), curva conduzida com sementes com tegumento; (E) Curva Padrão (sementes com tegumento) para os dois genótipos: fases de embebição: Fase I - de 0 a 20 h; Fase II - entre 20 e 60 horas; Fase III - a partir de 60 horas.



3.4 SCREENING TÉRMICO

Como as amostras e os dados não estavam distribuídos normalmente nos dois ensaios, foi realizada uma ANOVA *Kruskal-Wallis* de um fator nos grupos genótipos e temperatura. Os resultados demonstraram que os grupos genótipo não apresentam diferença significativa tanto nos experimento conduzido sem tegumento quanto no conduzido com tegumento. Não houve diferença significativa também para o índice de uniformidade (T80-20) nos dois experimentos. As médias das repetições de cada temperatura testada foram comparadas pelo teste de *Mann-Whitney* ao nível de 5% de probabilidade para cada parâmetro analisado (Figuras 5 e 7).

3.4.1 Ensaio 1: *Screening* térmico conduzido com sementes sem tegumento

No *screening* térmico conduzido com sementes sem tegumento a germinação foi nula em todos os genótipos incubados a 15°C. Foi verificada alta porcentagens de germinação final nas faixas de temperatura de 20 a 35°C sem diferença estatística para os dois genótipos avaliados. A 40°C o genótipo Minas Gerais 2013 não apresentou diferença significativa em relação às outras temperaturas, porém os valores de T50 e T80-20 diferiram e experimentalmente não houve formação de plântulas normais nesta temperatura em nenhum dos genótipos (Figura 5). Considerando os três parâmetros avaliados, os quais contribuem para se definir a temperatura ótima de germinação, ao passo que se define como condição ótima quando se obtém a maior germinabilidade em menor tempo e com maior uniformidade pôde-se considerar como temperatura ótima 30°C (Figura 5E), já que a nas outras temperaturas a protrusão radicular foi verificada mais tardiamente e a 35°C a germinabilidade apesar de alta não proporciona a formação de plântulas normais tão desenvolvidas quanto às verificadas nas temperaturas de 25 e 30°C, conforme ilustrado na figura 6, onde se pode verificar nitidamente que as plântulas que cresceram a 35°C não desenvolveram as raízes e o hipocitilo como nas plântulas das sementes germinadas a temperatura de 25 e 30°C. A descrição mais detalhada dos padrões de normalidade e anormalidade verificadas para as plântulas de pinhão-mansão serão discutidas posteriormente.

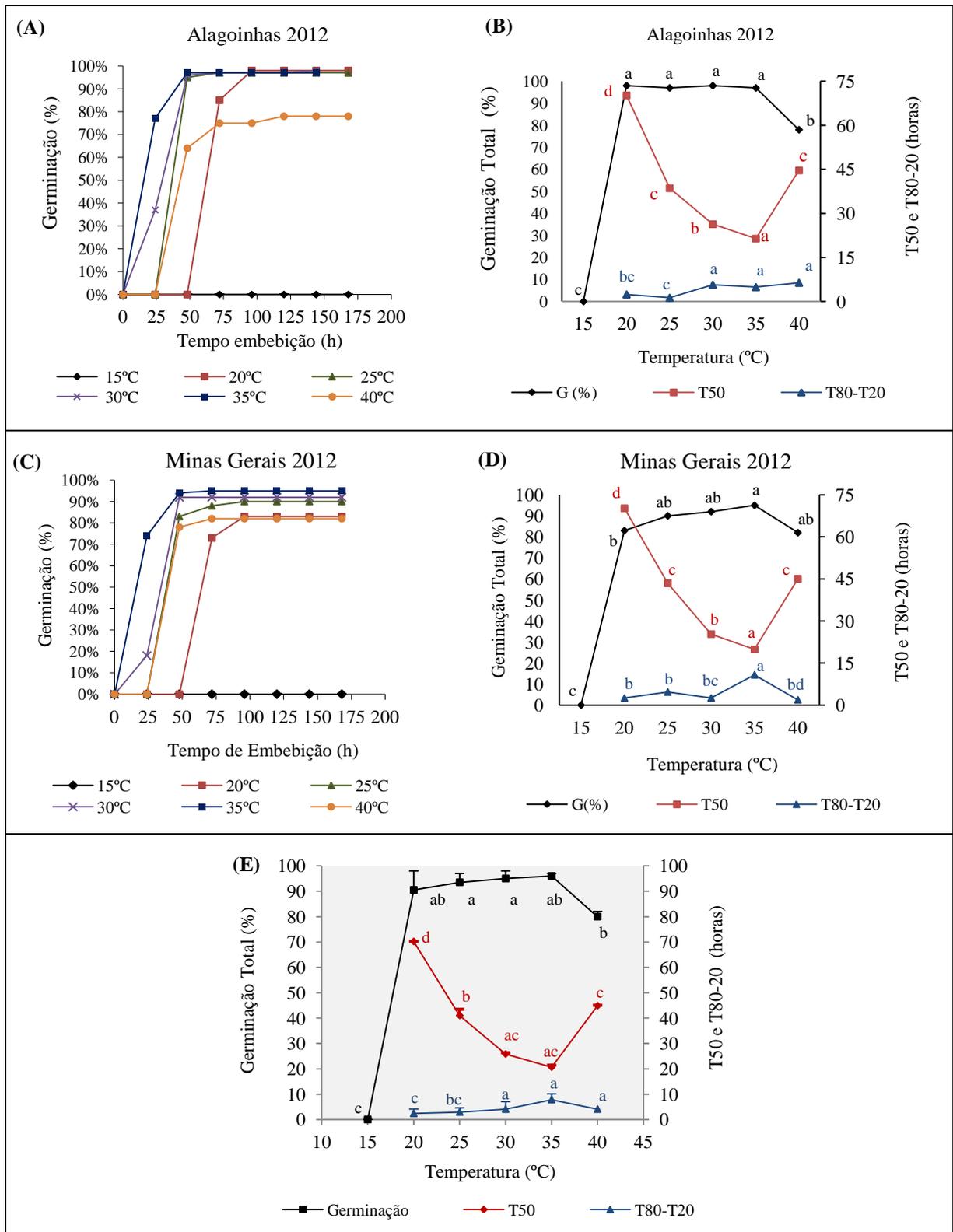
Joker e Jepsen (2003) relatam que sementes de *J. curcas* recém-colhidas apresentam dormência pós-maturação, sendo esta necessária antes que as sementes possam germinar e que

sementes secas germinam normalmente sem pré-tratamento. Os autores não recomendam a remoção do tegumento da semente antes da sementeira, pois embora acelere a germinação existe o risco de produzir plântulas anormais.

A retirada do tegumento para otimizar a germinação ainda é uma técnica controversa e sua realização dependerá do objetivo proposto. Em sementes de pinhão-mansão por vezes foi útil para verificar se a capacidade germinativa do genótipo estava mantida e realmente foi verificado que genótipos com germinabilidade baixa ou nula quando removido o tegumento germinavam normalmente. Esta observação demonstra apenas algum efeito em termos de absorção de água pelo tegumento, como uma possível dormência tegumentar temporária ou incapacidade do embrião de rompê-lo. Mas quanto a estes efeitos é necessário conduzir outros experimentos que possibilitem afirmar isto com maior precisão.

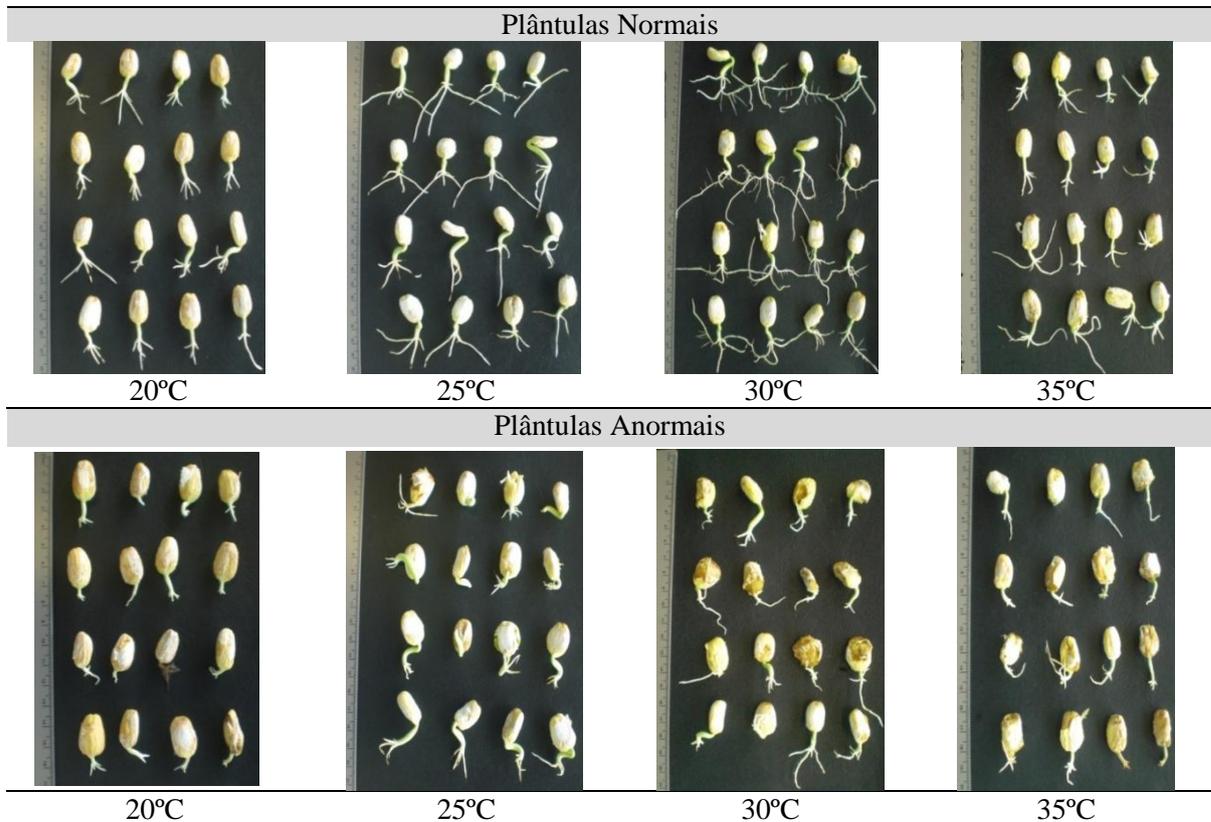
Mota et al. (2012), também testando diferentes temperaturas em sementes de *J. curcas*, não verificaram diferenças muito expressivas quando o tegumento das sementes de pinhão-mansão foi removido. Os autores verificaram que a porcentagem final de germinação das sementes foi maior na temperatura de 25°C (42%) quando o tegumento das sementes foi mantido. Entretanto o experimento conduzido pelos autores demonstrou uma germinabilidade baixa inclusive nas sementes com tegumento, o que pode indicar baixa qualidade do genótipo estudado e que contradiz os achados do estudo aqui apresentado, o qual apresenta uma boa qualidade em função das altas taxas de germinação verificadas. Nunes e Nunes (2005) verificaram maior porcentagem de germinação quando tiveram o tegumento das sementes de pinhão-mansão removido. Entretanto, Neves et al. (2009) obtiveram maior porcentagem de germinação e índice de velocidade de germinação em sementes com tegumento.

Figura 5 – *Screening* térmico conduzido com sementes de *Jatropha curcas* L. sem tegumento. (A) e (C) - Curvas de Germinação; (B) e (D) - Germinação Total (G%), Taxa de Germinação (T50) e Uniformidade (T80-20) em cada genótipo. (E) Análise geral para a espécie.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 6 - Plântulas desenvolvidas durante *Screening* térmico conduzido com sementes de *Jatropha curcas* L. sem tegumento. Plântulas normais (acima) após o 7º dia de semeadura e anormais (abaixo) após o 10º dia de semeadura nas diferentes temperaturas testadas.



Fonte: Fotos do autor

3.4.2 Ensaio 2: *Screening* térmico conduzido com sementes com tegumento

O *screening* térmico conduzido utilizando sementes com tegumento propiciou uma germinação mais tardia e menos uniforme quando comparadas as geminadas sem tegumento nas temperaturas mais favoráveis para a germinação. Após 48h do início da embebição das sementes sem tegumento, por exemplo, foi possível verificar por volta de 80% de sementes germinadas com estabilização da germinação após 72h, enquanto que nas sementes com tegumento neste mesmo período a germinação ainda encontrava-se em torno de 20% e a estabilização somente foi verificada após 100h de embebição.

As sementes dos genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012 apresentaram altas taxas de germinação na faixa de 20 a 35°C, enquanto que nas do genótipo Alagoas 2013 registrou-se baixa germinabilidade a 20°C (1%) (Figura 7). As melhores taxas de germinação, as quais não apresentaram diferenças estatísticas foram as verificadas nas sementes germinadas a

25 e 30°C para as sementes dos três genótipos, o que se refletiu também no desenvolvimento das plântulas. No entanto, a partir de todos os parâmetros analisados e análise estatística realizada, a temperatura de 30°C também se apresentou como temperatura ótima para a germinação de sementes de *J. curcas* com tegumento (Figura 8). O aspecto das plântulas normais verificadas nesta temperatura também reforça esta conclusão (Figura 9).

A 40°C foi verificada 37 e 44% de sementes que emitiram raízes nos genótipos Alagoas 2012 e Minas Gerais 2012, respectivamente, porém estas não conseguiram se desenvolver e formar plântulas normais como também foi verificado nas sementes germinadas sem tegumento (Figuras 10). Isto indica que a exposição prolongada às altas temperaturas constitui condição de estresse para o desenvolvimento inicial da planta. Foi verificada uma taxa de uniformidade (T80-20) maior nesta temperatura, porém o T50 foi bem superior do que nas outras temperaturas indicando um retardo na germinação, o que não é interessante em termos de produtividade agrícola, porém pode ser um indicativo de uma condição adaptativa da planta a espera de uma condição mais propícia para a germinação.

As sementes do genótipo Alagoas 2013, a 40°C apresentaram apenas 5% de germinação, demonstrando uma sensibilidade ainda maior para germinar em temperaturas a partir de 40°C. A 20°C este genótipo também apresentou germinabilidade praticamente nula (1%), o que também diferiu em relação aos outros dois genótipos avaliados, onde se registrou germinabilidade de 79% (genótipo Alagoas 2012) e 82% (genótipo Minas Gerais 2012) nesta temperatura. Essas diferenças podem ser justificadas pelas condições climáticas em cada área de coleta as quais promovem modificações no comportamento fisiológico das sementes dos genótipos produzidos em cada região. O genótipo Alagoas 2013 foi o exposto a menor amplitude térmica (10°C) durante o ano da coleta das sementes com registro total de 1189 mm de chuva neste mesmo período, enquanto que os genótipos Alagoas 2012 e Minas Gerais 2012 apresentaram ambos exposição a uma amplitude térmica de 22°C, com total do índice pluviométrico de 591 mm e 409 mm respectivamente (Tabela 1).

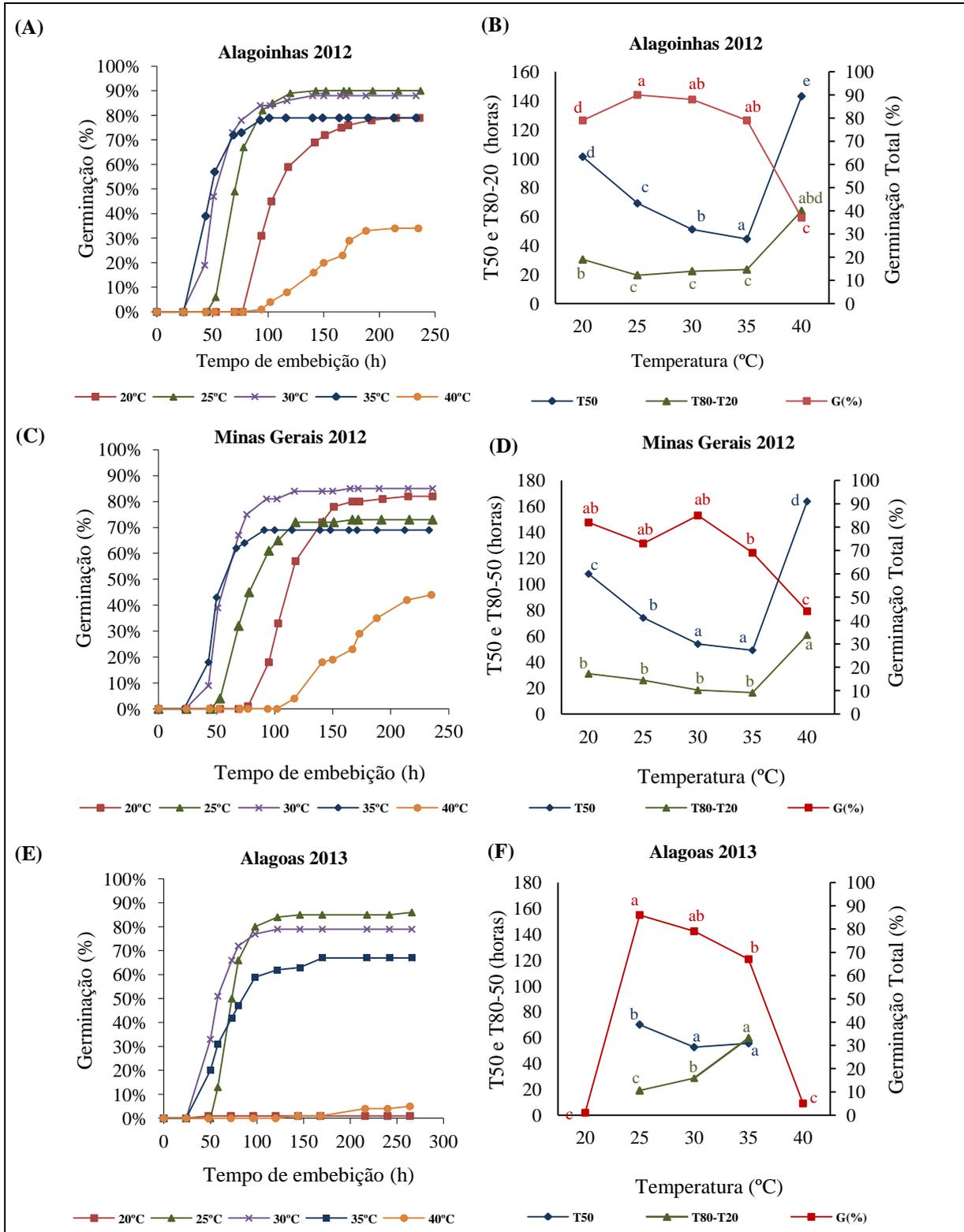
Com relação à avaliação das plântulas, a partir das imagens obtidas e as características a serem observadas preconizadas pelas RAS, verificou-se que no caso do pinhão-mansão nas condições de condução dos testes as estruturas evidenciadas para se considerar as plântulas normais foram: a presença do sistema radicular desenvolvido com presença das raízes primárias e secundárias produzidas dentro do tempo de duração do teste, hipocótilo delgado e alongado, presença dos dois cotilédones. Folhas ainda não são visíveis até o 10º dia, que foi o tempo de duração do teste. As plântulas normais, ilustradas na figura 9, desenvolvidas de 20 a 30°C apresentaram todas as estruturas iniciais conforme descritas anteriormente e nas desen-

volvidas a 35°C verifica-se nitidamente uma diferença no desenvolvimento das raízes e hipocotilo, apesar das sementes do genótipo Alagoinhas 2012, na análise do T50 para a emissão da radícula ter sido menor, sendo assim melhor, que nas outras temperaturas testadas e o genótipo Minas Gerais 2012 apesar de não ter diferido em relação à 30° diferiu em relação a 25°C. Esta observação demonstra um importante efeito da temperatura no desenvolvimento de plântulas ecologicamente relacionado à estratégia de sobrevivência da planta em campo. Diferentemente do que foi discutido, as plântulas do lote Alagoas, apesar da germinabilidade não ter apresentado diferença significativa, o T50 e a o T80-20 das plântulas desenvolvidas a 35°C apresentaram diferença estatisticamente significativa, demonstrando uma possível resistência das sementes deste genótipo a esta temperatura. Por outro lado, este genótipo apresentou sensibilidade 20°, temperatura na qual a germinabilidade foi muito baixa não havendo nem desenvolvimento de plântulas até o final do teste (Figura 9).

As características observadas nas plântulas de pinhão-manso como anormais nas condições de teste avaliadas foram: (1) plântulas com algumas das suas estruturas essenciais ausentes ou tão danificadas que não viabilizaria o desenvolvimento proporcional e plântulas muito deterioradas que comprometeram o seu desenvolvimento normal; (2) sistema radicular com raiz primária atrofiada, curta, desproporcional em relação às outras estruturas da plântula, raízes por vezes ausente, em alguns casos fina e fraca presa dentro do endosperma da semente, deteriorada devido a uma infecção primária, raízes seminais fraca ou ausente; (3) hipocótilo curto e muito engrossado, as vezes ausente ou alongado para dentro do endosperma, estrangulado, deteriorado por infecção, retorcido; (4) endosperma muito inchado e as vezes necrosado (Figura 10).

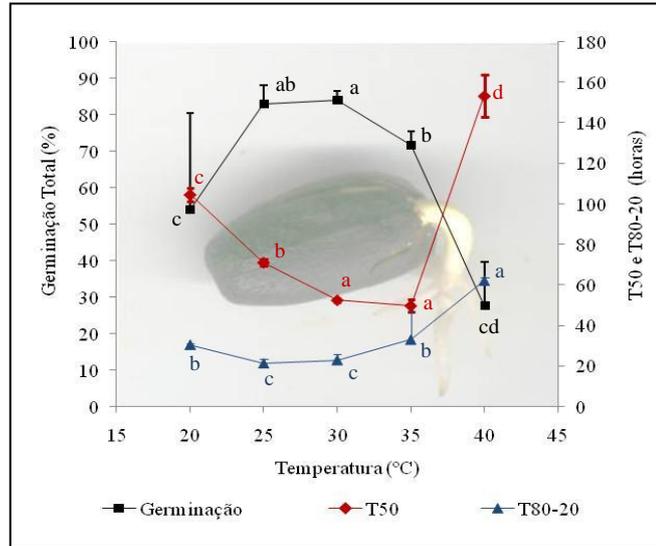
A validade dos resultados dos testes de germinação é, às vezes, questionada, pois, no laboratório, as condições são controladas, a fim de possibilitar a máxima capacidade germinativa das sementes. A germinação no laboratório nem sempre é igual ao desempenho no campo, onde as condições ambientais não são controladas e, às vezes, adversas ao processo de germinação e desenvolvimento do vegetal. No entanto, as discrepâncias entre os resultados do laboratório e campo podem ser reduzidas, quando as sementes apresentam alto vigor (LIMA JUNIOR, 2010), o que pode ser constatado nos genótipos de *J. curcas* aqui estudados, os quais apresentaram boa qualidade fisiológica.

Figura 7 - *Screening* térmico conduzido com sementes de *Jatropha curcas* L. com tegumento. Genótipos Alagoínhas 2012, Minas Gerais 2012 e Alagoas 2013. (A), (C) e (D) - Curvas de Germinação; (B), (D) e (F) - Germinação Total (G%), Taxa de Germinação (T50) e Uniformidade (T80-20) em cada genótipo. (F) Análise geral para a espécie.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de *Mann-Whitney* ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 8 - Germinação Total (G%), Taxa de Germinação (T50) e Uniformidade (T80-20) das sementes de *Jatropha curcas* L. durante *screening* térmico conduzido em sementes com tegumento.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Mann-Whitney ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 9 - Plântulas normais registradas durante *screening* térmico conduzido com sementes de *Jatropha curcas* L. com tegumento. Plântulas após 7 dias de semeadura nas diferentes temperaturas testadas.



Fonte: Fotos do autor

Figura 10 - Padrões de anormalidades verificados nas plântulas durante *screening* térmico conduzido com sementes de *Jatropha curcas* L. com tegumento. Plântulas anormais após 10 dias de semeadura nas diferentes temperaturas testadas.



Fonte: Fotos do autor

3.5 SCREENING OSMÓTICO

Os resultados do experimento de *screening* osmótico demonstraram que os potenciais osmóticos testados provocaram redução acentuada na germinação de forma similar nas sementes de *J. curcas* dos dois genótipos avaliados, onde os potenciais inferiores a -0.6 MPa foram críticos para a germinação das sementes, apesar de que nos potenciais -0.4 e -0.2 MPa as sementes também apresentaram germinação final baixa quando comparadas ao tratamento controle (Figura 11). A análise dos resultados permite concluir que em condições de estresse simulado, a exemplo da restrição hídrica, o desenvolvimento inicial de *J. curcas* pode ser prejudicado.

Comportamento similar foi verificado por Loureiro et al. (2007) quando em laboratório simularam a deficiência hídrica com uso de solução de Polietileno Glicol 6000 (PEG 6000) e tanto a porcentagem, quanto a velocidade de germinação de sementes de pinhão-

manso foram afetadas a partir do potencial osmótico de -0,2 MPa, com limite de tolerância verificado no potencial de -0,6 MPa (1% de germinação), demonstrando assim uma sensibilidade das sementes desta espécie ao estresse hídrico.

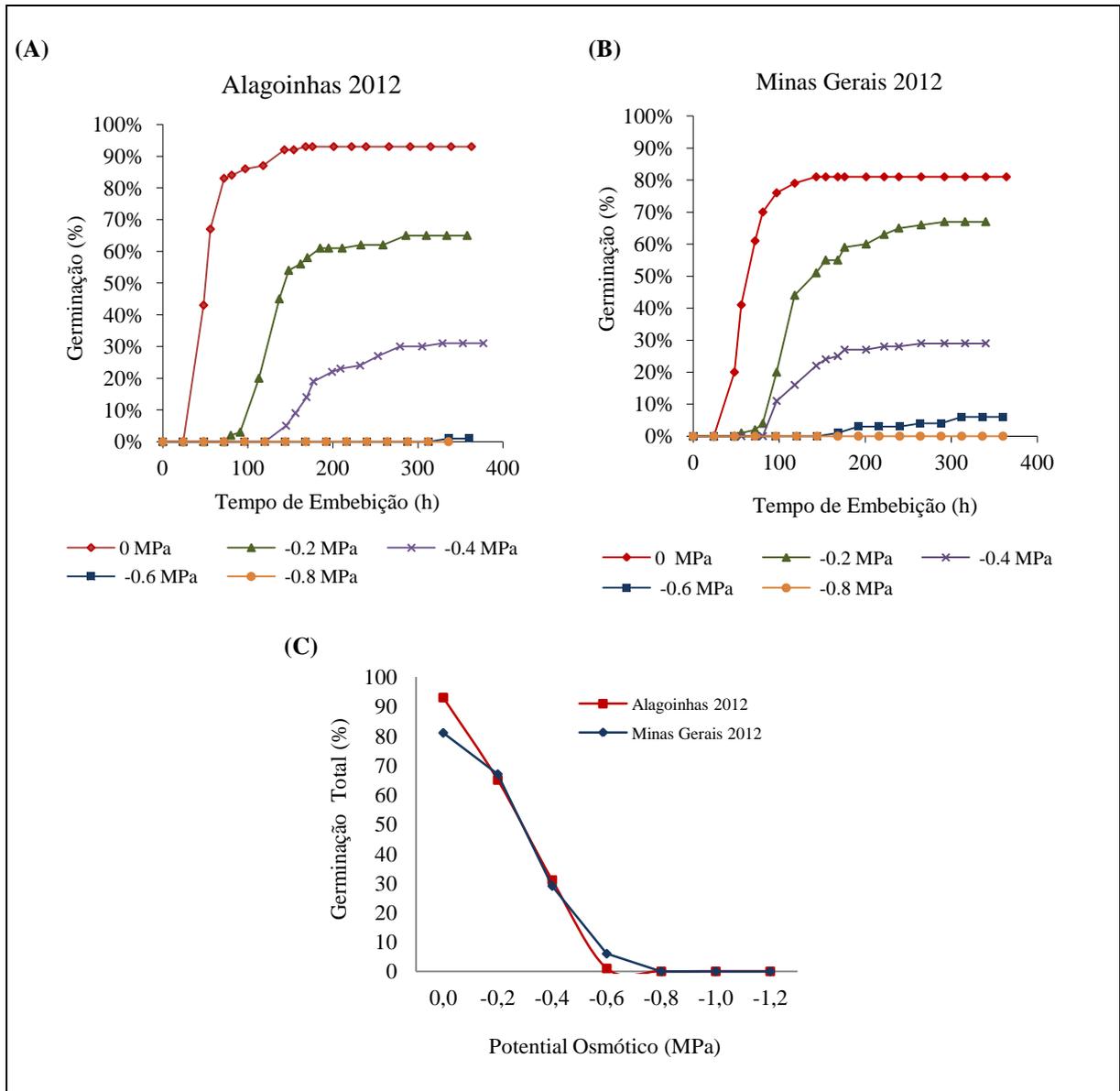
Avaliando a germinação de sementes de *J. curcas* sob os potenciais hídricos de 0,0; -0,3; -0,6 MPa a 30°C em cinco genótipos diferentes, Braga (2010) verificou que em -0,3 e -0,6 MPa a germinação foi nula para as sementes de todos os genótipos analisados, corroborando com os achados do presente estudo, o qual além de testar maior número de potenciais osmóticos, o tratamento controle apresentou uma boa germinabilidade. Enquanto no estudo desenvolvido por Braga (2010) os tratamentos controles dos cinco genótipos analisados apresentaram uma média de 50% de germinação, no presente estudo a média de germinação no tratamento controle dos dois genótipos analisados foi de 87%.

Silva et al. (2005) estudando o efeito do estresse hídrico sobre a germinação de sementes de faveleira (*Cnidoscolus juercifolius*), espécie também pertencente à família Euphorbiaceae, registraram a completa inibição da germinação a partir do potencial de -0,9 MPa, desta forma apresentando um limite de tolerância maior que o verificado em sementes de *J. curcas* no presente estudo.

Os dados apresentados demonstram o quanto o estresse hídrico pode reduzir significativamente o crescimento e o desenvolvimento de plantas *J. curcas*, pelo menos nos estágios iniciais do desenvolvimento e que a resistência a seca relatada por outros autores pode ser adquirida após a planta estar estabelecida no ambiente para assim ser capaz de suportar as condições adversas.

Um estudo investigando os efeitos comparativos de salinidade e estresse hídrico na fotossíntese, relações hídrica se no crescimento de plantas *J. curcas* verificou que apesar de ambas os estresses aplicados causaram reduções significativas no teor de clorofila, porém a atividade fotoquímica não foi afetada. Uma vez que, as plantas submetidas a estresses hídrico e salino mostraram uma recuperação rápida e quase completa, essas alterações fisiológicas pode representar um conjunto de mecanismos adaptativos utilizados por *J. curcas* para lidar com essas condições estressantes (SILVA et al., 2010).

Figura 11 – *Screening* osmótico conduzido com sementes de *Jatropha curcas* L. Genótipos Alagoíneas 2012 e Minas Gerais 2012. Restrição hídrica simulada com soluções de polietilenoglicol 8000 (PEG 8000) nos potenciais 0,0; - 0,2; -0,4; -0,6; -0,8; -1,0 e -1,2 MPa. (A) e (B) Curva de germinação nos diferentes potenciais testados; (C) Germinação total (%) nos diferentes potenciais por genótipos analisados.



3.6 EMBEBIÇÃO CONTROLADA (PRIMING)

Os resultados obtidos demonstraram que o *priming* não promoveu melhoria na germinação de sementes de *J. curcas* nas condições testadas. As sementes osmocondicionadas por 2 dias em solução de PEG 8000 apresentaram germinabilidade menor em relação ao controle em todas as temperaturas testadas quando transferidas para água e as sementes osmocondicionadas por 7 dias não germinou em nenhuma das temperaturas (Figura 12). Um efeito de envigoreamento foi verificado nas sementes osmocondicionadas por 2 dias a 40°C, condição na qual apesar de a germinabilidade total (39%) não ter sido diferente da controle (32%), as sementes germinaram mais rapidamente que as sementes que não foram submetidas ao *priming* (Tabela 3).

Tabela 3 - Germinação total das sementes de *Jatropha curcas* L. submetidas a embebição controlada durante 2 e 7 dias em solução osmótica a -0.6 MPa a 30°C. Genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012.

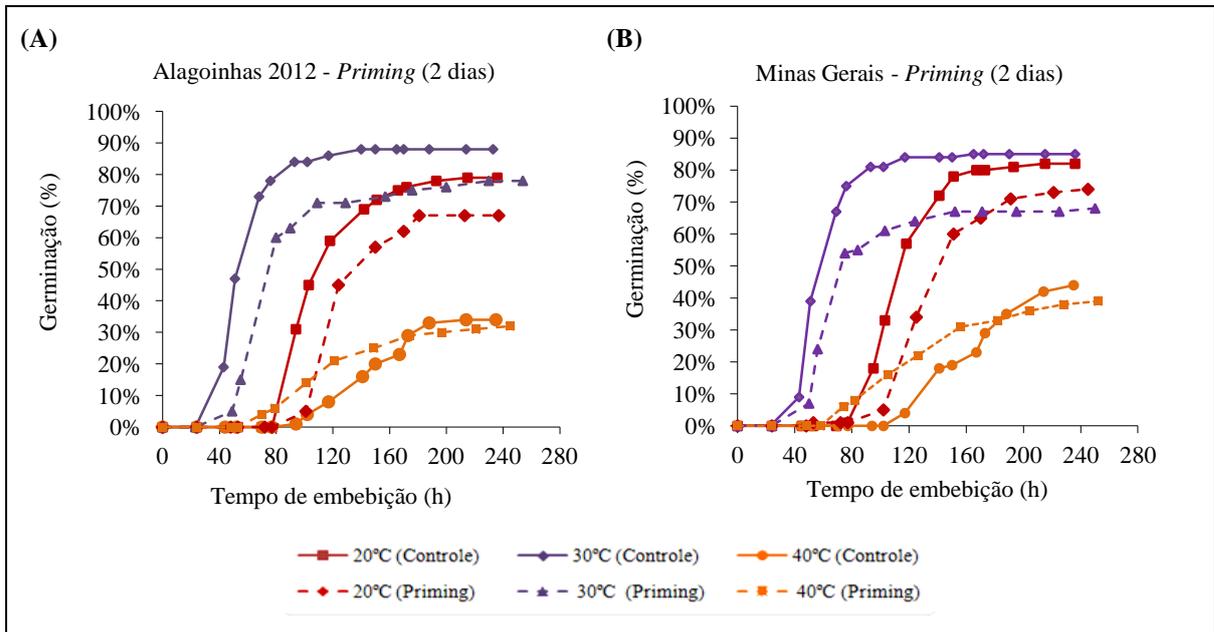
Tratamento	Alagoinhas 2012					
	Germinação Total (%)			T50 (dias)		
	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C
No <i>Priming</i>	79 ± 0.15a	88 ± 0.05a	34 ± 0.14a	102 ± 7.86a	52 ± 4.38a	144 ± 10.46b
<i>Priming</i> (2 dias)	67 ± 0.09a	78 ± 0.08a	32 ± 0.11a	119 ± 3.06b	70 ± 8.76b	104 ± 11.94a
<i>Priming</i> (7 dias)	6 ± 0.05b	10 ± 0.04b	0 b	**	**	**

Tratamento	Minas Gerais 2012					
	Germinação Total (%)			T50 (dias)		
	20°C	30°C	40°C	20°C	30°C	40°C
No <i>Priming</i>	82 ± 0.08a	85 ± 0.08a	44 ± 0.07a	108 ± 4.00a	54 ± 6.25a	162 ± 18.84b
<i>Priming</i> (2 dias)	74 ± 0.08a	68 ± 0.10b	39 ± 0.08a	128 ± 7.89b	63 ± 6.16a	118 ± 15.92a
<i>Priming</i> (7 dias)	0	10	0	**	**	**

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Brito (2010) osmocondicionou sementes de pinhão-manso de dois diferentes acessos sem solução de PEG 8000 a -0.8 MPa por sete dias e após este período reidratou sementes frescas e sementes secas (secagem pós condicionamento até obtenção de peso constante) e em ambos os tratamentos não verificou melhoria na germinação em nenhum dos acessos estudados. O condicionamento osmótico também não proporcionou melhoria na germinação de sementes de amendoim do campo (*Pterogyne nitens* Tul.), uma espécie nativa, porém pertencente à família Fabaceae (TONIN et al., 2005).

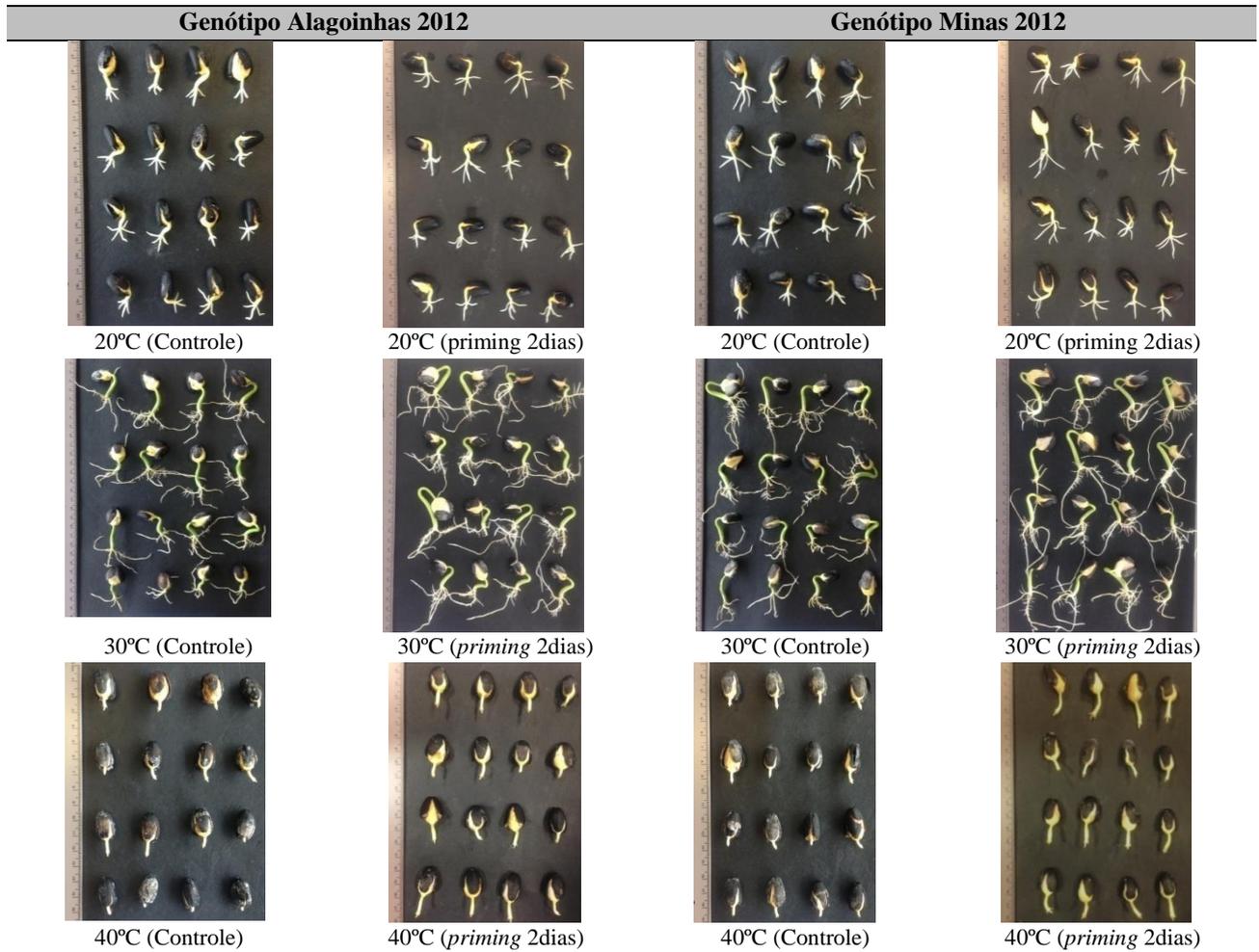
Figura 12 – Curva de germinação de sementes de *Jatropha curcas* L. com e sem *priming* nas temperaturas de 20, 30 e 40°C. (A) Genótipo Alagoinhas 2012 e (B) Minas Gerais 2012.



O condicionamento osmótico potencializou a germinação das sementes de tamborildamata (*Platymiscium pubescens* Micheli) durante o processo de embebição (LIMA E BORGES et al., 2002). Suñe et al. (2002), também verificaram incremento significativo na porcentagem de emergência e no índice de velocidade de emergência em sementes de babosa-do-brejo (*Adesmia latifolia* (Spreng.) Vogel.) condicionadas em solução de PEG 6000, quando comparada ao controle. O tratamento proporcionou aumento na porcentagem final, velocidade e uniformidade de germinação e crescimento das plântulas tanto em laboratório como em canteiros. Em sementes de pimentão (*Capsicum annuum* L.), o condicionamento osmótico foi influenciado tanto pelo período quanto pela temperatura e quando realizado em temperaturas mais elevadas, o desempenho das sementes foi favorecido, melhorando a qualidade fisiológica (ROVERI-JOSÉ et al., 2000).

Nas plântulas normais das sementes germinadas após o condicionamento osmótico é possível verificar que as plântulas cultivadas a 30°C apresentaram-se um pouco mais desenvolvidas em relação as plântulas do tratamento controle e que as incubadas a 40°C apesar de também não desenvolvem plântulas normais alongaram um pouco mais que as do tratamento controle e o T50 verificado foi maior que o controle (Tabela 3 e Figuras 12 e 13). Essas imagens podem ser um indicativo que mesmo que o condicionamento osmótico em termos de germinação não tenha melhorado em relação ao tratamento controle pode existir uma possibilidade do tratamento originar plântulas mais envigoradas e resistentes a seca que as sementes que não são tratadas.

Figura 13 - Plântulas de *Jatropha curcas* L. germinadas com e sem *priming* nas temperaturas de 20, 30 e 40°C. Genótipos Alagoinhas 2012 e Minas Gerais 2012.



Fonte: Fotos do autor

Ensaio de campo seriam bem indicados para a investigação desse potencial de envigoramento que a técnica de *priming* pode proporcionar e que já tem sido relatado na literatura em algumas culturas nas quais as sementes submetidas ao tratamento *priming* apresentaram, de um modo geral, maiores pesos médios de matéria seca. Trigo et al. (2000), por exemplo, verificaram que o condicionamento osmótico promoveu incrementos significativos no peso da matéria seca das plantas em relação às sementes que não foram submetidas ao *priming* para todos os genótipos de cebola estudados.

4 CONCLUSÕES

Sementes de *Jatropha curcas* L. apresentam em média 627.52 mm³ de volume, peso de mil sementes em torno de 646.48 g, podendo apresentar em média 0.65 g por semente. No presente estudo, os genótipos avaliados apresentaram boa qualidade e foi possível verificar que a redução do teor de água pode promover a melhoria da germinabilidade. A curva de embebição de água possibilitou caracterizar seu processo de germinação. A remoção do tegumento das sementes demonstrou que embora acelere a germinação pode produzir plântulas anormais. A temperatura ótima de germinação para as sementes dos genótipos avaliados foi 30°C, entretanto pode-se afirmar que semente de *J. curcas* germinam bem na faixa 25 à 35°C. Por outro lado, 40°C representa temperatura de estresse para a espécie. As sementes demonstraram ser sensíveis a restrição hídrica no estágio inicial do seu desenvolvimento. A embebição controlada (*priming*) não promoveu melhoria na germinação nas condições testadas, porém foi evidenciado uma melhoria em termos de desenvolvimento de plântula, sendo assim recomendado testar o *priming* na investigação do efeito deste no desenvolvimento de plântulas e resistência ao estresse em campo.

REFERENCIAS

ALBUQUERQUE, F.A. de et al. **Crescimento e Desenvolvimento do pinhão-mansão: 1º ano agrícola**, Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008. 21 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 197).

ANDRÉO-SOUZA, Y. A. R. A. et al. Efeito da salinidade na germinação de sementes e no crescimento inicial de mudas de pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n.02, p. 083-092, 2010.

ARRUDA, F.P. de et al. Cultivo de pinhão-mansão (*Jatropha curcas*L.) como alternativa para o semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, [S.l.], v.8, p.789-799, 2004.

BASKIN, C.C, BASKIN, J.M. Seeds, ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. **Academic Press**, New York, 1998.

BELTRÃO, N. E. M. de: CARTAXO, W. V. Considerações gerais sobre o pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras. CONGRESSO BRASILEIRO DE

PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. **Anais**. Varginha, 2006.

BEWLEY, D.D.; BLACK, A.M. **Seeds: physiology of development and germination**. New York: Plenum, 1994. 445, 4467p.

BRADFORD, K.J. Water relations on seed germination. In: KIGEL, J.; GALILI, G. **Seed development and germination**. New York: Marcel Dekker, 1995. 853 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p

BRITO, Cristiane Dantas de. **Germinabilidade de sementes de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) sob restrição hídrica: aspectos fisiológicos, moleculares e citológicos**. 2010. 51 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação -mestrado em Recursos Genéticos e Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2010.

BRAGA, Nathália da Silva. **Avaliação Fisiológica de Sementes de Pinhão**. 2010. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação - mestrado em Fitotecnia), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

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

DANTAS, B. F.et al.Tecnologia de Sementes de Pinhão-mansão (*Jatropha curcas*): Avaliações Iniciais da Qualidade Fisiológica. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DO BIODIESEL, 2., 2007, Brasília-DF, **Anais...** Brasília, 2007.

DE CASTRO, R.D. et al.**Germinação: Do Básico ao Aplicado**.Porto Alegre: Artmed. 2004. p.149-162.

DEBNATH, M, BISEN, P. S. *Jatropha curcas* L., a multipurpose stress resistant plant with a potential for ethnomedicine and renewable energy. **Curr Pharm Biotechnol**. [S.l.], v.9, n.4, p.288-306, 2008.

EVENCIO, T. Curva de absorção de água em sementes de pinhão-mansão (*Jatropha curcas*L.). **Revista Árvore**, [S.l.], v.35, n.2, p.193-197, 2011.

GAIROLA, K. C.; NAUTIYAL, A. R. E DWIVEDI, A. K.. Effect of Temperatures and Germination Media on Seed Germination of *Jatropha curcas* Linn. **Advances in Bioresearch**. [S.l.], v.2, Issue 2, p.66 – 71, dec.2011.

GUZMAN, L.E.P; AQUINO, A.L. Seed characteristics and storage behavior of physic nut (*Jatropha curcas*L.). **Philippine Journal of Crop Science**. [S.l.],v.34, n.1, p.13-21, 2009.

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

KERBAUY, G. B. **Fisiologia Vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

LABOURIAU, L. G. **A germinação da semente**. Washington: OEA, 1983.

LIMA JUNIOR, M.J.V. **Manual de Procedimentos para Análise de Sementes Florestais**. Manaus: UFAM, 2010.

LIMA E BORGES, E.E. et al. Comportamento fisiológico de sementes osmocondicionadas de *Platymiscium pubescens* Micheli (tamboril-da-mata). **Revista Árvore**, Viçosa, v. 26, n. 5, p. 603-613, 2002.

LOUREIRO, M. B. et al. Caracterização Morfoanatômica e Fisiológica de sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. (Euphorbiaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, v.37, n.6, p.1093-1101, 2013.

LOUREIRO, M. B. et al. Efeito do Estresse Hídrico Sobre a Germinação de Sementes Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Janaúba. **Anais...** Janaúba, 2007.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

MARTINS, C.C.; MACHADO, G.M.; CAVASINI, R. Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de pinhão-manso. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.32, n.3, p.863-868, 2008.

MELO, J. C. et al. Avaliação preliminar do potencial do pinhão-manso para a produção de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1, 2006, Brasília. **Anais...** Brasília: MCT/ ABIPTI, 2006, v. 2, p. 198-203.

MORAIS, Ellen Bárbara Santos Domingues. **Padronização do teste de germinação e qualidade de sementes de Pinhão-Manso (*Jatropha curcas* L.) durante o armazenamento**. 103 f.: Il. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação - Mestrado em Produção Vegetal no Semiárido). Universidade Estadual de Montes Claros – Unimontes. Janúba, MG: Unimontes, 2008.

MOTA, L.H.S. et al. Efeito da temperatura e tratamentos pré-germinativos na germinação e vigor de plântulas de *Jatropha curcas* L. **Biotemas**, Florianópolis, v.25,n.3, p.29-37, 2012.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNADES, G. D. **Fatores Externos (ambientais) que Influenciam na Germinação de Sementes**. Informativo Sementes IPEF - Abril 1998. Disponível em: <<http://www.ipef.br/tecsementes/germinacao.asp>> acesso em: 27.03.2014.

NEVES, J. M. G. et al. Padronização do teste de germinação para sementes de pinhão-manso. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 22, n. 4, p. 76-80, 2009.

NIU, G. et al. Responses of *Jatropha curcas* to Salt and Drought Stresses. **International Journal of Agronomy**. [S.l.], 2012.

NUNES, U. R.; NUNES, S. C. P. Germinação de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L. Euphorbiaceae). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SEMENTES, 15, 2005, Foz do Iguaçu. **Resumos...** Foz do Iguaçu: Abrates, 2005.

PEREIRA, M.D. et al. Physiological quality of physic nut (*Jatropha curcas* L.) seeds during storage. **Journal of Seed Science**, [S.l.], v.35, n.1, p.21-27, 2013

PIMENTA, A. C. et al. Curva de absorção de água em sementes de pinhão-manso. **Comunicata Scientiae**, [S.l.], v. 5, n. 3, p. 295-301, 2014.

PURCINO, A.A.C; DRUMMOND, O.A. **Pinhão-manso**. Minas Gerais: Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais, 1986, 7p.

ROVERI-JOSÉ, S. C. B., VIEIRA, M., & GUIMARÃES, R. Efeito da temperatura e do período de condicionamento osmótico na germinação e no vigor de sementes de pimentão. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 22, n. 2, p. 176-184, 2000.

SANTOS, A. P. dos; CARVALHO, C. C. N. de; SOUZA, E. dos A. Caracterização ambiental e levantamento detalhado dos solos da área da estação experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola e Universidade do Estado da Bahia - Campus II - Alagoinhas. Salvador: EBDA, 2007. 24 p.

SATURNINO, H. M. et al. **Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)**. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

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. **Embrapa Algodão, Comunicado Técnico**, [S.l.], n.309, p.3-4, 2006.

SILVA, L. M. de M. et al. Estresse hídrico e condicionamento osmótico na qualidade fisiológica de sementes de *Cnidocolus juercifolius*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.9, n.1, p.66-72, 2005.

SILVA E. N. et al. Comparative effects of salinity and water stress on photosynthesis, water relations and growth of *Jatropha curcas* plants. **J Arid Env**, [S.l.], n.74, p.1130–1137, 2010.

SUÑÉ, A.D.; FRANKE, L.B.; SAMPAIO, T.G. Efeitos do condicionamento osmótico na qualidade fisiológica de sementes de *Adesmia latifolia* (Spreng.) Vog. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v.24, n.1, p.18-23, 2002.

TONIN, G. A. et al. Influência da temperatura de condicionamento osmótico na viabilidade e no vigor de sementes de *Pterogyne nitens* Tull. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.27, n.2, p. 35-43. 2005.

TRIGO, M.F.O.O.; NEDEL, J.L.; TRIGO, L.F.N. Condicionamento osmótico em sementes de cebola: II. Efeitos sobre o vigor. **Revista Científica Rural**, Bagé, v.5, n.2, p.01-11, 2000.

VANZOLINI, S. et al. Qualidade sanitária e germinação de sementes de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.32, p.9-14, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n4/01.pdf>> Acesso em: 12 mar. 2014.

WINDAUER, LILIANA B. et al. Germination responses to temperature and water potential in *Jatropha curcas* seeds: a hydrotime model explains the difference between dormancy expres-

sion and dormancy induction at different incubation temperatures. **Annals of Botany**, n.109, p.265–273, 2012.

WORANG, R. L. et al. The Quality PHYSIC (*Jatropha curcas L.*) seeds packed in plastic material during storage. **Biotropia**, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 25-36, 2008.

CAPÍTULO III

MORFOMÉTRIA E FISILOGIA DE SEMENTES DE *Jatropha curcas* L. ASSOCIADAS ÀS VARIAÇÕES DE IMAGENS DE RAIOS X.

RESUMO

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), é uma espécie de uso múltiplo, popularmente conhecida como pinhão-manso. É uma planta muito difundida em todas as regiões tropicais árido e semi-áridas do mundo. Atualmente representa umas das espécies promissoras para produção de biodiesel por apresentar sementes ricas em óleo. A espécie apresenta uma alta variabilidade genética e avaliações morfométricas de sementes e plântulas, teor de água e peso das sementes, assim como análises de imagens constitui parâmetros que contribuem para esta área de investigação além de auxiliar na avaliação da qualidade de genótipos. Este estudo objetivou avaliar parâmetros morfométricos e fisiológicos, associando estes com resultados obtidos em teste de raios X em diferentes genótipos de sementes de *J. curcas*, possibilitando uma análise comparativa da qualidade dos genótipos avaliando os possíveis danos e o efeito desses na germinação. Além disso, pretenderam-se demonstrar a possibilidade de uma avaliação diferenciada das imagens radiográficas e a construção de um padrão de imagens, associadas ao desenvolvimento fisiológico da planta que auxilie de forma prática nas análises de imagens. Os resultados obtidos demonstraram a eficiência dos parâmetros na avaliação de características físicas, morfológicas e fisiológicas de sementes e plântulas de *J. curcas*. A técnica de raios X contribuiu como indicativo do potencial de viabilidade e possibilitou a construção dos padrões de imagem para análise de testes de raios X para sementes de *J. curcas*.

Palavras-chave: Pinhão-manso. Morfologia. Fisiologia. Radiografia.

MORPHOMETRY AND PHYSIOLOGY OF *Jatropha curcas* L. SEEDS ASSOCIATED WITH VARIATIONS OF IMAGES X-RAY

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae), a species of multiple use and popularly known as physic nut, is a plant widely spread in all tropical arid and semi-arid regions of the world. It currently is one of the promising species for biodiesel production by presenting seeds rich in oil. The species has a high genetic variability and morphometric reviews by seeds and seedlings, moisture content and seed weight, as well as image analysis are parameters that contribute to this area of research and assist in quality evaluation of lots. This study aimed to evaluate morphometric and physiological parameters associating the latter with results from X-ray testing in different seed lots of *J. curcas*, enabling a comparative analysis of the quality of lots and evaluating potential damage and its effect on germination. In addition, it was intended to demonstrate the possibility of a differentiated evaluation of radiographic images and building a pattern of images associated with the physiological development of the plant to assist in a practical way in image analysis. The results demonstrated the efficiency of the parameters in the evaluation of physical, morphological and physiological characteristics of seeds and seedlings of *J. curcas*. The X-ray technique formed an indicator of seed quality and enabled the construction of the image patterns for X-ray analysis testing of *J. curcas* seeds.

Keywords: Physic nut. Morphology. Physiology. Radiograph.

1 INTRODUÇÃO

Jatropha curcas L., espécie vegetal pertence á familia Euphorbiaceae, popularmente conhecida como pinhão-manso, é uma planta perene de crescimento arbustivo, podendo chegar até quatro metros de altura (VANZOLINI et al., 2010). A espécie é caracterizada por sua rusticidade, sendo considerada resistente á seca e pouco suscetível a pragas e doenças. É uma planta muito difundida em todas as regiões tropicais árido e semi-áridas do mundo, sendo utilizada na medicina popular por apresentar uma fonte de metabólicos secundários de importância medicinal. As suas sementes são ricas em óleo e possuem características desejáveis para a produção de biodiesel. Além disso, a recuperação de terrenos baldios e terras secas também são possíveis com o cultivo de *J. curcas*. Por esta razão, a espécie apresenta alto potencial comercial, tanto para produção de bio-energia quanto para a indústria de biofármacos (MELO et al., 2006; DEBNATH e BISEN, 2008).

O pinhão-manso pode apresentar uma alta variabilidade genética, em função apresentar altos índices de polinização cruzada, principalmente se as plantas são cultivadas por sementes. Sendo assim, o local de procedência das sementes pode interferir nas características fisiológicas como a germinação, além da produtividade e qualidade de óleo (ABREU et al., 2009). Já foram constatadas diferenças genéticas na quantidade de óleo e desempenho de crescimento entre sementes de *J. curcas* de diferentes procedências na Índia (GINWAL et al., 2004), assim como, divergências na morfologia da semente, germinação e características de crescimento das plântulas (GINWAL et al., 2005). No Brasil, Abreu et al. (2009) também verificaram variabilidade genética ao estudar 10 acessos de pinhão-manso de diferentes estados do país. Neste contexto, a alta variabilidade genética e a falta de cultivares desenvolvidas para a espécie perfazem um dos principais impasses para que os pesquisadores cheguem a um consenso sobre os padrões ideais de análise de sementes da espécie e até o momento não constam nas Regras de Análise de Sementes (BRASIL, 2009) recomendações e prescrições para avaliar as sementes de pinhão-manso.

A avaliação da morfologia interna de sementes é imprescindível tanto para a caracterização de espécies pouco estudadas quanto para a melhoria da qualidade de genótipos de sementes, no que se diz respeito ao seu atributo físico e fisiológico, visto que a informação sobre a existência de sementes defeituosas e vazias é desejável porque esta pode influenciar nos resultados dos testes de germinação (GOMES JUNIOR, 2010). Além da morfologia interna, avaliações morfométricas de sementes e plântulas, mesmo em estádios iniciais do

desenvolvimento germinativo, assim como aspectos como o teor de água e peso das sementes constituem parâmetros que contribuem positivamente nessas avaliações.

Imagens radiográficas têm grande aplicabilidade no controle de qualidade de sementes, envolvendo danos mecânicos, danos causados por insetos, danos causados por secagem, danos por umidade e morfologia interna (CICERO, 2010). Nesse contexto, a análise de imagens para a avaliação da morfologia interna de sementes, além de não danificar as sementes e possibilitar o exame da sua estrutura, relacionando com outros testes, contribui para a consistência das informações, pois os procedimentos podem ser reproduzidos sem a interferência humana (GOMES JUNIOR, 2010).

Outra ferramenta na análise de sementes são os testes de germinação, que fornecem informações sobre o potencial de uma amostra para germinar sob condições ótimas de ambiente (MARCOS FILHO, 1999), sendo assim possível avaliar a qualidade fisiológica das sementes. O potencial de desempenho das sementes está expresso nas características genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias (MARCOS FILHO, 2005) e os testes de germinação podem funcionar como um instrumento de resposta da expressão dessas características.

A captura e o processamento de imagem radiográfica têm permitido estabelecer-se relações entre integridade, morfologia e determinação do potencial fisiológico das sementes (MARCOS FILHO et al., 2010). Sendo assim, a análise da eficiente na avaliação da morfologia interna de sementes através de teste de raios X e sua relação com o potencial fisiológico por meio de teste germinação têm sido desenvolvidas com resultados positivos em várias espécies como: *Tabebuia heptaphylla*, *Terminalia argentea*, *Bowdichia virgilioides*, diferentes espécies de Lauraceae (*Ocotea pulchella*, *Persea pyrifolia*, *Nectandra grandiflora*, *Nectandra lanceolata* e *Nectandra nitidula*), assim como em *Ricinus communis*, espécie pertencente a mesma família da *J. curcas* (ALBUQUERQUE et al., 2008; CARVALHO et al., 2009; CARVALHO et al., 2010; DO AMARAL et al., 2011; GOMES et al., 2014), demonstrando ser uma ótima ferramenta para prever o desempenho de plântulas e selecionar sementes de alta qualidade.

Estudos com *J. curcas* investigando parâmetros de biomassa e mensuração das dimensões da semente já foram desenvolvidos e os resultados apresentam diferenças nessas medidas a depender do lote ou genótipo estudado (DAGAR et al., 2004; AQUINO et al., 2009; CHRISTRO et al., 2012). O estudo da eficiência dos testes de tetrazólio e de raios X para a avaliação da viabilidade de sementes desta espécie também foi desenvolvido, com

posterior realização de teste de germinação, a fim de se relacionar os resultados obtidos nesses dois testes (PINTO et al., 2009).

O teste de raios X recomendado internacionalmente pela ISTA – “International Seed Testing Association” (2009) e no Brasil pelas RAS – Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009), é considerado um método simples, rápido e não destrutivo que tem como objetivo avaliar a morfologia interna das sementes, permitindo a visualização de sementes vazias, cheias, mal formadas, com danos mecânicos ou ataques de insetos e fungos, possibilitando a detecção de anormalidades no embrião, além do seu estágio de desenvolvimento (SIMAK e GUSTAFSSON, 1953; SIMAK et al., 1989; BINO et al., 1993; BATTISTI et al., 2000). Desse modo, a técnica pode ajudar na triagem das sementes com alta e baixa qualidade (DELL'AQUILLA, 1992; VAN DER BURG et al., 1994), permitindo a seleção de genótipos em programas de controle da qualidade, aumentando assim a eficiência do sistema de produção.

A viabilidade das sementes submetidas ao comprimento de onda dos raios X não é comprometida devido às baixas intensidades utilizadas, possibilitando a realização de testes adicionais com a mesma semente (BINO et al., 1993; ISTA, 1995). Desta forma, a interpretação da análise do teste de raios X, e sua comparação com os resultados de testes paralelos de germinação permitem associar a integridade de partes vitais da semente ao seu potencial fisiológico, podendo fornecer informações precisas da qualidade do lote.

Diante do exposto, o presente estudo objetivou avaliar parâmetros morfométricos e fisiológicos associando estes como resultados obtidos em teste de raios X em diferentes genótipos de sementes de *Jatropha curcas* L., possibilitando assim uma análise comparativa da qualidade dos genótipos avaliando os possíveis danos internos e o efeito desses na germinação das sementes. Além disso, pretende-se demonstrar a possibilidade de uma avaliação diferenciada das imagens radiográficas e a construção de um padrão de imagens associadas ao desenvolvimento fisiológico da planta que auxilie de forma prática nas análises de imagens radiográficas em sementes de *Jatropha curcas* L.

2 METODOLOGIA

Os estudos foram conduzidos no laboratório do Millenium Seed Bank Building, localizado no Royal Botanic Gardens – Kew (RBG Kew, Wakehurst Place), Inglaterra, UK.

2.1 MATERIAL VEGETAL

O estudo foi desenvolvido com três genótipos de sementes de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão), sendo dois genótipos provenientes de estados da região nordeste (Bahia e Alagoas) e um da região sudeste (Minas Gerais) do Brasil. Um dos genótipos de sementes foi coletado de matrizes cultivadas na estação experimental da Empresa Baiana de Desenvolvimento Agrícola – EBDA (Genótipo Alagoinhas 2012), localizada no município de Alagoinhas–BA, e as sementes coletadas em setembro de 2012; outro genótipo foi recebido pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG (Genótipo Minas Gerais 2012), e as sementes foram coletadas em campo experimental localizado no município de Oratórios entre fevereiro e abril de 2012. O outro genótipo foi procedente do estado de Alagoas (Genótipo Alagoas 2013), e as sementes coletadas no período de Junho/Julho de 2013. Foi acessado o banco de dados meteorológicos do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET (<http://www.inmet.gov.br>) para obtenção das condições climáticas das áreas de coleta.

2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS E MORFOMÉTRIA

Para obtenção de uma caracterização geral dos genótipos de estudo determinou-se o peso de mil sementes e o grau de umidade (teor de água) dos diferentes genótipos de sementes utilizando o método de secagem em estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, sendo os cálculos realizados com base no peso úmido e os resultados expressos em porcentagem, seguindo a metodologia descrita na Regra para Análise de Sementes - RAS (BRASIL, 2009).

Realizaram-se ainda pesagens individualizadas de 100 sementes de cada genótipo com uso de balança analítica e obtiveram-se medidas biométricas do comprimento, largura e espessura (mm) de cada uma das sementes com auxílio de paquímetro digital. Com as medidas biométricas coletadas calculou-se a área e o volume de cada semente a fim de se comparar os dados morfométricos obtidos conjuntamente com os dados das imagens radiográficas. Para calcular a área e o volume de cada semente utilizaram-se respectivamente as fórmulas:

$$S = \pi * (\text{comp.}/2) * (\text{larg.}/2) \text{ e } V = \pi * (\text{comp.}/2) * (\text{larg.}/2) * (\text{espess.}/2).$$

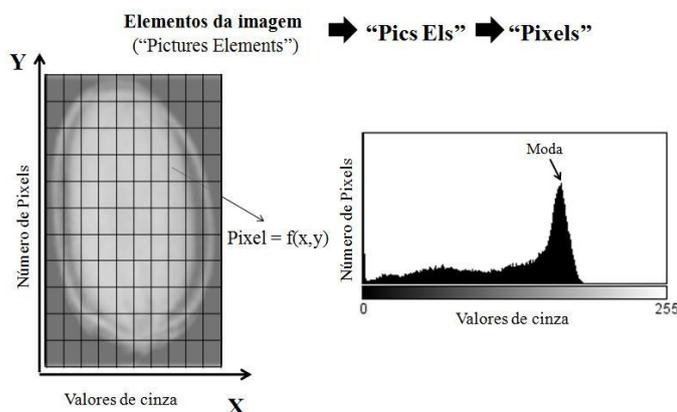
Cada semente pesada e medida foram devidamente numeradas e dispostas em caixas de acrílico compartimentadas, de maneira que pudessem, posteriormente, ser identificadas na captura das imagens radiográficas e na condução do teste de germinação. Desta forma utilizaram-se 5 caixas contendo 20 sementes cada, perfazendo uma amostragem de 5 repetições de 20 sementes por genótipo.

2.3 TESTE DE RAIOS X

As caixas acrílicas contendo as sementes dispostas como descrito acima foram colocadas no aparelho de raios X digital para captura das imagens. O aparelho utilizado foi o Faxitron MX20 (Quadi, Sandhurst, UK). As sementes foram radiografadas com intensidade de radiação de 22 kV por 20 segundos. As imagens foram analisadas com auxílio do software ImageJ (versão 1.47t, Java 1.6.0_20; <http://imagej.nih.gov/ij>), para análise de histogramas (distribuição de frequência), a fim de se obter dados numéricos gerados a partir das imagens possibilitando uma análise quantitativa comparável com os outros parâmetros mensurados.

Neste estudo, coordenadas de pixels das imagens foram utilizadas a partir dos histogramas de cada semente radiografada gerados com auxílio do *software* “ImageJ” versão 1.47t. (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). Os histogramas contêm as coordenadas: valores de cinza (x) X número de pixels (y). Os valores de cinza são determinados pelas frequências de valores de pixels e variam de 0 (preto) a 255 cores (branco), por isso também conhecida escalas ou tons de cinza. Desta forma, foi capturado os valores para os parâmetros “Moda_IJ” e “Max_IJ”, que foram analisados e comparados conjuntamente com os outros parâmetros (Figura 1).

Figura 1 - Ilustração do método de análise por coordenadas de Pixels utilizada para análise das imagens radiográficas das sementes de *Jatropha curcas* L.



Fonte: Ilustração do autor

“Moda_IJ”, representa o ponto que contém o valor de moda da distribuição (pico) de cores da escala de cinza expresso no histograma. Este valor corresponde a um dos valores da escala de cinza que contém as 256 cores. A partir dos valores representados no histograma da imagem radiográfica de cada semente foi calculada a dispersão dos valores e depois de removido o *background* foi possível determinar que ponto produziu o maior valor. “Max_IJ” é o número máximo de pixels no ponto que tem o valor de moda depois de removido *background*.

2.4 TESTE DE GERMINAÇÃO APÓS RAIOS-X

As sementes irradiadas foram submetidas ao teste de germinação para avaliar a germinabilidade dos genótipos, o desenvolvimento inicial das plântulas e possibilitar a correlação das imagens radiográficas com o desenvolvimento fisiológico e a construção dos padrões de imagem para análise de testes de raios X para espécie.

Para o teste de germinação foi mantido o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com cinco repetições de 20 sementes, conduzido em germinadores com temperatura ajustada para 30°C e com fotoperíodo de 8 horas. A temperatura de 30°C foi selecionada previamente como melhor temperatura de germinação para os três genótipos aqui analisados. As sementes foram colocadas para germinar em caixas de acrílico retangular mantendo-se as numerações das sementes na tampa para posteriormente ser possível relacionar os resultados de germinação com as imagens de raios X. Utilizou-se como substrato agar 1% (um gel de 99%

de água). As avaliações foram realizadas diariamente durante 10 dias e as plântulas normais e anormais contabilizadas, retiradas do teste e fotografadas no 7º dia. Sementes não germinadas também foram contabilizadas. As porcentagens de germinação obtidas foram atribuídas aos dados de caracterização dos genótipos. Imagens das etapas da metodologia utilizada neste estudo podem ser visualizadas na figura 2.

Figura 2 - Metodologia para as análises morfométricas, fisiológicas e radiográficas em sementes de *Jatropha curcas* L. (A) Biometria; (B) Pesagens individualizadas; (C) Montagem das sementes na placa acrílica; (D) Máquina de Raios X; (E) Imagens radiográficas digitais obtidas; (F) Teste de germinação em Agar 1%; (G) e (H) Desenvolvimento das plântulas; (I) Plântulas ao 10º dia após semeadura.



Fonte: Fotos do autor.

2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis utilizadas na caracterização dos lotes utilizou-se o teste t de Student e para comparação de médias o teste de Scott-Knott. Para as variáveis morfométricas (comprimento, largura, espessura, área e volume) e as geradas a partir da análise das imagens de raios X (Max_IJ e Moda_IJ) utilizou-se para a análise de variância o teste de ANOVA por Kruskal-Wallis e para comparações múltiplas (testes de significância) o teste de Mann-Whitney. Todos ao nível de 5% de significância. Com os parâmetros morfométricos citados e os dados correspondentes ao Max_IJ, Moda_IJ e tempo de protrusão da radícula (germinação), realizou-se também análise de correlação de Spearman a 5% de probabilidade para verificar a relação daintensidade entre as variáveis analisadas.

No teste de germinação, os resultados foram expressos em porcentagem e os valores das taxas de germinação (T50) e uniformidade (T80-20) foram estimadas com auxílio do software Origin versão 6.1 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Essas variáveis também foram analisadas pelos testes de Shapiro-Wilk, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney.

As análises estatísticas foram realizadas empregando os softwares Sisvar (versão 5.3) (FERREIRA, 2011) e *Genstat* versão 14 (VSN International Ltd., Hemel Hempstead, UK).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS GENÓTIPOS E MORFOMETRIA

Os dados referentes à caracterização dos genótipos podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1⁶ - Caracterização de sementes de genótipos de *Jatropha curcas* L

Parâmetros	Genótipos			Média Geral	CV (%)
	Alagoinhas 2012	Minas Gerais 2012	Alagoas 2013		
Comprimento (mm)	17,3 ± 0,9 c	18,0 ± 0,9 a	17,7 ± 1,0b	17,7	5,1*
Largura (mm)	10,8 ± 0,5 a	10,7 ± 0,6 a	10,6 ± 0,5a	10,7	4,9 ^{ns}
Espessura (mm)	8,3 ± 0,4 b	8,5 ± 0,5 a	8,5 ± 0,6a	8,4	6,1*
Volume (mm ³)	605,9 ± 68,3 b	646,2 ± 74,8 a	630,5 ± 89,2a	627,5	12,4*
Peso / sementes (g)	0,6 ± 0,1b	0,7 ± 0,1a	0,7 ± 0,1a	0,7	18,3*
Peso de mil sementes (g)**	0,6 ± 0,1b	0,7 ± 0,1a	0,7 ± 0,1a	0,7	18,3*
Teor de água (%)	5.7 ± 0.1b	5.5 ± 0.1 a	6.0 ± 0.1 c	5.70	5.70*
Germinação Total(%)	93 a	83 a	83 a	86	8.12 ^{ns}

⁶*significativo a 5%, ns – não significativo para o teste F.

**Peso de mil não tem comparação de média, pois não foi realizada em repetições (seguiu recomendações das RAS).

Médias seguidas pelas mesmas letras na linha não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de significância.

Para as variáveis morfométricas das dimensões obtidas, apenas para largura não houve diferença estatística. Para o comprimento houve diferença entre três genótipos, porém quanto ao volume só houve diferença no genótipo Alagoinhas 2012 em relação aos outros dois genótipos, com menor volume, e conseqüentemente menor peso individual o que refletiu também num menor peso de mil sementes. Entretanto, estes parâmetros parecem não ter interferido na qualidade fisiológica das sementes do genótipo Alagoinhas 2012 que apresentou maior germinabilidade (93%) quando comparada com a dos genótipos Minas Gerais 2012 e Alagoas 2013, ambos com 83% de germinação, demonstrando assim uma boa qualidade dos mesmos.

Se tomarmos como base as médias gerais obtidas, é possível inferir que, em geral, sementes de *J. curcas* apresentam média de 17,67 mm de comprimento, 10,70 mm de largura e 8,42 mm de espessura. Podem apresentar em média 627,52 mm³ de volume por semente. Cada semente de *J. curcas* pode pesar em média 0,65g e o peso de mil sementes pode variar de genótipo para genótipo em função das dimensões e peso individual das sementes contidas no lote, os quais em geral apresentam em média de 646,48g.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com alguns achados, como as correlações entre as mensurações unidimensionais em sementes de *J. curcas* procedentes de Pernambuco (PE), Minas Gerais (MG) e Mato Grosso do Sul (MS) com a biomassa. As sementes de pinhão-manso apresentaram diferenças significativas quanto às medidas externas e de biomassa (AQUINO et al., 2009). Sementes de pinhão-manso da Índia com diferentes pesos, que variaram de 100 a 800 mg, foram avaliadas quanto à germinação, e se verificou melhores porcentagens de germinação para as sementes maiores de 600 mg (DAGAR et al., 2004). Christro et al. (2012; 2014) investigaram sementes de diferentes genótipos de *J. curcas* e verificaram diferenças significativas entre os genótipos. Nos 20 genótipos estudados, Christro et al. (2014) encontraram uma média de 647,76 g para o peso de mil sementes, valor bem próximo ao apresentado neste estudo (646,5 g).

As sementes dos genótipos avaliados apresentaram uma média de 5,7% de teor de água e as médias verificadas diferiram entre si para todos os genótipos. Esse teor de água sugere a boa garantia da condição para a conservação da viabilidade das sementes em câmara seca (15°C, 15% UR). Segundo Joker e Jepsen (2003), as sementes de *J. curcas* são ortodoxas e podem ser secas até um baixo teor de água (5-7%). Zonta et al. (2011) secaram sementes de *J. curcas* por diferentes métodos de secagem e armazenaram os genótipos a serem estudados até o teor de água final de 9,9% (nas sementes secas na sombra), 8,8% (nas secas no sol), 8,5% (nas secas em estufa com ventilação a 33°C) e 8,3% (nas secas em

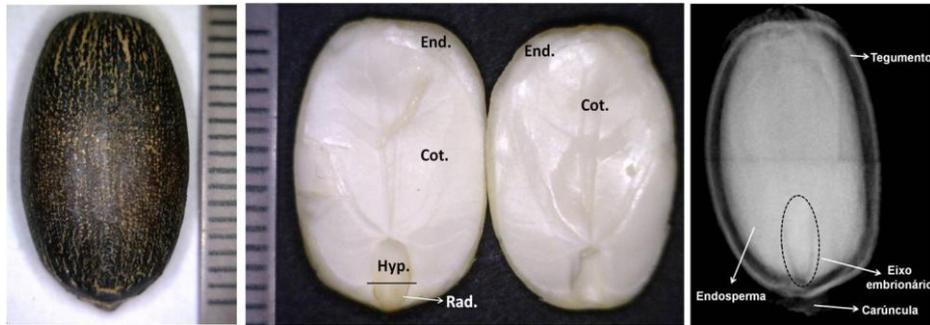
estufa com ventilação a 43°C). Com exceção das sementes secas a sombra, os teores de água atingidos nos outros métodos de secagem mantiveram a viabilidade das sementes.

3.2 MORFOMETRIA, RAIOS-X E FISILOGIA DAS SEMENTES.

Além dos dados morfométricos, a utilização da análise de raios X demonstrou ser eficiente na avaliação de características físicas, morfológicas e fisiológicas de sementes de *J. curcas*.

As imagens obtidas possibilitaram visualizar as estruturas essenciais da semente de *J. curcas*, apesar dos cotilédones não serem visíveis na imagem radiográfica por estarem totalmente envolvidos pelo endosperma, que é um tecido altamente denso (Figura 3). O mesmo aspecto é verificado nas imagens de *J. curcas* no estudo realizado por Pinton et al. (2009) ao utilizar intensidade de radiação de 25 Kv por 60s, assim como verificaram Carvalho et al. (2010) em sementes de *Ricinus communis* L. (mamona), também uma semente endospermática, no qual testou-se intensidade de radiação de 20 a 50 Kv e tempo de exposição de 15 a 75 segundos. Isso demonstra que independente da intensidade de radiação e tempo de exposição este é um padrão de imagem obtida em sementes que apresentam endosperma (endospermadas), órgão que, além dos cotilédones, também apresenta grande acúmulo de reservas as quais proporcionam este aspecto denso, e que é possível ser visualizados nos outros estudos com sementes sem endospermas (exospermadas).

Figura 3- Morfologia de sementes de *Jatropha curcas* L. (1) Imagem fotográfica da semente; (2) imagem fotográfica (em lupa) da semente destacando as estruturas internas; (3) Imagem radiográfica da semente destacando as partes internas visíveis por raios X.



Fonte: Fotos do autor.

Os parâmetros moda (Moda_IJ) e máximo pixel (Max_IJ) gerado em torno do valor da moda foram adicionados as análises juntamente às variáveis tempo de protrusão radicular (Prot_Rad), aos quais, com os parâmetros morfométricos realizou-se análise de correlação (Spearman) (Tabela 2).

Para a maioria dos parâmetros verificou-se correlação significativa, porém a intensidade do relacionamento dos coeficientes para alguns apresentou correlação positiva forte e em alguns casos positiva moderada, a exemplo das variáveis relacionadas a peso e as dimensões das sementes.

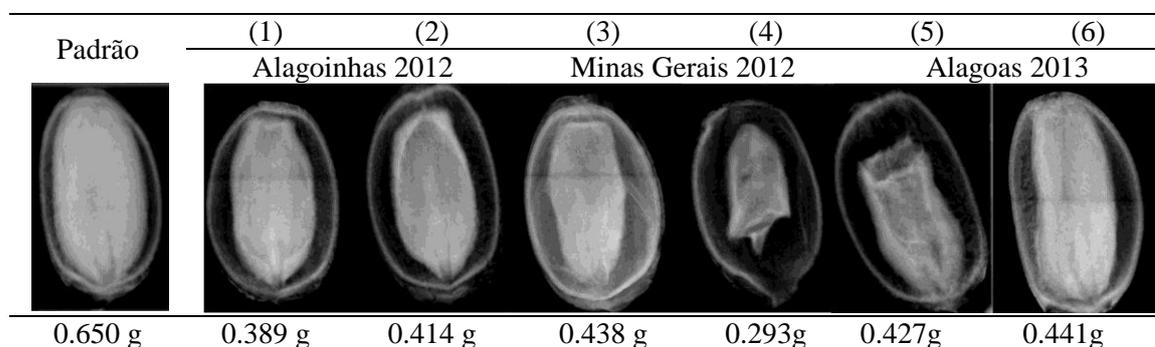
Moda_IJ e Max_IJ apresentaram correlação positiva e moderada, porém significativa em relação ao peso, indicando que o valor modal pode representar o enchimento de grãos, efeito que se reflete no peso da semente. Esta correlação juntamente com as imagens de raios X e germinação, indica que as sementes de menor peso, em média de 0,487g ou menos, podem corresponder a sementes inviáveis, em função da má formação do embrião (embrião atrofiado), o qual visualmente verifica-se pouco denso (Figura 4), onde todas as sementes são menores que o padrão para sementes viáveis da espécie. No caso das imagens de raios X verifica-se que normalmente essas sementes de menos peso apresentam valores menores de Moda_IJ e Max_IJ em relação aos verificados nas sementes que germinaram, onde os valores destes parâmetros foram maiores e estatisticamente significativo em relação aos valores encontrados para as sementes que não germinaram (Figura 4A e 4B). É importante destacar também que o Max_IJ mostrou uma melhor correlação com o tempo de protrusão da raiz, demonstrado que normalmente as sementes mais cheias tendem a germinar mais rapidamente, provavelmente em função da qualidade fisiológica das mesmas.

Tabela 2- Matriz de correlação com valores do coeficiente de Spearman⁷ das variáveis morfométricas (peso, comprimento, largura, espessura, área e volume da semente), radiográficas (Moda e Máximo pixel) e fisiológicas (tempo para protrusão radicular) analisadas.

	Peso (g)	Comp. (mm)	Larg. (mm)	Esp. (mm)	Área (mm ²)	Vol. (mm ³)	Moda_IJ	Máx_IJ	Prot. Rad. (h)
Peso (g)	1								
Comp. (mm)	0.605*	1							
Larg. (mm)	0.359*	0.335*	1						
Espes. (mm)	0.727*	0.556*	0.289*	1					
Área (mm ²)	0.576*	0.835*	0.768*	0.522*	1				
Vol.(mm ³)	0.742*	0.825*	0.627*	0.815*	0.899*	1			
Moda_IJ	0.483*	0.166*	0.081 ^{ns}	0.425*	0.139 ^{ns}	0.304*	1		
Máx_IJ	0.392*	0.150*	0.045 ^{ns}	0.134*	0.118*	0.153*	0.319*	1	
Prot. Rad. (h)	-0.131*	0.102 ^{ns}	0.207*	0.125 ^{ns}	0.191*	0.198*	-0.191*	-0.335*	1

Fonte: Pesquisa da autora

Figura 4 - Sementes de *Jatropha curcas* L. com peso diferenciado em função do conteúdo interno da semente. Sementes de menor peso em relação à média estimada para a espécie podem corresponder a sementes não viáveis. Semente Padrão (germinou); Sementes (1) a (6), com pesos inferiores (não germinaram).



Fonte: Fotos do autor

O tempo até protrusão radicular foi negativa e fracamente correlacionada com max_IJ , embora altamente significativa. Desta forma, Max_IJ constitui um fraco preditor de velocidade de germinação. Quando se avaliou estatisticamente as médias referentes aos parâmetros de qualidade das sementes verificou-se que o tempo de protrusão radicular não diferiu entre as sementes que produziram plântulas normais e aqueles que produziram plântulas anormais ($p=0.293$).

⁷Intensidade do relacionamento de coeficientes de correlação positivo e negativo: Perfeito (+1 e -1); Forte (+0.7 a +0.9 e -0.7 a -0.9); Moderado (+0.6 a +0.4 e -0.6 a -0.4); Fraco (+0.3 a +0.1 e -0.3 a -0.1) e Zero.

* significativo a 5% de probabilidade, ns – não significativo.

Neste estudo, o valor da moda (Moda_IJ) demonstrou ser uma boa representação para enchimento de grãos, ao passo que ele representa o valor do tom cinza da semente expresso com mais frequência, e no qual é possível verificar que quanto mais branca (denso) maior é esse valor da moda. Por outro lado, o valor máximo em torno da moda (Max_IJ) simplesmente diz algo sobre a forma da distribuição, sendo assim, um valor elevado, representa um pico alto, enquanto que um valor baixo significa que o pico está mais baixo. Um pico mais baixo é tipicamente associada com uma distribuição mais larga, enquanto que um pico pronunciado, está associada com uma distribuição estreita. Assim, um alto valor "Max_IJ" não significa necessariamente que a imagem da semente parece mais branca.

A figura 5 representa uma análise geral dos parâmetros avaliados nas amostras de sementes dos três genótipos utilizados para análise de raios X categorizados pelo que denominou-se de qualidade, por grupos de sementes: (1) germinaram e originaram plântulas normais; (2) germinaram, mas originaram plântulas anormais e (3) Sementes não germinadas. Considerando todas as sementes avaliadas (n=300) foi obtido um total de 87% de germinação, onde 76% das sementes germinadas originaram plântulas normais, 11% originaram plântulas anormais e desse total 14% de sementes não germinaram. Isto indica uma boa qualidade dos genótipos avaliados.

Plântulas normais e sementes não germinadas diferiram estatisticamente entre si para a média de todos os parâmetros avaliados, entretanto plântulas normais e anormais não diferiram entre si para nenhum dos parâmetros. Foi possível verificar diferença significativa entre plântulas anormais e sementes não germinadas apenas em relação aos parâmetros peso, espessura, volume e Max_IJ calculados a partir das imagens de raios X. Isso demonstra novamente que o peso e as dimensões representaram um bom parâmetro para inferir a qualidade da semente. Para as sementes de *J. curcas* avaliadas foi verificado que sementes que apresentaram em média ou menos de 0,49g, 578,4 mm³ e 961,7 pixels não germinaram enquanto que as sementes que apresentaram em média ou mais de 0,68g e 637,9 mm³ e 1.481 pixels germinaram e desenvolveram plântulas normais (Figura 5B, 5C e 5D).

Socolowski e Cicero (2008), trabalhando com sementes de *Tecoma stans* L., avaliaram, utilizando imagens radiográficas, as características morfológicas dos embriões pertencentes a diferentes classes de massa, sendo cada classe classificadas por categorias conforme a morfologia interna do embrião: embrião sem defeito, embrião com pequenos defeitos, embrião deformado e semente sem embrião. Os autores verificaram que praticamente todas as sementes com embriões sem defeitos germinaram, porém, nem todas originaram plântulas normais. Verificaram ainda que, a maioria das sementes das classes de

menor massa apresentou embriões deformados ou sem embriões, enquanto as de maior massa apresentaram embriões sem defeitos, em sua maioria.

Os estudos científicos disponíveis atualmente não trazem uma abordagem dos parâmetros como apresentados no presente estudo, porém alguns deles evidenciam algumas das considerações e conclusões expostas.

Pereira et al. (2014) estudando *Syngonanthus elegans* (Bong.) submeteram as sementes ateste de raios X digital e de germinação. As sementes foram classificadas em categorias com base na cor e textura da testa e as coordenadas de pixel em imagens foram usadas para determinar as dimensões de sementes e embriões. As imagens de raios X demonstraram diferenças no tamanho do embrião para as quatro frações de cor, indicando uma diferença de maturidade que foi confirmada por massa de sementes. A fração com os menores embriões também apresentou a menor viabilidade. No entanto, o tamanho do embrião e a massa da semente apresentaram fraca relação linear. Uma forte correlação foi observada para a capacidade de germinação e tamanho do embrião, mas uma correlação mais fraca para a capacidade de germinação e massa de sementes.

Estudos preliminares com sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) utilizando o software “Tomato Analyser” produziram resultados interessantes quando as sementes foram classificadas em categorias quanto ao grau de desenvolvimento do embrião e relacionadas com o desempenho das plântulas. Neste estudo foi observado variações do grau de desenvolvimento do embrião das sementes de mamona de 71% a 87% (CARVALHO et al., 2010). O grau de desenvolvimento do embrião utilizando o “Tomato Analyser” é determinado a partir do parâmetro “Pericarp Area” fornecido pelo programa (MARCOS FILHO et al., 2010). Em outro estudo, sementes de aroeira-branca (*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl.) foram radiografadas e classificadas com base na proporção do embrião em relação à cavidade embrionária, em 0%, <50%, 50-75% e 100%, sendo a última classe dividida quanto à morfologia do embrião, em normal e anormal (MACHADO e CICERO, 2003). A determinação das dimensões de sementes e embriões, assim como a análise do grau de desenvolvimento do embrião realizada por estimativa de área embrionária também é uma possibilidade de análise a partir das imagens radiográficas obtidas das sementes de *J. curcas*, porém não foi o objetivo proposto para este estudo no momento.

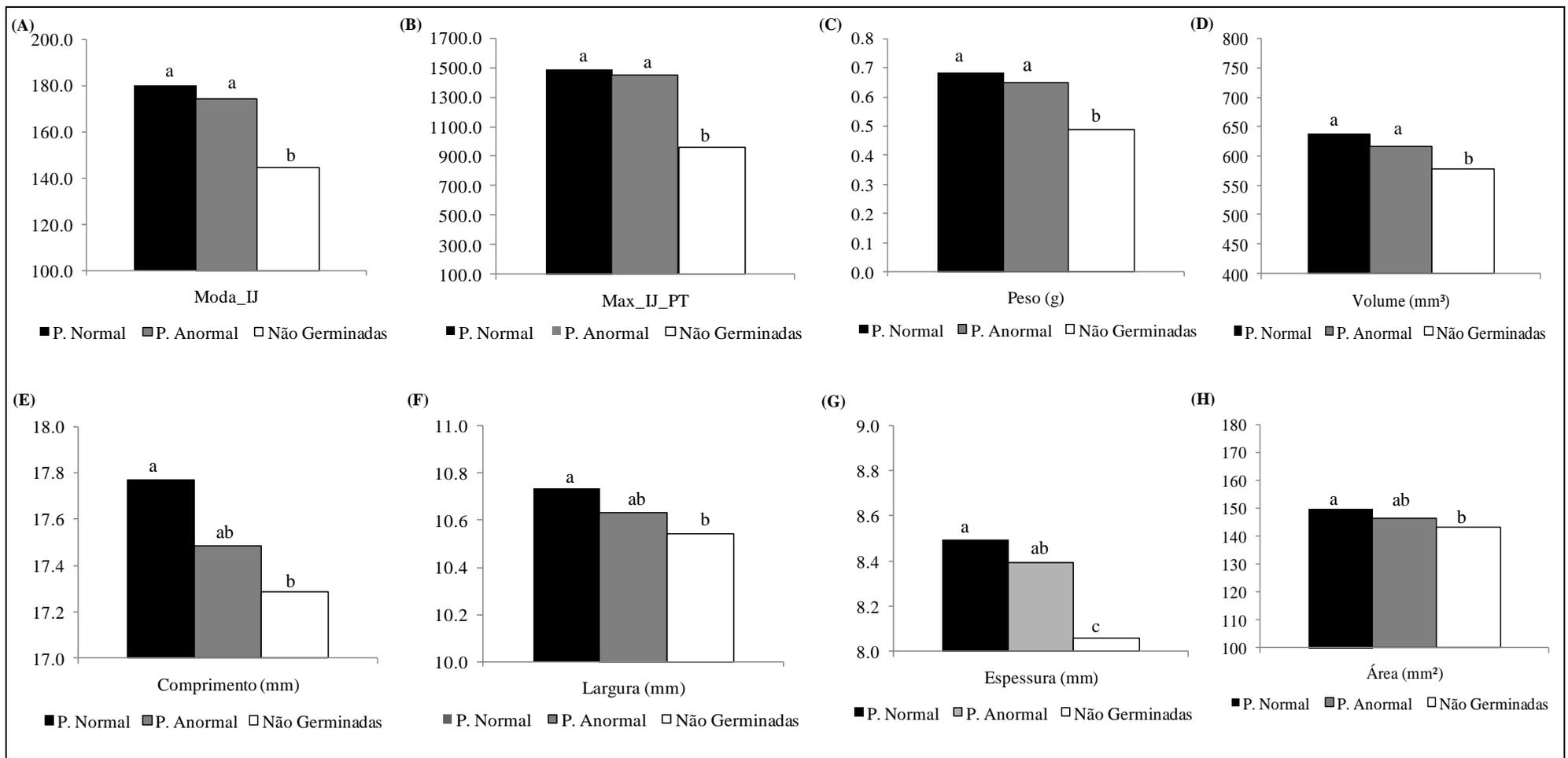


Figura 5 - Análise geral dos parâmetros avaliados nas amostras de sementes dos três genótipos utilizados para análise de raios X (Alagoinhas 2012, Minas Gerais 2012 e Alagoas 2013) categorizados pelos grupos de sementes que germinaram e originaram plântulas normais ou anormais e as sementes não germinadas. n=300 (sementes), 100 sementes por genótipo. (A) Média do valor modal obtido a partir das imagens radiográficas de cada semente; (B) Valor médio do Máximo pixels obtidos a partir das imagens radiográficas de cada semente; (C) Peso médio das sementes; (D) Volume médio das sementes; (E) Comprimento médio das sementes; (F) Largura média das sementes; (G) Espessura média das sementes e (H) Área média das sementes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Mann-Whitney, em nível de 5% de probabilidade.

As pranchas construídas e apresentadas nas figuras 6, 7 e 8 podem ser utilizadas como padrão na avaliação de imagens de raios X em sementes de *J. curcas*, contribuindo assim com mais um instrumento para a avaliação de qualidade de genótipos da espécie.

Na figura 6 é possível visualizar os padrões de imagens radiográficas das sementes de *J. curcas* que germinaram e originaram plântulas normais, na figura 7 os padrões de imagens das sementes que originaram plântulas anormais, e na figura 8 os padrões de imagens das sementes que não germinaram durante o teste de germinação.

Partindo para uma avaliação mais descritiva, o que é mais comum na literatura atual, ao comparar as imagens radiográficas com o teste de germinação e as imagens capturadas do desenvolvimento inicial das plântulas é possível verificar que em geral sementes de *J. curcas* que apresentam a cavidade embrionária totalmente preenchida ou com mais de 50% do preenchimento, com o embrião bem formado, originaram plântulas normais, constituindo assim um padrão de imagem que pode se considerar como indicativo da qualidade do genótipo. Sendo assim, é possível afirmar que as imagens de raios X possibilitaram avaliar a morfologia do tecido embrionário e endospermal os quais demonstraram relação com a semente e qualidade de plântulas originadas (Figura 6).

Os resultados obtidos demonstraram ainda, que a análise de raios X pode ser utilizada para relacionar os danos internos de sementes de *J. curcas* como desenvolvimento de plântulas anormais. Danos são visualmente identificados como manchas mais escuras ao longo do endosperma ou região axial que com os dados da análise de germinação foi possível associar como um aspecto visual que compromete a germinação e/ou o desenvolvimento de plântulas normais. Sementes que aparecem com regiões escuras apresentam elevada relação com as sementes que não germinaram e algumas que mesmo germinando originaram plântulas anormais (Figura 7 e 8). As manchas escuras podem ser sinais de deterioração ou até presença de patógenos, especificamente fungos. Nas imagens contidas na figura 7 é possível visualizar as plântulas com má formação da raiz, presença de raízes e hipocótilo atrofiados e/ou necrosado. Nas imagens das sementes que não germinaram durante o teste de germinação pôde ser visualizada a presença de sementes aparentemente vazias, parcialmente vazias, com defeito no embrião ou presenças de manchas (Figura 8).

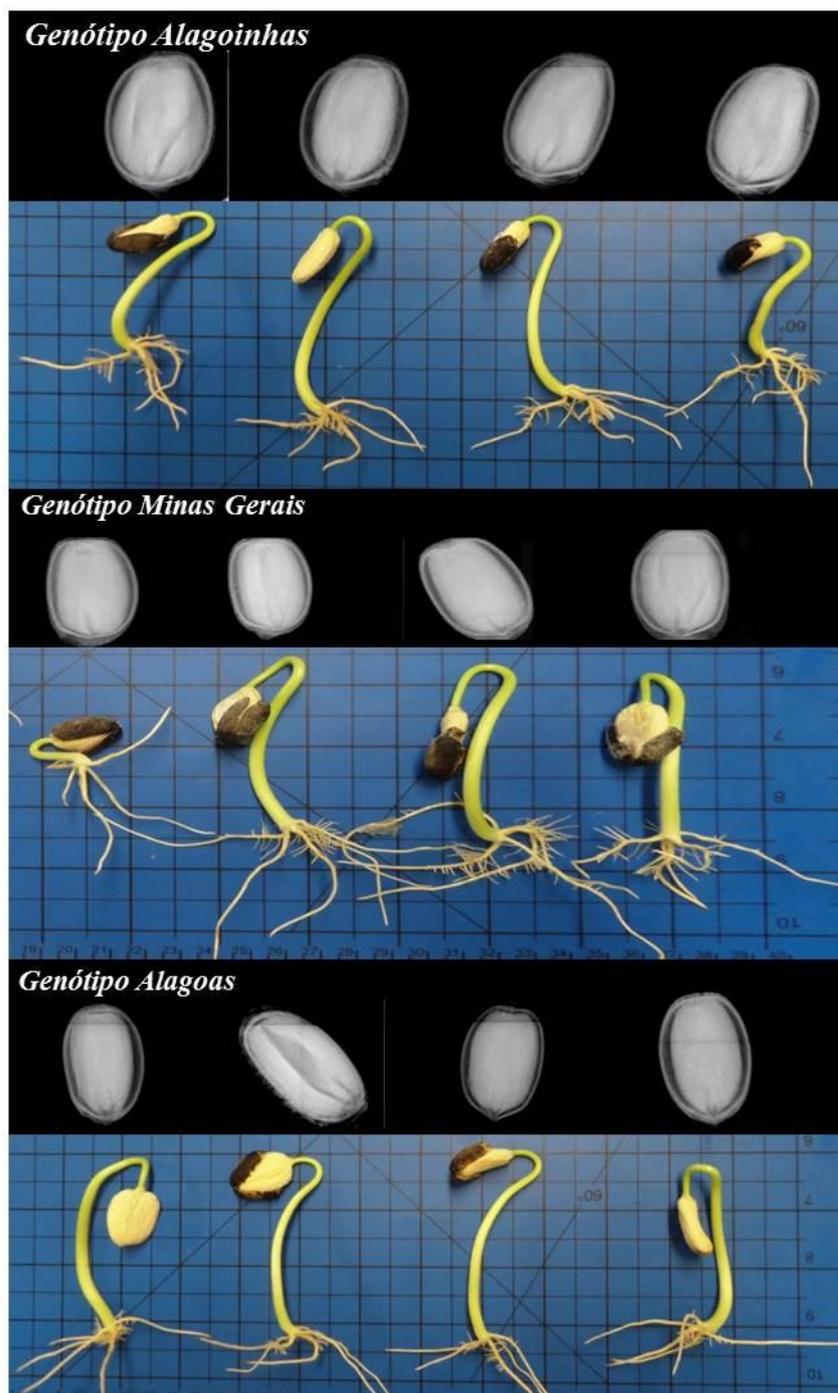
Um aspecto importante a ser abordado é que nem todas as plântulas avaliadas como anormais apresentaram imagens de raios X que indicasse anormalidade na semente ao passo de comprometer o desenvolvimento das plântulas. Sendo possível afirmar que algumas anormalidades verificadas em teste de germinação conduzidos em laboratório podem não refletir a realidade de campo, como por exemplo, o aparecimento de fungos que após a

semente germinar pode inviabilizar o desenvolvimento normal das plântulas, pois deterioraram os tecidos e a plântula não cresce como deveria. Necrose nas raízes e tombamento de hipocótilo também por necrose do tecido nesta região foi, por exemplo, deformações verificadas durante o teste de germinação em função da incidência de fungos, mas que as imagens radiográficas demonstraram que as sementes estavam sadias. Este aspecto pode ser visualizado, por exemplo, nas imagens de (8) a (12) da figura 7.

Pinto et al. (2009) constataram, em imagens radiográficas, também de pinhão-mansão, que as imagens apresentando regiões sem manchas escuras e trincas no endosperma e embrião, classificadas por eles como sementes sem danos, germinaram originando plântulas normais e que as sementes que apresentam manchas escuras (provavelmente tecidos deteriorados) em mais de 50% do endosperma, assim como no embrião, os quais classificaram como sendo danos severos, não germinam ou originam plântulas anormais. Estas informações grande coerência com os dados apresentados neste estudo.

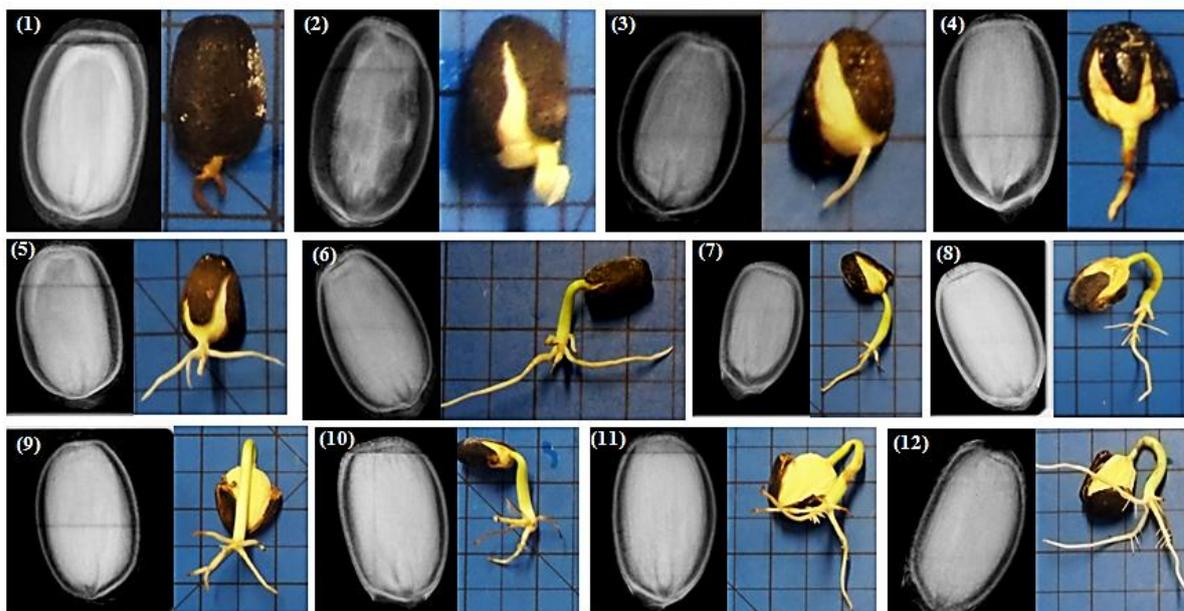
Sementes com danos internos (embriões morfologicamente anormais) e/ou sementes vazias (embrião ausente), também foi observado em canafístula (*Peltophorum dubium*) (OLIVEIRA et al., 2003), Aroeira branca (*Lithraea molleoides*) (MACHADO e CICERO, 2003), *Tabebuia serratifolia*, *Tabebuia impetiginosa* (OLIVEIRA et al., 2004) e embaúba (*Cecropia pachystachya*) (PUPIM et al., 2008).

Figura 6. Padrão de imagens radiográficas das sementes dos três genótipos de *Jatropha curcas* L. que germinaram e originaram plântulas normais (Alagoinhas 2012, Minas Gerais 2012 e Alagoas 2103).



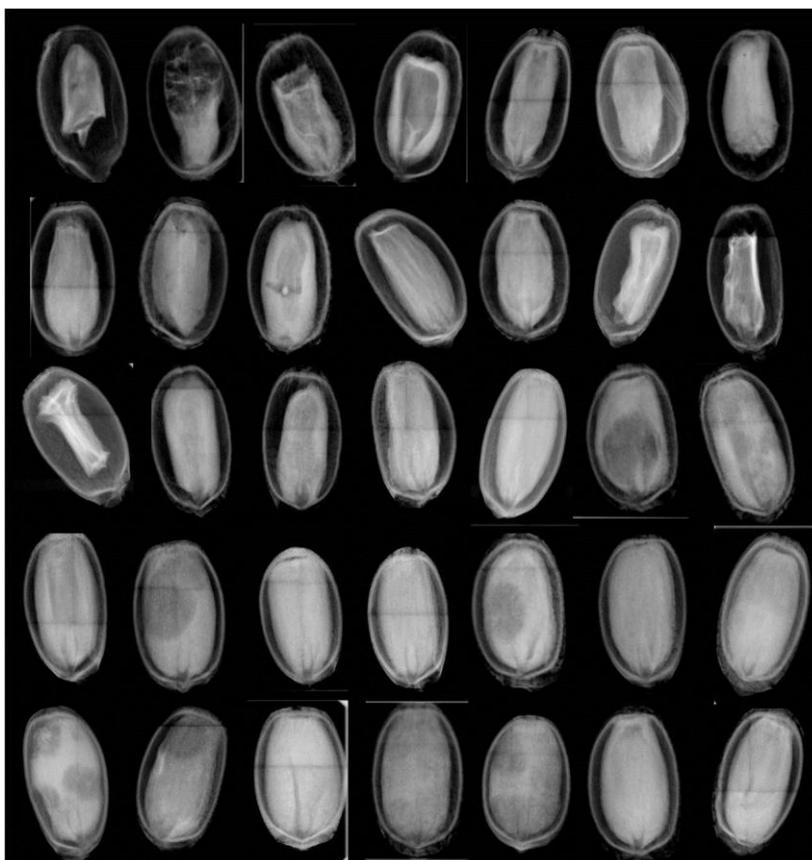
Fonte: Fotos do autor.

Figura 7. Padrão de imagens radiográficas das sementes de *Jatropha curcas* L. que originaram plântulas anormais. (1) a (4) Má formação da raiz; (4) Hipocótilo atrofiado e necrosado; (5) a (10) Presença de raízes necrosadas e (11) e (12) Hipocótilo necrosado.



Fonte: Fotos do autor.

Figura 8. Padrão de imagens radiográficas das sementes dos três genótipos de *Jatropha curcas* L. avaliados (Alagoinhas 2012, Minas Gerais 2012 e Alagoas 2013) que não germinaram durante o teste de germinação. Sementes parcialmente vazias, com defeito no embrião ou presenças de manchas.



Fonte: Fotos do autor.

3.3 ANÁLISE DA GERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS (Dados Complementares)

Os genótipos avaliados, em estudo anterior, passaram por *screening* térmico que indicou 30°C como temperatura ótima para os três genótipos. Neste estudo apesar de utilizar outro tipo de substrato (Agar 1%), sob temperatura de incubação de 30°C constante, os genótipos Alagoinhas 2013, Minas Gerais 2012 e Alagoas 2013 apresentaram germinação final de 93, 83 e 83% respectivamente e a maior frequência de sementes germinadas foi verificada em torno de 64 horas de embebição (Figura 9A e 9B).

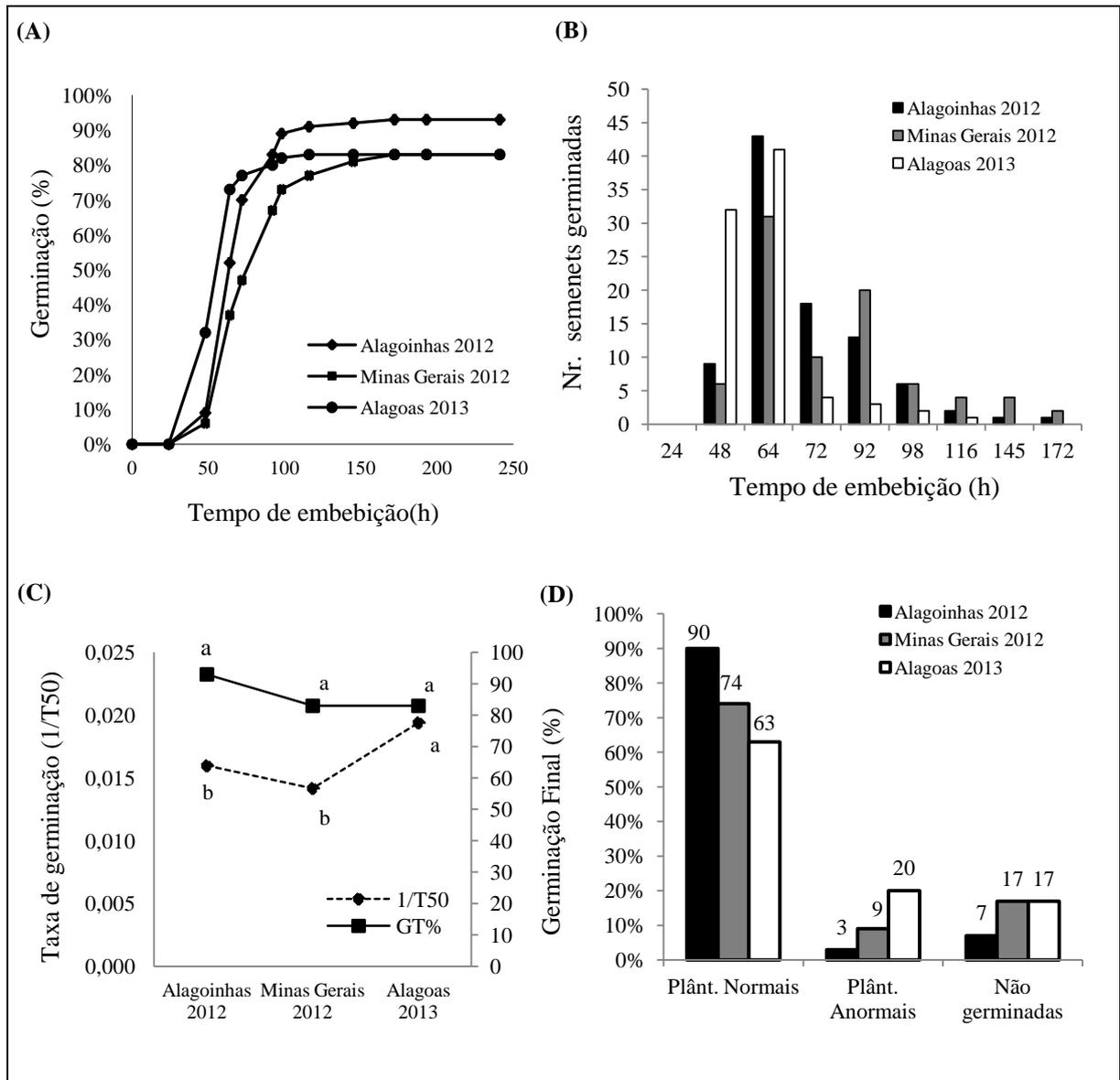
A uniformidade (T80-20) verificada nos referidos genótipos foi de 21.8, 31.8 e 16.3 e a taxa de germinação (T50) de 62.6, 70.6 e 51.5 respectivamente. Estatisticamente a germinação final ($P = 0.069$) e o T80-20 ($P = 0.185$) não diferiram significativamente entre os genótipos de sementes. O T50 diferiu entre os genótipos ($P = 0.010$), principalmente em função do genótipo de Alagoas 2013 que apresentou o T50 inferior (germinação mais rápida) (Figura 9C). O genótipo Alagoinhas 2012 apresentou maior número de plântulas normais e o genótipo Alagoas 2013 a menor porcentagem, a qual pode ser atribuída às condições do teste no qual foi verificada uma maior incidência de fungos o que comprometeu o desenvolvimento das plântulas provocando a deformação destas por deterioração (Figura 9D).

Morais (2008) sugere que o teste de germinação de sementes de pinhão-mansão deve ser realizado a temperatura alternada entre 25-30°C. Martins et al. (2008) recomendaram que seja realizado sob temperatura alternada 20-30°C, em substrato areia ou papel e com contagem final aos 10 dias da semeadura. Para Gairolla et al. (2011) a temperatura ótima foi registrada 30°C e o melhor substrato foi a vermiculita onde se obteve média total de germinação de 85%. Windauer et al. (2012) verificaram porcentagem de germinação final máxima a 25°C (82%), porém apesar da redução da porcentagem de germinação final, sementes incubadas a 30°C germinaram mais rápido do que em qualquer outra temperatura, incluindo a 25 °C.

No caso dos genótipos estudados, a região de coleta do genótipo Alagoinhas 2012 está situada a uma altitude aproximada de 131 m em relação ao nível do mar, a região de coleta do genótipo Minas Gerais 2012 a 698 m e a região de coleta do genótipo Alagoas 2013 a 84 m. De acordo com os dados coletados das estações meteorológicas mais próximas das regiões de coleta do genótipos dentro dos 12 meses que inclui o período de coleta das sementes, a região de Alagoinhas registrou temperaturas que variaram entre 18 e 33°C, a região de Minas Gerais entre 11 e 29°C e a região de Alagoas 21 e 31°C. A maior precipitação registrada durante o

período de levantamento dos dados pluviométricos em Alagoins foi de 215 mm de chuva, no 3º trimestre de 2012; em Minas Gerais 500 mm, no 1º trimestre de 2012, e em Alagoas 702 mm no 2º trimestre de 2013.

Figura 9. Dados do teste de germinação das sementes dos três genótipos teste de raios X. (A) Curva de germinação; (B) Curva de frequência relativa da germinação; (C) Germinação total e Taxa de germinação (T50); (D) Porcentagem de plântulas normais, anormais e de se sementes não germinada.



O pinhão-mansó é adaptável a uma ampla faixa climática, temperaturas entre 18 a 28,5°C, altitudes do nível do mar a cerca de 1.000 metros e precipitação média de 480 a 2.380 mm (BELTRÃO e CARTAXO, 2006). Isto pode justificar a variação de resultados encontrados na literatura referente à ideal temperatura para condução de testes de germinação em laboratório.

O teste de germinação conduzido com os genótipos Alagoinhas 2012, Minas Gerais 2012 e Alagoas 2013 possibilitaram fornecer informações sobre o potencial fisiológico dos genótipos sob condições ótimas de temperatura. O potencial de desempenho das sementes está expresso nas características genéticas, físicas, fisiológicas e sanitárias (MARCOS FILHO, 2005) e os testes de germinação podem funcionar como um instrumento de resposta da expressão dessas características.

4 CONCLUSÕES

A avaliação dos parâmetros morfométricos e fisiológicos associando com os resultados obtidos nos teste de raios X das sementes dos diferentes genótipos *Jatropha curcas* L., possibilitou a análise da qualidade dos genótipos.

A correlação entre a maioria dos parâmetros morfométricos, de raios X e fisiológico (tempo de protrusão radicular) avaliados foi estatisticamente significativa, porém houve variação na intensidade do relacionamento dos coeficientes.

A análise dos histogramas das imagens radiográficas possibilitou uma avaliação diferenciada das imagens, onde os valorda moda (Moda_IJ) demonstrou ser uma boa representação para enchimento de grãos, representando que quanto maior o valor da moda, mais branca é a imagem, sendo assim mais cheio é o grão, correspondendo em sua maioria a sementes viáveis. O valor máximo em torno da moda (Max_IJ) simplesmente diz algo sobre a forma de distribuição, valor elevado representa um pico alto (distribuição estreita) e o valor baixo que pico está mais baixo (distribuição mais larga), significando assim, que um alto valor "Max_IJ" não significa necessariamente que a semente parece mais branca.

As análises radiográficas possibilitaram visualizar os danos internos nas sementes e o efeito desses na germinação, assim como a construção de um padrão de imagens associadas ao desenvolvimento fisiológico da planta, o qual auxiliará de forma prática nas análises de imagens de raios X em sementes de *Jatropha curcas* L.

REFERÊNCIAS

- ABREU, F. B. et al. Variabilidade genética entre acessos de pinhão-manso na fase juvenil. **Magistra**, Cruz das Almas, BA, v. 21, p. 36-40, 2009.
- ALBUQUERQUE, K. S.; GUIMARÃES, R. M. Avaliação da qualidade de sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.) pelo teste de raios X. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1713-1718, 2008.
- AQUINO, N.F. et al. Morfometria de sementes de *Jatropha curcas*L. em função da procedência, **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lavras,n.8, 2009.
- BATTISTI, A. et al. Detection and evaluation of seed damage of cypress, *Cupressus sempervirens* L., in Italy. **Seed Science and Technology**, [S.l.], v.28, n.3, p.729-738, 2000.
- BELTRÃO, N. E. 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. Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 3., 2006,Varginha.**Anais...**v. 3, 2006.
- BINO, R.J.; AARTSE, J.W.; VAN DER BURG, W.J. Non-destructive Xray analysis of *Arabidopsis* embryo mutants. **Seed Science Research**, Cambridge, v.3, p.167-170, 1993.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília, DF: Mapa/ACS, 2009. 399p.
- CARVALHO, L. R. de; CARVALHO, M. L. M. de e DAVIDE, A.C.. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de espécies florestais de Lauraceae.**Rev. bras. sementes**. Londrina, v.31, n.4, p. 57-66, 2009.
- CARVALHO, M.L.M.; ALVES, R.A.; OLIVEIRA, L.M. Radiographic analysis in castor bean seeds (*Ricinus communis* L.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.32, n.1, p.170-175, 2010.
- CHRISTO, L. et al.Genetic Variability among Genotypes of Physic Nut Regarding Seed Biometry. **American Journal of Plant Sciences**, [S.l.], n.5, p.1416-1422, 2014.
- _____. Biometric Analysis of Seeds of Genotypes of Physic Nut (*Jatropha curcas*L.). **Agropecuária Científica no Semi-Árido**, [S.l.], n.8, p.1-6, 2012.
- CICERO, S. M. Aplicação de imagens radiográficas no controle de qualidade de sementes. Análise de Imagens.**Informativo Abrates**, Londrina, v. 20, n. 3, p. 48-51, 2010.
- DAGAR, J. C., BHAGWAN H., KUMAR, Y. Seed germination studies of *Salvadora persica* and *Jatropha curcas*. **Indian Journal of Forestry**, Dehradun, v. 27, n. 3, p. 283-289, 2004.

DEBNATH M, BISEN PS. *Jatropha curcas* L., a multipurpose stress resistant plant with a potential for ethnomedicine and renewable energy. **Curr Pharm Biotechnol.** [S.l.], v.9, n.4, p.288-306, 2008.

DELL'AQUILLA, A. Water uptake and protein synthesis in germinating wheat embryos under osmotic stress of polyethylene glycol. **Annals of Botany**, Camben-a, v. 69, n. 2, p. 167-171, 1992.

DO AMARAL, J. B., et al. Teste de Raios X para Avaliação do Potencial Fisiológico de Sementes De Ipê-Roxo. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina,v.33, n.4,p. 601-606. 2011.

FERREIRA, Daniel Furtado. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, [S.l.], v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GAIROLA, K. C.; NAUTIYAL, A. R. E DWIVEDI, A. K.. Effect of Temperatures and Germination Media on Seed Germination of *Jatropha curcas*Linn. **Advances in Bioresearch.** [s.l.], v.2, Issue 2, p.66 – 71, 2011.

GINWAL, H.S. et al. Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas*Linn. In central India. **Silvae Genetica**, Dehradun,v. 54, n. 2, 2005.

_____. Seed source variation in growth performance and oilyield of *Jatropha curcas*Linn. in Central India. **Silvae Genetica**, Dehradun, v. 53, n. 4, 2004.

GOMES JUNIOR, F. G. Aplicação da análise de imagens para avaliação da morfologia interna de sementes. Análise de Imagens.**Informativo Abrates**,Londrina, v. 20, n. 3, p. 33-39, 2010.

GOMES, K.B.P. et al. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Terminalia argentea* (Combretaceae) pelo teste de raios X. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 4, p. 752-759, 2014.

INTERNACIONAL SEED TESTING ASSOCIATION. International Rules for seed Testing. **Handbook of vigour test methods.** 3. ed. Zurich: ISTA, 1995. 117 p.

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

MACHADO, C.F.; CICERO, S.M. “Aroeira-branca”(*Lithraea molleoides* (Vell.) Engl. – Anacardiaceae) seed quality evaluation by the X-ray test. **Scientia Agricola**, [S.l.], v.60, n.2, p.393-397, 2003.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas.** Piracicaba: FEALQ, 2005. 495p.

_____. Teste de vigor: importância e utilização. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. **Vigor de sementes: Conceitos e Testes.** Londrina: ABRATES, 1999.

MARCOS FILHO, J. et al.. Using tomato analyzer software to determine embryo size in x-rayed seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 146-153, 2010.

MARTINS, C.C.; MACHADO, G.M.; CAVASINI, R. Temperatura e substrato para o teste de germinação de sementes de pinhão-manso. **Ciência e Agrotecnologia**, Londrina, v.32, n.3, p.863-868, 2008.

MELO, J. C. et al. Avaliação preliminar do potencial do pinhão-manso para a produção de biodiesel. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 1, 2006, Brasília. **Anais...** Brasília: MCT/ ABIPTI, 2006, v. 2, p. 198-203.

MORAIS, E.B.S.D. **Padronização de teste de germinação e qualidade de sementes de Pinhão-Manso (*Jatropha curcas*L.) durante o armazenamento**. 2008. 103f. Trabalho de Conclusão de Curso (Dissertação - Mestrado) - Universidade Estadual de Montes Claros, Janaúba, MG.

OLIVEIRA, L.M.; CARVALHO, M.L.M.; DAVIDE, A.C. Utilização do teste de raios X na avaliação da qualidade de sementes de canafístula (*Peltophorum dubium* (Sprengel) Taubert). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.25, n.1, p.116-120, 2003.

OLIVEIRA, L.M. et al. Avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia serratifolia* Vahl. e *T. impetiginosa* (Martius Ex A.P. de Candolle) Standley – (Bignoniaceae) pelo teste de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.26, n.2, p.138-143, 2004.

PEREIRA, L.A. et al. Embryo morphology indicates physiological maturity better than seed mass in *Syngonanthus elegans* (Eriocaulaceae). **Seed Sci. & Technol.**[S.l.], 42, 161-170, 2014.

PINTO, T.L.F. et al. Avaliação da viabilidade de sementes de pinhão-manso pelo teste de tetrazólio e de raios X. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.31, n.2, p.195-201, 2009.

PUPIM, T.L. et al. Adequação do teste de raios X para avaliação da qualidade de sementes de embaúba (*Cecropia pachystachya* Trec.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.30, n.2, p.28-32, 2008.

SIMAK, M.; BERGSTEN, U.; HENRIKSSON, G. Evaluation of ungerminated seeds at the end germination test by radiography. **Seed Science and Technology**, [S.l.], v.17, n.2, p.361-369, 1989.

SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**, [S.l.], v.39, p.458-468, 1953.

SOCOLOWSKI, F.; CICERO, S.M. Caracterização morfológica de embriões por imagens de raios X e relação com a massa e a qualidade fisiológica de sementes de *Tecoma stans* L. Juss. ex Kunth (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.30, n.2, p.200-208, 2008.

VAN DER BURG, W.J. et al. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v.119, p.256-263, 1994.

VANZOLINI, S. et al. Qualidade sanitária e germinação de sementes de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v.32, p.9-14, 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbs/v32n4/01.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2014.

WINDAUER, Liliana B. et al. Benech-Arnold, Roberto. Germination responses to temperature and water potential in *Jatropha curcas* seeds: a hydrotime model explains the difference between dormancy expression and dormancy induction at different incubation temperatures. **Annals of Botany**, [S.l.], 109: 265–273, 2012.

ZONTA, J. B. et al. Diferentes tipos de secagem: efeitos na qualidade fisiológica de sementes de pinhão-manso. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 4, p. 721-31, 2011.

CAPÍTULO IV

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE SEMENTES E PLÂNTULAS DE *Jatropha curcas* L. EM RESPOSTA Á DIFERENTES TEMPERATURAS

RESUMO

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) é uma espécie de uso múltiplo, considerada promissora para a produção de biodiesel por apresentar sementes ricas em óleo, bem como uma fonte de metabólitos secundários de importância medicinal. O objetivo deste estudo foi realizar *screening* fitoquímico, determinar a atividade antioxidante e quantificar os compostos fenólicos, assim como determinar a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e ascorbato peroxidase (APX) em sementes e plântulas em *J. curcas* germinadas sob diferentes temperaturas (25, 30 e 35 °C). Amostras de sementes secas (quiescentes) e sementes embebidas por 42h em água nas três temperaturas foram secas, trituradas e extratos brutos preparados, utilizando etanol P.A como solvente extrator, os quais se utilizou para o *screening* fitoquímico, as análises da atividade antioxidante (método de sequestro de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil -DPPH) e determinação dos compostos fenólicos (método de Folin-Ciocalteu). Extratos preparados com amostras frescas de sementes quiescentes, plântulas inteiras e compartimentadas (raiz e parte aérea) utilizando tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,4) foram avaliados quanto a atividade das enzimas antioxidantes CAT, SOD e APX. A CAT foi estimada pela diminuição da absorvância do H₂O₂ a 240 nm, a SOD avaliada pela capacidade da enzima em inibir a foto-redução do azul de nitrotetrazólio e a APX por meio do monitoramento da oxidação do ascorbato a 290 nm. A germinação total verificado foi de 76%, 78% e 81% para as sementes encubadas respectivamente a 25, 30 e 35°C. Foi obtido um maior e significativo número de plântulas normais para as sementes germinadas a 30°C (69%) quando comparadas a 35°C (49%). Flavonas, xantonas e flavonóis foram detectados em extratos de sementes secas e esta mostrou maior atividade antioxidante e concentração do composto fenólico que os extratos de sementes embebidas, os quais apresentaram apenas a presença de compostos fenólicos livres e esteróides. A mudança de temperatura não promoveu diferenças na atividade antioxidante e dos compostos fenólicos durante a embebição. A atividade das enzimas foi diferente nos compartimentos analisados. Amostras de sementes embebidas e mantida a 30°C apresentaram atividade da CAT superior. A atividade mais elevada da SOD foi verificada em sementes embebidas a 30 e 35°C e nas raízes das plântulas cultivadas a 35°C. A atividade da APX foi maior em plântulas inteiras e raízes crescidas a 30°C e 35°C, respectivamente. As temperaturas testadas não proporcionaram uma condição de estresse térmico a ponto de desencadear uma resposta antioxidante diferenciada, demonstrando assim que as espécies reativas de oxigênio podem ter atuado apenas como atores de vias de sinalização celular dentro da “janela oxidativa para a germinação”.

Palavras-chave: Enzimas antioxidantes. *Screening* fitoquímico. Compostos fenólicos.

ANTIOXIDANT ACTIVITY *Jatropha curcas* L. SEEDS AND SEEDLINGS IN RESPONSE TO DIFFERENT TEMPERATURES

ABSTRACT

Jatropha curcas L. (Euphorbiaceae) is a multiple use species, considered promising for biodiesel production by presenting seeds rich in oil as well as a source of secondary metabolites of medicinal importance. The aim of this study was to carry phytochemical screening, determine the antioxidant activity and quantify the phenolic compounds, as well as determine the activity of antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and ascorbate peroxidase (APX) in seeds and seedlings *J. curcas* germinated under different temperatures (25, 30 and 35 °C). Samples of dried seeds (quiescent) and seeds soaked for 42h in water at three temperatures were dried, crushed and prepared crude extracts using PA ethanol as extracting solvent, which was used for phytochemical screening, analysis of antioxidant (sequestering of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-DPPH method) and determination of phenolic compound (Folin-Ciocalteu method). Extracts prepared with fresh samples of quiescent seeds, whole seedlings and compartmentalized seedlings (roots and shoots) using potassium phosphate buffer 100 mM (pH 7.4) were evaluated for antioxidant enzymes CAT, SOD and APX. CAT was estimated by the decrease in absorbance of H₂O₂ at 240 nm and evaluated for SOD enzyme's ability to inhibit the photo-reduction of nitroblue tetrazolium and APX by monitoring the oxidation of ascorbate 290 nm. The total germination observed was 76%, 78% and 81% respectively for seeds soaked at 25, 30 and 35 °C. It was obtained and a higher mean number of normal seedlings for seeds germinated at 30 °C (69%) compared to 35 °C (49%). Flavones, flavonols and xanthenes were detected in seed extracts dried and this showed a higher antioxidant activity and concentration of phenolic compound that extracts of seeds soaked, which showed only the presence of free phenolic compounds and steroids. The change in temperature did not cause differences in antioxidant activity and phenolic compounds during soaking. The enzyme activity was analyzed in different compartments. Samples of seeds soaked and held at 30 °C showed higher CAT activity. The highest SOD activity was detected in imbibed seeds 30 and 35 °C and roots of the seedlings grown at 35 °C. The APX activity was higher in whole seedlings and roots grown at 30 °C and 35 °C respectively. The tested temperatures did not provide thermal stress conditions to trigger a different point antioxidant response, thereby showing that reactive oxygen species can be actuated only as cell signaling pathways of players within "oxidative window for germination."

Keywords: Antioxidant enzymes. Phytochemical screening. Phenolic compounds.

1 INTRODUÇÃO

Jatropha curcas L. conhecida vulgarmente como pinhão-manso, é uma espécie vegetal oleaginosa pertencente à família Euphorbiaceae, multiuso, de grande importância econômica, especialmente por ser indicada como promissora para produção de biodiesel. A espécie é amplamente distribuída na América Central, América do Sul, África, Índia e Sudeste da Ásia e suas sementes são ricas em toxinas importantes a exemplo da curcina e dos ésteres de forbol que podem atuar como inibidores da tripsina e lectinas. É amplamente cultivada em áreas áridas e semiáridas, pela tolerância a seca e a altas temperaturas (NITHIYANANTHAM et al., 2013; SILVA et al., 2013).

As plantas exibem respostas metabólicas únicas frente a estresses abióticos múltiplos, e muitas vezes a exposição a um fator de estresse abiótico único pode promover respostas fisiológicas não só a fonte primária do estresse, como também a estresses outros. Fatores abióticos como seca, altas temperaturas, salinidade, dentre outros, em geral promovem redução no rendimento de culturas vegetais e têm sido objeto de intensas pesquisas para elucidação dos processos fisiológicos e metabólicos envolvidos nas relações hídricas, ajustamento osmótico e metabolismo oxidativo vegetais. (LOUREIRO et al., 2007; CARNEIRO et al., 2011; VIRGENS et al., 2012; DE BRITO, et al., 2015)

A temperatura é um dos mais importantes fatores que influenciam na viabilidade de sementes e crescimento de plântulas, assim como determina a capacidade e taxa de germinação. É muito comum, por exemplo, plantas que são sujeitas a elevadas temperaturas, responderem ao estresse térmico e também secundariamente ao estresse oxidativo (IGBINOSA et al., 2011; SILVA et al., 2013). Estresses por altas ou baixas temperaturas podem causar uma série de eventos em cascata, iniciando com peroxidação lipídica e avançando para degradação de membranas, e eventualmente morte celular (MARINI et al., 2012, 2013; RIBEIRO et al., 2014).

Como em qualquer sistema biológico, o aumento da temperatura pode resultar no aumento da velocidade das reações, tendo limites específicos para a progressão. Entre as respostas metabólicas provocadas pela variação de temperatura em plantas, estão as alterações nas atividades de algumas enzimas. Em sementes tem sido evidenciada alteração na atividade de enzimas ao longo da germinação em diferentes temperaturas e a depender da espécie estudada, demonstrando que temperaturas estressantes podem provocar ou não danos oxidativos. Estudos demonstram que, em alguns casos, o aumento ou decréscimo da atividade

de determinadas enzimas, um elemento comum durante a germinação, pode significar importante capacidade da espécie em desenvolver mecanismos de tolerância ao estresse, especialmente no combate as Espécies Reativas de Oxigênio (ERO), sendo um comportamento normal durante o processo germinativo e intrínseco a cada espécie. (RAMALHEIRO, 2009; CAKMAK et al., 2010; MEI e SONG, 2010; FLORES et al., 2014).

O estresse oxidativo constitui-se como um desequilíbrio entre as taxas de produção de moléculas oxidantes e de degradação por moléculas antioxidantes (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2007), usualmente ocorre com o aumento das concentrações de espécies reativas de oxigênio (ERO), estando relacionado com uma série de doenças (IENCO et al., 2011; PIMENTEL et al., 2012). Fatores como predisposição genética, condições ambientais e propriedades específicas de grupos celulares podem acentuar o dano oxidativo, ou até mesmo diminuir a capacidade de degradação desses agentes em organismos celulares (DU e GEBICKI, 2002, 2004; DIZDAROGLU e JARUGA, 2012). A principal consequência do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica, degradação de lipídeos, proteínas e DNA, resultando em danos membranas biológicas e aumentando a sua fluidez (GILL e TUTEJA, 2010). Isso compromete sua integridade e inativa a interação entre membrana e receptor e entre membrana e enzima, além de ocasionar lesões oxidativas que favorecem o aparecimento de mutações ao nível do DNA (VICENTINO e MENEZES, 2007).

Em sementes, as espécies reativas de oxigênio são continuamente produzidas durante o desenvolvimento da semente, da embriogênese a germinação, mas também estão envolvidas na deterioração durante o armazenamento de sementes. As ERO desempenham um papel duplo na fisiologia da semente se comportando, por um lado, como agentes de vias de sinalização celular e, por outro lado, como produtos tóxicos que se acumulam sob condições de estresse. No entanto, existe evidências que as ERO se acumulam também desempenhando papéis importantes na sinalização associada com a germinação e a redução da dormência. Existe um conceito de "janela oxidativa para a germinação", na qual o que restringe a ocorrência dos eventos celulares associada a germinação de uma faixa crítica de nível das ERO, encerrado em limites inferiores e superiores. Baseado neste conceito, acima ou abaixo da "janela oxidativa para a germinação", baixas ou altas quantidades de ERO, respectivamente, não permitiria o progresso em direção à germinação (BAILLY et al., 2008).

Os sistemas biológicos são capazes de produzir antioxidantes que atuam contra os efeitos deletérios de ERO através de mecanismos enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes são substâncias que atuam em baixas concentrações em substratos oxidáveis

inibindo ou retardando significativamente a lipoperoxidação (HALLIWELL, 1995). Antioxidantes naturais são compostos de baixo peso molecular como as vitaminas C e E, carotenóides, glutathione reduzida e compostos fenólicos, entre outros, que podem prevenir a formação de radicais livres e a atividade de espécies reativas de oxigênio (LORENZI, 2002; OLIVEIRA et al., 2011; LÓPEZ-LAREDO et al., 2012; TEWARI et al., 2013; PEREIRA et al., 2014).

Dentre os antioxidantes não enzimáticos, as substâncias polifenólicas são de grande importância na remoção das ERO inibindo a peroxidação lipídica e promovendo o sequestro de metais pesados, devido a sua função quelante. Flavonóis, ácidos cinâmicos, cumarinas e ácidos caféicos são compostos polifenólicos bem conhecidos com propriedades antioxidantes extremamente fortes, as quais conferem proteção às células e tecidos contra os danos oxidativos. Estes compostos partilham padrões químicos comuns, com um ou mais grupos fenólicos para doação de prótons que neutralizam as ERO (IGBINOSA et al., 2011, COSTA et al., 2013).

Além desses compostos não enzimáticos, os níveis metabólicos normais de espécies reativas de oxigênio são mantidos pela atividade antioxidante de diversas enzimas, como a glutathione peroxidase, glutathione-reductase, catalase, ascorbato peroxidase e superóxido dismutase (OLIVEIRA et al., 2011; LÓPEZ-LAREDO et al., 2012; COSTA DA SILVA et al., 2013; TEWARI et al., 2013; PEREIRA et al., 2014). Sob condições de estresse abióticos em que o crescimento da planta encontra-se reduzido (como situações de estresse térmico e estresse oxidativo) em função da produção excessiva das ERO, é comum a ativação dessas enzimas antioxidantes como mecanismo natural de tolerância ao estresse, evitando a ação tóxica das ERO, antes que os danos celulares possam ser estabelecidos (LEAL et al., 2005; MARINI et al., 2012).

Informações sobre o metabolismo oxidativo de sementes e plântulas de *J. curcas* sob condições de estresse térmico ainda são escassas na literatura. Tendo em vista estes aspectos, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito de diferentes temperaturas na resposta antioxidante de sementes e plântulas de *J. curcas*. Para tanto, realizou-se a avaliação do perfil fitoquímico, a análise da atividade antioxidante e quantificação de compostos fenólicos em extratos etanólicos, assim como a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX) e superóxido dismutase (SOD).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL E AMOSTRAGEM

Utilizaram-se sementes de *J. curcas* coletadas em julho de 2013, no Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, Cidade de Rio Largo (AL), em matrizes de um plantio experimental com 350 plantas com idade de sete anos, estando a área de coleta, situada nas coordenadas geográficas de 9°47'S e 35°83' W. Em seguida, as sementes foram beneficiadas no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos do Instituto de Ciências da Saúde (LBBB/ICS/UFBA) para a realização dos ensaios experimentais. Testes de germinação preliminares foram conduzidos para estabelecer os tratamentos para as análises bioquímicas.

O material biológico, para todas as análises, foi composto de sementes secas (quiescentes), considerada como um controle biológico, sementes embebidas por 42 horas em água (fase II do processo germinativo), plântulas inteiras e plântulas compartimentadas, em parte aérea e raiz (Figura 1) cultivadas a 25, 30 e 35°C. Para realização do *screening* fitoquímico, as análises da atividade antioxidante e quantificação dos fenóis totais foram utilizadas apenas amostras de sementes secas (controle) e sementes embebidas por 42 horas.

Para a embebição das sementes e o cultivo das plântulas, inicialmente as sementes (Figura 1 A) passaram por desinfestação utilizando-se solução de hipoclorito de sódio a 0,5% com adição de Twin 20 (1 gota a cada 100 mL de solução de hipoclorito de sódio a 0,5%), durante 10 minutos. Em seguida as sementes foram lavadas em água destilada, aproximadamente, três vezes.

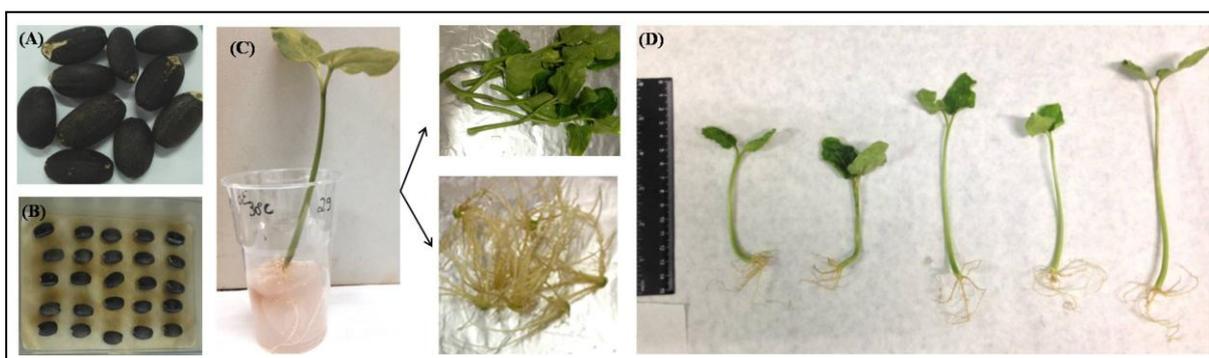
As sementes a serem coletadas após 42 horas de embebição foram dispostas em caixas plásticas contendo três folhas de papel de germinação estéreis (substrato) e umedecidas com água em volume equivalente a três vezes o peso substrato (Figura 1B). As sementes foram embebidas em água por 42 horas e mantidas nas temperaturas de 25, 30 e 35°C.

As plântulas foram semeadas nas mesmas temperaturas, porém utilizou-se como substrato solução de Ágar a 1%, diluído em água destilada (ágar/água) e solubilizado em placa aquecedora em temperatura máxima até fervura da solução. Após resfriar a solução, 100 mL foram adicionadas em copos plásticos e depois de polimerizada foram adicionadas duas sementes por copo. A germinação foi acompanhada e contabilizada e as plântulas foram coletadas a partir do décimo dia de embebição, utilizando-se como critério de coleta das

amostras plântulas que apresentaram os cotilédones expandidos (Figura 1 C). Cada tratamento foi constituído por três repetições com dez plântulas e/ou compartimentos.

Imagens digitalizadas de dez plântulas por tratamento foram utilizadas para cálculo da estimativa de área (Figura 1D). O uso deste método não destrutivo viabilizou avaliar o crescimento das plântulas no período e nas diferentes temperaturas. As imagens digitais foram capturadas com auxílio de máquina fotográfica digital com 16.2 megapixels (Samsung WB31F) e a análise das imagens foram realizada utilizando o *software* gratuito “ImageJ” versão 1.47t. (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA). As amostras foram fotografadas utilizando ao lado de cada imagem uma régua para possibilitar a calibração da imagem. Os dados referentes às áreas das plântulas foram tabulados em planilha eletrônica no *software* Excel® e os resultados foram expressos pela média da área total das plântulas.

Figura 1 – Sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L. semeadas a 25, 30 e 35°C utilizadas para análises bioquímicas. (A) Semente Seca; (B) Sementes embebidas por 42 horas; (C) Plântula com cotilédones expandidos após 10 dias de semeadura e Plântulas compartimentadas (parte aérea e raiz) e (D) Plântulas fotografadas e utilizadas para cálculo da estimativa de área.



Fonte: Fotos do autor

2.2 PREPARO DOS EXTRATOS

2.2.1. Extrato Etanólico Bruto (EEB)

Os extratos brutos utilizados no *screening* fitoquímico, na análise da atividade antioxidante e par a quantificação dos fenóis totais foram produzidos a partir das amostras após secagem (peso seco) obtidas pelo método de secagem em estufa a 50°C até peso constante. Foi também registrado o peso úmido e seco para posterior determinação da umidade. O material seco foi pesado (10g) e triturado. O extrato foi preparado com auxílio do extrator Soxhlet (MARCONI MA044/8/50), utilizando-se 125 mL de Etanol P.A como

solvente extrator e o equipamento. A extração foi realizada à 80°C por 3 horas, o qual permaneceu em refluxo por mais 1 hora. Após a extração, o solvente e o extrato foram separados com uso de rotaevaporador (marca *Laborota 4000*) a 40°C, sendo o solvente recuperado e posteriormente o recipiente contendo o extrato foi colocado em capela de exaustão para a evaporação de todo o solvente. Os cartuchos contendo as amostras foram pesados antes e depois da extração para determinação do percentual de rendimento do extrato obtido através da fórmula: $R (\%) = \text{Massa Obtida} / \text{Massa Inicial} \times 100$ (SOUSA et al., 2007).

2.2.2. Extrato Proteico (EP)

Para determinação da atividade enzimática os extratos proteicos foram preparados a partir de material fresco. Após a coleta das amostras (sementes secas e embebidas, plântulas, parte aérea e raízes) estas foram trituradas com auxílio de nitrogênio líquido e mantidas armazenadas em ultra freezer (-80°C) até o momento do preparo dos extratos e análise. Sendo assim, para o preparo dos extratos proteicos, 1g do material vegetal triturado (sementes secas, sementes embebidas, plântulas, parte aérea e raízes) foi homogeneizado em 10 mL do tampão de extração composto por fosfato de potássio 100 mM (pH 7,4) e mantido sob agitação constante por 1 hora. Logo após, foi centrifugado a 3000 rpm por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante coletado. Os extratos proteicos obtidos a partir de cada amostra foram utilizados para a quantificação das proteínas totais, em espectrofotômetro (Ultrospec 7000), utilizando o método de Bradford (1976) e armazenado para posterior determinação da atividade específica das enzimas antioxidantes. Utilizou-se padrão de Albumina Bovina (BSA) para construção da curva analítica

2.3. SCREENING FITOQUÍMICO

Os extratos etanólicos brutos (EEB) foram submetidos à análise qualitativa quanto à presença ou ausência dos seguintes grupos químicos: saponinas, fenóis, taninos, antocianinas e antocianidinas, flavonas, flavonóis e xantonas, chaconas e auronas, triterpenos e esteroides livres. Essas análises foram realizadas de acordo com o descrito por Matos (2009), seguindo a metodologia descrita a seguir.

Para a análise da presença de **saponinas** diluiu-se 20 mg de EEB em 1 mL de água ultrapura (Milli-Q). O tubo foi agitado vigorosamente por 2 minutos. A formação de espuma

persistente e abundante é o indicativo da presença de saponinas. Para a detecção de **Fenóis** e **Taninos** 20 mg de EEB foi diluído em 1,0 mL de álcool etílico (PA). Os tubos foram homogeneizados em agitador vortex. Após 1 min. em agitação, em cada tubo foram acrescentadas três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico, e mantido sob agitação em vortex. A formação de precipitado e variações de cor são utilizados como critérios para a identificação dos grupos funcionais. O tubo Branco foi preparado com a mesma quantidade de etanol e cloreto férrico, mas sem o extrato. A obtenção de coloração variável entre o azul e o vermelho, foi indicativa da presença de Fenóis.

Para a detecção de **Antocianinas, Antocianidinas, Flavonóis, Xantonas, Chaconas e Auronas** (ensaio ácido-alcalino), diluiu-se 20 mg de EEB em 1,0 mL álcool etílico (PA). Para cada extrato foram preparados três tubos com identificação diferenciada por valores de pH (pH 3,0; pH 8,0 e pH 11,0). A alteração nos valores de pH possibilita a visualização da coloração correspondente ao metabólito que se desejava detectar, caso estes estejam presentes nas amostras. A acidulação foi feita com HCl 0,1M e alcalinização obtida com adição de NaOH 0,1M. Para cada pH foi preparado um tubo sem adição de extrato utilizado como controle negativo (Tubo Branco). Soluções de coloração vermelha em pH 3,0 foram consideradas positivas para antocianinas, antocianidinas, chaconas e auronas. Soluções em pH 8,5 com a cor lilás foram consideradas como positivas para antocianinas e antocianidinas. Amostras em pH 11,0 com coloração azul-púrpura foram consideradas positivas para antocianinas e antocianidinas, e de coloração amarela foram consideradas positivas para flavonas/flavonóis e xantonas, enquanto que as de coloração vermelho púrpura foram consideradas positivas para chaconas e auronas e vermelho alaranjado foram considerados positivos para flavonóis. Para análise da presença de **Catequinas** e **Flavonas** (ensaio ácido-alcalino complementar), os tubos de pH 3,0 e pH 11,0 da análise anterior foram cuidadosamente aquecidos com auxílio lamparina durante 2 a 3 minutos. A obtenção de coloração pardo-amarelado no tubo de pH 3,0 foi indicativa presença de catequinas e coloração vermelho alaranjado no tubo de pH 11,0 indicativo da presença de flavononas.

A detecção de **Triterpenos** e **Esteróides** (teste Lieberman-Burchard) foi realizada diluindo-se 20 mg de EEB em 1,0 mL de clorofórmio P.A.. Após a diluição em clorofórmio adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético P.A. em cada tubo. Posteriormente acrescentou-se 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Os tubos foram agitados por três minutos e então verificado se houve alteração da coloração. Coloração azul evanescente seguida de verde permanente foi indicativa da presença de esteróides livres e a coloração parda até vermelha

indicava da presença de triterpenóides livres. Um tubo sem adição de extrato foi preparado como controle negativo (Tubo Branco).

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A determinação da atividade antioxidante foi realizada a partir da avaliação da atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila – DPPH, utilizando-se o método descrito por Rufino e colaboradores (2007) com modificações (SOUSA et al., 2007). Utilizou-se uma solução estoque de DPPH a 120 mM e para o preparo da curva analítica o Ácido Gálico a 4 µg/mL. O percentual da atividade antioxidante foi determinado dissolvendo-se 0,015g do extrato bruto em 20 mL de metanol. Cada amostra biológica foi analisada em triplicata.

Desses extratos foram preparadas amostras de leitura em diferentes concentrações para determinar a concentração eficiente (EC_{50}) ou concentração inibitória (IC_{50}) que corresponde à quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Ultrospec 7000) a 515 nm. A partir dos resultados obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante, que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, e a concentração inibitória (IC_{50}). Para o cálculo da concentração eficiente (EC_{50}) utilizou-se a equação oriunda das leituras das amostras, em geral representada pela equação representada por ($y = -ax + b$), onde: $y = \text{Absorbância inicial do controle}/2$ e $x = EC_{50}$ (mg/mL).

2.5 COMPOSTOS FENÓLICOS

A determinação dos compostos fenólicos totais foi realizada com os mesmos extratos etanólicos preparados para análise da atividade antioxidante. A determinação foi realizada por meio de espectrofotometria utilizando o método de Folin–Ciocalteu com modificações, de acordo com o descrito por Sousa et al. (2007) e Pereira et al. (2014).

Para o procedimento de análise pesou-se 5 mg do extrato etanólico, os quais foram transferidos para um tubo contendo 5,0 mL de metanol. Uma alíquota de 100 µL desta solução foi misturada a 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6,0 mL de água destilada. Após 1 minuto de agitação, adicionou-se 2,0 mL de Na_2CO_3 a 15% à mistura, a qual foi

agitada por 30 segundos. A solução foi avolumada com água destilada para 10 mL e transferida para 1 tubo falcon de 15 mL. Após 2 horas, as absorvâncias das amostras foram medidas a 750 nm em espectrofotômetro (Ultrospec 7000) utilizando-se cubetas descartáveis de 1,0 mL, tendo sido usado como “branco” o metanol e todos os reagentes, excetuando o extrato. A concentração de compostos fenólicos foi determinada por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva analítica construída com padrões de ácido gálico PA (concentração entre 0 a 500 µg/mL).

2.6 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

2.6.1 Determinação de Proteínas Totais

Para a **quantificação das proteínas totais** dos extratos produzidos com amostras de cada tratamento (item 2.2.2), amostras de leitura foram preparadas utilizando-se uma alíquota de 1,0 µL do extrato proteico diluído em 800 µL água ultrapura (Milli-Q) e acrescentado a estas 200 µL do reagente de Bradford (reagente de cor), industrializado “Bio-RadProteinAssay” (BIO-RAD). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Ultrospec 7000) a 595 nm para determinação da concentração proteica, baseada em curva de analítica obtida a partir de diluição da solução estoque de albumina bovina – BSA (1440 µg.mL⁻¹). Os padrões foram preparados diluindo a solução estoque de BSA, de maneira a obter soluções padrões com as seguintes concentrações: 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg.mL⁻¹, acrescentando-se a estes 200 µL do reagente de Bradford e procedendo-se a quantificação.

2.6.2. Determinação da Atividade das Enzimas Antioxidante

A atividade da **catalase** (CAT, EC 1.11.1.6) foi determinada conforme Azevedo *et al.* (1998), estimada pelo decréscimo na absorvância de H₂O₂ a 240 nm em um meio de reação contendo fosfato de potássio 200 mM (pH7,0) e H₂O₂ 12,5 mM.

A atividade da **superóxido dismutase** (SOD, EC 1.15.1.1) foi avaliada pela capacidade da enzima em inibir a foto-redução do azul de nitrotetrazólio (NBT) como descrito por GIANNOPOLITIS e RIES, 1977, com modificações. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro (Ultrospec 7000) a 560 nm e as alíquotas definidas a partir da curva de

inibição para cada parte avaliada. Foram utilizados os seguintes volumes de extrato proteico: 5,0; 17,5; 17,0 e 24,0 μL para extratos de sementes, plântulas, parte aérea e raiz, respectivamente. Considerou-se que uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a foto-redução do NBT nas condições de ensaio.

A atividade da **ascorbato peroxidase** (APX, EC 1.11.1.11) foi realizada por meio do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm. O meio de reação foi composto de tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 7,0), ácido ascórbico 0,5 mM e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 0,1 mM (NAKANO e ASADA, 1981).

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, utilizando-se 4 repetições de 25 sementes para os *screening* fitoquímico e os ensaios de atividade antioxidante e quantificação de compostos fenólicos e de 3 repetições de 10 sementes/plântulas nos ensaios de atividade enzimática. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os dados obtidos foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, seguido de comparações das médias pelo teste de Scott-Knott ou Teste t de Student (LSD) a 5% de probabilidade. O pacote estatístico utilizado foi o Sisvar 5.3 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SCREENING FITOQUÍMICO

Os extratos etanólicos brutos de pinhão-manso preparados com amostras de todos os tratamentos analisados apresentaram fenóis, esteroides livres e triterpenos. Nas sementes secas e em amostras embebidas a 35°C ainda foram detectadas catequinas. Este metabólito parece ter sido afetado pela temperatura ou simplesmente pela mudança do estágio metabólico da planta, já que as sementes quando embebidas tiveram seu metabolismo reativado (Tabela 1).

Os esteroides são encontrados como álcool livre ($3\beta\text{-OH}$), esterificados a ácidos graxos ou como glicosídeos. São constituintes de membranas em plantas, algas e fungos e afetam a

sua permeabilidade (DEWICK, 2002). O papel antioxidante destes grupamentos químicos reside na capacidade de redução de espécies reativas de oxigênio (ANDRADE, 2007).

Tabela 1 – Perfil fitoquímico de extratos etanólicos obtidos a partir de sementes de *Jatropha curcas* L. embebidas 42 horas em água nas temperaturas de 25, 30 e 35°C.

Metabólito secundário	Temperatura			
	Secas	25°C	30°C	35°C
Saponinas	-	-	-	-
Fenóis	+	+	+	+
Taninos	+	-	-	-
Antocianinas e Antocianidinas	-	-	-	-
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	-	-	-	-
Triterpenóides e Esteroides livres	+	+	+	+
Catequinas	+	-	-	+

(+) Presença; (-) Ausência.

Estes resultados diferem dos encontrados por Rocha (2013) que ao realizar *screening* fitoquímico de extratos brutos de sementes secas de *J. curcas* relatou a presença de fenóis simples, taninos catéquicos, flavonas, flavonóis, xantonas e esteróides. Esta diferença de resultados pode estar associada a metodologia de preparo dos extratos, onde, a autora citada utilizou secagem das amostras em estufa a 105°C e extração por maceração para preparo dos extratos. Os extratos produzidos por extração contínua com Soxhlet apresentaram-se ricos em esteróides, taninos catéquicos, flavonas, flavonóis e xantonas. De acordo com este trabalho o processo de secagem interferiu na qualidade do extrato obtido e nos grupos químicos extraídos, pois ao utilizar sementes sem secar os extratos continham apenas esteróides e saponinas quando preparados por maceração e quando obtidos por soxhlet verificou-se a presença de taninos catéquicos, flavonas, flavonóis, xantonas e esteróides.

3.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O rendimento dos extratos etanólicos brutos preparados com amostras de sementes de pinhão-manso embebidas em água por 42 horas nas temperaturas de 25, 30 e 35°C, e posteriormente desidratadas a 50°C, em termos percentuais, não diferiram significativamente (Tabela 2). Tais rendimentos foram significativamente inferiores ao registrado para as amostras controle (semente secas – 17,22%).

Tabela 2-Rendimento (%) dos extratos etanólicos brutos de sementes de *Jatropha curcas* L. embebidas por 42h em água nas temperaturas de 25, 30 e 35°C⁸.

Tratamentos	Rendimento (%)
Secas	17,22 a
25°C	10,50b
30°C	8,44b
35°C	10,82b

Atualmente, experimentos envolvendo a utilização do DPPH para investigação do potencial antioxidante de extratos vegetais têm sido largamente utilizados. A partir dos dados da concentração eficiente (EC₅₀), pode-se inferir que os extratos etanólicos obtidos a partir das sementes de pinhão-mansão incubadas nas diferentes temperaturas experimentais (25, 30 e 35°) exibiram menor atividade antioxidante do que os extratos preparados a partir de sementes secas (Tabela 3). Quanto menor é a EC₅₀ maior é a atividade antioxidante dos extratos (IGBINOSA et al., 2011).

Tabela 3 – Concentração eficiente (EC₅₀) de extratos etanólicos brutos de sementes de *Jatropha curcas* L. embebidas 42 horas em água nas temperaturas de 25, 30 e 35°C⁹.

Tratamentos	Atividade Antioxidante (%)	EC ₅₀ (µg/mL) ± Desvio
Sementes Secas	37,10±1,52 a	918,67± 34,67a
Sementes a 25°C	23,18 ± 5,58 b	1490,33± 64,82b
Sementes a 30°C	30,16 ± 3,93 b	1347,72± 290,02b
Sementes a 35°C	24,39 ± 3,53 b	1604,67± 69,02b
Ácido Gálico (Padrão)		0.002

Os resultados obtidos contradizem o esperado, de que as temperaturas mais elevadas promoveriam maior produção de radicais livres, gerando assim maior necessidade de antioxidantes para conter um possível estresse oxidativo. As sementes secas embora com metabolismo reduzido, provavelmente, acumularam antioxidantes naturais no processo de desenvolvimento, os quais foram mobilizados a doarem prótons (H⁺) para estabilizar o radical DPPH, removendo assim elétrons anormais, os quais são responsáveis pela reatividade de radicais (NITHIYANANTHAM et al., 2013).

Rocha (2013) determinou a atividade antioxidante de diferentes partes da planta de *J. curcas*, produzindo extratos pelo método de soxhlet e maceração, utilizando material seco e

⁸ Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

⁹ Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

fresco e encontrou maior valor de EC₅₀ para o extrato de sementes secas (142,01 µg/mL) extraída pelo método de soxhlet, que assim como no presente estudo apresentou alto valor para o EC₅₀ em relação ao padrão e aos tratamentos térmicos aplicados, significando ter uma atividade antioxidante muito baixa se comparado a outras partes da planta estudada. Rocha (2013) encontrou maior atividade antioxidante em folhas secas (EC₅₀ 47,46 µg/mL) e em raízes frescas (EC₅₀ 62,07 µg/mL). Já Diwani *et al.* (2009), também avaliando extratos de *J. curcas*, apesar de não ter medido a atividade em semente, encontrou melhor atividade primeiramente em raízes (EC₅₀ 0,048 µg/mL) e depois em caule (0,047 µg/mL).

3.3 COMPOSTOS FENÓLICOS

Embora sem diferenças estatísticas, a maior concentração de compostos fenólicos foi verificada em sementes secas, corroborando de certo modo, com os dados de atividade antioxidante, representada pela EC₅₀ e os achados do *screening* fitoquímico devido a presença de flavonas, flavonóis e xantonas em sementes secas (Tabela 4).

Tabela 4 - Compostos fenólicos (mg EAG/g) em extratos etanólicos de sementes de *Jatropha curcas* L. embebidas 42 horas em água nas temperaturas de 25, 30 e 35°C¹⁰

Tratamentos	Compostos Fenólicos (mg EAG/g)
Sementes Secas	109,66 a
Sementes a 25°C	70,64 b
Sementes a 30°C	101,95 a
Sementes a 35°C	74,92 b

As substâncias com núcleo fenólico, como tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos, apresentam destaque especial como antioxidantes, por atuarem como eficientes captadores de espécies reativas de oxigênio (oriundas do metabolismo aeróbico, do processo fotossintético e de situações de estresse abiótico ou biótico), graças a relação estrutural que se dá entre as diferentes partes da sua estrutura química, além de reduzirem e quelarem íons férrico que atuam na peroxidação lipídica (NITHIYANANTHAM. *et al.*, 2013).

¹⁰mg EAG/g - Miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato. Médias seguidas por letras iguais na coluna não diferem significativamente pelo Teste Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Os mecanismos de ação dos compostos fenólicos, embora bastante pesquisados permanecem de certa forma não completamente elucidados, contudo sabe-se que a habilidade destes compostos em absorver e neutralizar as ERO, auxilia por exemplo, na decomposição dos radicais hidroxila e superóxido, com atuação tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOARES, 2002). Alguns fenóis podem influenciar na permeabilidade seletiva das membranas, além de inibirem enzimas ligadas às membranas como ATPases e fosfolipases. Estas propriedades, em conjunto podem explicar o uso etnoterapêutico da espécie *Jatropha curcas* na medicina popular (IGBINOSA et al., 2011).

Costa et al. (2011), quantificaram a atividade antioxidante, o teor de compostos fenólicos e determinaram a atividade antimicrobiana de diferentes partes botânicas de *Schinus terebinthifolius* (aroeira vermelha) e *Miracrodruon urundeuva* (aroeira preta) e também verificaram atividade muito baixa nos extratos de sementes, assim como a ausência de atividade antimicrobiana.

O acúmulo de compostos antioxidantes não enzimática também pode desempenhar um papel na proteção de células contra ERO durante a dessecação.

3.4 ENZIMAS ANTIOXIDANTES

A determinação da atividade de enzimas *in vivo* é intimamente relacionada com o teor de água da célula. Em baixos teores de umidade é fortemente ligado às estruturas macromoleculares, diminuindo assim a mobilidade e acessibilidade molecular de enzimas para seus substratos (BAILLY, 2004). Este aspecto pode justificar a maior atividade antioxidante encontrada em sementes secas em comparação as sementes embebidas e a detecção de atividade enzimática nas sementes embebidas, conforme será mostrado adiante. A reativação da atividade metabólica pelo processo de embebição ativou a maquinaria enzimática para controlar os efeitos oxidativos que precedem a protrusão radicular e o consequente desenvolvimento das plântulas.

O percentual total de germinação verificado foi de 76%, 78% e 81% para as sementes encubadas respectivamente nas temperaturas de 25, 30 e 35°C. Para as plântulas normais foi registrado percentuais de 56%, 69% e 49% nas respectivas temperaturas citadas. Não houve diferença estatisticamente significativa para os dois parâmetros fisiológicos avaliados (Figura 2A), entretanto, pode-se verificar que foi obtido um maior e significativo número de plântulas normais nas sementes germinadas a 30°C (69%) quando comparadas ao rendimento de

plântulas normais cultivadas a 35°C (49%) (Figura 2A). A temperatura de 30° C foi estabelecida como ótima para a espécie quando avaliada a germinação em diferentes genótipos (Capítulo 2), sendo então neste estudo considerada a condição controle para o coleta das plântulas.

Considerando como fontes de variação as temperaturas testadas (25, 30 e 35°C) e os compartimentos das sementes avaliados (semente seca, semente embebida por 42 horas, plântulas, parte aérea e raiz de plântulas), a análise de variância fatorial realizada apresentou diferença estatisticamente significativa para atividade de todas as enzimas para os compartimentos analisados. O maior efeito da temperatura foi verificado para a atividade da SOD, onde a atividade foi maior nas amostras embebidas a 30 e 35°C quando comparadas a 25°C. Para a interação entre os fatores só houve diferença significativa para a atividade da CAT e da SOD (Tabela 5).

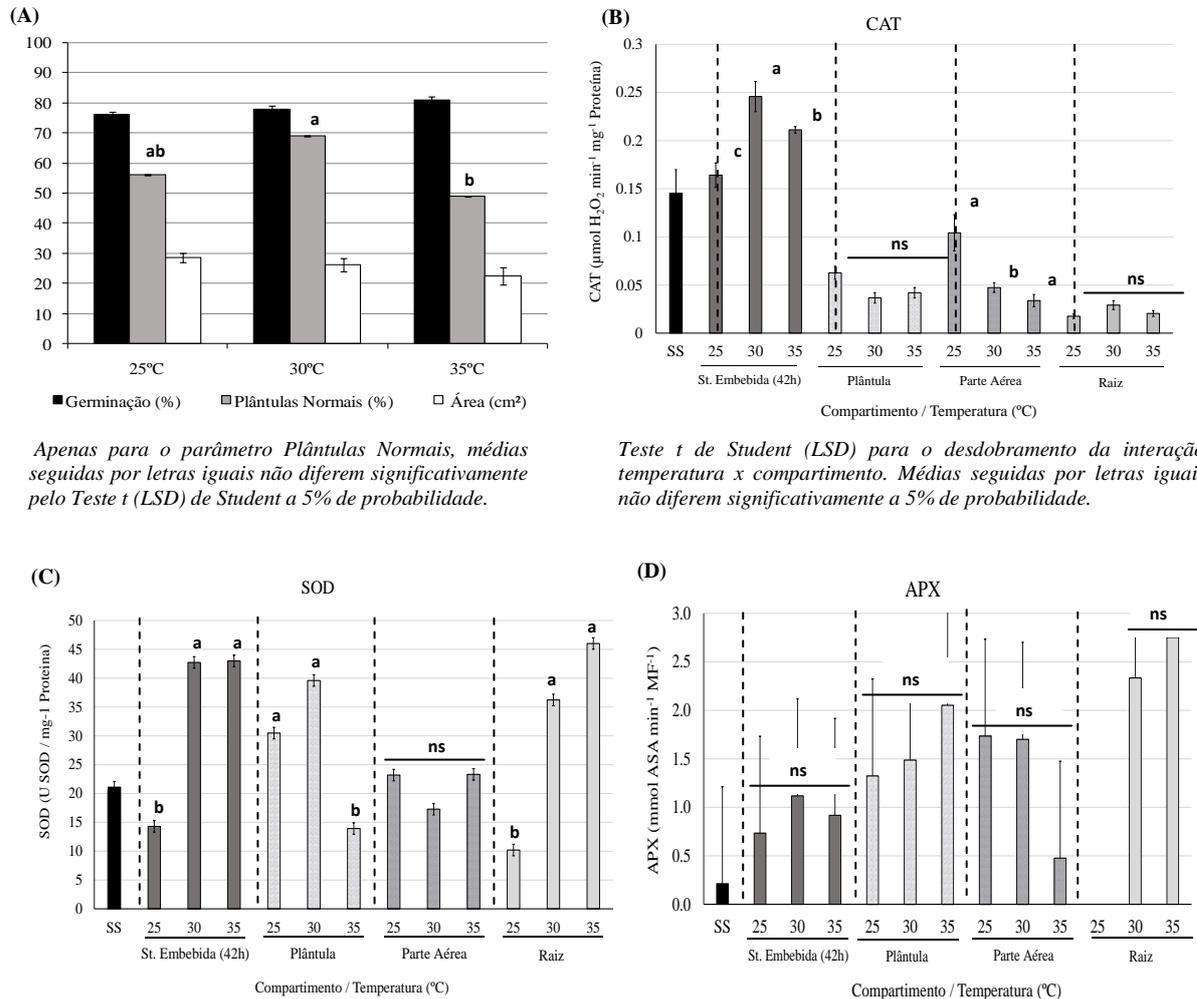
Tabela 5. Análise de variância dos diferentes tratamentos analisados para a atividade da superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT) e ascorbato peroxidase (APX) em sementes e plântulas de *Jatropha curcas* L.

Anova Fatorial (valores de F)			
Fontes de Variação	CAT	SOD	APX
Compartimentos	94.94 *	201.21 *	3.84*
Temperatura	1.26 ns	335.93 *	1.64 ns
Temp. x Compartimento.	4.11 *	314.12 *	2.10 ns
CV	24.72	25.22	80.72

*significativo a 5% de probabilidade

A atividade da catalase (CAT) apresentou diferença significativa apenas entre a fonte de variação compartimento, porém com maior atividade verificada nas amostras de sementes embebidas por 42 horas em água, e entre a interação entre compartimento x temperatura, onde a maior atividade foi verificada nas amostras de sementes embebidas por 42 horas a 30°C. Os valores encontrados para a atividade da CAT nas diferentes temperaturas testadas não apresentaram diferenças estatísticas em relação às médias gerais analisadas, porém na análise de desdobramento temperatura x compartimentos foi possível verificar maior atividade nas amostras de sementes embebidas por 42 horas a 30 e 35°C em comparação as mantidas a 25°C e nas amostras de parte aérea das plântulas mantidas a 25°C quando comparadas as outras temperaturas testadas (Figura 2B).

Figura 2 – Análise fisiológica e da atividade das enzimas antioxidantes em sementes, plântulas e diferentes compartimentos de plântulas de *Jatropha curcas* L. submetidas à germinação sob diferentes temperaturas (25, 30 e 35°C). (A) Germinação Final (%), Plântulas normais (%), Área de Plântula (cm²); (B) Catalase (CAT); (C) Superóxido Dismutase (SOD); (D) Ascorbato Peroxidase (APX).



Apenas para o parâmetro Plântulas Normais, médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente pelo Teste t (LSD) de Student a 5% de probabilidade.

Teste t de Student (LSD) para o desdobramento da interação temperatura x compartimento. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

Teste t de Student (LSD) para o desdobramento da interação temperatura x compartimento. Médias seguidas por letras iguais não diferem significativamente a 5% de probabilidade.

A CAT é a enzima que possui alto potencial no processo de dismutação direta do H₂O₂ em H₂O e O₂, sendo indispensável para a desintoxicação de ERO durante condições de alta produção de radicais tóxicos (GARG & MANCHANDA 2009). A baixa atividade da CAT verificada no presente estudo, tanto nas amostras de plântulas quanto nas partes aérea e raiz de plântulas quando comparada a atividade verificada nas amostras de semente seca e embebidas, demonstra que possivelmente os teores de H₂O₂ não se apresentaram tão altos, de forma que as temperaturas testadas não constituíram condições de estresse excessivo a ponto de ser necessário acionar o sistema oxidativo.

Outro aspecto a ser considerado que podem justificar os valores da atividade da CAT encontrado neste estudo é que as ROS desempenham um duplo papel na fisiologia de sementes, por um lado, podem se comportar como atores de vias de sinalização celular e, por

outro, como produtos tóxicos que se acumulam sob condições de estresse. ROS, desde que o seu valor seja rigidamente controlado pelo equilíbrio entre a produção e a eliminação são benéficos para a germinação e em particular para atuar como um sinal positivo para a libertação de dormência da semente (BAILLY et al., 2008). Desta forma é possível que a ação da CAT no sistema estudado agiu como um ator da via de sinalização celular para o processo germinativo, principalmente quando se verifica que sua maior atividade se deu em nível de semente seca e na fase II de embebição da semente quando então o metabolismo está ativado para desencadear a germinação.

Dentre as enzimas envolvidas na remoção de ERO a SOD é considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos tóxicos em níveis elevados (GILL & TUTEJA 2010). No estudo desenvolvido, das enzimas analisadas, a maior atividade foi verificada para a SOD, onde em relação ao efeito da temperatura, a sua atividade foi maior a 30 e 35°C, nas quais as médias não apresentaram diferença significativa, quando comparada a atividade a 25°C. Há diferenças de respostas em função do compartimento analisado. A maior atividade da SOD foi verificada nas amostras de sementes embebidas por 42 h em água a 35° Ce nas amostras de raízes. Em relação a influência da temperatura, quando encubadas a 25°C a maior atividade da enzima foi verificada em plântulas, seguindo de parte aérea das plântulas e sementes secas. A 30°C a atividade foi maior nas amostras de sementes embebidas em água, seguida das de plântula e raiz das plântulas. Enquanto que a 35°C a maior atividade foi verificada nas amostras de raízes e sementes embebidas (Figura 2C).

Estes dados demonstram que em condições ótimas de germinação, neste caso 30°C, o sistema oxidativo é ativado nos estágios iniciais do processo germinativo de forma a manter o equilíbrio do processo de desenvolvimento normal das plântulas, o que seria uma atuação normal da enzima para auxiliar no processo germinativo. Enquanto que em temperaturas maiores, como a 35°C, o sistema oxidativo também poderia estar agindo de forma a reparar o estresse induzido pelo aumento da temperatura, o que pôde ser verificado pela atividade aumentada nas raízes das plântulas cultivadas a esta temperatura e que constitui o principal órgão de transporte da planta (Figura 2C).

O aumento na atividade da SOD é conhecido por conferir tolerância ao estresse oxidativo (JALEEL et al., 2007). No eixo embrionário de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott (braúna), durante a germinação, as atividades das enzimas SOD e CAT apresentaram maiores alterações ao longo da germinação em 15°C e 40°C, demonstrando que temperaturas estressantes provocam danos oxidativos (FLORES et al., 2014). Do ponto de vista molecular,

recentemente, foi demonstrado que a diminuição da expressão da Cu/Zn-SOD em *Populus* regula o nível de H₂O₂ extracelular e o desenvolvimento da planta (SRIVASTAVA et al., 2006), o que pode justificar os achados do estudo aqui apresentado.

Nas plantas, acredita-se que em condições aeróbicas, as mitocôndrias são o principal local de produção de H₂O₂ relacionados aos processos fisiológicos contínuos (RASMUSSEN et al., 1998). Sabe-se também que na semente, a atividade respiratória é rapidamente iniciada e intensificada quando começa a fase de embebição (BEWLEY e BLACK, 1994). Esse episódio pode justificar também atividade da CAT e da SOD nas sementes, principalmente, naquelas embebidas e acondicionadas a 30°C.

Em condições de estresse, o radical superóxido produzido é tóxico, sendo, rapidamente, dismutado a H₂O₂ por ação da SOD, a primeira linha de defesa no ataque às ERO (POMPEU et al., 2008). O H₂O₂ formado pode ser detoxificado por ação da catalase e peroxidase, produzindo água (H₂O) e oxigênio (O₂), enzimas importantes na defesa das células contra os radicais superóxido gerados, principalmente, em condições de estresse (JALEEL et al., 2007).

Em girassol, através da manipulação da germinação de sementes com envelhecimento acelerado e embebição controlada (*priming*), foi demonstrado que a taxa de germinação está intimamente relacionada com a atividade da catalase (BAILLY et al., 2002). A atividade da CAT é essencial para remover o H₂O₂ potencialmente tóxico produzido sob condições de vários estresses, e assim evitar o estresse oxidativo (WILLEKENS et al., 1995). Em sementes oleaginosas, a CAT é, particularmente, importante nos eventos iniciais do crescimento da plântula, porque remove o H₂O₂ produzido durante a beta-oxidação de ácidos graxos (BEWLEY e BLACK, 1994), o que também justifica a maior atividade dessa enzima nas amostras de sementes secas e nas embebidas de pinhão-manso estudadas.

A atividade da APX só apresentou diferença significativa quando se comparou a atividades da enzima entre os compartimentos testados, com maior atividade verificada nas amostras extraídas de plântulas, sendo que neste caso, a média da atividade da enzima tanto nas plântulas inteiras quanto nos compartimentos separados não apresentaram diferenças significativas (Figura 2D). A interação da temperatura x compartimento também não apresentou diferença significativa demonstrando que a atividade APX não foi influenciada pelas temperaturas testadas. Entretanto, dentre os compartimentos estudados a maior atividade foi verificada nas amostras de raízes obtidas de sementes embebidas a 35°C.

Sementes secas, maduras, tolerantes à dessecação exibem alta atividade da CAT e Glutation redutase enquanto que a atividade da SOD e da APX é menor, ao passo que o

inverso ocorre no caso de sementes imaturas e intolerantes a dessecação (BAILLY et al., 2001; BAILLY, 2004). Este efeito pôde ser evidenciado neste estudo quando verificou-se a maior atividade da SOD e da CAT em sementes secas quando comparadas a atividade da APX.

Outro fator importante na atividade antioxidante é a afinidade das enzimas pelo substrato. Enquanto a CAT tem uma baixa afinidade pelo H_2O_2 , sendo ativa somente quando este está em altas concentrações, a APX e outras peroxidases têm alta afinidade, eliminando o H_2O_2 quando em baixas concentrações (GECHEV et al., 2006; JALEEL et al., 2009).

Em termos gerais, o mecanismo de ação das enzimas avaliadas neste estudo demonstrou uma efetiva eliminação do H_2O_2 , possivelmente originado pela atividade da SOD e também por outras fontes, o que pode indicar que até as sementes e plântulas de *J. curcas* foram capazes de controlar as ERO formadas mesmo a 35°C onde se verificou uma menor porcentagem de formação de plântulas normais.

4 CONCLUSÕES

Flavonas, xantonas e flavonóis foram detectados em extratos de sementes secas e sementes embebidas apresentam compostos fenólicos livres e esteroides;

Sementes secas apresentam maior atividade antioxidante e concentração do composto fenólico que os extratos de sementes embebidas em diferentes temperaturas;

A mudança de temperatura não promove diferenças na atividade antioxidante e dos compostos fenólicos durante a embebição de sementes de *J. curcas*;

As temperaturas de 25, 30 e 35°C não proporcionam uma condição de estresse térmico em *J. curcas* a ponto de desencadear uma resposta antioxidante diferenciada.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-Mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.17, n.2, p.231-235, 2007.

AZEVEDO, R. A. et al.. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiology Plantarum**, [S.l.], v.104, p.280-292, 1998.

BAILLY, Christophe. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. **Seed Science Research**, [S.l.], n.14, p.93-107, 2004.

BAILLY C. et al.. Changes in activities of antioxidant enzymes and lipoxygenase during growth of sunflower seedlings from seeds of different vigour. **Seed Science Research**, [S.l.], v.12, p.47-55, 2002.

_____. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. **Journal of Experimental Botany**, [S.l.], n.52, p.701–708, 2001.

_____. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. **C. R. Biologies**. [S.l.], n.331, p.806–14, 2008.

BEWLEY, J.D., BLACK, M. Seeds. **Physiology of development and germination**.2.ed. Nova Yorque: Plenum Press, 1994.

BRITO, Cristiane Dantas de et al. Behavior of *Jatropha curcas* L. seeds under osmotic stress: germination and cell cycle activity. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v. 37, n. 3, p. 279-287, 2015.

CARNEIRO, M. M. L. C. et al. Atividade antioxidante e viabilidade de sementes de girassol após estresse hídrico e salino. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 4, p. 752-761, 2011.

CAKMAK, T. et al.. Natural aging-related biochemical changes in alfafa (*Medicago sativa* L.) seeds stored for 42 years. **International Research Journal of Plant Science**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2010.

- COSTA, C.; RIBEIRO, P.; de CASTRO, R.; FERNANDEZ, L. Avaliação da atividade antioxidante em amostras comerciais de *Schinus terebinthifolius* (aroeira vermelha). **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Salvador, v. 12, n. 3, p. 312-317, 2013.
- COSTA, Cinara Oliveira D`Sousa. **Avaliação da Atividade Antioxidante e Antimicrobiana de Extratos de *Myracrodruon urundeuva* Allemao e *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 2011. 64f. Dissertação (Mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas). Universidade Federal da Bahia. 2011.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2. ed. West Sussex: John Wiley & Sons, 2002.
- DIZDAROGLU, Miral; JARUGA, Pawel. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. **Free radical research**, [S.l.], v. 46, n. 4, p. 382-419, 2012.
- DU, Juan; GEBICKI, Janusz M. Proteins are major initial cell targets of hydroxyl free radicals. **The international journal of biochemistry & cell biology**, [S.l.], v. 36, n. 11, p. 2334-2343, 2004.
- _____. DNA degradation and protein peroxidation in cells exposed to hydroxyl free radicals. **Redox report**, [S.l.], v. 7, n. 5, p. 329-331, 2002.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p.1039-1042, 2011.
- FLORES, A. V. et al.. Atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna* Schott sob diferentes temperaturas. **CERNE**, [S.l.], v. 20, n. 3, p. 401-408, 2014.
- GARG, N. & MANCHANDA, G. 2009. ROS generation in plants: Boon or bane? **Plant Biosystems**, 143(1): 81-96.
- GECHEV, T. S. et al.. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bio Essays**, [S.l.], v. 28, p. 1091–1101. 2006.
- GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutases. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**, [S.l.], v.59, p.309-314, 1977.
- GILL, Sarvajeet Singh; TUTEJA, Narendra. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, [S.l.], v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization: methodology and mechanism. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v.49, p.1341-1348, 1995.

IENCO, E.C. et al. May "mitochondrial eve" and mitochondrial haplogroups play a role in neurodegeneration and Alzheimer's disease?. **Int. J. Alzheimers Dis.** [S.l.], 2011.

IGBINOSA, O. O. et al. Polyphenolic Contents and Antioxidant Potential of Stem Bark Extracts from *Jatropha curcas* (Linn). **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v.12, p.2958-2971, 2011.

JALEEL, C. A. et al. Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. **Acta Physiology Plant**, [S.l.], v. 31, p.427–436, 2009.

_____. Water deficit stress mitigation by calcium chloride in *Catharanthus roseus*: Effects on oxidative stress, praline metabolism and indole alkaloid accumulation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amsterdam, v.60, p.110-116, 2007.

LEAL, L. K. A. M. et al. Amburoside A a glucoside from *Amburana cearensis* protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v.388, p.86-90, 2005.

LÓPEZ-LAREDO, A. et al. Variation in antioxidant properties and phenolics concentration in different organs of wild growing and greenhouse cultivated *Castillejatenui flora* Benth. **Acta Physiologia e Plantarum** [S.l.], 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MARINI, Patricia et al.. Indicativos da perda de qualidade de sementes de arroz sob diferentes temperaturas através da atividade enzimática e respiratória. **Interciência**, [S.l.], v. 38, n. 1, p. 54-59, 2013.

_____. Alterações fisiológicas e bioquímicas em sementes de arroz submetidas ao estresse térmico. **Revista Ciência Agronômica**, [S.l.], v. 43, n. 4, p. 722-730, 2012.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.10, n.2, p.96-103, 2007.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009.

MEI, Y.; SONG, S. Response to temperature stress of reactive oxygen species scavenging enzymes in the cross-tolerance of barley seed germination. *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, Hangzhou, v. 11, n. 12, p. 965-972, 2010.

NAKANO, Y.; ASADA, K. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. ***Plant and Cell Physiology***, [S.l.], v.22, p.867-880, 1981.

NITHIYANANTHAM, S.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G. A promising approach to enhance the total phenolic content and antioxidant activity of raw and processed *Jatropha curcas* L. kernel meal extracts. ***Industrial Crops and Products***, Amsterdam, v.43, p.261–269, 2013.

OLIVEIRA, D. da S.; et al.. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. ***Acta Scientiarum. Health Sciences***, Maringá, v. 33, n. 1, p. 89-98, 2011.

PEREIRA, E. P. L. et al..Effect of water restriction on total phenolics and antioxidant properties of *Amburana cearensis* (Fr. Allem) A.C. Smith cotyledons during seed imbibition. ***Acta Physiologia Plantarum***, [S.l.], v.36, p.1293–1297, 2014.

PIMENTEL, G. D. et al. Gut-central nervous system axis is a target for nutritional therapies. *NutrJ*, [S.l.], v.11, p.22.2012.

POMPEU, G.B. et al.. Antioxidant isoenzyme responses to nickel-induced stress in tobacco cell suspension culture. ***Scientia Agricola***, Piracicaba, v.65, p.548-552, 2008.

RAMALHEIRO, J. P. S. C. Contribuição para a caracterização bioquímica do estado de maturação de azeitonas de diferentes variedades. 2009. 51f. Trabalho de Conclusão de curso (Dissertação - Mestrado em Engenharia Alimentar) - Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2009.

RASMUSSEN AG, HEISER V, ZABALETA E, BRENNICKE A, GROHMANN L. Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondria complex in plants. ***Biochemical Biophysics Acta***, Amsterdam, v.1364, p.101-111, 1998.

RIBEIRO, P. R. et al..Identification of reference genes for gene expression studies during seed germination and seedling establishment in *Ricinus communis* L. ***Seed Science Research***, Cambridge, v. 24, n. 04, p. 341-352, 2014.

- ROCHA, Nubia Ferreira. **Atividade antioxidante e antitumoral em extratos de *Jatropha curcas* L.** 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (mestrado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas). Universidade Federal da Bahia. Salvador- BA. 2013.
- SILVA, E. N. et al.. Contrasting physiological responses of *Jatropha curcas* plants to single and combined stresses of salinity and heat. **Journal of Plant Growth Regulation**, [S.l.], v.32, p.159–169, 2013.
- SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.15, n.1, p.71-81, 2002.
- SOUSA, C.M.D.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**. Teresina, v.30, n. 2, p.351-355, 2007.
- SRIVASTAVA, V.et al. Down-regulation of high isoelectric point extracellular superoxide dismutase mediates alterations in reactive oxygen species metabolism and developmental disturbances in hybrid aspen. **The Plant Journal**, [S.l.], v.49, p.135–148, 2006.
- TEWARI, Rajesh Kumar; PROMMER, Judith; WATANABE, Masami. Endogenous nitric oxide generation in protoplast chloroplasts. **Plantcellreports**, [S.l.], v. 32, n. 1, p. 31-44, 2013.
- VICENTINO, A. R. R.; MENEZES, F. de S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.17, n.3, p.384-387, 2007.
- VIRGENS, Ivana Oliveira et al. Comportamento fisiológico de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All.(Anacardiaceae) submetidas a fatores abióticos. **Ciência Florestal**, v. 22, n. 4, p. 681-692, 2012.
- WILLEKENS, H., INZEÂ, D., VAN MONTAGU, M., VAN CAMP, W. Catalases in plants. **Molecular Breeding**, [S.l.], v.1, p. 207- 228, 1995.

ANEXO (Capítulo IV)

Teste de média: Teste t de Student (LSD) para o desdobramento das variáveis analisadas.Tabela 1: Atividade da Catalase ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ Prot}$) em sementes, plântulas e diferentes compartimentos de plântulas de *Jatropha curcas* L. submetidas à germinação sob diferentes temperaturas (25, 30 e 35°C).

Compartimentos	Temperatura (°C)			Média Geral
	25	30	35	
Semente Seca	0.14 Aa	0.14 Ba	0.14 Ba	0.14 B
St. Embebida	0.16 Ac	0.25 Aa	0.21 Ab	0.20 A
Plântula	0.06 Ba	0.04 Ca	0.04 Ca	0.04 C
Parte aérea	0.10 Ca	0.05 Cb	0.03 Cb	0.06 C
Raiz	0.01 Da	0.03 Ca	0.02 Ca	0.02 D
Média Geral	0.10 a	0.10 a	0.09 a	

Médias seguidas por letras maiúscula iguais na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste t de Student (LSD) ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 2: Atividade da Superóxido Dismutase (U SOD/mg Prot) em sementes, plântulas e diferentes compartimentos de plântulas de *Jatropha curcas* L. submetidas à germinação sob diferentes temperaturas (25, 30 e 35°C).

Compartimentos	Temperatura (°C)			Média Geral
	25	30	35	
Semente Seca	21.09 Aba	21.09 Ba	21.09 Ba	21.09 B
St. Embebida	14.30 Bb	42.73 Aa	42.00 Aa	33.34 A
Plântula	30.48 Aa	39.60 Aa	13.93 Bb	28.00 AB
Parte aérea	23.19 Aba	17.28 Ba	23.31 Ba	21.26 B
Raiz	10.20 Bb	36.22 Aa	46.01 Aa	30.81 A
Média Geral	19.85 b	31.39 a	29.47 a	

Médias seguidas por letras maiúscula iguais na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste t de Student (LSD) ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 3: Atividade da Ascorbato Peroxidase ($\text{mmol ASA min}^{-1} \text{ MF}^{-1}$) em sementes, plântulas e diferentes compartimentos de plântulas de *Jatropha curcas* L. submetidas à germinação sob diferentes temperaturas (25, 30 e 35°C).

Compartimentos	Temperatura (°C)			Média Geral
	25	30	35	
Semente Seca	0.21 ABa	0.21 Ba	0.21 Ca	0.21 B
St. Embebida	0.73 ABa	1.11 ABa	0.91 BCa	0.92 AB
Plântula	1.32 ABa	1.50 ABa	2.05 ABa	1.62 A
Parte aérea	1.73 Aa	1.70 ABa	0.48 Ca	1.30 A
Raiz	0.00 Bb	2.33 Aa	2.75 Aa	0.70 A
Média Geral	0.80 a	1.37 a	1.28 a	

Médias seguidas por letras maiúscula iguais na coluna e minúscula na linha não diferem entre si pelo teste t de Student (LSD) ao nível de 5% de probabilidade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Visando contribuir com informações consistentes sobre o estudo de sementes de *Jatropha curcas* L., esta tese buscou contemplar quatro vertentes de grande importância no estudo com sementes: morfologia, fisiologia, bioquímica, além do uso da radiologia correlacionada às informações morfofisiológicas.

Primeiramente foi possível caracterizar as sementes de *J. curcas* L. na qual os estudos desenvolvidos com diferentes genótipos geraram dados que possibilitarão o reconhecimento de características morfológicas de outros genótipos. Em seguida foram desenvolvidas diferentes análises experimentais abordando aspectos fisiológicos que nos possibilitou estabelecer algumas evidências e sugerir formas de ampliar o conhecimento relacionado à espécie a partir de futuras propostas. Algumas delas serão comentadas a seguir.

O estudo do efeito do grau de umidade das sementes na germinação, no qual ficou evidenciado que o teor de água das sementes pode influenciar na capacidade germinativa, porém investigações bioquímicas poderiam nos explicar melhor que efeito metabólico pode estar influenciando neste comportamento que por vezes pode nos levar a ideia de ocorrência de dormência na espécie, mas somente estudos complementares poderiam nos informar se pode estar havendo um bloqueio físico pela presença do tegumento ou fisiológico pela ação de hormônios inibidores da germinação, por exemplo. Estudos de armazenamento também devem levar em consideração o parâmetro grau de umidade em consideração durante as análises. Já o estudo da curva de absorção de água pelas sementes possibilitou caracterizar as diferentes fases do processo germinativo nas sementes com e sem tegumento, demonstrando, como já citado por outros autores, que a diferença na taxa inicial de embebição pode variar extensivamente, dependendo das características da testa e/ou pericarpo que cerca o embrião, no caso das sementes de *J. curcas*, a testa.

A condução do *screening* térmico possibilitou a determinação das condições ótimas de germinação para cada genótipo estudado e uma previsão de melhores condições para espécie, ao passo que foi verificado que um dos genótipos (Alagoas 2013) apresentou uma aparente resistência às temperaturas mais elevadas que os outros, assim como sensibilidade às temperaturas mais baixas, no caso 35° e 20°C respectivamente. O *screening* osmótico demonstrou sensibilidade das sementes de *J. curcasa* restrição hídrica, pelo menos nos estádios iniciais do seu desenvolvimento e o estudo de condicionamento osmótico por meio

de embebição controlada (*priming*) como forma de envigoroamento das sementes não promoveu melhoria na germinação nas condições testadas, porém demonstrou uma melhoria em termos de desenvolvimento de plântula, sendo assim recomendado testar o *priming* na investigação do efeito no desenvolvimento de plântulas e resistência ao estresse em campo. Outro aspecto a ser considerado é que no presente estudo, o *priming* foi desenvolvido com genótipos de sementes que apresentavam uma boa viabilidade, efeito que possivelmente pode ser revertido em caso de se tentar aplicar a técnica em lotes de sementes com perda de viabilidade por exemplo.

Com relação ao estudo desenvolvido com uso de radiografia correlacionada a informações morfológicas nas sementes de *J. curcas*, foi possível verificar que a técnica utilizada contribuiu não só como indicativo do seu potencial de viabilidade, mas também possibilitou a construção dos padrões de imagem para análise de testes de raios X para sementes de *J. curcas*, onde pensando-se de forma aplicada às imagens radiográficas podem contribuir na identificação de anormalidades para posterior eliminação de sementes com alguma contaminação por patógeno ou que apresentem má formação durante a maturação e/ou problemas durante o processo de coleta e beneficiamento. Desta forma, proporcionando a melhoria da qualidade física e fisiológica de genótipos de sementes, tanto para fins comerciais ou em caso de armazenamento com fins de pesquisa ou manutenção de amostras em bancos de germoplasma.

Em termos bioquímicos, acredita-se ser necessário a repetição de algumas análises e a continuidade dos estudos para investigação do estresse oxidativo sob efeito de agentes abióticos induzidos, já que aparentemente as temperaturas testadas não constituíram condição tão estressante para a planta. Inclusão de outras análises, como o da atividade de outras enzimas responsáveis pelo sistema oxidativos em plantas, assim como a determinação de perfis eletroforéticos das respectivas enzimas também podem contribuir na compreensão desse contexto.

Estudos moleculares para investigar, por exemplo, a expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo de determinados fatores abióticos induzidos, também são sugestivos para compreender os fatores genéticos que regulam a biossíntese deles, assim como, fornecer informações relevantes que possam ser úteis na elaboração de futuros projetos com foco em programas de melhoramento genéticos da planta, assim como estudos que visem sua aplicação biotecnológica.



Instituto de Ciências da Saúde

Programa de Pós Graduação

Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas

Avenida Reitor Miguel Calmon s/n - Vale do Canela. CEP: 40110-100