



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM

RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS



MARLA OLIVEIRA CERQUEIRA

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS
EM SEMENTES DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)
SOB CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

FEIRA DE SANTANA/BA

JUNHO/2012

MARLA OLIVEIRA CERQUEIRA

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS
EM SEMENTES DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)
SOB CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

FEIRA DE SANTANA/BA

JUNHO/2012

Ficha catalográfica: Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

C395p Cerqueira, Marla Oliveira
Perfil eletroforético de proteínas em sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) sob condições de restrição hídrica / Marla Oliveira Cerqueira. – Feira de Santana - BA, 2012.
75f. : il.

Orientador: Renato Delmondez de Castro.
Co-orientadora: Luzimar Gonzaga Fernandez

Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais)– Universidade Estadual de Feira de Santana, Departamento de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, 2012.

1. Pinhão manso. 2. Endosperma. 3. Eixo-embriônico. 4. Componentes tóxicos. 5. Curcína. I. Castro, Renato Delmondez de. II. Fernandez, Luzimar Gonzaga. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Departamento de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 582.757

MARLA OLIVEIRA CERQUEIRA

**PERFIL ELETROFORÉTICO DE PROTEÍNAS
EM SEMENTES DE PINHÃO-MANSO (*Jatropha curcas* L.)
SOB CONDIÇÕES DE RESTRIÇÃO HÍDRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientador: Prof. Dr. Renato Delmondez de Castro
Co-orientadora: Prof^a. Dr.^a Luzimar Gonzaga Fernandez

FEIRA DE SANTANA/BA

JUNHO/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Daniele Takahashi
Departamento de Biofunção / Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Dr. Guilherme Araújo Lacerda
Departamento de Biofunção / Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Prof.^a Dr.^a Luzimar Gonzaga Fernandez
Co-orientadora e Presidente da Banca
Departamento de Biofunção / Instituto de Ciências da Saúde
Universidade Federal da Bahia - UFBA

FEIRA DE SANTANA/BA
JUNHO/2012

Aos meus pais Aloisio e Ozenaide pelo exemplo e apoio em todas as etapas de minha vida... pelos exaustivos sacrifícios...pelas palavras de incentivo ditas por telefone para que eu continuasse firme na batalha, conselhos que escondiam saudades e preocupações...por vezes que tiveram que se conformar com minha ausência em momentos importantes...enfim, pelo amor incondicional e pelos mais sábios ensinamentos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À UEFS e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pela seriedade e responsabilidade de seus profissionais, em especial ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais (PPG-RGV), Prof. Dr. José Raniere Silva Santana.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo aporte financeiro por meio de projeto PNPd.

À PETROBRÁS, também pelo aporte financeiro por meio do do projeto de pesquisa ao qual o meu trabalho está inserido.

Ao meu orientador Dr. Renato Delmondez de Castro por ter me aceitado como orientanda, por me auxiliar nos trabalhos, por confiar em mim e estar sempre buscando melhorias para o desenvolvimento das pesquisas juntamente com a professora Luzimar.

À minha Co-orientadora Dr.^a Luzimar Gonzaga Fernandez por acompanhar meus trabalhos, tirar minhas dúvidas e pelas constantes buscas de melhorias para todos os trabalhos no Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

Ao Alberto Vicente, secretário do PPG-RGV, um anjo para os alunos. Sempre disposto a ajudar.

À professora Marta Bruno Loureiro por está sempre presente auxiliando nos trabalhos dos estudantes de graduação, mestrado e doutorado no LBBB-UFBA.

À Danielle Takahashi meu sincero agradecimento por ter sido minha companheira de bancada. Sem ela muita coisa não aconteceria. Valeu Dani!

A Guilherme A. Larcerda que tanto nos ensinou a organizar nosso LBBB.

A Leomara que “foi pau para toda obra” no laboratório, nos ajudando sempre. Saudades Leo!

A Wilson pelas dicas, ideias e por sempre está disposto a ajudar.

A Deus uno e supremo que, acima de tudo e todos, me deu força, paciência e sabedoria em toda a jornada.

Aos meus pais Aloisio e Ozenaide que tanto se dedicaram para que eu pudesse chegar até aqui. Eterna gratidão.

Aos meus irmãos Marcos e Mílvia que por muitas vezes tiveram que me representar nos momentos de ausência perante a família e os amigos e pelo apoio quando precisei.

A minha sobrinha e afilhada Ianne Cecília por ser tão singular ao perguntar: “Tia Inha, tu tá onde? Por que você nunca mais veio me ver em Feira de Santana? Estou com muita saudade de você.” Tia ama!

Aos meus avós, sempre preocupados comigo.

Ao meu amado Hugo por tanto me estimular a seguir em frente... pelo amor, cuidados, companheirismo e dedicação principalmente nos momentos decisivos finais do mestrado.

Aos meus sogros Alice e Aldo, minha cunhada Diana, seu esposo Ian e filho Felipe por me acolherem com carinho e me incentivarem a buscar o melhor.

À D. Luci, seu Adhemir, Murilo e Érick por terem me amparado assim que eu cheguei em Salvador. Grande gratidão.

Aos colegas da turma pelos momentos que deixaram muitas saudades.

Ao professor Milton Roque que me apresentou o mundo da pesquisa. Muito obrigada pela sua amizade, atenção, carinho e respeito. Obrigada meu amigo!

E finalmente a todos os amigos, coleguinhas do LBBB-UFBA e seus familiares que direta ou indiretamente contribuíram significativamente para a construção desta dissertação: Mooana, Érica Patrícia, Cris, Leilane, Carol, Cissa, Alexandre, Cimille, Erikinha, Graça, Brena, Felipe, Valdir, Paulo Teixeira, Ivana, Geórgia Vocês foram peças fundamentais em todos os momentos desta caminhada, cada um com sua devida importância. E é claro que sem vocês não haveria “happy hour” nas sextas-feiras. Meus sinceros agradecimentos!

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1:	Protocolo de preparação do gel de eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970; DE CASTRO et al. 1998).	24
Tabela 2:	Tempo médio (TM), Velocidade média (VM), Índice de velocidade da germinação (IVG) e Coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de pinhão-manso embebidas em água e sob restrição hídrica (-0,8 MPa) a 25°C.	26
Tabela 3:	Peso de mil sementes (g), massa seca (g) e teor de umidade (%) das sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA.	28
Quadro 1:	Siglas utilizadas para cada extrato bruto de amostra de sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em água e em PEG 8000, -0,8 MPa com suas respectivas descrições.	22
Quadro 2:	Valores médios de absorbância, concentração de proteínas por μL da amostra (μg), quantidade de amostra para obter 15 μg de proteínas (μL) e volume de bromofenol para 25 μL final em cada canaleta para amostras do controle: sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em água.	57
Quadro 3:	Valores médios de absorbância, concentração de proteínas por μL da amostra (μg), quantidade de amostra para obter 30 μg de proteínas (μL) e volume de bromofenol para 20 μL final em cada canaleta para amostras do tratamento de restrição hídrica: sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em PEG 8000, -0,8 MPa.	58

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imagens de pinhão-manso, **(A)** Arbusto. **(B)** botões florais e desenvolvimento da semente. **(C)** Inflorescência contendo flores estaminadas do sexo masculino (M) e flores pistiladas do sexo feminino (F). **(D)** Corte transversal do fruto contendo três sementes em desenvolvimento. **(E)** Sementes maduras. Fotos: **(A)** <http://www.biofuelsrevolution.com/images/grass-stains/Jatropha-plantation-in-Brazil.jpg>; **(B-E)** Dr. Andrew King (King et al., 2009). 5
- Figura 2:** Aspecto anatômico da semente de pinhão-manso, **(A)** semente inteira com tegumento ou testa (T) e a carúncula (Ca). **(B)** semente sem testa, com o tégmen (Tg) e endosperma (En) expostos. **(C)** par de cotilédones foliáceos (Cot) e embrião (Em). Fotos: **(B)** Dr. Wei He (2011). 12
- Figura 3:** Mapa de localização da cidade de Cafarnaum/BA. Fotos: maps.google.com.br/ <http://pt.wikipedia.org/wiki/Cafarnaum> (Bahia). 16
- Figura 4:** Teste de germinação em rolo. **(A)** Distribuição das sementes no rolo e **(B)** Fechamento do rolo. 17
- Figura 5:** Medidas biométricas de comprimento (A), largura (B) e espessura (C) na semente de pinhão manso. 18
- Figura 6:** Dessecador com os recipientes de metal contendo as sementes submetidas à secagem em estufa (105 °C por 24h). 19
- Figura 7:** **(A)** Semente sendo aberta com auxílio de uma lâmina, após a retirada do tegumento. **(B)** Cotilédones do endosperma sendo separados com o auxílio de uma pinça e **(C)** Saquinhos de papel alumínio devidamente identificados e utilizados para guardar no ultrafreezer os compartimentos separados. 20
- Figura 8:** Média (mm) das medidas de biometria das sementes dos lotes 2010 e 2011 de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA. Comp. (comprimento), Larg. (largura) e Esp. (espessura). LBBB/ICS/UFBA/Marla Cerqueira. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%. 30
- Figura 9:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo extratos proteicos de amostras eixo hipocótilo-radícula/plântula das sementes de pinhão-manso (controle): sementes embebidas em água. Canaletas - **MM**: marcador de peso molecular, **2**: semente seca; **3**: 2 dias de embebição, **4**: 4 dias de embebição; **5**: 6 dias de embebição; **6**: 8 dias de embebição; **7**: 10 dias de embebição; **8**: 12 dias de embebição; **9**: 14 dias de embebição. 32
- Figura 10:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo extratos proteicos de amostras de endosperma das sementes de pinhão-manso (controle): sementes embebidas em água. Canaletas - **MM**: marcador de peso molecular, **2**: semente seca; **3**: 2 dias de embebição, **4**: 4 dias de embebição; **5**: 6 dias de embebição; **6**: 8 dias de embebição; **7**: 10 dias de embebição; **8**: 12 dias de embebição; **9**: 14 dias de embebição. A seta indica o peso molecular correspondente à proteína curcina e o círculo vermelho as prováveis bandas da curcina. 33
- Figura 11:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo extratos proteicos de amostras de eixo-embrionário das sementes de pinhão-manso sob restrição hídrica: sementes embebidas em PEG 8000, -0,8 MPa. Canaletas - **MM**: marcador de peso molecular, **2**: semente seca; **3**: 2 dias de embebição, **4**: 4 dias de 36

embebição; **5**: 6 dias de embebição; **6**: 8 dias de embebição; **7**: 10 dias de embebição; **8**: 12 dias de embebição; **9**: 14 dias de embebição.

- Figura 12:** Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo extratos proteicos de amostras de endosperma das sementes de pinhão-manso sob restrição hídrica: sementes embebidas em PEG 8000, -0,8 MPa. Canaletas - **MM**: marcador de peso molecular, **2**: semente seca; **3**: 2 dias de embebição, **4**: 4 dias de embebição; **5**: 6 dias de embebição; **6**: 8 dias de embebição; **7**: 10 dias de embebição; **8**: 12 dias de embebição; **9**: 14 dias de embebição. A seta indica o peso molecular correspondente à proteína curcina e o círculo vermelho as prováveis bandas da curcina. 37
- Figura 13:** Curva analítica utilizada para o cálculo da concentração de proteínas nas amostras do controle (sementes de pinhão manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em água). 55
- Figura 14** Curva analítica utilizada para o cálculo da concentração de proteínas nas amostras do tratamento de restrição hídrica (sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em PEG 8000, -0,8 MPa. 56

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AGECOM – Agência Goiana de Comunicação

BSA - Albumina sérica bovina

DNA – Ácido desoxirribonucleico

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Hab/km² – Habitantes por quilômetro quadrado

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e estatística

kDa - Kilodalton

mA - Miliampere

mM - Milimolar

MPa - Mega Pascal

nm - Nanômetro

pH - Potencial hidrogeniônico

PIB – Produto interno bruto

RAS - Regras para Análise de Sementes

RNA – Ácido ribonucleico

RPM - Rotações por minuto

rRNA – Ácido ribonucleico ribossômico

S – Sul

t – Toneladas

Tris-HCl - Tris hidrocloreídrico

V - voltagem

W – Oeste

µg.mL⁻¹ - Micrograma por mL

µL – Microlitro

RESUMO

Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma Euphorbiaceae de grande interesse para a produção do biodiesel, porém componentes tóxicos limitam o uso de suas sementes. O trabalho objetivou verificar a influência da restrição hídrica no perfil eletroforético de proteínas durante a embebição de sementes de pinhão-manso. Foi realizada a caracterização fisiológica de dois lotes de sementes oriundas de Cafarnaum/BA analisando a germinação, peso de mil, biometria e umidade das sementes. O lote com maior germinação foi submetido à restrição hídrica com PEG 8000 (-0,8 MPa), mantidas em B.O.D. a 25°C, sem fotoperíodo durante 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias. Eixo-embrionário e endosperma foram separados, macerados em nitrogênio líquido, adicionados a tampão fosfato pH 7,5, centrifugado a 14.000 rpm, 4°C por 15 minutos, para extração de proteínas totais acumuladas nos compartimentos. O sobrenadante foi coletado para a quantificação destas proteínas utilizando-se como padrão, albumina bovina e leitura de absorbância a 595 nm. Foi realizado eletroforese em gel de poliacrilamida a 300 V, 60 mA durante 1:20 h para verificar o perfil proteico dos compartimentos. As proteínas foram identificadas no gel com solução de Azul de Comassie. O perfil eletroforético diferiu nas amostras germinadas em água e em PEG 8000 (-0,8 Mpa), o qual contribuiu para a visualização de bandas proteicas relacionadas com a defesa da planta à restrição hídrica e aumento na intensidade das bandas correspondentes ao peso molecular da curcina nas amostras de endosperma das sementes submetidas à restrição hídrica em comparação à sementes secas.

Palavras-chave: Endosperma, eixo-embrionário, componentes tóxicos, PEG 8000, curcina.

ABSTRACT

Physic nut (*Jatropha curcas* L.) is a Euphorbiaceae of great economic interest for the production of biodiesel, but toxic components limit the use of its seeds. The aim of the study was to check the influence of water restriction in the electrophoretic profile of proteins during imbibition of seeds of physic nut. Two seeds lots from Cafarnaum/BA were characterized by analyzing germination percentage, weight of thousand seeds, biometry and moisture of seeds. The lot with higher germination percentage was imbibed water restriction in PEG 8000 solution (-0,8 MPa) and incubated at 25 °C in continuous darkness for 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14 days. Embryonic axis and endosperm were isolated, macerated in liquid nitrogen, added to phosphate buffer pH 7.5, centrifuged at 14.000 rpm at 4 °C for 15 minutes for extraction of total proteins. The supernatant was collected for quantification of total protein using BSA as standard and performing absorbance reading at 595 nm in a spectrophotometer. Was carried the polyacrylamide gel electrophoresis at 300 V, 60 mA at 1:20 h to verify the protein profile in seed tissues. The proteins were visualized in the gel with coomassie blue solution. The electrophoretic profile differed between samples imbibed in water and in PEG 8000 (-0.8 MPa). It was possible to visualize protein bands related to plant defense to water restriction as well as an increased on intensity of bands corresponding to the molecular weight of the curcin in samples of endosperm of seeds imbibed under water restriction, when compared to dry seeds.

Key-words: Endosperm, embryonic axis, toxic components, PEG 8000, curcin.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE TABELAS E QUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.0	INTRODUÇÃO	1
2.0	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	A Família Euphorbiaceae e o pinhão-manso	3
2.2	Importância do pinhão-manso.....	6
2.3	Restrição hídrica	8
2.4	Morfologia da semente	11
2.5	Proteínas totais.....	12
2.6	Curcina	13
3.0	MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1.	Área de amostragem (procedência das sementes)	16
3.2.	Ensaio em laboratório	17
3.2.1.	Teste de germinação	17
3.2.2.	Peso de mil sementes.....	18
3.2.3.	Biometria das sementes.....	18
3.2.4.	Teor de água nas sementes.....	18
3.2.5.	Restrição hídrica de sementes.....	19
3.2.6.	Extração de proteínas totais	21
3.2.7.	Quantificação das proteínas totais.....	21
3.2.8.	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	23
3.3.	Análise estatística	25
4.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
4.1	Caracterização dos lotes.....	26
4.1.1	Variáveis da germinação	26
4.1.2	Peso de mil, teor de umidade e massa seca de sementes	28
4.1.3	Biometria das sementes	29
4.2	Quantificação de proteínas totais	31
4.3	Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)	32
5.0	CONCLUSÕES	41
6.0	REFERÊNCIAS.....	42
	APÊNDICE I.....	55
	APÊNDICE II	57
	ANEXO	59

1.0 INTRODUÇÃO

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma espécie que pertence à família Euphorbiaceae (SANTOS et al., 2005). Apesar de apresentar agentes tóxicos, essa oleaginosa tem despertado atenção, ultimamente, devido ao potencial do uso do óleo produzido por suas sementes para a produção de biodiesel. Por ser uma espécie tolerante à seca e por adaptar-se muito bem às terras marginais, apresenta-se como uma alternativa viável para o aumento da renda da agricultura familiar sem prejudicar a produção de alimentos (COX et al., 2006, GLOVER et al., 2007).

É uma espécie considerada uma opção agrícola para a região Nordeste do Brasil, pois se desenvolve sob condições climáticas diversas (SEVERINO et al., 2004), apresenta produtividade elevada chegando a produzir duas toneladas de óleo por hectare, ainda ajuda a armazenar mais carbono e manter a qualidade do solo, água e nutrientes de uma forma mais sustentável devido ao seu sistema radicular profundo (COX et al., 2006, GLOVER et al., 2007). Pode ser utilizado como cerca viva, suporte para plantas lianas como a baunilha (*Vanilla aromatica*), visto que seu tronco possui casca lisa, macia e como fixador de dunas na orla marítima (PEIXOTO, 1973). Contudo, a espécie ainda prescinde de um conhecimento agrônomo mais aprofundado nas diversas condições de clima e solos brasileiros (BELTRÃO e CARTAXO, 2006)

As sementes de pinhão-manso apresentam toxinas e agentes anti-nutricionais que limitam sua utilização como ração animal. Dentre estes se destacam os ésteres de forbol e a curcina como os componentes mais tóxicos localizados no endosperma das sementes (OLSNES & KOSLOV, 2001).

A ineficiência dos processos de destoxificação da torta resultante da extração do óleo do pinhão-manso faz com que seja utilizada apenas como fertilizante orgânico. Entretanto, o uso da torta para outra finalidade, como alimentação animal ajudaria a resolver o problema da quantidade de biomassa produzida, dando outro destino para esta e ainda traria vantagens para os animais uma vez que a torta é rica em proteínas (OPENSHAW, 2000; AUDI et al., 2005; SEVERINO, 2005).

Para contribuir com o aumento das informações a respeito do pinhão-mansão, o presente trabalho objetivou verificar a influência da restrição hídrica no perfil eletroforético de proteínas durante a embebição em sementes de pinhão-mansão. Para tanto foi necessário, (I) caracterizar fisiologicamente sementes de pinhão-mansão oriundas de Cafarnaum/BA, (II) verificar o comportamento fisiológico de sementes de pinhão-mansão em condições de restrição hídrica induzida por solução de PEG 8000, -0,8 MPa, (III) determinar o perfil eletroforético das proteínas totais presentes no eixo embrionário e no endosperma das sementes de pinhão-mansão em condições de restrição hídrica e extraídas em pH 7,5.

2.0 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Família Euphorbiaceae e o pinhão-manso

O pinhão-manso é uma espécie pertencente à família das Euphorbiaceae, que estão entre as famílias de maior importância econômica entre as Angiospermas. Incluem plantas geralmente latescentes, monoicas ou dioicas, com flores diclinas pistiladas muito características pelo gineceu sincárpico, ovário súpero e tricarpelar. O fruto é geralmente uma cápsula tricoca com deiscência explosiva, abrindo-se em três mericarpos (SATIRO et al., 2008)

Levantamentos florísticos revelam que a família está representada em regiões tropical e temperada de todo o planeta por um total de 8.000 espécies, distribuídas em 317 gêneros. Estes estão agrupados em 49 tribos e cinco subfamílias, segundo o sistema de classificação proposto por Webster (1994).

No Brasil é uma das famílias mais ricas em número de espécies, cerca de 1.000, distribuídas em cerca de 80 gêneros. Sua distribuição é ampla, possuindo representantes em todos os diferentes tipos de vegetação do país (CORDEIRO, 1995; HARLEY & SIMMONS, 1986; CARNEIRO et al., 2002; BARROSO et al. 1991). Ocorre praticamente em todas as regiões, sempre de forma esparsa, propagando-se, sobretudo, nos estados do Nordeste, em Goiás e em Minas Gerais. De modo geral, cresce nos terrenos abandonados e não cultivados, não se desenvolvendo, porém, nos locais de densa vegetação, com a qual dificilmente consegue competir (NUNES, 2007).

Segundo Salatino et al. (2007), muitas espécies de Euphorbiaceae são bem conhecidas em diferentes partes do mundo como tóxicas ou medicinais, o pinhão-manso é uma destas. A alta diversidade dos efeitos causados pelas toxinas dessa família é um reflexo da diversidade química elevada deste grupo de plantas.

A palavra *Jatropha*, deriva do grego *iatrós* (doutor) e *trophé* (comida), refletindo suas propriedades medicinais. É também conhecido como pinhão-paraguaio, pinhão-de-purga (Brasil), *pinõn*, *physic nut*, *purging nut* (Inglaterra), *tempate* (Honduras e El Salvador), *medicinier*, *pignon d'Inde*, *purghere* (França), *kadam* (Nepal), *yu-lu-tzu* (China), *mupuluka* (Angola), *butuje* (Nigéria), *pinoncillo* (México) e *purgueira* (Portugal) (HELLER, 1996).

A origem do pinhão-manso é bastante discutida. De acordo com Heller (1996) esta espécie foi provavelmente, distribuída por portugueses marítimos provenientes das ilhas de Cabo Verde a outros países como a África e a Índia. Alguns relatos afirmam ser proveniente da América do Sul (PEIXOTO, 1973). Outros afirmam que é natural do Estado do Ceará, no Brasil, outros, informam ser da América Latina (FERNANDEZ, 1993), provavelmente do México e América Central (GINWAL et al., 2005). No entanto, a espécie é encontrada em quase todas as regiões intertropicais com precipitação anual de 200-1500 mm (BRITTAINE & LUTALADIO, 2010), ocorrendo em maior escala nas regiões tropicais e temperadas e, em menor extensão, nas frias (CORTESEÃO, 1956; PEIXOTO, 1973; BRASIL, 1985).

É caracterizado como arbusto perene com cerca de 4 m de altura, latescente, folhas alternas, longo-pecioladas, cordiformes, com cinco lobos; flores unissexuadas, pentâmeras, amarelo-esverdeadas em panículas terminais ou axilares e com as flores masculinas ocupando as extremidades superiores dos ramos; frutos cápsulas tricocas, coriáceas com três sementes lisas e escuras, de cotilédones foliáceos e endosperma branco abundante (OLIVEIRA et al., 2007) Figura 1).

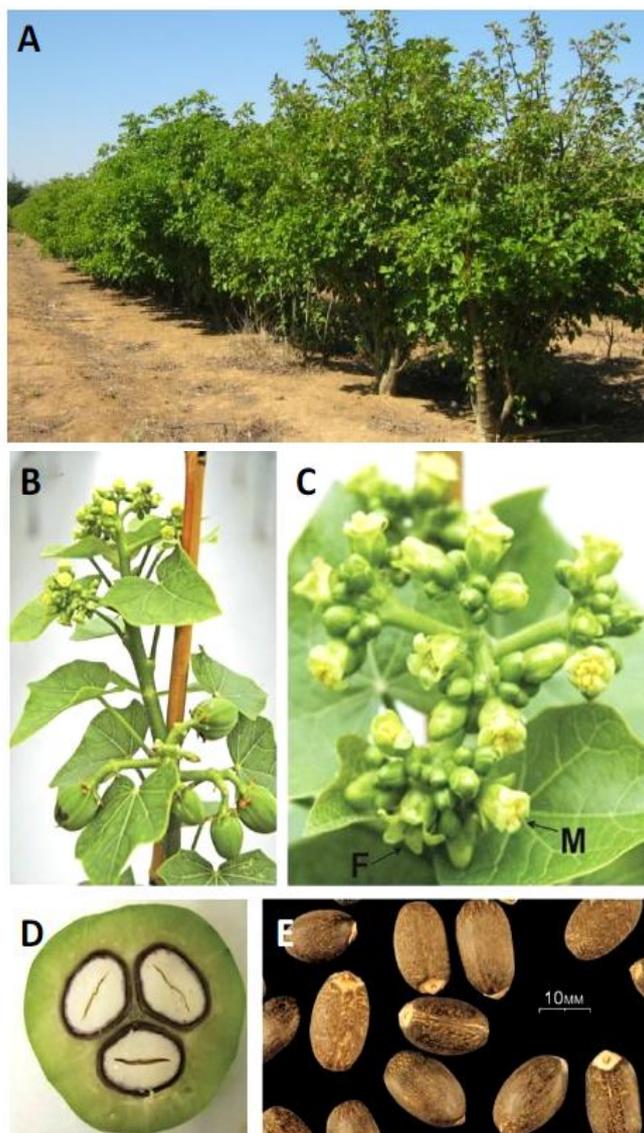


Figura 1. Imagens de *Pinhão-manso* L.. **(A)** Arbusto de *Pinhão-manso*; **(B)** botões florais e desenvolvimento da semente; **(C)** Inflorescência contendo flores estaminadas do sexo masculino (M) e flores pistiladas do sexo feminino (F); **(D)** Corte transversal do fruto contendo três sementes em desenvolvimento. **(E)** Sementes maduras. Fotos: **(A)** <http://www.biofuelsrevolution.com/images/grass-stains/Jatropha-plantation-in-Brazil.jpg>; **(B-E)** Dr. Andrew King (KING et al., 2009).

Sua propagação é feita geralmente por sementes, mas pode ser propagada vegetativamente a partir de estacas (BRITTAINE & LUTALADIO, 2010; HELLER, 1996). A multiplicação por sementes tem como resultado uma grande variabilidade, geralmente resulta em plantas mais robustas, de maior longevidade e com desenvolvimento de raiz apumada, o que confere uma maior resistência a

falta de água. Por outro lado a estaquia origina maior uniformidade entre indivíduos (SATURNINO et al., 2005).

Adaptado às mais diversas condições edafoclimáticas, o pinhão-manso apresenta aparente rusticidade e tolerância a condições de estresses abióticos e, talvez bióticos, sobrevivendo, assim, em condições de solos marginais e de baixa fertilidade natural. Deve preferencialmente ser plantado em solos profundos, bem estruturados e pouco compactados, para que o sistema radicular possa se desenvolver adequadamente, explorando o maior volume de solo possível (ARRUDA et al., 2004). A planta sobrevive utilizando a água armazenada nos caules, quando perdem as folhas, um mecanismo de adaptação à escassez de água (SATURNINO et al., 2005).

É uma espécie que não está domesticada e ainda não se conhecem variedades melhoradas ou cultivares. Sabe-se também muito pouco da bioquímica e da fisiologia do pinhão-manso e alguns aspectos agronômicos carecem ainda de investigação, como por exemplo, a população ideal de plantas e a configuração da plantação (BELTRÃO, 2006). No entanto é uma planta que se destaca pelo potencial oleaginoso de suas sementes (ARRUDA et al., 2004; SATURNINO et al., 2005; DIAS et al., 2007).

2.2 Importância do pinhão-manso

A crescente preocupação em relação ao meio ambiente e a rápida diminuição das reservas de combustíveis fósseis no mundo, além do aumento no preço do petróleo levou à exploração de óleos vegetais na produção de combustíveis alternativos (COSTA NETO et al., 2005).

O uso da biomassa para a produção de energia e biocombustíveis é considerado, atualmente, uma importante alternativa para o ajuste harmonioso entre o desenvolvimento e a conservação ambiental, principalmente em países em desenvolvimento (TOLEDO et al, 2009).

A demanda do uso da biomassa vegetal, em particular, como uma fonte de biodiesel, tem aumentado recentemente devido a uma série de fatores, incluindo aumento dos preços do petróleo, o desejo de reduzir emissões de CO₂ e segurança combustível. Ao mesmo tempo, há exigências crescentes em terra,

água e outros recursos usados para a produção de alimentos para uma crescente população mundial – o que não pode concorrer com a produção de biocombustíveis (KING et al., 2009).

O Brasil apresenta vantagens naturais para a agricultura energética como ampla disponibilidade de terras férteis, elevada insolação, boa distribuição de chuvas, além de apresentar grandes diversidades em espécies potenciais à produção de biocombustíveis (TOLEDO et al, 2009). Neste sentido o pinhão aparece como uma oleaginosa viável para a obtenção do biodiesel. A produção anual de sementes chega a 4,5 toneladas, cerca de 2 toneladas de óleo por hectare e atinge a idade reprodutiva cerca de três a quatro anos após o plantio – período que pode se estender por 40 anos (CARNIELLI, 2003; ACHTEN et al., 2008).

Grande parte do interesse em *Pinhão-manso* surgiu devido à sua capacidade de crescer em "terras marginais". Embora este termo seja pouco definido, é geralmente usado para descrever terra que é de fraca qualidade em termos de uso agrícola e normalmente não utilizada para cultivo. O uso deste tipo de terra para o cultivo de *Pinhão-manso* é atrativo, uma vez que não irá deslocar à produção de culturas de alimentos (FAIRLESS, 2007).

No país, além do uso como cerca viva em propriedades distantes do norte e nordeste de Minas Gerais, existem relatos de que o óleo de pinhão-manso já foi utilizado no passado na iluminação das casas, através de candeias, devido à vantagem de sua combustão não produzir fumaça nem odor (COELHO, 2006). Em países como a Índia e a Tailândia, grandes produtores de pinhão-manso, seu óleo já foi utilizado não somente na iluminação de residências como também na iluminação pública (AGECOM – BA, 2007).

O cultivo do pinhão-manso ainda ajuda na redução da erosão e na perda de água por evaporação, pois a planta cobre o solo com uma camada de matéria seca evitando enxurradas, e além do mais, enriquece-o com matéria orgânica decomposta (BRITTAINE & LUTALADIO, 2010, HELLER, 1996, KING et al., 2009, PEIXOTO, 1973).

O óleo viscoso contido em suas sementes é solúvel em álcool e possui inúmeras aplicações na indústria: produção de lubrificante de motores a diesel desde a segunda guerra mundial onde foi utilizado por países colonizados da África (GUIA RURAL, 2006), fabricação de sabão e tinta, na medicina popular como purgativo, tratamento de afecções na pele, hidropsia, gota, paralisia e reumatismo, principalmente nos países tropicais (SCAVONE e PANIZZA, 1980; ADOLF et al., 1984; GANDHI et al., 1995), usado como inseticida ou moluscicida (BRITTAINE e LUTALADIO, 2010).

O óleo do pinhão é rico em ácidos graxos insaturados, principalmente oleato (18:1) e linoleato (18:2), seguido por ácidos graxos saturados palmitato (16:0) e estearato (18:0) (ACHTEN et al., 2008). A extração do óleo das sementes do pinhão-manso resulta na torta.

Segundo Mendonça (2009) e Openshaw (2000) essa torta resultante da extração do óleo das sementes do pinhão-manso constitui excelente adubo orgânico, rico em nitrogênio, fósforo e potássio e poderia ser utilizada como alimento para ração animal. No entanto seu uso para tal finalidade está impossibilitado devido a presença de fatores limitantes de natureza tóxica, alergênica e antinutricional presentes, incluindo curcina – o foco deste trabalho e, ésteres de forbol como os mais tóxicos, lectina, inibidores de tripsina, fitatos, saponinas e taninos (MAKKAR et al., 1998a, MAKKAR et al., 1998b, MAKKAR & BECKER, 2009, DEVAPPA et al., 2010).

O plantio do pinhão-manso ainda está em fase inicial no Brasil, pois os sistemas de produção apresentam dificuldades de domínio tecnológico para regulamentar a espécie como cultura agrícola devido à necessidade de informações sobre a produção de sementes, sistemas de propagação, densidades de plantio, sistemas de podas de formação e manutenção, nutrição mineral e toxicidade, adubação e manejo da cultura (EMBRAPA Agroenergia, 2009).

2.3 Restrição hídrica

Em condições naturais e agricultáveis as plantas estão freqüentemente expostas aos estresses ambientais. Estresse pode ser definido como uma

pressão excessiva de algum fator adverso que tende a inibir o funcionamento normal dos sistemas. No caso das sementes, quando não levam a morte, alteram a velocidade, o tempo e a uniformidade da germinação. Entretanto, os desvios em relação a essas variáveis dependem tanto do grau do estresse quanto da resistência da espécie a estas condições adversas (GIAVENO & OLIVEIRA, 2003; TAIZ & ZEIGER, 2009).

Para que uma semente viável possa germinar são necessários: suprimento de água em quantidade suficiente; temperatura e uma composição de gases adequada, bem como de luz para determinadas espécies (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

A germinação é definida como a capacidade da semente produzir uma plântula que, pelas características das estruturas essenciais do embrião, demonstra aptidão para produzir uma planta normal sob condições de campo (BRASIL, 1992).

Frequentemente observa-se um padrão trifásico de absorção de água e hidratação de sementes secas durante a germinação. A fase I é rápida, dirigida pelo potencial matricial da semente seca. Trata-se de um processo puramente físico, que depende somente da ligação da água a matriz da semente. Na fase II, o metabolismo é reativado para que haja o crescimento do embrião e a finalização da germinação. É também chamada de um intervalo para preparação metabólica, caracterizada por um período de platô, onde as sementes não absorvem água (ou absorvem em pouquíssimas quantidades). Na fase III, ocorre a protrusão da raiz primária, e é observado um novo incremento no peso da semente, traduzido pelo acúmulo de água (BEWLEY & BLACK, 1994).

Até a fase II as sementes ainda são tolerantes a dessecação, podendo o processo ser estagnado e reiniciado posteriormente quando houver reidratação. Entretanto a partir da protrusão radicular haverá perda de viabilidade se o fornecimento de água for interrompido (TAYLOR, 1997; DE CASTRO et al., 2004).

Dentre os diversos fatores ambientais capazes de influenciar o processo germinativo, a indisponibilidade de água é um dos mais importantes. Da embebição resulta a reidratação dos tecidos, com conseqüente intensificação do processo respiratório e das demais atividades metabólicas, incluindo reativação

do ciclo celular e crescimento (DE CASTRO et al., 2000; CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Conseqüentemente ocorrem também alterações no perfil de expressão de genes em resposta à condição de estresse hídrico por 'seca' (VERLUES et al., 2006).

A aplicação de estresse em plantas tem sido usada para aumentar o desempenho de sementes de espécies ornamentais e agrícolas, por acelerar e uniformizar a germinação. O estresse pode ser definido como um fator externo, que exerce influência desvantajosa sobre a planta (TAIZ & ZEIGER, 2006). Pode-se citar como estresse a restrição hídrica e de temperatura elevada, que afetam a produtividade das culturas e limitam a expansão da agricultura em muitas regiões do mundo, e pelo ponto de vista agrícola esse estresse pode ser resumido como ambiente desfavorável, levando a diminuição na produtividade e comprometendo desta forma sua sustentabilidade (SONG et al., 2005).

O estresse hídrico, geralmente, atua diminuindo a velocidade e a percentagem de germinação de sementes, sendo que para cada espécie existe um valor de potencial hídrico, abaixo do qual a germinação não ocorre (ADEGBUYI et al., 1981). Em condições de laboratório, por conveniência, realizam-se estudos de germinação com o uso de soluções aquosas de sacarose, sais, manitol e polietilenoglicol, a fim de simular condições padronizadas de estresse hídrico para seleção de espécies mais tolerantes (SANTOS et al., 1992). Esse controle da hidratação da semente pelo emprego de soluções diluídas até um limite que permita a realização dos processos metabólicos pré-germinativos, sem a protusão da radícula, é denominado pré-condicionamento osmótico, osmocondicionamento ou *priming* (BRADFORD, 1986; YOON et al., 1997).

É importante se conhecer o potencial hídrico onde a porcentagem de germinação é nula e o período no qual as sementes deverão estar submetidas à solução osmótica. Se o fornecimento de água for insuficiente, as sementes não finalizarão a fase II, e se for excessivo, estas podem alcançar a fase III e os benefícios do osmocondicionamento serão perdidos (MARCOS FILHO, 2005).

O polietilenoglicol (PEG), fórmula geral $\text{HOCH}_2(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{OH}$, é um dos agentes osmóticos mais utilizados nesses estudos. É quimicamente inerte e atóxico para as sementes, possui molécula grande de alto peso molecular, é

capaz de simular condições de restrição hídrica sem penetrar no tegumento das sementes (VILLELA et al., 1991).

Loureiro et al. (2007) verificaram que o PEG 6000 no potencial osmótico de -0,6 MPa houve uma brusca redução na germinação de sementes de pinhão-mansão chegando a nulidade no potencial de -0,8 MPa. No entanto, a intensidade da resposta germinativa ao estresse hídrico foi variável entre as sementes de diferentes espécies. Silva et al., (2005) estudando o efeito do estresse hídrico sobre a germinação de sementes de faveleira (*Cnidoscolus juercifolius*), espécie também pertencente a família Euphorbiaceae e endêmica do semiárido nordestino, constataram que as sementes apresentaram um limite de tolerância maior, verificando a completa inibição da germinação a partir do potencial de -0,9 MPa.

O estudo sobre germinação e tratamento osmótico em sementes representa assim, uma linha de pesquisa das mais promissoras para se entender os mecanismos fisiológicos de sobrevivência ao estresse hídrico, não obstante vários de seus aspectos ainda não foram elucidados, como, por exemplo, os efeitos da secagem e a possibilidade de reversão dos efeitos dos tratamentos durante o armazenamento das sementes (CÓRDOBA, 1995). Além disso visa definir metodologias para avaliação da viabilidade de sementes sob condições favoráveis (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000).

2.4 Morfologia da semente

A semente de pinhão-mansão é ovalada, endospermica, de tegumento quebradiço. Possui na parte superior uma proeminência carnuda, a carúncula, que se encontra próxima à micrópila. Na parte inferior do involúcro da semente existe uma película branca cobrindo a amêndoa, o tégmen; albúmen abundante, branco, oleaginoso, contendo um embrião com formato reto, cotilédones planos, foliáceos e arredondados (SATURNINO et al., 2005) (Figura 2).

A semente possui cerca de 45% de casca e 55% de amêndoa, o que pode variar conforme as condições ambientais e genotípicas e ainda as porcentagens de óleo em relação à amêndoa variam entre 48 a 59% e em relação à semente pode chegar a 57% (PEIXOTO, 1973).

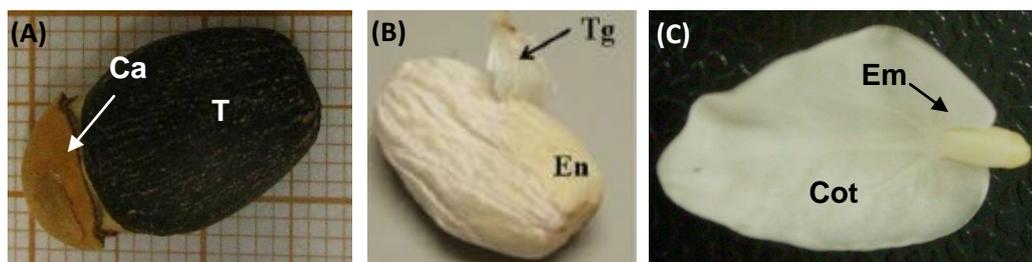


Figura 2. Aspecto anatômico da semente de *Jatropha curcas* L., **(A)**: semente inteira com tegumento ou testa (T) e a carúncula (Ca). **(B)**: semente sem testa, com o tégmen (Tg) e endosperma (En) expostos. **(C)**: par de cotilédones foliáceos (Cot) e embrião (Em). Fotos: **(B)**: Dr. Wei He (2011).

2.5 Proteínas totais

As proteínas estão entre as principais substâncias de reserva acumuladas durante o desenvolvimento embrionário (BEWLEY & BLACK, 1994). Na embriogênese zigótica, o aumento no conteúdo de proteína ocorre como resultado da síntese de proteínas de reserva e proteínas LEA (“late embryogenesis abundant”). As proteínas LEA têm grande afinidade com as moléculas de água, atuando na proteção à desidratação da semente (BEWLEY & BLACK, 1994). As proteínas de reserva são utilizadas como fonte de nitrogênio no desenvolvimento e germinação do embrião, sendo divididas albuminas, globulinas, glutelinas e prolaminas (SHEWRY et al., 1995).

Por estarem no centro da ação nos processos biológicos, as proteínas atuam mediando as transformações moleculares que definem o metabolismo celular, através de catálises. Exercem funções regulatórias controlando as condições intracelulares e extracelulares e mandam informações para outros componentes da célula, além de serem componentes estruturais essenciais das células (VOET et al., 2002).

As proteínas executam um papel essencial na modulação da resposta da planta ao estresse. As temperaturas elevadas podem direta ou indiretamente causar danos às proteínas, pela inativação de enzimas, por alterações na conformação de polipeptídeos ou por desestruturação de complexos proteicos em membranas (FERGUSON et al.1990).

Em condições de déficit hídrico, também ocorre o aumento da produção de radicais livres de oxigênio nas plantas e o acúmulo de solutos compatíveis poderá ter algum efeito protetor contra danos oxidativos nas proteínas (ITURBE-ORMAETXE et al., 1998).

O ensaio de quantificação de proteínas totais pelo método de Bradford (1976) é facilmente utilizado para números grandes de amostras, bem como adaptáveis a qualquer tamanho amostral. Baseia-se na observação de que o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 existe em duas formas diferentes da cor, vermelho e azul. A forma vermelho é convertida para a forma azul após ligação do corante à proteína. O complexo proteína-corante tem um coeficiente de extinção alto conduzindo assim a uma grande sensibilidade na medição da presença das proteínas. A ligação do corante com a proteína é um processo muito rápido (aproximadamente 2 min) não necessitando de temporização crítica para o ensaio (BRADFORD, 1976).

A técnica de eletroforese de proteínas é capaz de auxiliar a detecção dos estádios iniciais de deterioração através da avaliação da atividade de enzimas associadas à degradação e oxidação de substâncias de reserva, bem como com a biossíntese de novas substâncias (SPINOLA et al., 2000). A capacidade de avaliação e a correta interpretação da variação eletroforética nos perfis de proteínas e enzimas pode ser uma eficiente ferramenta na determinação de mudanças bioquímicas resultantes do processo deteriorativo (CARRARO, 1990).

2.6 Curcina

As plantas tóxicas possuem substâncias que, por suas propriedades naturais, físicas, químicas ou físico-químicas, alteram o conjunto funcional-orgânico em vista de sua incompatibilidade vital, conduzindo o organismo vivo a reações biológicas diversas. O grau de toxicidade depende da dosagem e do indivíduo, embora haja substâncias tóxicas que, em dosagens mínimas, entram na composição de vários remédios (ALBUQUERQUE, 1980).

Apesar da alta toxicidade da *Pinhão-manso*, o óleo extraído de suas sementes não é tóxico, uma vez que as toxinas não são solúveis em lipídeos ficando então restritas à torta (GAILLARD & PEPIN, 1999). Essa toxicidade é

atribuída principalmente à presença de dois componentes nas sementes, os mais tóxicos, dentre eles, a curcina (MACIEL et. al., 2007).

Proteínas Inativadoras de Ribossomos são um grupo heterogêneo de enzimas que possuem atividade de N-glicosidase sobre o rRNA e, portanto, são capazes de inibir a síntese de proteínas em células eucarióticas. RIPs têm sido encontrados em muitas espécies de plantas e também em algumas bactérias e fungos e são de dois tipos RIP tipo-I e RIP tipo-II (BARBIERI et al., 1993, STIRPE e BATTELLI, 2006).

RIPs tipo-I possuem uma única cadeia enzimática e um peso molecular aproximado de 30 kDa. Uma vez que RIPs são capazes de inativar a síntese de proteínas, RIPs tipo-I são altamente tóxicas nas células de sistemas livres, mas são bem menos tóxica para a célula intacta, dificilmente podem penetrar na membrana celular. RIPs tipo-II são heterodímeros que contêm uma cadeia enzimática A e uma cadeia de hidratos de carbono lectina de ligação (cadeia B). A cadeia A é similar a da RIP tipo-I, são codificadas pelo mesmo gene (HARTLEY & LORD, 2004) e a cadeia B ajuda a cadeia A entrar na célula. Como resultado, RIPs tipo-II exibem cerca de 1000 vezes mais citotoxicidade do que RIPs tipo-I (BARBIERI et al., 1993).

A curcina é muitas vezes classificada como uma lectina e descrita como sendo similar à ricina da mamona com a implicação que têm toxicidades semelhantes. Estas descrições são imprecisas. Ambas, curcina e ricina são RIPs que depurinam rRNA, porém curcina é uma RIP tipo-I com peso molecular de aproximadamente 28 kDa (BARBIERI et al., 1993;. JUAN et al., 2003; QIN et al., 2005) enquanto que a ricina é uma RIP tipo-II.

Gandhi *et al.* (1995) relatam que a atividade inibidora da síntese de proteínas da curcina só foi demonstrada “*in vitro*” e além do mais, é cerca de mil vezes menor que a da ricina e a da abrina, potentes fitotoxinas extraídas da espécie *Ricinus communis L.* e do gênero *Aleurites*, respectivamente.

Durante décadas, vários autores fizeram experimentos relatando a toxicidade de *Pinhão-manso L.* para animais. Adam & Maqzoub (1975) demonstraram a toxicidade desta planta para cabras. As sementes se mostraram tóxicas e com conseqüências fatais entre 2 e 21 dias. Os sintomas foram diarréia profusa, desidratação e debilidade orgânica. Gandhi *et al.* (1995) estudaram a

toxicidade aguda em ratos. Os animais exibiram diarreia e hemorragia nos olhos. A autópsia revelou inflamação do trato gastrintestinal. Não existem antídotos específicos. O tratamento é sintomático e preventivo a fim de se evitar complicações cardiovasculares, neurológicos e renais. A lavagem gástrica é utilizada como medida preliminar em todos os casos.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de amostragem (Procedência das sementes)

Foram utilizados dois lotes de sementes de pinhão-manso coletados em março/2010 e março/2011, respectivamente, na cidade de Cafarnaum/BA (11°41'38"S e 41°28'4"W), localizada na Chapada Diamantina no semiárido baiano, a 430 Km da capital do estado, Salvador (Figura 3).

É uma cidade pequena com uma área territorial de 675,439 Km² inserida no bioma caatinga, a 700 m acima do nível do mar. Sua população era de 17.209 hab. em 2010, com uma densidade demográfica de 25,48 hab/km². A maioria desta população é urbana, cerca de 61,4% e o PIB per capita do município era cerca de R\$ 3.365,45 em 2009. O município possui produção agrícola de cereais, leguminosas e oleaginosas, com o destaque para a maior produção e maior número de hectares plantados para a mamona no ano de 2007 (IBGE, 2010).



Figura 3. Mapa de localização da cidade de Cafarnaum/BA (A). Fotos: maps.google.com.br/ [http://pt.wikipedia.org/wiki/Cafarnaum_\(Bahia\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Cafarnaum_(Bahia)).

3.2 Ensaio em laboratório

As sementes foram devidamente identificadas em campo e acondicionadas em sacos plásticos resistentes até a chegada ao Laboratório de Bioquímica, Biotecnologia e Bioprodutos (LBBB), Departamento de Biofunção do Instituto de Ciências da Saúde (ICS), na Universidade Federal da Bahia (UFBA), em Salvador-BA.

As sementes foram beneficiadas e armazenadas em sacos plásticos em geladeira a 4°C, para subsequente caracterização inicial do lote por meio de testes padrões de avaliação.

3.2.1 Teste de germinação

Para o teste de germinação foram utilizadas cinco repetições de vinte sementes (5 x 20) de cada lote. Inicialmente as sementes passaram por desinfestação superficial com solução de hipoclorito de sódio comercial a 5%, durante 10 minutos e foram secas sobre papel em bancada ($\pm 23^{\circ}\text{C}$). Em seguida, foram dispostas uniformemente em rolo de papel de germinação estéril umedecido com água destilada em volume de 7 mL, equivalente a três vezes o peso do substrato (Figura 4), e incubadas durante sete dias sob ausência de luz em câmara de germinação tipo B.O.D a 25°C. As avaliações foram realizadas diariamente e o substrato de papel trocado a cada dois dias, a fim de evitar a contaminação das sementes por microrganismos.

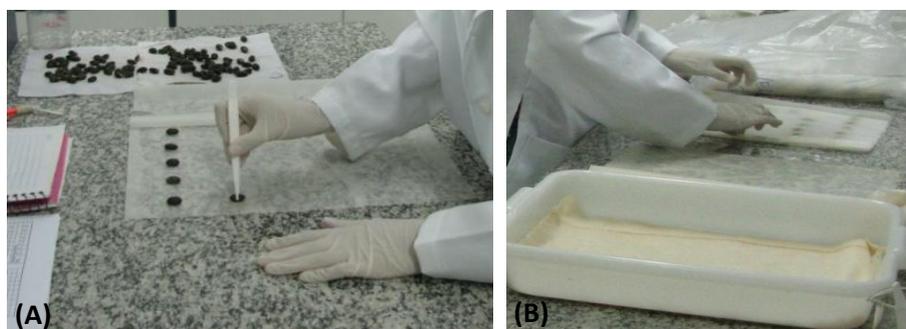


Figura 4. Teste de germinação em rolo. **(A)** Distribuição das sementes no rolo e **(B)** Fechamento do rolo.

As variáveis de avaliação da qualidade fisiológica dos lotes de sementes foram: porcentagem de germinação (emissão de raiz primária), índice de velocidade da germinação (IVG,) tempo médio da germinação (TM), velocidade média da germinação (VM) e coeficiente de uniformidade da germinação (CUG), segundo recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.2 Peso de mil sementes

Para realizar a determinação do peso de mil sementes utilizou-se oito repetições de 100 sementes para cada lote. Cada semente foi pesada separadamente em balança analítica Shimadzu modelo AUY220 com precisão de 0,0001g e o cálculo realizado conforme recomendações das Regras para Análises de Sementes (BRASIL, 2009).

3.2.3 Biometria de sementes

Para a avaliação da biometria das sementes, foram amostradas aleatoriamente 100 sementes de cada lote com o auxílio de um paquímetro digital (*Marathon*) com precisão de 0,01 mm, foram feitas 3 tipos de medidas em cada semente: comprimento - medida do ápice à base/hilo ao lado oposto (Figura 5A), largura (Figura 5B) e espessura - região mediana (Figura 5C).

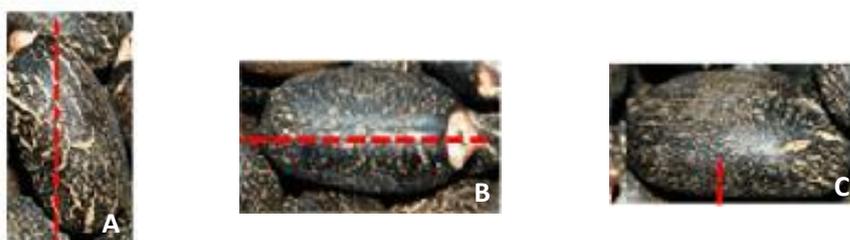


Figura 5: Medidas biométricas de comprimento (A), largura (B) e espessura (C) na semente de pinhão manso.

3.2.4 Teor de água das sementes

Foram utilizadas quatro repetições de cinco ou seis sementes de cada lote, que correspondiam ao peso de 5g de sementes, partidas em quatro partes com

auxílio de um estilete, alocadas em recipientes de metal (pesados inicialmente) com tampa aberta, e submetidas ao método de estufa a $105 \pm 3^\circ\text{C}$ por 24 h. Após este período os recipientes foram rapidamente tampados e colocados por 30 minutos em dessecador ou até esfriar (Figura 6). Em seguida pesados em balança analítica Shimadzu modelo AUY220 com precisão de 0,0001g e os valores obtidos foram expressos em porcentagem de massa fresca das sementes, conforme recomendações das Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009).

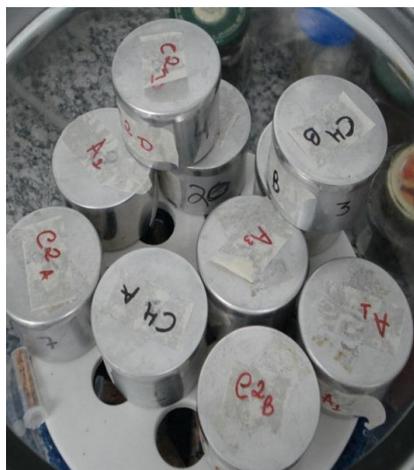


Figura 6. Dessecador com os recipientes de metal contendo as sementes submetidas à secagem em estufa (105°C por 24h).

3.2.5 Restrição hídrica de sementes

O delineamento deste experimento foi inteiramente casualizado em fatorial com duas condições hídricas x sete tempos de embebição + um (semente seca).

O tratamento de restrição hídrica foi realizado por hidratação das sementes secas, por 14 dias, numa solução osmótica de polietilenoglicol (PEG 8000) com potencial osmótico de $-0,8$ MPa preparadas de acordo com Villela et al. (1991). As condições de tratamento osmótico foram pré-definidas com base nos ensaios de Loureiro et al. (2007), a partir dos quais se verificou total impedimento da germinação de sementes de pinhão-manso a partir deste potencial osmótico.

As sementes secas de pinhão-manso em estudo foram submetidas à embebição em PEG 8000, $-0,8$ MPa em 7 tempos de embebição: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias de embebição. Cada tempo com cinco repetições de 25 sementes,

totalizando 125 sementes, seguindo a mesma disposição do teste de germinação inicial. As sementes do controle também foram embebidas em água durante os mesmos períodos 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 14 dias. As avaliações foram realizadas diariamente tanto para as sementes do controle, quanto para as sementes embebidas em solução de PEG. Foram realizadas trocas de substrato a cada dois dias durante os períodos de embebição a fim de evitar eventual contaminação por microrganismos. Ao final as sementes que estavam na solução de PEG foram lavadas com água destilada por 5 minutos para a eliminação da solução de PEG. Em seguida foi retirado o tegumento de todas as sementes, este foi eliminado e separaram-se os compartimentos de interesse: eixo embrionário e endosperma. As sementes do controle também passaram pela separação de seus compartimentos. Destas também foi eliminado o tegumento e separou-se o eixo hipocótilo-radícula/plântula e endosperma. Algumas sementes do controle já continham plântulas formadas devido ao tempo de embebição, estas então foram consideradas como parte do eixo hipocótilo-radícula.

Os compartimentos foram separados com o auxílio de uma lâmina de bisturi e uma pinça e colocados em saquinhos de papel alumínio contendo nitrogênio líquido (Figura 7). Os saquinhos foram devidamente identificados com o número da repetição, o tratamento e o compartimento que continha, em seguida alocados em ultrafreezer a -80°C (Sanyo mod. MDF U53VC) para posterior análise.

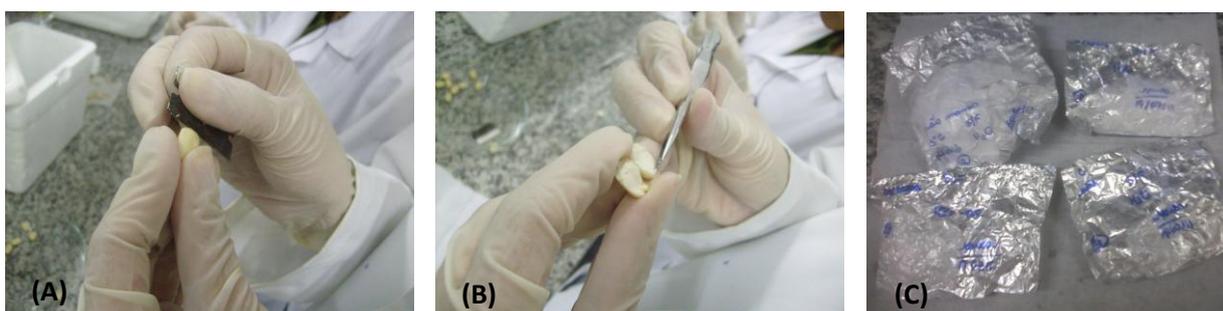


Figura 7. (A) Semente sendo aberta com auxílio de uma lâmina, após retirada do tegumento. (B) Cotilédones do endosperma sendo separados com o auxílio de uma pinça e (C) Saquinhos de papel alumínio devidamente identificados e utilizados para guardar no ultrafreezer os compartimentos separados.

3.2.6 Extração de proteínas totais

A extração de proteínas foi feita baseada no protocolo elaborado por em Laemmli (1970) com ajuste do pH da solução tampão de extração para 7,5.

Os compartimentos das sementes foram retirados do ultra-freezer e imediatamente macerados separadamente em cadinho de porcelana contendo nitrogênio líquido. Em seguida foi retirado do material macerado uma quantidade de 0,1 g pesada em balança analítica para extração de proteínas totais, colocados em microtubo de 1,5 mL (este já havia sido pesado anteriormente) e adicionado imediatamente 1 mL de tampão fosfato de potássio pH 7,5 (Anexo), uma proporção de 10 volumes de tampão para cada volume de amostra. Após adicionar o tampão, cada amostra foi homogeneizada em agitador tipo vortex (Ika, mod. MS 3) por 1 minuto e centrifugada em centrífuga refrigerada (HETTICH mod. 320R) a 14.000 RPM, 4°C, por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e dividido em 3 alíquotas de 350 µL cada, descartando o *pelet*. As alíquotas foram congeladas em ultrafreezer à -80°C (Sanyo mod. MDF U53VC).

3.2.7 Quantificação de proteínas totais

As proteínas presentes na amostra foram quantificadas utilizando-se os procedimentos do Kit “Micro-protein” (Bio-Rad, cod. nº 500-0002), modificado a partir dos métodos descritos por Bradford (1976). Para a análise das amostras foi utilizada uma alíquota de 1 µL do extrato bruto em 799 µL de água ultrapura (Millipore, Milli-Q) totalizando 800 µL. Essas amostras foram preparadas em microtubos de 1,5 mL e acrescentado a elas 200 µL do reagente de Bradford (reagente de cor), contido no kit BIO-RAD Protein Assay.

As leituras foram feitas em espectrofotômetro (Analyzer 850M), no comprimento de onda de 595 nm, e o cálculo foi realizado utilizando a curva analítica obtida a partir de diluição da solução estoque padrão de albumina sérica bovina – BSA (1440 µg.mL⁻¹, Molecular probes cod. nº T-7451). Os padrões foram preparados diluindo-se a solução estoque de BSA, de maneira a obter soluções padrões com as seguintes concentrações: 0 (branco); 0,5; 1,0; 2,0; 4,0;

6,0; 8,0 e 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, acrescentado-se a estes 200 μL do reagente de Bradford e procedendo-se a leitura da absorbância para posterior quantificação.

Após a leitura dos padrões foi efetuada a leitura das amostras de interesse, também a 595 nm. Foram efetuadas leituras em espectrofotômetro de 16 amostras para o controle e 16 para os tratamentos de restrição hídrica. Cada análise foi efetuada em triplicata. Um total de 48 testes para cada condição de hidratação.

O quadro 1, abaixo, apresenta as siglas utilizadas para os extratos brutos obtidos das amostras de sementes de pinhão-manso embebidas em água (controle) e em PEG 8000 com suas respectivas descrições.

Quadro 1. Siglas utilizadas para cada extrato bruto de amostra de sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em água e em PEG 8000, -0,8 MPa com suas respectivas descrições.

AMOSTRAS	DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS
SSEx	Amostra de eixo-embrionário da semente seca;
SSEn	Amostra de endosperma da semente seca;
Ág. Ex. 2dae	Amostra de eixo-embrionário da semente com 2 dias de embebição em água;
Ág. Ex. 4dae	Amostra de eixo-embrionário da semente com 4 dias de embebição em água;
Ág. Ex. 6dae	Amostra de eixo-embrionário/plântula da semente com 6 dias de embebição em água;
Ág. Ex. 8dae	Amostra de eixo-embrionário/plântula da semente com 8 dias de embebição em água;
Ág. Ex. 10dae	Amostra de eixo-embrionário/plântula da semente com 10 dias de embebição em água;
Ág. Ex. 12dae	Amostra de eixo-embrionário/plântula da semente com 12 dias de embebição em água;
Ág. Ex. 14dae	Amostra de eixo-embrionário/plântula da semente com 14 dias de embebição em água;
Ág. En. 2dae	Amostra de endosperma da semente com 2 dias de embebição em água;
Ág. En. 4dae	Amostra de endosperma da semente com 4 dias de embebição em água;
Ág. En. 6dae	Amostra de endosperma da semente com 6 dias de embebição em água;
Ág. En. 8dae	Amostra de endosperma da semente com 8 dias de embebição em água;
Ág. En. 10dae	Amostra de endosperma da semente com 10 dias de embebição em água;
Ág. En. 12dae	Amostra de endosperma da semente com 12 dias de embebição em água;
Ág. En. 14dae	Amostra de endosperma da semente com 14 dias de embebição em água;

PEG Ex. 2dae	Amostra de eixo-embrionário da semente com 2 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG Ex. 4dae	Amostra de eixo-embrionário da semente com 4 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG Ex. 6dae	Amostra de eixo-embrionário da semente com 6 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG Ex. 8dae	Amostra de eixo-embrionário da semente com 8 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG Ex. 10dae	Amostra de eixo-embrionário da semente com 10 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG Ex. 12dae	Amostra de eixo-embrionário da semente com 12 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG Ex. 14dae	Amostra de eixo-embrionário da semente com 14 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG En. 2dae	Amostra de endosperma da semente com 2 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG En. 4dae	Amostra de endosperma da semente com 4 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG En. 6dae	Amostra de endosperma da semente com 6 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG En. 8dae	Amostra de endosperma da semente com 8 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG En. 10dae	Amostra de endosperma da semente com 10 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG En. 12dae	Amostra de endosperma da semente com 12 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;
PEG En. 14dae	Amostra de endosperma da semente com 14 dias de embebição em PEG 8000, -0,8 MPa;

3.2.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Foram preparados géis de poliacrilamida (PAGE - “Polyacrylamide Gel Electrophoresis”) contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS – “Sodium Dodecyl Sulfate”) na concentração de 12,5% de acrilamida (Sigma-Aldrich, cod. nº A3553) para o gel separador e 4% para o gel empilhador de acordo com Laemmli, 1970, modificado por De Castro et al., 1998 (Tabela 1).

Após o preparo, a solução de gel separador foi aplicada entre as placas de vidro com o auxílio de pipeta graduada, até a extremidade inferior do pente (aproximadamente 1,5 cm). Após a polimerização, cerca de 25 minutos, foi aplicada solução de gel empilhador, e inserido o pente na parte superior do gel para a formação das canaletas. Cada gel era composto de 10 canaletas, sendo que todos os géis receberam na sua primeira canaleta a aplicação de 6 µL do marcador BenchMark™ Protein Ladder (10 – 220 KDa, Invitrogen)

correspondendo a concentração de 0,6 μg . Nas demais canaletas foram aplicadas as amostras diluídas em solução tampão de amostra contendo azul-de-bromofenol (GE cod. nº 17-1329-01) (Anexo I). Para o gel das amostras submetidas à restrição hídrica foi utilizada uma concentração de proteínas de 30 μg em cada poço e um volume final de 20 μL e para o gel das amostras controle foi utilizada uma concentração de 15 μg de proteínas em cada poço e volume final de 25 μL em cada canaleta. Por fim adicionou-se o tampão de corrida (Anexo I) e fechou-se o sistema.

Tabela 1. Protocolo de preparação do gel de eletroforese SDS-PAGE (Laemmli, 1970, De Castro et al. 1998).

Soluções	Gel separador (12,5%)	Gel empilhador (4%)
Solução estoque de acrilamida (Sigma-Aldrich, cod. nº A3553)	6,25 mL	670 μL
Tris-HCl 1,5M pH 8,8 (GE, cod. Nº US75825)	3,75 mL	-----
Tris-HCl 0,5M pH 6,8 (GE, cod. Nº US75825)	-----	1,25 mL
SDS 10% (Sigma-Aldrich, cod. nº L3771)	150 μL	50 μL
Água Milli-Q	4,8 mL	3 mL
TEMED (tetrametilenodiamina) - (Sigma-Aldrich, cod. nº T9281)	22 μL	10 μL
APS 10% (persulfato de amônio) -(GE, cod. nº 17-1311-01)	150 μL	70 μL
Volume final	15 mL	5mL

A programação de corrida para cada gel foi de 300V e 60mA (fonte GE EPS 601, cod. nº 18-1130-02) durante 1:20h, executada em aparelho de eletroforese vertical (Bio-Rad mod. Mini-Protean).

Após a eletroforese, os géis de poliacrilamida foram mantidos por 16 h (overnight) em solução corante de azul de Coomassie (Anexo I) à temperatura ambiente (23° C). Em seguida, o gel foi submerso em uma solução descorante (Anexo I), sendo mantido à temperatura ambiente sob agitação em vortex (Ika, mod. MS 3) por um período de \pm 5h, ocorrendo trocas da solução descorante a cada 30 minutos até a visualização das bandas de proteínas. Em seguida os géis foram fotografados em câmera fotográfica Fujifilm modelo A180 e descartados em recipiente próprio para tal.

3.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância. A diferença entre as médias foi analisada pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se para tal o programa SISVAR 5.0 desenvolvido pela Universidade Federal de Lavras (FERREIRA, 2000).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos lotes

4.1.1 Variáveis da germinação

As sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA apresentaram uma média de 91% de germinação e 5,73 para o índice de velocidade de germinação (IVG) para o lote de 2010, 83% de germinação e 5,11 de IVG para o lote de 2011 (Tabela 2). Estes valores não apresentaram diferença estatística a 5% de probabilidade e podem indicar que as sementes dos dois lotes estão bem viáveis, pois são valores satisfatórios. O IVG é calculado pela quantidade de plântulas normais que germinam a cada dia durante a realização do teste de emergência uma vez que quanto mais rapidamente a semente germina, ou seja, quanto maior o índice de velocidade, maior é o seu vigor (RAS, 1992).

Tabela 2. Porcentagem de germinação (%G), Tempo médio (TM), Velocidade média (VM), Índice de velocidade de germinação (IVG), e Coeficiente de uniformidade de germinação (CUG) de sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA, a 25° C sem fotoperíodo.

	%G	VM	TM	IVG	CUG
Lote 2010	91a	0,30a	3,25a	5,73a	4,08 ^a
Lote 2011	83a	0,29a	3,31a	5,11a	4,23 ^a
CV(%)	8,13	3,25	2,89	7,99	70,81

* Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

O teste de germinação é o principal parâmetro utilizado para a avaliação da qualidade fisiológica das sementes e permite conhecer o potencial de germinação de um lote em condições favoráveis. Os resultados do teste são utilizados para determinar a taxa de semeadura, para a comparação do valor de lotes e para a comercialização e ainda possibilita a obtenção de resultados comparáveis entre laboratórios (CARVALHO & NAKAGAWA, 2000). Estudos como estes são efetivamente o ponto de partida para utilização e exploração de forma racional

das espécies cujos trabalhos sobre germinação ainda são escassos (CABRAL et al., 2003).

Para Borges (2003) o estabelecimento de dada espécie está ligado à capacidade de suas sementes germinarem rápida e uniformemente, a fim de vencer a concorrência com outras espécies presentes no local, ou pela capacidade de se manterem viáveis por períodos mais longos até que as condições ambientais sejam propícias ao desenvolvimento das plântulas.

Apesar da porcentagem da germinação oferecer informações importantes sobre as características de germinação de um conjunto de sementes face a um determinado tratamento, uma análise da germinação sob um enfoque cinético requer outras formas de abordagens como um todo. Nesse sentido, o tempo médio (TM) e a velocidade média de germinação (VM) permitem estas interpretações adicionais ao processo fisiológico da germinação (FERREIRA & BORGHETTI, 2004).

Na Tabela 2 pode-se verificar que TM e VM não apresentaram diferença estatística a 5% entre os lotes. Os valores estão relacionados proporcionalmente à porcentagem da germinação.

Não houve diferença significativa para o CUG entre os lotes 2010 e 2011 (Tabela 2). O processo germinativo foi desuniforme para ambos os lotes (CUG inferior a 10%) demonstrando a heterogeneidade das sementes que resulta da variabilidade na germinação das sementes individuais que compõem os lotes. Quanto mais elevado o índice de uniformidade maior a sincronização de germinação entre as sementes de um lote (CARMONA, et al., 1998)

Segundo Santana & Ranal (2004), o coeficiente de uniformidade é muito importante, pois permite avaliar o comportamento germinativo das sementes de uma amostra. Comparando as amostras, consideram-se uniformes aquelas que apresentam valores de uniformidades maiores.

Silva et al. (2011) trabalhando também com pinhão-mansão verificaram que a germinação das sementes se iniciou a partir do terceiro dia de semeadura, mas sem uniformidade.

Pereira & Lopes (2011) ao avaliar sementes de pinhão-mansão com tratamentos de restrição hídrica, descreveram que a germinação das sementes iniciava em média ao terceiro dia de embebição na amostra controle.

4.1.2. Peso de mil, umidade e massa seca de sementes

O peso de mil, a massa seca e umidade das sementes estão expressos na Tabela 3.

O peso de mil sementes é utilizado para calcular a densidade de semeadura, o número de sementes por embalagem e o peso da amostra de trabalho para análise de pureza, quando não especificado nas RAS. É uma informação que dá ideia do tamanho das sementes, assim como de seu estado de maturidade e de sanidade (BRASIL, 2009).

Tabela 3. Peso de mil sementes (g), massa seca (g) e umidade (%) das sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA.

	Peso de mil (g)	Massa seca (g)	Umidade (%)
Lote 2010	619,39b	3,95a	7,76 ^a
Lote 2011	651,10a	3,97a	7,62 ^a
MÉDIA	635,25	3,96	7,69
CV(%)	2,46 [*]	3,94 ^{n.s.}	9,39 ^{n.s.}

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

*significativo a 5%, %, ^{n.s.} não significativo.

Não há diferença estatística a 5% de probabilidade para a umidade entre os lotes de sementes. Os valores de 7,76% para as sementes do lote de 2010 e peso de 619,39g para mil sementes e de 7,62% para o lote de 2011 para um peso de mil sementes de 651,10g estão dentro do limite de 5 a 10% do peso fresco e manutenção da viabilidade das sementes em estado desidratado. Dantas et al. (2007) avaliando o mesmo parâmetro para o pinhão-manso encontrou valores de 8,75% de teor de água para 466,65g de peso de mil sementes, demonstrando que os valores diferem devido às condições em que cada lote de semente está submetido.

Segundo Joker & Jepsen (2003), as sementes de pinhão-manso são ortodoxas e podem ser secas a baixos teores de água (5 - 7%) e quando armazenadas em condições de baixa temperatura, mantêm a viabilidade por pelo menos um ano. Contudo, por possuírem alto conteúdo de óleo, não se espera que possam ser conservadas por longos períodos como a maioria das espécies ortodoxas. Nestas, um moderado aumento da temperatura, conseqüente do

processo respiratório, é suficiente para decompor os lipídios e elevar a taxa de deterioração atribuída às hidrólises enzimáticas, peroxidação e autoxidação. Por esse motivo, as sementes oleaginosas devem ser armazenadas com grau de umidade inferior ao recomendado para as amiláceas (11-12%) (BRACCINI et al., 2001; MARCOS FILHO, 2005).

Embora os lotes não tenham apresentado diferença para a massa seca de sementes e umidade das mesmas, o peso de mil foi significativamente diferente, com o lote de 2011 apresentando maior valor (Tabela 3). Diversos autores têm verificado uma correlação positiva entre o peso e a germinação de sementes, a exemplo de Berreta et al. (1990) que trabalhou com qualidade de sementes de *B. auleticus* e confirmou uma germinação melhor e mais rápida para sementes de maior peso. No entanto, mesmo o lote 2011 apresentando um maior valor para o peso de mil, sua germinação foi mais lenta (menor VM e maior TM) e obteve menor germinabilidade quando comparado ao lote 2010 (Tabela 2), mesmo não existindo diferença estatística para estes parâmetros.

4.1.3 Biometria das sementes

Quanto às dimensões de análise morfométrica, as sementes dos lotes de 2010 e 2011 apresentaram médias de 17,3 mm de comprimento, 10,5 mm de largura, 7,96 mm de espessura e 17,3 mm de comprimento, 10,9 de espessura e 8,24 mm de largura, respectivamente. Houve diferença estatística tanto para largura quanto para a espessura das sementes entre os lotes. Para estes dados o lote de 2011 também apresentou os maiores valores (Figura 8).

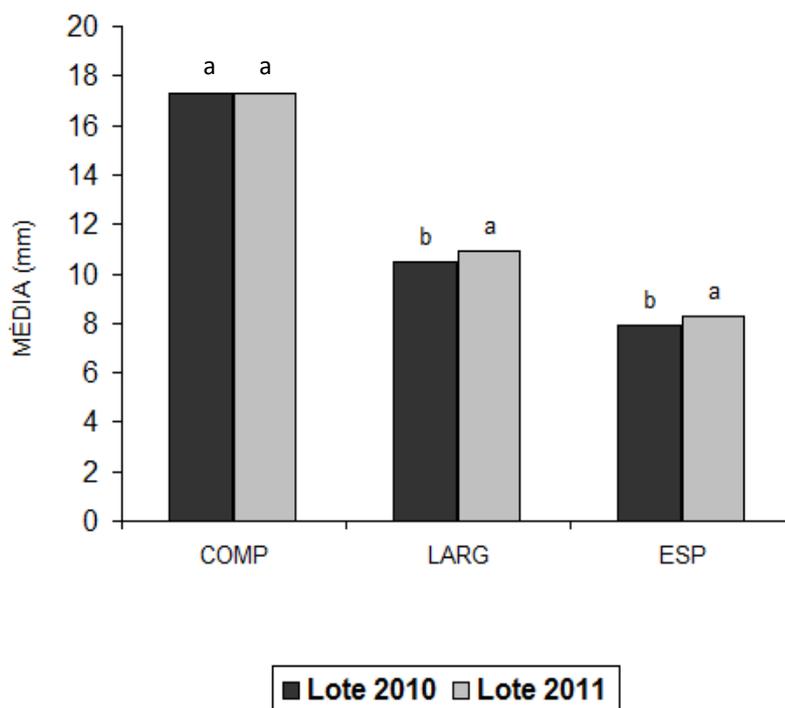


Figura 8. Média (mm) das medidas de biometria das sementes dos lotes 2010 e 2011 de pinhão-mansó provenientes de Cafarnaum/BA. Comp. (comprimento), Larg. (largura) e Esp. (espessura). LBBB/ICS/UFBA/Marla Cerqueira. Colunas com mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott-Knott a 5%.

Aquino et al. (2009) estudando a morfometria de sementes de pinhão-mansó de diferentes procedências, encontraram valores de 17,03 a 19,08 mm para comprimento e 8,47 a 8,77 mm para espessura, enquanto que Hui Liu et al. (2009) verificaram 15 a 20 mm de comprimento e 10 a 13 mm de largura. No entanto, Ginwal et al. (2005) verificaram divergências morfológicas e germinativas nas sementes de pinhão-mansó, apontando portanto, para a necessidade de seleção e identificação de características físicas, correlacionadas com a qualidade fisiológica, a fim de eliminar as sementes indesejáveis e buscar aprimoramento da qualidade do lote.

A biometria da semente está relacionada a características da dispersão e do estabelecimento de plântulas (FENNER, 1993), sendo também utilizada para diferenciar espécies pioneiras e não pioneiras em florestas tropicais (BASKIN & BASKIN, 1998). Estudos sobre a morfometria de sementes fazem-se necessário visto a importância para identificação botânica, assim como na propagação da espécie. Além de permitir a identificação de genótipos superiores quando aliado a

estudos quantitativos de caracteres agronômicos da planta, imprescindíveis para o melhoramento genético (JARVIS et al., 2000; REGO et al., 2007).

Os dados obtidos para analisar a qualidade fisiológica das sementes de pinhão-mansão dos lotes de 2010 e 2011 demonstraram que não houve diferenças a 5% de significância para a maioria dos parâmetros. O lote de 2010 apresentou melhores valores para as variáveis de germinação, mesmo não sendo diferentemente significativo do lote de 2011, por isso foi escolhido para o experimento de restrição hídrica.

4.2 Quantificação de proteínas totais

Para a determinação da concentração de proteínas no extrato bruto obtido, foi construída uma curva analítica, de acordo com a metodologia descrita por Bradford (1976). As curvas analíticas obtidas a partir de solução padrão de BSA e utilizadas como base do cálculo para a quantificação de proteínas estão apresentadas no Apêndice I. Cada extrato bruto foi avaliado em triplicata. A partir da concentração de proteínas foi definido o volume de extrato a ser colocado em cada canaleta do gel de eletroforese para cada amostra do controle e dos tratamentos de restrição hídrica.

Os valores obtidos em absorbância em cada amostra são mostrados no apêndice II. O quadro 1 apresenta os valores obtidos para absorbância em cada amostra do controle e o quadro 2 apresenta os valores obtidos para absorbância em cada amostra do tratamento de restrição hídrica. O valor da absorbância nos quadros representa a média aritmética das leituras em triplicatas para cada amostra. A concentração de proteínas foi determinada utilizando a equação da reta da curva padrão do BSA (Figura 13 e 14 em apêndice I).

O tratamento de restrição hídrica das sementes de pinhão-mansão utilizando o PEG 8000 com potencial osmótico de -0,8 MPa foi realizado com base nos experimentos de Loureiro et. al. (2007). Estes avaliaram a germinação e o vigor de sementes de pinhão-mansão submetidas ao estresse hídrico simulado por PEG 6000 nos potenciais osmóticos de -0,2, -0,4, -0,6, -0,8, -1,0, -1,2, -1,4 e -1,6 MPa e descreveram que estas apresentaram um decréscimo na emissão da raiz

primária a medida que o potencial osmótico se tornou mais negativo, chegando a nulidade na germinação no potencial de -0,8 MPa.

Para Bewley & Black (1994) a inibição na emergência da raiz primária decorrente de uma menor disponibilidade de água relaciona-se, frequentemente, à redução na atividade de algumas enzimas com menor prejuízo ao metabolismo geral das sementes.

4.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE)

Analisando os géis de poliacrilamida SDS-PAGE dos extratos brutos obtidos a partir de amostras do controle e do tratamento de restrição hídrica é possível verificar diferenças na intensidade das bandas que representam proteínas presentes nas amostras das sementes de Pinhão-manso (Figuras 9, 10, 11 e 12), considerando a concentração de proteína aplicada.

A figura 9 apresenta o perfil eletroforético de proteínas totais em gel de acrilamida SDS-PAGE para extratos brutos de amostras de eixo hipocótilo-radícula/plântula do controle.

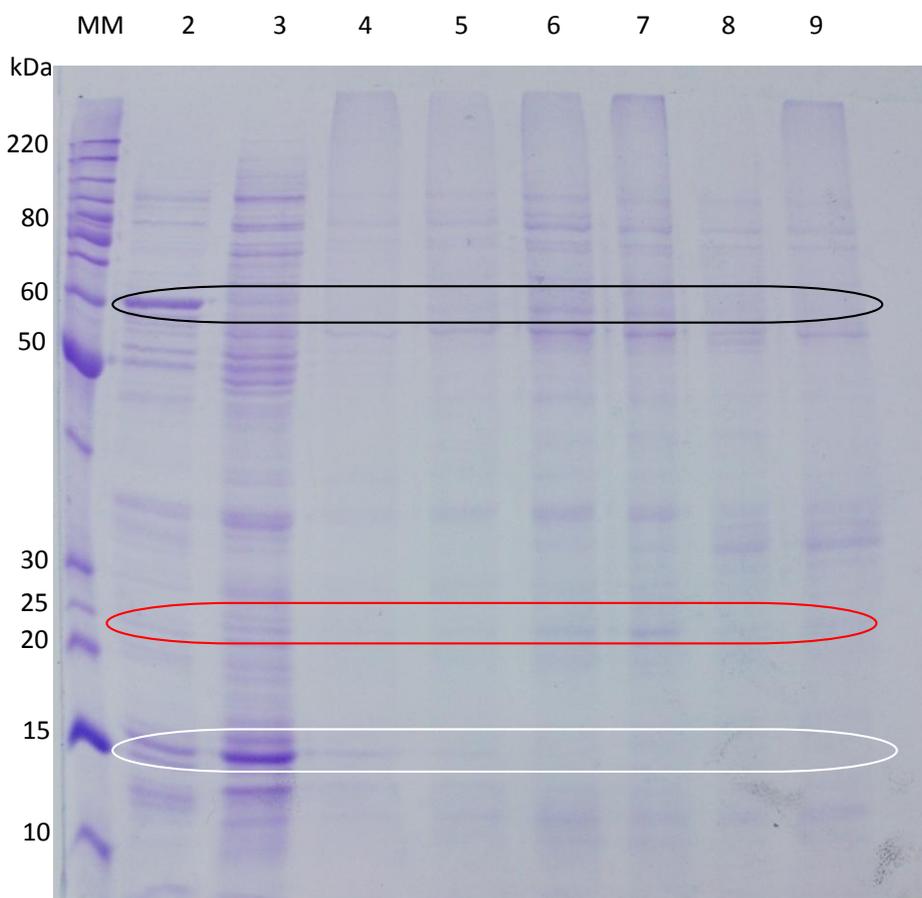


Figura 9. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo extratos proteicos de amostras de eixo hipocótilo-radícula/plântula das sementes do controle: sementes embebidas em água. Canaletas - **MM**: marcador de peso molecular, **2**: semente seca; **3**: 2 dias de embebição, **4**: 4 dias de embebição; **5**: 6 dias de embebição; **6**: 8 dias de embebição; **7**: 10 dias de embebição; **8**: 12 dias de embebição; **9**: 14 dias de embebição.

A figura 10 apresenta o perfil eletroforético de proteínas totais em gel de acrilamida SDS-PAGE para extratos brutos de amostras de endosperma do controle.

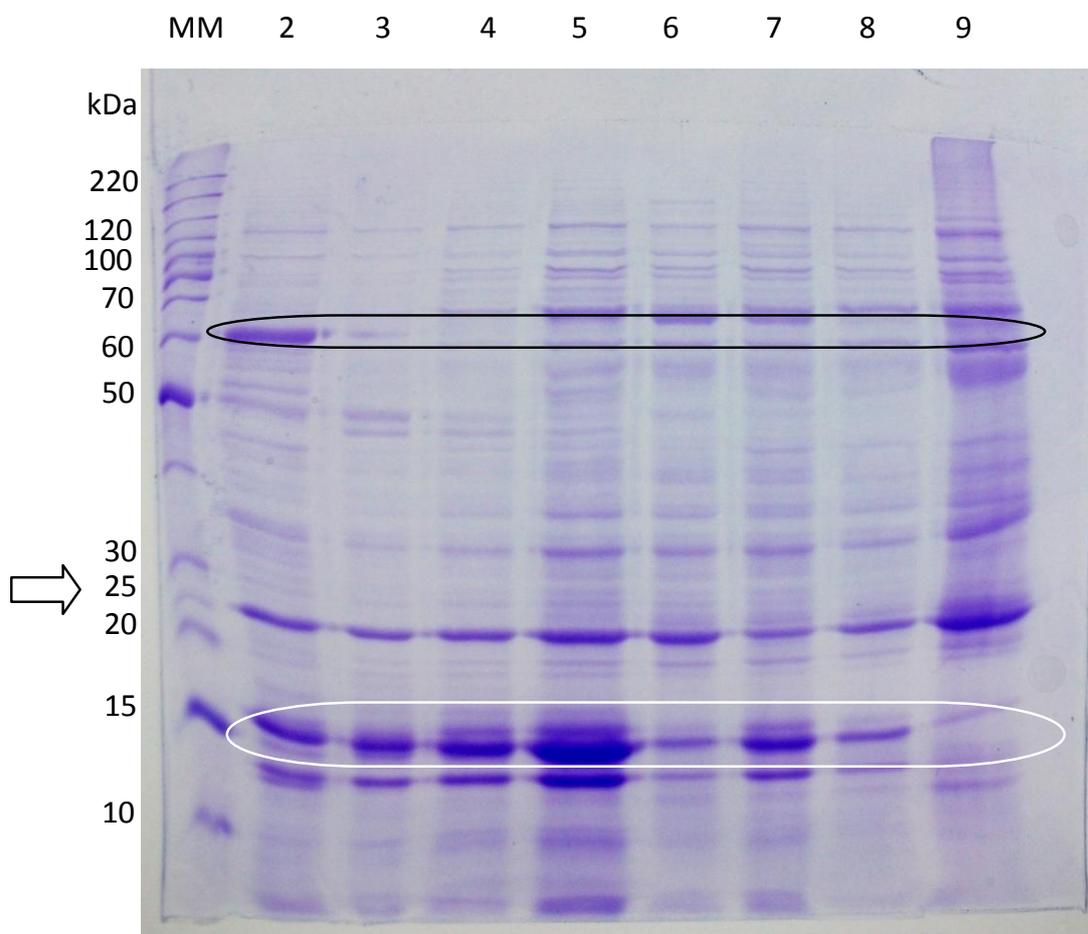


Figura 10. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo extratos proteicos de amostras de endosperma das sementes do controle: sementes embebidas em água. Canaletas - **MM**: marcador de peso molecular, **2**: semente seca; **3**: 2 dias de embebição, **4**: 4 dias de embebição; **5**: 6 dias de embebição; **6**: 8 dias de embebição; **7**: 10 dias de embebição; **8**: 12 dias de

embebição; **9**: 14 dias de embebição. A seta indica o peso molecular correspondente à proteína curcina e prováveis bandas da curcina.

Na figura 9 as bandas de proteínas são visualizadas com pouca intensidade, estando de acordo com a concentração de proteína aplicada. Quando comparadas com as bandas do gel dos extratos brutos das amostras de endosperma do controle, pode-se verificar maior intensidade de bandas, confirmando a característica de endosperma de reserva e cotilédone foliáceo. Não houve muita diferença na intensidade das bandas de proteínas entre os tempos de embebição em água, 0 a 14 dias (canaletas 2 a 9) tanto para as amostras de eixo hipocótilo-radícula/plântula quanto para as amostras de endosperma. Proteínas correspondente a peso molecular 60 kDa (marcadas com círculo preto) são visualizadas com maior intensidade no eixo embrionário de semente seca (canaleta 2, figura 9), no endosperma da semente seca e em todos os tempos de embebição (canaletas 2 a 9, figura 10). As bandas de proteínas de peso molecular aproximadamente de 15 kDa (marcadas com círculo branco) são visualizadas também em todos os tempos de embebição nas amostras de endosperma, no entanto, apenas no eixo embrionário da semente seca (canaleta 2, figura 9) e na amostra de eixo com 2 dias de embebição em água (canaleta 3, figura 9).

Comparando as figuras 9 e 10 é possível verificar que algumas bandas de proteínas são mais intensamente visíveis nas amostras do endosperma ou apenas neste, como é o caso das bandas de peso molecular 25 kDa que não é visível nas amostras de eixo-embrionário. Estas bandas, destacadas pelo círculo vermelho (Figura 9) e uma seta (Figura 10), devem ser analisadas com atenção maior, pois incluem a faixa de peso molecular correspondente a curcina, uma proteína tóxica inativadora de ribossomo tipo I (RIP I) que age como irritante da mucosa gastrointestinal, tem ação hemaglutinante (MARQUES et al., 2008) e é uma das responsáveis por limitar o uso do pinhão-manso.

Suda & Giorgini (2000) trabalhando com análise bioquímica da germinação de sementes a 30° C de *Euphorbia heterophylla*, também uma Euphorbiaceae demonstraram que no endosperma das sementes eram visualizadas bandas de proteínas solúveis em água na faixa de peso molecular de 29,5 a 66 kDa e 20 a

22 kDa. Eles identificaram estas proteínas como albuminas e verificaram que após 48 horas de embebição estas albuminas eram fracionadas e começavam a ser visualizadas apenas como bandas com cerca de 20 kDa de peso molecular, podendo estar sendo degradadas. Já Marcone et al. (1998) afirmaram que as proteínas expressas tanto em dicotiledôneas quanto em monocotiledôneas na faixa de peso molecular entre 20 e 27 kDa e 30 a 39 kDa eram as globulinas.

Outros pesquisadores, estudando proteínas de oleaginosas, demonstraram que a fração globulínica foi majoritária entre as outras frações proteicas, a exemplo de Lourenço (2004) estudando as sementes de canola (variedade Hyola601), que apresentou valores de 32,16% de globulina e Ramos & Bora (2004) para a castanha-do-pará, que encontrou 72,99% de globulinas.

As proteínas de sementes vegetais foram classificadas, de acordo com a sua solubilidade, em albuminas, globulinas, prolaminas e glutelinas. Com essa classificação, tem-se uma ideia da composição de aminoácidos que as sementes vegetais possuem (OSBORNE, 1924)

Os tecidos vegetais possuem grande quantidade de água e baixa relação proteína/matéria fresca, além de possuir substâncias que interferem na análise proteica, como compostos fenólicos, enzimas proteolíticas e oxidativas, terpenóides, pigmentos, ácidos orgânicos, íons inibitórios e carboidratos. Após a extração, geralmente as proteínas são precipitadas em soluções salinas, tamponantes e/ou solventes orgânicos, visando à eliminação da maioria dos interferentes ainda assim é difícil a visualização das bandas proteicas (CARPENTIER et al., 2005).

Além do mais, vários mecanismos estão envolvidos no controle da síntese protéica, mecanismos estes que atuam desde a transcrição do gene até a obtenção da proteína na forma ativa. Durante a síntese proteica podem ocorrer modificações pós-transcricionais e pós-traducionais alterando conformação espacial de proteínas e gerar diferentes classes protéicas, as quais bioquimicamente e estruturalmente que podem desempenhar diferentes funções nas vias metabólicas e na composição do proteoma do organismo (DIAS et. al, 2007).

A figura 11 apresenta o perfil eletroforético de proteínas totais em gel de acrilamida SDS-PAGE para extratos brutos de amostras de eixo embrionário do tratamento de restrição hídrica.

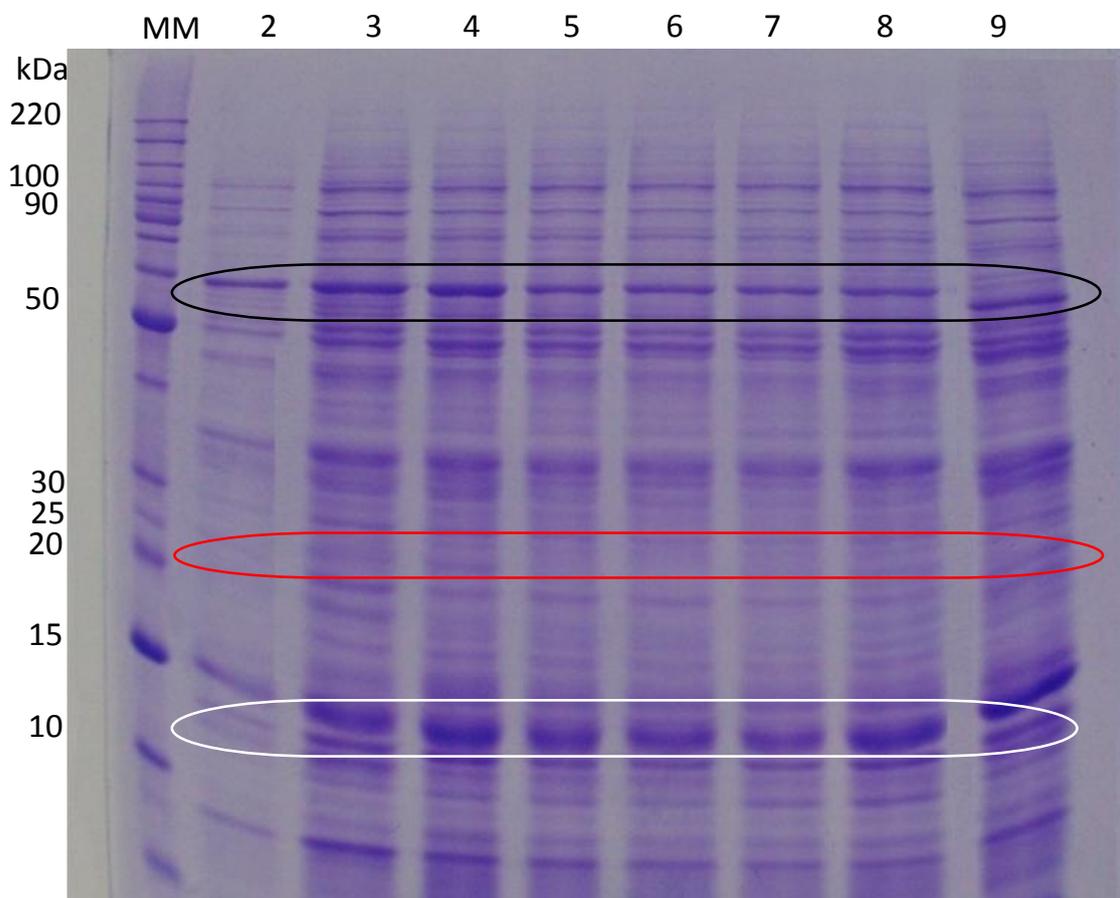


Figura 11. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo extratos proteicos de amostras de eixo-embriológico das sementes sob restrição hídrica: sementes embebidas em PEG 8000, -0,8 MPa. Canaletas - **MM**: marcador de peso molecular, **2**: semente seca; **3**: 2 dias de embebição, **4**: 4 dias de embebição; **5**: 6 dias de embebição; **6**: 8 dias de embebição; **7**: 10 dias de embebição; **8**: 12 dias de embebição; **9**: 14 dias de embebição.

A figura 12 apresenta o perfil eletroforético de proteínas totais em gel de acrilamida SDS-PAGE para extratos brutos de amostras de endosperma do tratamento de restrição hídrica.

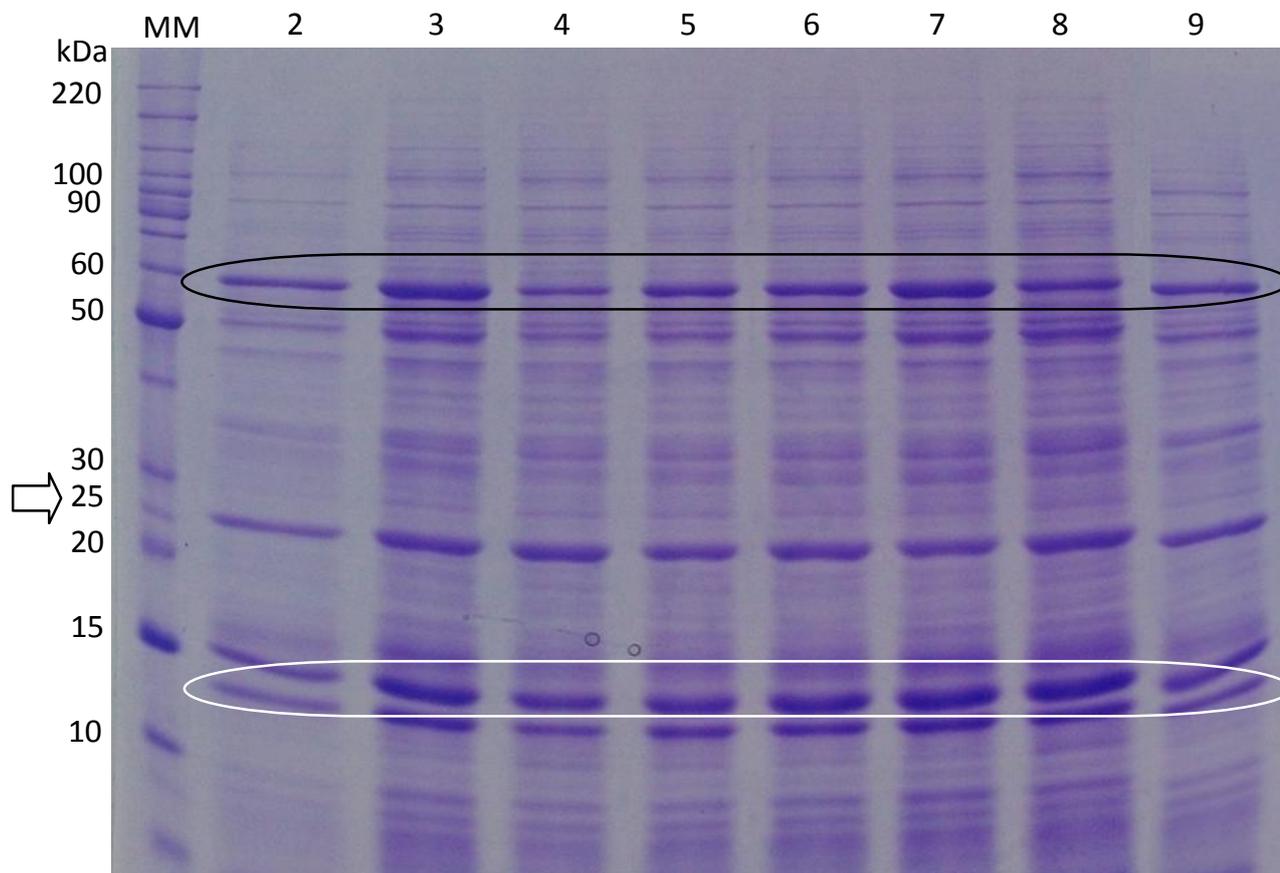


Figura 12. Gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) contendo extratos proteicos de amostras de endosperma das sementes sob restrição hídrica: sementes embebidas em PEG 8000, -0,8 MPa. Canaletas - **MM**: marcador de peso molecular, **2**: semente seca; **3**: 2 dias de embebição, **4**: 4 dias de embebição; **5**: 6 dias de embebição; **6**: 8 dias de embebição; **7**: 10 dias de embebição; **8**: 12 dias de embebição; **9**: 14 dias de embebição. A seta indica o peso molecular correspondente à proteína curcina e prováveis bandas da curcina.

Observando as figuras 11 e 12 verifica-se que há bandas em comum e bandas diferentes entre as amostras de eixo embrionário e de endosperma. As bandas de proteínas com peso molecular de 100 kDa são visualizadas com mais intensidade nas amostras do endosperma e em todos os tempos de embebição, 0 a 14 dias (Figura 12). Bandas proteicas correspondentes a peso molecular de 100 e 80 kDa são visualizadas mais intensamente nas amostras de eixo embrionário embebidas em PEG do que nas amostras do endosperma, no entanto não foi possível visualizar proteínas com 80 kDa nas condições utilizadas em nenhum dos compartimentos da semente seca já as bandas correspondentes a 100 kDa foram visualizadas com maior intensidade nos extratos brutos provenientes do eixo embrionário (Figura 11). E ainda, bandas com peso molecular de 60 kDa e 15 kDa (marcadas com círculo preto e branco, respectivamente) são visualizadas tanto nas sementes secas (eixo e endosperma) quanto nos extratos brutos de eixo e endosperma das sementes embebidas e em todos os tempos de embebição (0 a 14 dias).

Algumas bandas de proteínas de peso molecular de difícil identificação na faixa de peso molecular do padrão utilizado são visualizadas apenas nas amostras de eixo-embrionário e endosperma submetidas ao estresse hídrico, não aparecendo, portanto, nos mesmos compartimentos das sementes secas, o que sugere que o PEG (estresse hídrico) induziu o aparecimento de novas bandas de proteínas em ambos compartimentos ou apenas em um, isoladamente. Estas proteínas podem estar relacionadas com a defesa da planta ao estresse submetido. Campalans et al. (2000) estudando os eventos moleculares envolvidos na aquisição de tolerância à desidratação, observou a indução de novos polipeptídeos durante a desidratação de embriões de *Prunus amygdalus*. Como resposta à ação do ABA e do estresse osmótico que ocorre no embrião maduro, foram identificadas as proteínas tipo desidrinas, LEA e outras (Campalans et al., 2000), que têm sido utilizadas como marcadores das diferentes fases desses processos (Garello et al., 2000).

Yang et al., (2009) analisando proteoma de sementes de pinhão-manso embebidas em água durante 0, 24, 48, 60 e 72 h, conseguiram identificar pontos de proteínas de endosperma de peso molecular entre 12 e 97 kDa, classificadas em 5 grupos: proteínas tradutoras de sinais, proteínas relacionadas com

mobilização de óleo, ATP sintase, proteínas relacionadas com estresse oxidativo e outras proteínas não identificadas.

A identificação de proteínas expressas diferencialmente permite a associação destes polipeptídeos com diferentes eventos fisiológicos que ocorrem nas células, tecidos e órgãos (Korkumat et al., 2006).

Como nas amostras de endosperma do controle, bandas com peso molecular que incluem a proteína curcina, 25 kDa, marcados com o círculo vermelho (Figura 11) e seta (Figura 12), são visualizadas ainda mais intensamente nas amostras de endosperma dos tratamentos de restrição hídrica (com exceção da semente seca que aparece uma banda com menor intensidade), em todos os tempos de embebição (canaletas 3 a 9, figura 12) e não são visualizadas nas amostras de eixo-embrionário destas e na semente seca (canaletas 2 a 9, figura 11). Dados semelhantes para sementes de pinhão-manso foram encontrados na literatura.

Wei (2011) trabalhando com 4 isoformas da curcina: curcina 1, curcina 2, curcina 3 e curcina 4, demonstrou que a curcina 1 é abundante em altos níveis no endosperma de sementes durante a germinação e o estabelecimento de plântulas e começa a ser acumulada durante o desenvolvimento das sementes. Em seus trabalhos ele encontrou baixos níveis de curcina 1 no embrião das sementes, mas pode ter sido contaminação de material do endosperma durante a separação dos compartimentos ou então durante o desenvolvimento da semente houve o acúmulo de curcina 1 em níveis muito baixos no embrião. A curcina 1 é uma isoforma particularmente do endosperma e Wei (2011) afirma que ela não foi identificada em outros órgãos de Pinhão-manso ou se foi encontrada foi em quantidade muito baixa, insignificante. Já a curcina 2 foi mais expressa em plântulas, cotilédones e em todos os tecidos vegetativos e curcina 4 é embrionária, aparecendo em plântulas, cotilédones e em todos os tecidos vegetativos, não sendo encontrada, portanto no endosperma. Não foi possível detectar a curcina 3 nas análises feitas, então ela foi excluída das análises realizadas pelo autor. Qin et al. (2010) explorando a região promotora de curcina 1 e curcina 2 em pinhão-manso descreveram que a curcina 1 é endospermica e a curcina 2 só aparece sob tratamento de estresse nas sementes. Estes dados estão de acordo com os dados obtidos neste trabalho,

uma vez que as bandas bem marcadas nas sementes submetidas à restrição hídrica vistas na figura 12 podem representar além da curcina 1, a curcina 2 justificando a intensidade da banda no endosperma.

Yin et al. (2010) encontraram curcina 2 em sementes jovens sem tratamento de estresse sugerindo que a curcina 2 não está unicamente ligada ao estresse e Wei (2011) também verificou que a curcina 2 é pouco induzida pelo PEG 6000. No entanto Qin et al. (2005) verificaram que concentrações altas de PEG 6000 induziram o aparecimento da curcina 2. Segundo os autores, essa toxina está relacionada com a defesa da planta a uma condição de estresse biótico ou abiótico. Ela pode ser responsável pela proteção da planta a estas situações.

A distribuição específica das isoformas da curcina pelos tecidos da semente de pinhão-manso é remanescente da observação de outras RIPs presentes em outras famílias de plantas como por exemplo a ricina, na mamona (Tully e Beevers, 1976) e o milho B32 (Soave e Salamini, 1984).

5.0 CONCLUSÕES

- As sementes de pinhão-mansó dos lotes de 2010 e 2011 provenientes de Cafarnaum/BA estão viáveis, não existindo diferença fisiológica entre os lotes.
- A germinação, peso de mil sementes, biometria e umidade das sementes dos dois lote analisados não diferem significativamente a 5% de probabilidade.
- O perfil eletroforético de proteínas dos extratos brutos difere entre os tecidos tanto para as amostras de sementes germinadas em água quanto para as amostras sob condições de restrição hídrica com PEG 8000, -0,8 MPa.
- O perfil eletroforético de proteínas totais revelou bandas de proteínas com peso molecular semelhante ao de proteínas relacionadas com a defesa da planta à restrição hídrica em tecidos embrião e do endosperma de sementes de pinhão-mansó embebidas sob condições de restrição hídrica em solução de PEG 8000 a -0,8 MPa;
- O perfil eletroforético de proteínas totais revelou bandas de proteínas em sementes de pinhão-mansó, com peso molecular semelhante ao da curcuma;

6.0. REFERÊNCIAS

ACHTEN, W. M. J. et al.; *Jatropha* bio-diesel production and use. **Biomass and bioenergy**. Oxford, v.32, n.12, p.1063-1084, 2008.

ADAM, S. E. I., MAGZOUN, M.; Toxicity of *Jatropha curcas* for goats. **Toxicology** n.4, 347-354p.,1975.

ADEGBUYI, E.; COOPER, S. R.; DON, R.; Osmotic priming of some herbage Grass seed using polyethylene glycol (PEG). **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 9, n. 3, 867-878p, 1981.

ADOLF, W.; OPFERKUCH, H.J., HECKER, E.; Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**. v.23, n.1, 129-132p. 1984.

AGECOM – BA. EBDA instala novas áreas de pesquisa com pinhão-mansão. [Salvador, BA]: AGECOM, 2007. Disponível em: <www.pinhaomanso.com.br> Acesso em: 20 jun. 2010.

ALBUQUERQUE, J. M.; Plantas tóxicas no Jardim e no Campo, CAP, Belém, 120p,1980.

AQUINO, N. F. et al.; Morfometria de sementes de *Jatropha curcas* L. em função da procedência, **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v.8, n.2, 142-145p, 2009.

ARRUDA, F. P., BELTRÃO, N. E. M., ANDRADE, A. P., PEREIRA, W. E., SEVERINO, L. S.; Cultivo de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o semi-árido nordestino, **R. Bras. Oleag.**, Fibrosas, n.8, 789-799p, 2004.

AUDI, J., BELSON, M., PATEL, M.; Ricin poisoning: A comprehensive review. **The Journal of the American Medical Association**, v.294, n.9, 2342-2351p. 2005.

BARBIERI, L., BATTELLI, M. G., STIRPE, F.; Ribosome-inactivating proteins from plants, **Biochim. Biophys. Acta**, n.1154, 237-282p. 1993.

BARROSO, G. M., PEIXOTO, A. L., COSTA, C. G., ICHASO, C. L. F., GUIMARÃES, E. F., LIMA, H. C.; Sistemática de Angiospermas do Brasil. **Imprensa Universitária da Universidade Federal de Viçosa**. Viçosa. v.II. 1991.

BASKIN, C. C., BASKIN, J. M.; Seeds: ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination. San Diego: **Academic Press**. 666p., 1998.

BELTRÃO, N. E. M.; Considerações gerais sobre o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras. Campina Grande, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.mda.gov.br/saf/arquivos/0705910897.doc>>. Acesso em: 03 jul. 2006.

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. **3º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**, Varginha, v. 3, 2006.

BERRETA, E. J., ESTEFANELL, N., ARIAS, P.; Evaluación de la producción y calidad de la semilla de *Bromus auleticus* Trin. cosechada en diferentes estados de madurez. In: SEMINARIO NACIONAL DE CAMPO NATURAL, 2., 1990, Tacuarembó, **Anais...** Tacuarembó: INIA: Instituto Nacional de Investigacion Agropecuária. Sociedad Uruguaya de Pasturas Naturales, 159-171p., 1990.

BEWLEY, J. D., BLACK, M.; Seeds: physiology of development and germination. 2.ed., New York: **Pleenum**, 445p., 1994.

BRACCINI, A. L., BRACCINI, M. C. L., SCAPIM, C. A.; Mecanismos de deterioração das sementes: aspectos bioquímicos e fisiológicos. Informativo **ABRATES**, Londrina, v. 11, n. 1, 10-15p, 2001.

BRADFORD, K. J.; Manipulation of seed water relation via osmotic priming to improve germination under stress conditions. **Hort Science**, Alexandria, v.21, n.3, 1105-1112p, 1986.

BRADFORD, M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, n.72, 248-254p., 1976.

BRASIL. Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária Brasília-DF: Departamento Nacional de Produção Vegetal – SNA/DNPV/CLAV. 399p. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura e da Reforma Agrária. Regras para análise de sementes. Brasília: **SNAD, DNDV, CLAV**, 365p., 1992.

BRASIL. Ministério da Indústria e do Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais. Brasília-DF: **Ministério da Indústria e do Comércio (Brasil. Ministério da Indústria e do Comércio. Documentos**, 16). 364p. 1985.

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

CABRAL, E. L., BARBOSA, D. C. A., SIMABUKURO, E. A.; Armazenamento e germinação de sementes de *Tabebuia aurea* (manso) Benth & Hook. F. S. Moore. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v.17, n.4, 609-617p., 2003.

CARMONA, R., MARTINS, C. R., FÁVERO, A. P.; Fatores que afetam a germinação de sementes de gramíneas nativas do cerrado. **Rev. Bras. de Sementes**, v.20, n.1, 16-22p., 1998.

CAMPALANS, A., PAGÈS, M., MESSEGUER, R.; Protein analysis during almond embryo development. Identification and characterization of a late embryogenesis abundant protein, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 449-457, 2000.

CARNEIRO, D. C.; CORDEIRO, I. & FRANÇA, F.; A família Euphorbiaceae na Flora de Inselbergs da região de Milagres, Bahia, Brasil. **Boletim de Botânica**, Universidade de São Paulo, São Paulo, n. 20, 31-47p., 2002.

CARNIELLI, F.; O combustível do futuro. 2003. Disponível em: www.ufmg.br/boletim/bul1413. Acesso em: 21 de setembro de 2010.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEN, R.; PANIS, B. Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis. **Proteomics**, v. 5, p. 2497-2507, 2005.

CARRARO, D. M.; Variação e herança dos padrões eletroforéticos em órgãos e estágios de desenvolvimento em milho (*Zea mays* L.). Piracicaba, 1990. 121f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1990.

CARVALHO, N. M., NAKAGAWA, J.; Sementes: ciência, tecnologia e produção. 4.ed. Jaboticabal: **FUNEP**, 588p., 2000.

COELHO, K.; Resposta Técnica. 16 jan. 2006. Disponível em: <<http://sbrtv1.ibict.br/upload/sbrt1952.pdf?PHPSESSID=2ab95bc31d3e40da5688bd61baeacb98>>. Acesso em 28 de maio de 2008.

CORDEIRO, I.; Euphorbiaceae. In: B.L. Stannard (ed.). Flora do Pico das Almas, Chapada Diamantina, Bahia, Brasil. Kew, **Royal Botanic Gardens**, 300-317p., 1995.

CÓRDOBA, G. A. T.; Osmocondicionamento em sementes de *Esenbeckia leiocarpa* ENGL (GUARANTÃ). **Revista Brasileira de Sementes**, v.17, n.2, 220-226p, 1995.

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

COSTA NETO, P. R. et al.; Transesterificação de óleo comestível usado para a produção de biodiesel e uso em transportes. 2005. Disponível em: <<http://www.biodieselecooleo.com.br/biodiesel/estudos.htm>> . Acesso em 20 de setembro de 2010.

COX, T. S., GLOVER, J. D., VAN TASSEL, D. L., COX, C. M., DEHAAN, L. R.; Prospects for developing perennial-grain crops. **Bioscience**, n.56, 649- 659p., 2006.

DANTAS, B. F., SILVA, F. F. S., LOPES, A. P., DRUMOND, M. A.; Tecnologia de Sementes de Pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L): Avaliações iniciais da qualidade fisiológica. In: **II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel**. Brasília-DF, 2007.

DE CASTRO, R. D. et al.; Detection of β -tubulin in tomato seeds: optimization of extraction and immunodetection, **Phytochemistry**, v. 47, 689–694p., 1998.

DE CASTRO R. D., HILHORST, H. W. M.; Dormancy, germination and the cell cycle indeveloping and imbibing tomato seeds, **R. Bras. Fisiol. Veg.** v.12, 105-136p., 2000.

DE CASTRO, R. D., BRADFORD, K. J., HILHORST, H. W. M.; In: FERREIRA, A. G. & BORGUETTI, F. (Org.) Germinação: do básico ao aplicado. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 323p., 2004.

DEVAPPA, R. K., MAKKAR, H. P., BECKER, K.; *Jatropha* toxicity—a review. **Journal of Toxicol Environmental Health**, Part B, 13, 476-507p., 2010.

DIAS, L. A. S., LEME, L. P., LAVIOLA, B. G., PALLINI FILHO, A., PEREIRA, O. L., CARVALHO, M., MANFIO, C. E., SANTOS, A. S., SOUSA, L. C. A., OLIVEIRA, T. S., DIAS, D. C. F. S.; Cultivo de pinhão-mansô (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível. Viçosa. v.1. 40p. 2007.

DIAS, L.L.C.; SILVEIRA, V.; SANTA-CATARINA, C.; BALBUENA, T.S.; FLOH, E.I.S. Comparative analysis of the two-dimensional gel electrophoresis patterns during seed development in *Ocotea catharinensis*. **Proteomics**, (submetido). 2007.

EMBRAPA AGROENERGIA. EMBRAPA investe na destoxificação do pinhão mansô. Disponível em: www.cnpae.embrapa.br. 2009. Acesso em setembro de 2009.

FAIRLESS, D.; The little shrub that could maybe. **Nature**, London, v.449, 652-655p., 2007. doi: 10.1038/449652a.

FENNER, M.; Seed ecology. Chapman & Hall, London, 1993.

FERGUSON, D. L, GUIKEMA, J. A., PAULSEN, G. M.; Ubiquitin pool modulation and protein degradation in wheat roots during high temperature stress. **Plant Physiology**, Stanford, v.92, 740-746p., 1990.

FERNANDEZ, R.; Nicarágua biodiesel: el milagro del tempate. Envio digital, Manágua, Nicarágua, n.143, 23-26p., 1993. Disponível em: <<http://www.envio.org.ni/articulo.php>> Acesso em 02 de novembro de 2010.

FERREIRA, A. G., BORGHETTI, F. (Orgs.); Germinação: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed, 2004.

FERREIRA, D. F. Sistema SISVAR para análises estatísticas: manual de orientação. Universidade Federal de Lavras / Departamento de Ciências Exatas, Lavras, 66p., 2000.

GAILLARD, Y., PEPIN, G.; Poisoning by plant material: review of human cases and analytical determination of main toxins by higher-performance liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry. **Journal of Chromatography**. v.733, 181-229p., 1999.

GANDHI, V. M., CHERIAN, R. M., MULKY, M. J.; Toxicological studies on ratanjyout oil. **Food Chemical Toxicology**, v.33., n.1, 39-42p., 1995.

GARELLO, G., BARTHE, P., BONELLI, M., BIANCO-TRINCHANT, J., BIANCO, J., PAGEDEGIVRY, M.L.; Abscisic acid-regulated responses of dormant and non-dormant embryos of *Helianthus annuus*: role of ABA-inducible proteins. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 38, p. 473-482, 2000.

GIAVENO, C. D., OLIVEIRA, R. F.; Estresse ambiental: Conceitos gerais. Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal, 2003 (publicação eletrônica). Disponível em

<http://www.sbfv.org.br/materialdidatico/download/Estresse1ricardo.pdf> Acesso em 01 de Setembro 2010.

GINWAL, H. S., PHARTYAL, S. S., RAWAT, P. S., SRIVASTAVA, R. L.; Seed source variation in morphology, germination and seedling growth of *Jatropha curcas* Linn. In: Central India. **Silvae Genetica**, Dehradun, v.54, n.2, 2005.

GLOVER, J. D., COX, C. M., REGANOLD, J. P.; Future farming: a return to roots? **Scientific American**, v.297, 82-89p., 2007.

GUIA RURAL. Culturas de A a Z. Abril de 1986. Disponível em: <<http://www.pinhaomanso.com.br/pinhaomanso.html>> Acesso em 10 jul. 2006.

HARLEY, R. M., SIMMONS, N. A.; Florula of Mucugê, Chapada Diamantina, Brazil. Kew, **Royal Botanic Gardens**. 1986.

HELLER, J.; Physic nut., *Jatropha curcas* L.: Promoting the conservations and use of underutilized and neglected crops.; Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/ International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI), Italy. 66 pp. 1996.

HUI LIU et al.; A Comparative Analysis of Embryo and Endosperm Proteome from Seeds of *Jatropha curcas*. **Plant Biol.**, v.10, n.1111, 1744-7909p, 2009.

IBGE. Censo 2010 Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/painel/painel.php?codmun=290530#>. Acesso em 10 de maio de 2012.

ITURBE-ORMAETXE I., ESCUREDO P., ARRESE-IGOR C., BECANA M., Oxidative damage in pea plants exposed to water deficit or paraquat. **Plant Physiol.**, v.116, 173-181p. 1998.

JARVIS, D.I.; Los caracteres agromorfológicos y la selección y el mantenimiento queda el agricultor. In: IPGRI, Training Guide for in situ conservation on-farm. Roma: **IPGRI**, 51-81p., 2000.

JOKER, D., JEPSEN, J.; *Jatropha curcas* L. Seed Leaflet, Humleback, Denmark, n.83, 2p., 2003.

JUAN, L., YU, C., YING, X., FANG, Y., LIN, T., FANG, C.; Cloning and Expression of Curcin, a Ribosome-Inactivating Protein from the Seeds of *Jatropha curcas*. **Acta Botanica Sinica**. v.45. n.7. 858-863p. 2003.

KING, A. J., HE, W., CUEVAS, J. A., FREUDENBERGER, M., RAMIARAMANANA, D., GRAHAM, I. A.; Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, v.60, 2897-2905p., 2009.

KORMUTÁK, A.; SALAJ, T.; VOOKOVÁ, B. Storage protein dynamics in zygotic and somatic embryos of white fir. *Biologia Bratislava*, v. 61, p. 479-485, 2006.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, **Nature**, London, v.227, 680-685p.1970

LOUREIRO, M. B. et al.; Efeito do Estresse Hídrico Sobre a Germinação de Sementes Pinhão-mansó (*Jatropha curcas* L.). In: II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel. Arquivos eletrônicos, publicações, Agricultura, Brasília, 2007. Disponível em <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/agricultura/29.pdf>> Acesso em 9 de setembro de 2010.

LOURENÇO, K. D. S.; Estudo comparativo parcial das características lipídica, e protéicas, determinação de fatores antinutricionais em sementes de duas cultivares de canola (*Brassica napus*, L). 2004. [dissertação de mestrado]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2004.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., Farr, A. L., Randal, R. J.; Protein measurement with the folin phenol reagent, **J. Biol. Chem.**, v.193, 265-275p. 1951.

MACIEL, F. M., MACHADO, O. L. T.; Avaliação do potencial alergênico de sementes de *Jatropha curcas* L., pinhão-mansó.. In: II Congresso da Rede

Brasileira de Tecnologia de Biodiesel, 2007, Brasília - DF. II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel: **Livro de resumos**. Brasília, de 27 a 29 de novembro de 2007. Brasília-DF: MCT/ABIPTI/2007, 2007.

MAKKAR, H. P. S. & BECKER, K.; *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value added coproducts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.111, 773-787p., 2009.

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 Chemistry**, v.62, 207-215p., 1998.

MAKKAR, H. P., BECKER, K., SCHMOOK, B.; Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.52, 31-36p., 1998.

MARCONE, M.F.; KAKUDA, Y. & YADA, R.Y. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants – I. Isolation/purification and characterization. **Food Chemistry**, 62: 27-47, 1998.

MARCOS FILHO, J.; Fisiologia das Sementes de Plantas Cultivadas. Piracicaba: **Fealq**, v.12, 495p., 2005.

MARQUES, D. A., FERRARI, R. A.; O papel das novas biotecnologias no melhoramento genético do pinhão manso, **Biológico**, São Paulo, v.70, n.2, 65-67p. 2008.

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

MENDONÇA, S., LAVIOLA, B. G.; Potencial e toxidez da torta de pinhão manso. In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2009, Montes Claros. **Anais do Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel**. 2009.

NUNES, C. F.; Caracterização de frutos, sementes e plântulas e cultivo de embriões de pinhão manso (*Jatropha curcas*L.). 2007. 78f. Dissertação (Mestrado Fitotecnia).– Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2007.

OLIVEIRA, R. B., GIMENEZ, V. M. M., GODOY, S. A. P.; Intoxicações com Espécies da Família Euphorbiaceae. **Revista Brasileira de Biociências**. Porto Alegre, v.5, supl. 1, 69-71p., 2007.

OLSNES, S., KOZLOV, J.; Ricin, *Toxicon*, v.39, 1723-1728p., 2001.

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

OSBORNE, T.B. The Vegetable Proteins. London, Longmans, **Green and Co.**, 1924.

PEIXOTO, A. R.; Plantas oleaginosas arbóreas. São Paulo: **Nobel**, 282p., 1973.

PEREIRA, M. D., DIAS, D. C. F. S., DIAS, L. A. S.; Germinação de sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) em diferentes temperaturas e substratos. **In: II Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel**. Brasília-DF, 2007.

QIN, W., MING-XING, H., YING, X., XIN-SHEN, Z., FANG, C.; Expression of a ribosome inactivating protein (curcin 2) in *Jatropha curcas* is induced by stress. **Journal of Biosciences** v.30, 351–357p. 2005.

QIN, X., SHAO, C., HOU, P., GAO, J., LEI, N., JIANG, L., YE, S., GOU, C., LUO, S., ZHENG, X., GU, X., ZHU, X., XU, Y., CHEN, F.; Different functions and expression profiles of curcin and curcin-L in *Jatropha curcas* L. **Z Naturforsch C**, v.65, 355-362p., 2010.

RAMOS, C. M. P., BORA, P. S.; Functional characterization of acetylated brazil nut (*bertholletia excelsa* hbk) kernel globulin. **Ciênc Tecnol Alim**. 24:134-8, 2004.

REGO, S. S. et al.; Caracterização morfológica do fruto, semente e germinação de *Duranta vestita* Cham. (Verbenaceae), **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.5, supl. 1, 474-476p., 2007.

SALATINO, A., SALATINO, M. L. F., NEGRI, G.; Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** [online]. v.18, n.1, 11-33p., ISSN 0103-5053. doi: 10.1590/S0103-50532007000100002, 2007.

SANTANA, D. G. & RANAL, M. A.; Análise da germinação: um enfoque estatístico. Brasília: UnB. 248 p., 2004.

SANTOS, M. J., MACHADO, I. C., LOPES, A. V.; Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha* L.(Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.28, n.2, 361-373p, 2005.

SANTOS, S. R. G., PAULA, R. C. de; Qualidade fisiológica de *Sebastiania commersoniana* (Baill.) Smith & Downs (branquilha – Euphorbiaceae) durante o armazenamento. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.74, 87-94p., 2007.

SANTOS, V. L. M., CALIL, A. C., RUIZ, H. A., ALVARENGA, E. M., SANTOS, C. M.; Efeito do estresse salino e hídrico na germinação e vigor de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**. Brasília, v.14, n. 2, 189-194p., 1992.

SATIRO, L. N., ROQUE, N.; A família Euphorbiaceae nas caatingas arenosas do médio rio São Francisco, BA, Brasil. **Acta Bot. Bras.** [online], v.22, n.1, 99-118p., ISSN 0102-3306, doi: 10.1590/S0102-33062008000100013, 2008.

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

SCAVONE, O., PANIZZA, S.; Plantas tóxicas, **CODAC-USP**, São Paulo, 1980.

SEVERINO, L.S.; O que sabemos sobre a torta de mamona; Embrapa Algodão; **Documentos**, 134, 31p., 2005.

SHEWRY, P.R.; NAPIER, J.A.; TATHAM, A.S. Seed storage proteins: structures and biosynthesis. **Plant Cell**, v. 7, p. 945-956, 1995.

SILVA, R. de C., CAMILLO, J., LUIS, Z. G., SCHERWINSKI-PEREIRA, J. E.; Potencial germinativo e morfoanatomia foliar de plântulas de pinhão-manso originadas de germoplasma criopreservado. **Pesq. agropec. bras.** [online], v.46,

n.8, 836-845p., ISSN 0100-204X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2011000800008>, 2011.

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

SOAVE, C., SALAMINI, F.; Organization and regulation of zein genes in maize endosperm. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 304, 341-347p., 1984.

SONG, S. Q., LEI, Y. B., TIAN, X. R.; Proline metabolism and cross-tolerance to salinity and heat stress in germinating wheat seeds, **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v.52, n.6, 897-904p., 2005.

SPINOLA, M. C. M., CICERO, S. M., MELO, M.; Alterações bioquímicas e fisiológicas em sementes de milho causadas pelo envelhecimento acelerado. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v.57, n.2, 263-270p., 2000.

STIRPE, F., BATTELLI, M. G.; Ribosome-inactivating proteins: progress and problems, **Cellular and Molecular Life Sciences**, 63, 1850-1866p., 2006.

SUDA, C.N.K.; GIORGINI, J.F.; Seed reserve composition and mobilization during germination and initial seedling development of *Euphorbia heterophylla*. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 3, p. 226-245, 2000.

TAIZ, L., ZEIGER, E.; *Fisiologia Vegetal*, Versão traduzida, 4ed, Porto Alegre, 738 p., 2009.

TAYLOR, A. C.; Seed storage, germination and quality, **The physiological of vegetable crops**, New York, 1-36p., 1997.

TOLEDO, J. V., MARTINS, L. D., KLIPPEL, V. H., HOLLANDA, M. P., COSTA, F. P.; Zoneamento Agroclimático para Cultura da Mamona (*Ricinus Communis* L) no Estado do Espírito Santo. In: **6º Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas**,

Óleos, Gorduras e Biodiesel, 2009, Montes Claros - MG. Biodiesel: Inovação Tecnológica. Lavras - MG : UFLA, v.6, 985-992p., 2009.

TULLY, R. E., BEEVERS, H.; Protein bodies of castor bean endosperm: isolation, fractionation, and the characterization of protein components, **Plant Physiol**, 58, 710-716p., 1976.

VERLUES, P. E. et al.; Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status, **The Plan Journal**, v.45, 471–694p., 2006.

VILLELA, F. A., DONI FILHO, L., SEQUEIRA, E. L.; Tabela de potencial osmótico em função da concentração de polietilenoglicol 6000 e da temperatura. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.26, n.11/12, 1957-1968p, 1991.

VOET, D., VOET, J. G., PRATT, C. W.; Fundamentos de Bioquímica, 1ª impressão, 99-100p., 2002.

WEBSTER, G. L.; Classification of the Euphorbiaceae. **Annals of Missouri Botanical Garden** 81, 3-32p., 1994.

YIN, Z. C., WU, L. F., MAO, H. Z., QIU, C. X.; *Jatropha curcas* curcin genes, tissue-specific promoters and generation of curcin-deficient transgenic *Jatropha* plants. 2010.

YOON, B. Y., LANG, H. J., COBB, B. G.; Effects of priming on improve germination under stress, **Horticultural Science**, Calcutá, v.32, n.2, 383-395p, 1997.

APÊNDICE I

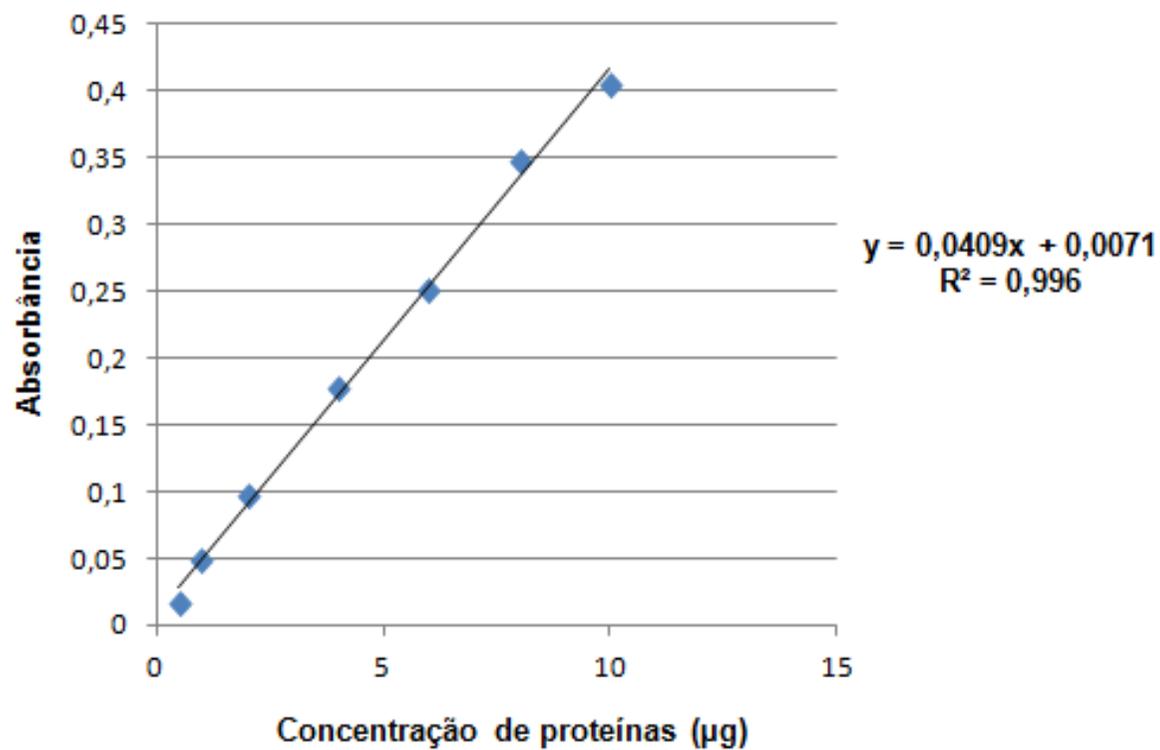


Figura 13: Curva analítica utilizada para o cálculo da concentração de proteínas nas amostras do controle (sementes de pinhão manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em água).

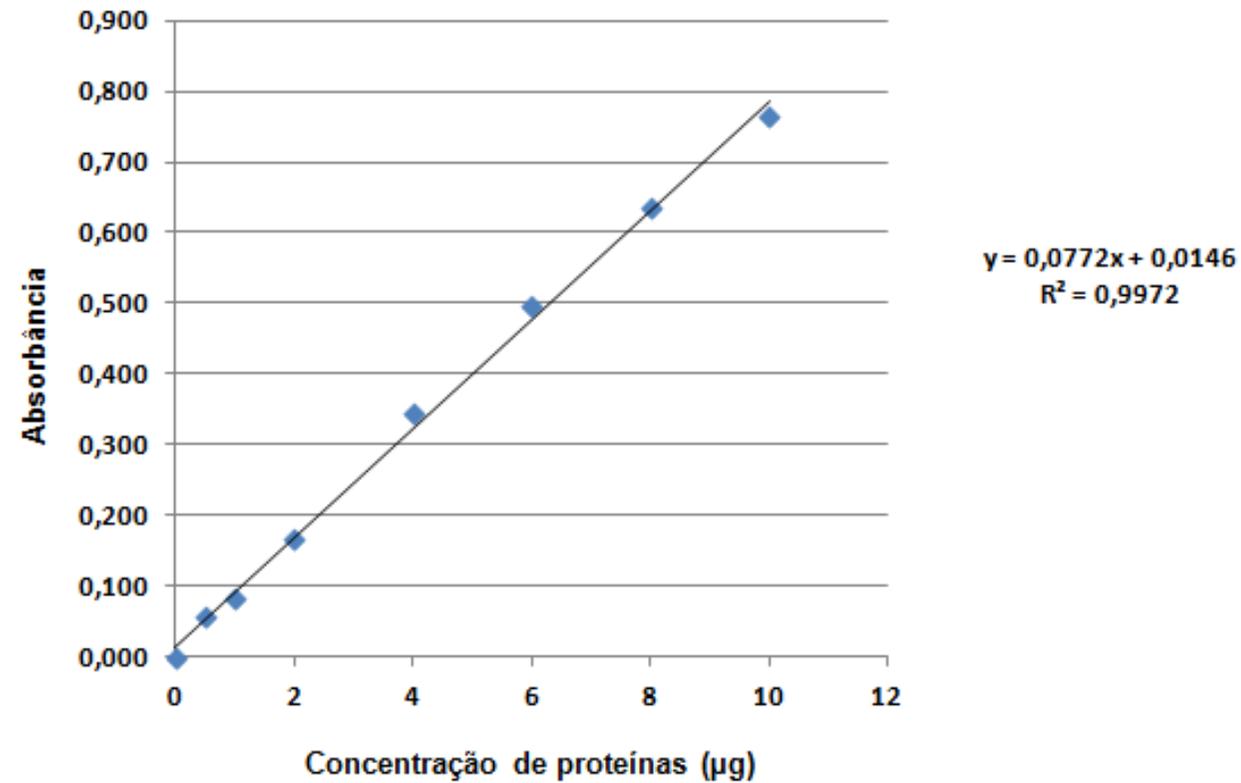


Figura 14: Curva analítica utilizada para o cálculo da concentração de proteínas nas amostras do tratamento de restrição hídrica (sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em PEG 8000, -0,8 MPa).

APÊNDICE II

Quadro 2. Valores de média de absorvância, concentração de proteínas por μL da amostra (μg), quantidade de amostra para obter 15 μg de proteínas (μL) e volume de bromofenol para 25 μL de volume final em cada canaleta para amostras do controle: sementes de pinhão manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em água.

Amostras	Absorvância (média)	Concentração de proteínas por μL da amostra (μg)	Quantidade de amostra para obter 15 μg de proteínas (μL)	Volume do corante azul de bromofenol para 25 μL de volume final (μL)
SSEx	0,207	4,9	3,1	21,9
Ág. Ex. 2dae	0,329	7,9	1,9	23,1
Ág. Ex. 4dae	0,083	1,9	8,1	16,9
Ág. Ex. 6dae	0,087	2,0	7,7	17,3
Ág. Ex. 8dae	0,060	1,3	11,6	13,4
Ág. Ex. 10dae	0,034	0,7	22,8	2,2
Ág. Ex. 12dae	0,152	3,5	4,3	20,7
Ág. Ex. 14dae	0,053	1,1	13,4	11,6
SSEn	0,190	4,5	3,4	21,6
Ág. En. 2dae	0,324	7,7	1,9	23,1
Ág. En. 4dae	0,474	11,4	1,3	23,7
Ág. En. 6dae	0,233	5,5	2,7	22,3
Ág. En. 8dae	0,134	3,1	4,8	20,2
Ág. En. 10dae	0,150	3,5	4,3	20,7
Ág. En. 12dae	0,294	7,0	2,2	22,8
Ág. En. 14dae	0,034	0,7	22,8	2,2

Quadro 3. Valores de média de absorbância, concentração de proteínas por μL da amostra (μg), quantidade de amostra para obter 30 μg de proteínas (μL) e volume de bromofenol para 20 μL de volume final em cada canaleta para amostras do tratamento de restrição hídrica: sementes de pinhão-manso provenientes de Cafarnaum/BA embebidas em PEG 8000, -0,8 MPa.

Amostras	Absorbância (média)	Concentração de proteínas por μL da amostra (μg)	Quantidade de amostra para obter 30 μg de proteínas (μL)	Volume do corante azul de bromofenol para 20 μL de volume final (μL)
SSEx	0,207	4,9	6,1	13,9
PEG Ex. 2dae	0,446	5,6	5,4	14,6
PEG Ex. 4dae	0,265	3,2	9,3	10,7
PEG Ex. 6dae	0,639	8,1	3,7	16,3
PEG Ex. 8dae	0,447	5,6	5,4	14,6
PEG Ex. 10dae	0,440	5,5	5,4	14,6
PEG Ex. 12dae	0,663	8,4	3,6	16,4
PEG Ex. 14dae	0,310	3,8	7,9	12,1
SSEn	0,190	4,5	6,7	13,3
PEG En. 2dae	0,264	3,2	9,3	10,7
PEG En. 4dae	0,249	3,0	10,0	10,0
PEG En. 6dae	0,257	3,1	9,6	10,4
PEG En. 8dae	0,338	4,2	7,2	12,8
PEG En. 10dae	0,345	4,3	7,0	13,0
PEG En. 12dae	0,386	4,8	6,3	13,7
PEG En. 14dae	0,475	6,0	5,0	15,0

ANEXO

1. Soluções utilizadas durante a extração de proteínas e para o gel de eletroforese em acrilamida SDS-PAGE.

1.1 Solução tampão fosfato de potássio pH 7,5 1M

- Solução estoque de K_2HPO_4 – 8mL
- Solução estoque de KH_2PO_4 – 2mL
- Água Milli-Q para 100mL

1.2 Solução tampão de corrida para o gel (0,025M TRIS/0,192M glicina/0,1% SDS – pH 8,3)

- Tris – 4,53g
- Glicina – 21,6g
- SDS – 1,5g
- Água destilada para 1,5L de volume final

1.3 Solução de tampão bromofenol desnaturante

- Tris HCl pH 6,8 0,5M – 1,2mL
- SDS 10% - 1,5 mL
- Glicerol 100% - 0,75mL
- B-mercaptoetanol – 0,4mL
- Corante bromophenol blue – 0,015g

1.4 Solução corante Coomassie para o gel de acrilamida

- Metanol – 100mL
- Ácido acético glacial – 17,4mL
- Corante coomassie G-250 – 0,063g
- Água destilada para 250mL de volume final

1.5 Solução descorante para o gel de acrilamida

- Metanol – 400mL
- Ácido acético glacial – 70mL
- Água destilada para 1L