



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
DOUTORADO – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: SEMENTES

**“PROTOCOLO DE CRIOCONSERVAÇÃO DE
SEMENTES DE ALGODÃO (*Gossypium hirsutum* L.
raça *latifolium* Hutch.)” CULTIVARES BRS 200
MARROM E BRS VERDE”.**



ROBSON ROGÉRIO PESSOA COELHO

Areia (PB), Fevereiro de 2006

**“PROTOCOLO DE CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES
DE ALGODÃO (*Gossypium hirsutum* L. raça *latifolium*
Hutch.)” CULTIVARES BRS 200 MARROM E BRS VERDE”.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia – Área de concentração de Sementes, da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, em cumprimento às exigências para a obtenção do Grau de Doutor.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Sementes

AUTOR: Robson Rogério Pessoa Coelho

DOCENTE ORIENTADOR: Prof. Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata

Areia – PB

Fevereiro - 2006

C 672p Coelho, Robson Rogério Pessoa.

“Protocolo de criopreservação de sementes de algodão (*Gossypium hirsutum* L.raça *latifolium* Hutch.) cultivares BRS 200 Marrom r BRS Verde”/ Robson Rogério Pessoa Coelho. – Areia (PB), 2006.

90p.: il.

Orientador: Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata

Tese (Doutorado) CCA/UFPB

1. Sementes de algodão. 2. Temperaturas subzero. 3. Nitrogênio líquido.

UFPB/BC.

CDU 631.53.01/02(043)

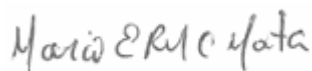
2. ed.

**“PROCOLO DE CRIOCNSERVAÇÃO DE SEMENTES
DE ALGODÃO (*Gossypium hirsutum* L. raça *latifolium*
Hutch.)” CULTIVARES BRS 200 MARROM E BRS VERDE”.**

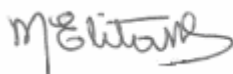
ROBSON ROGÉRIO PESSOA COELHO

TRABALHO DE TESE APROVADO EM: 20 / 02 / 2006.

APROVADO:



Dr. Mário Eduardo Rangel Moreira Cavalcanti Mata
Orientador – UAEAG-CTRN/UFCG – Campina Grande



Dra. Maria Elita Duarte Martins
Examinadora Externa - UAEAG-CTRN/UFCG - Campina Grande



Dr. Francisco de Assis Cardoso Almeida
Examinador Interno - UAEAG-CTRN/UFCG - Campina Grande



Dr. Humberto Silva
Examinador Externo – CCBS – UEPB – Campina Grande

Areia – PB

Fevereiro – 2006

AGRADECIMENTOS

Vivenciamos a mudança todos os dias em nossas vidas. Mudanças sutis, pequenas, como aqueles fios de cabelos brancos que teimam em aparecer, os filhos que crescem e te bombardeiam com perguntas sobre o mundo; mudanças de trabalho, coisas boas e ruins que sempre nos acompanham até o fim da existência. Resolvi assim, mudar o modo de agradecer a todos quantos me ajudaram, direta ou indiretamente na construção deste trabalho. Preferi também não usar parágrafos, por parecer que quem está por último ser menos importante. Mas, todavia, uma coisa não muda nesses agradecimentos: a emoção de escrevê-los. Primeiro e, sobretudo, agradeço a **DEUS**, pela sua bondade infinita, misericórdia e por nos ter proporcionado com um mínimo (ou máximo) de inteligência, para de posse desse poder, tentar contribuir com a mudança do mundo. Não existem segundos ou terceiros postos ou lugares para agradecimentos. Todos daqui para frente têm ou tiveram enorme participação na, como já mencionei, construção do trabalho. Assim, obrigado a **minha família**, em especial minha mãe Natália, minha esposa Guia, e meus filhos, Pedro e Isadora, que conseguiram juntar forças para na minha ausência, enquanto nos bancos da universidade, tocar a vida e dessa maneira transferir para mim uma força imensa. Falarei do meu Pai Terreno um pouco mais na frente. Agradeço também aos **colegas de curso**, pelo coleguismo, força e porque não pela alegria de encarar este desafio, os quais não nomearei para evitar injustiças. Da mesma maneira, agradeço aos **Mestres** (não a todos, não serei aqui hipócrita), em especial ao Dr. Mário Eduardo, pela nossa caminhada desde o mestrado, e por acreditar na minha capacidade, por entender meus anseios e atender meus pleitos na realização do trabalho. Aos membros **examinadores** minha eterna gratidão. Aos **funcionários** do Laboratório de Sementes, Rui, “Seu Biu”, Pedro (*in memoriam*), Antonio, que com o passar do tempo e do curso se transformaram, creio eu, em amigos. Não posso me esquecer, e aqui não farei, dos **amigos e colegas (ex) de trabalho** do Laboratório de Tecnologia de Alimentos da UFPB em João Pessoa, Cândido, Bel, Tarsísio, Artur, Maria José, Teresa, Diógenes, Gilvan, que durante quase 10 anos de trabalho na UFPB se constituíram em praticamente minha segunda família. As **instituições**, não agradeço, pois acredito que elas foram, são e continuarão sendo construídas por nós, e não nós sendo construídos por elas. Espero não ter esquecido de ninguém, me desculpem a pretensão, e até uma próxima vez.

Reservo este espaço para agradecer e lembrar de meu **Pai, José Afonso Coelho**, que já não está mais aqui, junto de nós, mas que sua lembrança, seus ensinamentos, suas conquistas, sua formação moral, amor e incentivos eu JAMAIS esquecerei, e sempre, apesar das minhas limitações, procurarei seguir e até, porque não, imitar.

Pai, eu te amo.

RESUMO GERAL

A preservação de sementes de valor econômico em nitrogênio líquido, ou crioconservação tem o potencial de estender o período de armazenagem quase que indefinidamente. Contudo, durante o processo de congelamento e o descongelamento, a temperatura alcançada pode ocasionar stress podendo ser letal para muitas espécies de materiais biológicos inclusive sementes. A capacidade das sementes de resistir ao congelamento em nitrogênio líquido se configura como o fator crítico para a crioconservação. Dessa maneira, buscou-se no presente trabalho, pesquisar a crioconservação de sementes de algodão herbáceo colorido, das cultivares BRS 200 Marrom e BRS Verde, material desenvolvido pela Embrapa Algodão. Para tanto, o estudo foi dividido em quatro partes, buscando-se abranger todas as etapas para o estabelecimento de um protocolo de armazenamento a longo prazo em temperaturas criogênicas. Assim estudou-se a determinação do teor de água crítico para a crioconservação, a cinética de congelamento criogênico em diferentes temperaturas, a crioconservação, ou seja, o armazenamento em temperaturas subzero por 12 meses, e, finalmente, buscou-se avaliar a possível degradação de substâncias químicas essenciais ao processo de germinação, em decorrência da exposição das sementes a condições de armazenagem tão extremas. O teor de água limite para crioconservação das sementes de algodão das duas cultivares situa-se entre 6-8%, enquanto que para o armazenamento a longo prazo, observaram-se quedas no poder germinativo e no vigor das duas cultivares. Verificou-se que as curvas de congelamento destas sementes principalmente nas temperaturas de -25, -45 e -170°C, apesar da maior similaridade com as curvas de resfriamento, apresentam, ainda que de forma discreta, as três fases características da curva de congelamento da água pura. Com relação à difusividade térmica, concluiu-se que esta aumenta com o aumento do teor de umidade, e não apresenta um comportamento simétrico com a oscilação da temperatura. Os resultados obtidos permitem também concluir, que as sementes das duas cultivares tem composição química similares e que de maneira geral houve uma diminuição das concentrações dos componentes químicos de reserva no decorrer do armazenamento, com exceção dos minerais.

Palavras-chave: sementes de algodão, temperaturas subzero, nitrogênio líquido.

GENERAL ABSTRACT

The preservation of seeds of economical value in liquid nitrogen or cryoconservation has the potential of extending the storage period almost indefinitely. However, during the freezing and thawing processes, the reached temperature can cause stress that could be lethal for many biological material species, including seeds. The capacity of seeds to resist to freezing in liquid nitrogen is configured as critical factor for the long term conservation. In this work an attempt was made to investigate the cryoconservation of herbaceous color cotton seeds from the cultivates BRS 200 Brown and BRS Green, material developed by Embrapa Algodão. In this case, the study was divided in four parts in the attempt to include all the stages for the establishment of a long term storage protocol in cryogenic temperatures. It was studied the determination of the high moisture freezing limit for the cryoconservation, the kinetics of cryogenic freezing in different temperatures, the storage in subzero temperatures for 12 months (cryoconservation), and, finally, the possible degradation of essential chemical substances to the germination process, considering the exposition of seeds to such extreme storage conditions. The high moisture freezing limit of cotton seeds from the two cultivates range from between 6-8%, while for the long term storage there was a drop in germination and vigor in the two cultivates in any of the temperatures and thawing methods used. It was verified that the freezing curves of these seeds mainly in the temperatures of -25, -45 and -170oC, in spite of the largest similarity with the cooling curves, they present, although in discrete way, the three characteristic phases of the curve of freezing of the pure water. With regard to the thermal diffusivity, it was concluded that it increases with the increase in humidity content, and it does not present a symmetrical behavior with temperature oscillation. The found results also allow to conclude that the seeds of the two cultivates have similar chemical composition and that, in general, there was a decrease in the reserve of chemical components during storage, except for the minerals.

Key-words: cotton seeds, subzero temperatures, liquid nitrogen.

CONTEÚDO

AGRADECIMENTOS	iv
RESUMO GERAL	vi
GENERAL ABSTRACT	vii
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	4
CAPÍTULO 1	6
<i>TEOR DE ÁGUA LIMITE PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO</i>	6
RESUMO	6
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	7
MATERIAL E MÉTODOS	10
RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
CONCLUSÕES.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO 2	24
<i>CINÉTICA DO CONGELAMENTO CRIOGÊNICO DE SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO</i>	24
RESUMO	24
ABSTRACT	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	35
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES.....	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

CAPÍTULO 3	50
<i>QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO DURAMENTE O ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURAS SUBZERO...</i>	50
RESUMO	50
ABSTRACT	50
INTRODUÇÃO	51
MATERIAL E MÉTODOS	55
RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72
CAPÍTULO 4	77
<i>POSSIBILIDADE DE DEGRADAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS DE RESERVA DURANTE A CRIOARMazenagem.....</i>	77
RESUMO	77
ABSTRACT	77
INTRODUÇÃO	78
MATERIAIS E MÉTODOS	82
RESULTADOS E DISCUSSÃO	82
CONCLUSÕES.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS	77
SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS	77
NOVIDADES/INOVAÇÕES PRESENTES NESTE TRABALHO	77

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 – Dessecador utilizado na secagem das sementes. 11
- FIGURA 2 – Recipiente hermético utilizado para umedecimento das sementes..... 12
- FIGURA 3 - Equações que representam a germinação em função do teor de água para a determinação do TULC. 18
- FIGURA 4- Equações que representam o vigor (IVG) em função do teor de água para a determinação do TULC. 19

CAPÍTULO 2

- FIGURA 5 - Influência do super-resfriamento inicial e da velocidade de resfriamento na nucleação e no crescimento dos cristais de gelo.....28
- FIGURA 6 – Curvas de congelamento de (a) água pura e (b) uma solução diluída de sacarose..... 31
- FIGURA 7 – Diagrama das fases de uma mistura binária (sacarose-água)33
- FIGURA 8 – Curva de congelamento de um alimento(carne), indicando a porcentagem de água não-congelada... 34
- FIGURA 9 - Evolução da temperatura durante o congelamento de alimento com resfriamento lento (a), rápido (b) e muito rápido (c).. 35
- FIGURA 10 - Dessecador utilizado na secagem das sementes de algodão.....36
- FIGURA 11 – Recipiente hermético para o processo de umedecimento das sementes de algodão.37
- FIGURA 12 - Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água ajustado para 7,5% b.u. 40
- FIGURA 13 - Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água ajustado para 9% b.u. 41
- FIGURA 14 - Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água inicial de 10% b.u. 42
- FIGURA 15 - Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água ajustado para 12% b.u. 43
- FIGURA 16- Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água ajustado para 12% b.u. 44
- FIGURA 17 – Variação na difusividade térmica de sementes de algodão da cultivar BRS 200 Marrom com a temperatura e o teor de água. 46
- FIGURA 18– Variação na difusividade térmica de sementes de algodão da cultivar BRS Verde com a temperatura e o teor de água. 47

CAPÍTULO 3

- FIGURA 19 – Sementes das duas cultivares de algodão utilizadas no experimento. (a) cv BRS 200 Marrom; (b) cv BRS Verde.....56
- FIGURA 20 – Cabina de secagem contendo sílica gel como dessecante (última bandeja). ... 57
- FIGURA 21 – Botijão criogênico, onde se pode ver na parte superior os canisters. 57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- TABELA 1 – Resumo da análise de variância da germinação e vigor (IVG) de sementes de algodão das variedades BRS Verde e BRS 200 Marrom para a determinação do teor de água limite para crioconservação (TULC).. 13
- TABELA 2 – Valores médios de germinação e vigor das sementes de algodão BRS Verde e BRS 200 Marrom, para a interação cultivar versus teor de água após 5 dias de crioconservação.. 14

CAPÍTULO 2

- TABELA 3 – Temperaturas em que se inicia o congelamento em diversos alimentos. 34

CAPÍTULO 3

- TABELA 4 – Síntese da análise de variância da germinação e vigor das sementes de algodão colorido das duas cultivares..... 60
- TABELA 5 –Valores médios da germinação e vigor das sementes de algodão das cultivares BRS 200 Marrom, para os fatores período de armazenamento, temperaturas de armazenamento e métodos de descongelamento. 62
- TABELA 6 –Valores médios da germinação e vigor das sementes de algodão das cultivares BRS Verde, para os fatores período de armazenamento, temperaturas de armazenamento e métodos de descongelamento. 63
- TABELA 7 – Valores médios do desdobramento da interação períodos de armazenamento versus temperaturas de armazenamento para a variável percentual de germinação das sementes das duas cultivares de algodão colorido..... 65
- TABELA 8 - Valores médios do desdobramento da interação períodos de armazenamento versus método de descongelamento para a variável percentual de germinação das sementes da cultivar BRS 200 Marrom de algodão colorido..... 67
- TABELA 9- Valores médios do desdobramento da interação temperaturas de armazenamento versus método de descongelamento para a variável percentual de germinação das sementes da cultivar BRS Verde de algodão colorido. 68
- TABELA 10 - Valores médios do desdobramento da interação períodos de armazenamento versus temperaturas de armazenamento, para a variável comprimento de hipocótilo das plântulas da cultivar BRS Verde de algodão colorido. 69
- TABELA 11 - Valores médios do desdobramento da interação períodos de armazenamento versus método de descongelamento para a variável comprimento de hipocótilo das plântulas das cultivares BRS 200 Marrom e BRS Verde de algodão colorido..... 70
- TABELA 12-Valores médios do desdobramento da interação temperaturas de armazenamento versus método de descongelamento para a variável comprimento de hipocótilo das plântulas das cultivares BRS 200 Marrom e BRS Verde de algodão colorido. 71

CAPÍTULO 4

TABELA 13 – Composição química das sementes de algodão colorido da cultivar BRS 200 Marrom crioconservadas por três períodos em três temperaturas e descongeladas por três métodos de descongelamento.....	83
TABELA 14 – Composição química das sementes de algodão colorido da cultivar BRS Verde crioconservadas por três períodos em três temperaturas e descongeladas por três métodos de descongelamento.....	85

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A criopreservação de sementes foi inicialmente concebida para a preservação de recursos genéticos de espécies agriculturalmente importantes para seleções, melhoramentos e manutenção de estoques para o futuro. O método de criopreservação consiste em submeter o material biológico desde sua temperatura fisiologicamente normal, até ultra baixas temperaturas (geralmente em nitrogênio líquido, a -196°C). O desenvolvimento de protocolos de criopreservação relativamente simples tem permitido que sementes de milhares de outras espécies possam ser armazenadas a um custo relativamente baixo, em um ambiente sem os problemas de envelhecimento, variações genéticas e perdas tão comuns em muitos sistemas de armazenagem de sementes tradicionais (Touchell & Dixon, 1994). Por outro lado, com o desenvolvimento da agricultura, os conhecimentos foram se expandindo tanto com relação às condições de armazenamento quanto às variações ambientais que influem na qualidade da semente armazenada. O agricultor começou também a dar maior importância à manutenção de sementes por períodos mais prolongados, já que em muitos casos era vantajoso conservá-las por dois ou mais anos, diminuindo assim as chances de perdas em anos de baixa produção.

A possibilidade da manutenção da viabilidade de sementes quando estas são armazenadas em condições controladas de temperatura e suprimento de oxigênio é enorme, porque há redução ou interrupção dos mecanismos à semente, sobretudo, produção de metabólitos essenciais, decomposição de macromoléculas e acúmulo de metabólitos tóxicos (Stanwood, 1985).

Técnicas de criopreservação têm sido utilizadas para sementes de inúmeras espécies herbáceas, arbustivas e arbóreas de região temperada. No entanto, para as espécies tropicais, é necessário estabelecer protocolos para que estas técnicas sejam adotadas rotineiramente (Salomão et al., 2002).

Planta da família das Malváceas, o algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) é conhecido desde a antiguidade. Alguns estudiosos apontam a Índia como berço da espécie, embora

tecidos de algodão tenham sido encontrados entre as populações indígenas, quando os europeus pisaram terras americanas pela primeira vez. Em sua carta, Pero Vaz de Caminha cita roupas confeccionadas “*com huum pano nom sey de que*”, com os quais as mães indígenas seguravam seus filhos ao colo. No Brasil, a exploração comercial começou pela capitania do Pará, no século XVIII, estendendo-se depois para o Nordeste (Bezerra, 2004).

Até meados do século passado, foi uma das principais culturas nordestinas. No entanto, uma série de fatores a fizeram refluir: ataques de pragas sucessivas, especialmente do bicudo, concorrência com o algodão norte-americano no mercado mundial e ineficiência no modelo de produção, baseado em colheita manual e cultivos familiares. Do Nordeste, a liderança na produção de algodão passou para São Paulo e Paraná, estados que investiram em novas técnicas de cultivo, seleção e melhoramento de cultivares, como também na produção e comercialização de sementes e, no final do século, para o Centro-Oeste do país, principal região produtora atualmente. Agora aos poucos, sobretudo pela ação da Embrapa, o algodoeiro também vai abrindo capulhos no Nordeste, voltando, modernizado às origens (Bezerra, 2004).

A ação da Embrapa deve-se, sobretudo ao lançamento de novas cultivares de algodão de fibra de cor natural, como o caso do marrom, sucesso no Brasil e no exterior. A Embrapa lançou várias cultivares de algodão de fibra colorida, como a BRS 200 Marrom e a BRS Verde, alvos deste trabalho. Estas cultivares são recomendadas, segundo a empresa, para trabalho em áreas de agricultura familiar. A cultivar BRS 200 Marrom é perene, de ciclo econômico de três anos. Deve ser plantada nas áreas do Nordeste zoneadas pelo Ministério da Agricultura para o algodão perene, distanciadas de pelo menos 5 km das áreas plantadas com algodão de fibra de cor branca, para evitar cruzamentos naturais. Já a cultivar BRS Verde é de ciclo anual, recomendada, preferencialmente para a região Nordeste. Para ser cultivado em outras regiões, de acordo com a empresa, alguns cuidados devem ser tomados, no que se refere às doenças, devendo-se escolher áreas livres de patógenos, como também a realização de tratamentos fitossanitários. Deve-se manter uma distância de 1000 m entre os campos de algodão BRS Verde e campos de algodão branco, evitando-se contaminações devido a cruzamentos naturais (Embrapa Algodão, 2002).

Pretendeu-se com este trabalho, estudar a criopreservação das sementes de duas cultivares de algodão colorido: BRS Verde e BRS 200 Marrom. Desta forma, o estudo foi dividido em cinco partes, buscando-se abranger todas as etapas para o estabelecimento de um protocolo de armazenamento a longo prazo em temperaturas subzero.

Assim, o primeiro capítulo trata da determinação do teor de água limite, condição primeira para o sucesso de um protocolo de criopreservação, já que a adequação do grau de água das sementes é determinante para a qualidade da conservação. Uma pequena alteração do teor de água das sementes pode ocasionar grandes mudanças na sua longevidade. Para a conservação a longo prazo de sementes ortodoxas recomenda-se que estas sejam dessecadas até graus de água muito baixos, geralmente entre 3 e 7% (HANSON, 1985).

No segundo capítulo, busca-se conhecer a cinética de congelamento criogênico das sementes de algodão em diferentes temperaturas e teores de água, com vistas a identificar gradientes de temperatura externos e internos, que podem vir a provocar estresse e diminuições de germinação e vigor, prejudicando, por conseguinte, o emprego de técnicas de criopreservação (Farias et al., 2003).

O terceiro capítulo trata da criopreservação propriamente dita, ou seja, do armazenamento das sementes a longo prazo em temperaturas subzero, avaliando a viabilidade e o vigor no decorrer dos doze meses em que se realizou o armazenamento.

O quarto capítulo trata de um aspecto pouco explorado quando se fala de criopreservação: a possível degradação de substâncias químicas essenciais ao processo de germinação. e posterior estabelecimento das plantas resultantes. Analisa-se o comportamento de proteínas, gorduras, carboidratos e fração mineral ao longo do armazenamento criogênico em três momentos distintos: aos 60, 180 e 360 dias após a instalação do experimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BELTRÃO, N.E.de M; CARVALHO, L.P de; **Algodão Colorido no Brasil, e em Particular no Nordeste e no Estado da Paraíba**. Campina Grande: Embrapa Algodão. Documentos, n. 128, Campina Grande, 2004. 17p.

FARIAS, D.C. de; CAVALVCANTI MATA, M.E.R.M.; BRAGA, M.E.D.; TORRES, H.L.H. Curvas de congelamento criogênico de sementes de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA, 23, Goiânia, 2003. **Anais...** Campinas: Sociedade Brasileira de Engenharia Agrícola, 2003. CD-ROM.

HANSON, J. **Procedures for handling seeds in seedbanks**. Rome: IPGRI, 1985. 115p.

SALOMÃO, A.N.; SANTOS, I.R.I.; MUNDIM, R.C. Estabelecimento de método para congelamento e descongelamento de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr (Caesalpinaceae). **Circular Técnica – Embrapa**, Brasília, nov. 2002, 3p.

STANWOOD, P.C. Cryopreservation of seed germplasm for genetic conservation. In: KARTHA, K.K. (Ed.) **Cryopreservation of plant cells and organs**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1985, p. 199-226.

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

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

TEOR DE ÁGUA LIMITE PARA CRIOCONSERVAÇÃO DE SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO.

RESUMO

O armazenamento em nitrogênio líquido é uma técnica muito promissora para a conservação a longo prazo de recursos genéticos e suas vantagens (baixa manutenção, interrupção de envelhecimento etc) têm motivado o desenvolvimento de protocolos de criopreservação para sementes de muitas espécies economicamente importantes. O teor de água da semente é provavelmente o fator mais crítico para o sucesso de um protocolo de criopreservação. Assim, o objetivo do presente estudo foi o de determinar o teor de água limite para criopreservação (TALC) de sementes de algodão das cultivares BRS Verde e BRS 200 Marrom. Para essa determinação as sementes com teor de água de 6, 8, 10,12 e 14% base úmida foram criopreservadas a -196°C e no vapor de nitrogênio (-170°C) por um período de 5 dias e submetidas, após descongelamento a temperatura ambiente por 3 horas, aos testes de germinação e vigor. Concluiu-se que o teor de água limite para criopreservação das sementes de algodão das cultivar BRS Verde situa-se entre 6 a 8%, e da cultivar BRS 200 Marrom é de 8%.

PALAVRAS-CHAVE: nitrogênio líquido, armazenagem, viabilidade, vigor.

HIGH MOISTURE FREEZING LIMIT TO CRYOPRESERVATION OF COTTON COLORED SEEDS.

ABSTRACT

Liquid nitrogen storage is a very promising technique for long-term conservation of germplasm, and its advantages (e.g low maintenance costs, suspension of aging) have motivated the development of cryopreservation protocols for seeds of many economically important species. The seed moisture content is probably the most critical factor in the definition of a successful cryopreservation protocol. Thus, the objective of this study was to determine the high moisture freezing limit (HMFL) of cotton seeds to cultivates BRS Green and BRS 200 Brown. For this determination, the cotton seeds that had moisture content of 6, 8, 10, 12 e 14% wet base were cryoconserved to -196°C and in vapor of nitrogen (-170°C) for a period of 5 days, and submitted, after thawing to room temperature for 3 hours, to the germination tests and vigor. It was concluded that the HMFL of cotton seeds from cultivate BRS Green locates among 6 to 8%, and of cultivating BRS 200 Brown it is of 8%.

KEYWORDS: liquid nitrogen, storage, viability, vigor.

INTRODUÇÃO

Desde o aparecimento da agricultura, o homem preocupa-se em assegurar a disponibilidade de sementes para o próximo plantio. Além dos problemas de proteção contra roedores, pássaros, insetos e microrganismos, a conservação de sementes é também afetada por outros fatores que podem causar a perda completa do seu valor para plantio (POPINIGIS, 1996). O teor elevado de água é, em geral, a principal causa que concorre para a perda do poder germinativo e do vigor das sementes. Por esse motivo tornam-se necessários conhecimentos sobre os problemas causados pelo excesso de água nas sementes e como controlá-los ou eliminá-los (TOLEDO e MARCOS FILHO, 1977).

No entanto, é possível manter ou prolongar a viabilidade das sementes quando armazenadas em condições controladas de temperatura e suprimento de oxigênio. Isto ocorre porque há redução ou interrupção dos mecanismos deletérios à semente, sobretudo, produção de metabólitos essenciais, decomposição de macromoléculas e acúmulo de metabólitos tóxicos (STANWOOD, 1985). Roberts (1973) salienta ainda que a baixos conteúdos de água há uma visível redução na formação de cristais de gelo nas estruturas intracelulares da semente, quando estas são expostas às temperaturas subzero, atenuando possíveis danos decorrentes do congelamento.

A técnica de crioconservação, isto é, o armazenamento em nitrogênio líquido a -196°C , ou em sua fase de vapor ao redor de -170°C , proporcionam o potencial para uma preservação sem limites de tempo, com a redução do metabolismo a níveis tão baixos que todos os processos bioquímicos são significativamente reduzidos e a deterioração é virtualmente paralisada. Os métodos tradicionais de conservação apenas adiam a deterioração por um período de tempo determinado e específico de acordo com o material e a espécie em questão (CUNHA, 1996).

O estabelecimento de métodos (os chamados “protocolos”) para crioconservação de sementes está condicionado ao conhecimento de suas propriedades físicas e químicas e da

determinação do conteúdo de água ideal, bem como das taxas apropriadas de congelamento e descongelamento (STANWOOD e ROSS, 1979).

A utilização do nitrogênio líquido como um meio de armazenamento pressupõe que as sementes sobrevivam à exposição sem sofrer danos maiores à sua viabilidade, e para isso, o teor de água da semente é, provavelmente, o mais crítico fator para o sucesso da crioconservação, pois se o conteúdo de água da semente for muito alto, observa-se a sua morte instantânea durante o processo de congelamento e/ou descongelamento (OSPINA *et al.*, 2000; CUNHA, 1996).

Observa Stanwood (1980), que se a semente atingir níveis de água entre 4 e 6%, o sucesso as crioconservação estará garantido, pois as sementes com grau de água elevado quando submetidas a temperaturas abaixo de zero apresentam expansão de seus tecidos devido ao congelamento da água e posterior ruptura levando-as à morte. Medeiros *et al.* (1992), citando diversos autores, expõem que as injúrias causadas às células por ocasião do congelamento rápido possam ser devidas à formação de cristais de gelo no espaço confinado intracelular, que conduz à ruptura mecânica tanto da estrutura citoplasmática quanto da membrana plasmática, resultando na degradação celular.

Engelmann e Engels (2002), ressaltam que o teor de água recomendado para um bem sucedido armazenamento a longo prazo a temperaturas de -18°C ou menor, situa-se entre 3-7% dependendo da espécie. Os autores relatam ainda que, nos anos 80, várias pesquisas foram iniciadas para investigar os efeitos de teores de água muito baixos na longevidade das sementes, baseado na suposição que uma redução maior no teor de água poderia trazer um efeito benéfico na longevidade da semente. Contudo, ficou demonstrado que a secagem de sementes além de um teor crítico não provém nenhum benefício adicional para a longevidade, podendo, pelo contrário, acelerar as taxas de envelhecimento da semente.

Dessa maneira, convencionou-se adotar um limite máximo de água para o congelamento (High Moisture Freezing Limit-HMFL ou Teor de Água Limite para a

Crioconservação-TALC), acima do qual a viabilidade de uma amostra de sementes é reduzida durante o congelamento (STANWOOD, 1985). Este limite crítico é, segundo o autor, normalmente uma faixa relativamente estreita de teor de água dentro da espécie, mas pode variar entre espécies. Em geral, de acordo com Touchell e Dixon (1994), um aumento no conteúdo de água da semente resulta em um declínio na sobrevivência da semente após o armazenamento em nitrogênio líquido. Ainda segundo os autores, para sobreviver ao armazenamento em nitrogênio líquido, o TALC deve ser obtido, embora isto não possa ser possível para aquelas espécies onde a viabilidade declina quando a semente é submetida ao processo de secagem (p.ex. sementes recalcitrantes). Para estas espécies, métodos de congelamento alternativos (como p. ex. congelamento de embriões) deva ser considerado, sugerem os autores.

O problema é que as melhores condições de armazenagem para sementes, de acordo Vertucci *et al.*,(1994), são, até agora e de forma geral, desconhecidas. Experimentos iniciados em meados dos anos 60 mostram que temperatura e conteúdo de água são importantes, mas a exata relação entre essas variáveis não foi elucidada, ressaltam os autores. As equações de viabilidade, desenvolvidas predominantemente para os experimentos de armazenagem sob condições de altas temperaturas ($> 50^{\circ}\text{C}$), ou de alta umidade, eram usadas para estimar a deterioração sob as melhores condições. Estas equações foram idealizadas segundo duas hipóteses: (1) que a longevidade aumenta tal quanto às sementes são progressivamente secas, e (2) que a temperatura e o conteúdo de água comportam-se independentemente. Testes realizados com o intuito de provar a assertiva da primeira hipótese chegaram à conclusão, que secar as sementes além de um conteúdo crítico de água não provém nenhum benefício adicional para a longevidade e que provém na verdade, um aumento nas taxas de envelhecimento. O teor de água crítico ou ótimo varia entre espécies se for expresso como conteúdo de água; contudo, os diferentes conteúdos de água são alcançados expondo as sementes a uma umidade relativa constante até o equilíbrio.

Assim, o objetivo do presente estudo foi o de determinar o teor de água limite para a criopreservação de sementes de algodão colorido, das variedades BRS Verde e BRS 200 Marrom.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Utilizaram-se sementes deslintadas das cultivares BRS Verde e BRS 200 Marrom, obtidas junto a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, Unidade Algodão, localizada em Campina Grande. As sementes cedidas foram da safra 2004.

Após 5 dias imersas no nitrogênio líquido à -196°C, como também no vapor de nitrogênio à -170°C, as sementes das variedades estudadas, com teores de água de 6, 8, 10, 12 e 14%, foram submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente ($\pm 25^\circ\text{C}$ e 85% UR), por período de 3 horas.

Para a obtenção dos teores de água relacionados anteriormente, procedeu-se primeiramente, a determinação da umidade inicial das sementes, por meio do método gravimétrico (BRASIL, 1992), com a utilização de estufa a 105°C, que se baseia no processo da água extraída das sementes durante a sua permanência na estufa por 24 h, calculando-se os resultados mediante a seguinte equação:

$$\% X = \frac{P_i - P_f}{P_i - t} \times 100$$

em que:

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

P_i - peso inicial da subamostra, g

P_f - peso final da subamostra, g

t - tara do recipiente, g

Para a caracterização do material quanto ao teor de água, os lotes das sementes foram submetidos aos processos de hidratação ou secagem, até alcançarem os teores de água estabelecidos para a instalação dos diferentes ensaios de determinação do TULC (6, 8, 10, 12 e 14%, b.u). A perda ou ganho de água pelas sementes, foi determinado por meio da seguinte fórmula:

$$Pf = Pi \frac{100 - Xi}{100 - Xf}$$

em que:

Pf - peso final da amostra, g

Pi - peso inicial da amostra, g

Xi - umidade inicial das sementes (b.u), %

Xf - umidade desejada das sementes (b.u), %

Para a secagem, as amostras foram colocadas em um secador (cabina de secagem), ou um dessecador de vidro (Figura 1), que continha como agente dessecante, sílica gel amorfa, sendo pesadas rotineiramente, até que atingissem os pesos referentes aos teores de água desejados; para este fim foi utilizada uma balança eletrônica semi-analítica, com precisão de 0,001g.

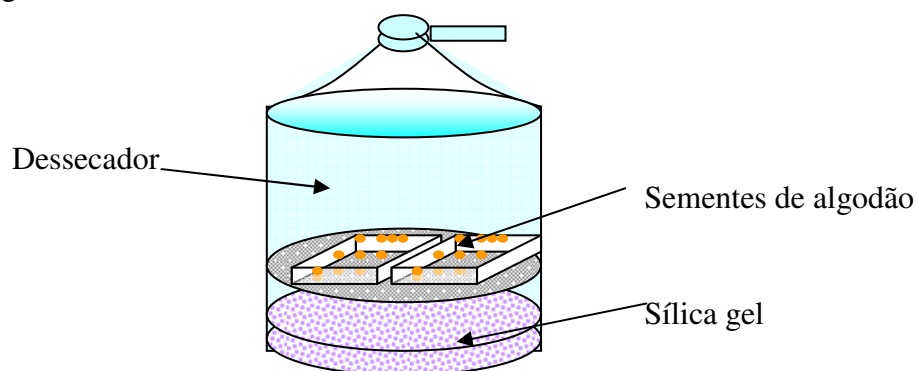


FIGURA 1 – Dessecador utilizado na secagem das sementes.

Para a operação do aumento do teor de água, as sementes foram colocadas em pequenas cestas de arame, suspensas por um anel de PVC, no interior de recipientes de vidro, hermeticamente fechados, contendo água destilada (Figura 2); posteriormente, os

recipientes foram colocados em uma câmara tipo BOD regulada para 10°C. As operações de pesagem obedeceram aos mesmos critérios empregados para a operação de secagem das sementes.

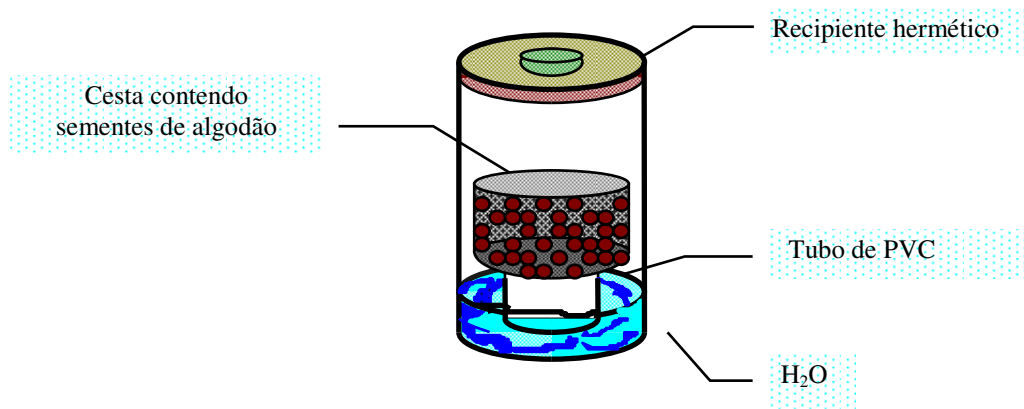


FIGURA 2 – Recipiente hermético utilizado para umedecimento das sementes.

Em seguida foram feitos os testes de germinação de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992), e vigor (IVG), segundo Maguire (1962), considerando-se germinadas as sementes que emitiram ao menos 30 mm de radícula no 4^o e 12^o dias depois da sementeira.

Após a realização dos testes, avaliou-se em que teor de água se obtiveram os melhores valores de germinação e vigor, determinando-se assim o teor de água que as sementes poderiam ser crioconservadas, ou seja, o Teor de Água Limite para a Crioconservação (TALC).

O delineamento estatístico utilizado foi o inteiramente ao acaso em um arranjo fatorial 2x2x5 (2 cultivares x 2 temperaturas x 5 teores de águas), com quatro repetições de vinte e cinco sementes cada uma. Os dados obtidos destas variáveis foram submetidos à análise de variância, pelo programa computacional ASSISTAT, versão 6.6 (SILVA, 1996) e as médias dos fatores qualitativos comparadas pelo teste de Tukey, a 1% de probabilidade.

Para a identificação do comportamento da variação da germinação e do vigor das sementes das duas cultivares de algodão utilizadas, realizou-se um estudo de regressão polinomial, determinando-se os coeficientes através da utilização de programa computacional.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teor de água inicial das sementes das duas cultivares utilizadas no estudo, foi de 10,7% b.u., para as sementes da cultivar BRS Verde, e de 10,9% b.u., para aquelas da cultivar BRS 200 Marrom. As sementes apresentaram uma germinação média inicial de 59% para a cultivar BRS Verde, e de 77,5% para a cultivar BRS 200 Marrom.

Na Tabela 1, encontra-se o resumo da análise de variância, que detectou efeitos significativos para as variáveis cultivar e teor de água, assim como para a interação dupla cultivar x teor de água na germinação e no IVG, provenientes de sementes crioconservadas em cinco distintos teores de água (b.u.).

TABELA 1 – Resumo da análise de variância da germinação e vigor (IVG) de sementes de algodão das variedades BRS Verde e BRS 200 Marrom para a determinação do teor de água limite para crioconservação (TALC). Areia,(PB)-2005.

Fonte de variação	G.L.	Quadrados médios	
		Germinação	Vigor (IVG)
Cultivar (C)	1	1.312,2**	0,8883**
Temperatura (T)	1	33,80 ns	0,0256 ns
Teor de Água (TU)	4	6.016,92**	13,7235**
C x T	1	28,80 ns	0,0041 ns
C x TA	4	323,32**	2,1583**
T x TA	4	21,42 ns	0,069 ns
C x T x TA	4	42,42*	0,1802**
Resíduo	60	13,33	0,0353**
CV (%)	-	5,80	8,17

** = significativo ao nível de 1% de probabilidade; * = significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns = não significativo.

Na Tabela 2, as sementes da variedade BRS Verde com teor de água entre 6 e 8%, foram as que tiveram os maiores percentuais de germinação e vigor não diferindo entre si, em nível de 1% de probabilidade pelo teste de Tukey. Observa-se no entanto, que para a

variedade BRS 200 Marrom o melhor percentual de germinação e vigor são obtidos nas sementes com um teor de água de 8%.

TABELA 2 – Valores médios de germinação e vigor das sementes de algodão BRS Verde e BRS 200 Marrom, para a interação cultivar versus teor de água após 5 dias de crioconservação à temperatura de -196°C. Areia, (PB)-2005.

Teor de água (%bu)	Germinação (%)		Vigor (IVG)	
	BRS Verde	BRS 200 Marrom	BRS Verde	BRS 200 Marrom
6	76,0 aA	79,5 aB	2,90 bA	3,53 aB
8	78,5 bA	93,5 aA	2,90 bA	3,86 aA
10	53,2 bB	72,2 aC	1,25 bD	1,64 aC
12	44,5 bC	50,7 aD	1,57 aC	1,61 aC
14	42,0 aC	38,5 aE	2,34 aB	1,38 bC

Diferença média significativa, para germinação (DMS) colunas = 6,29; DMS linhas = 4,47; Diferença média significativa, para vigor (DMS) colunas = 0,2643; DMS linhas = 0,1880; Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 1% de probabilidade.

Tal comportamento indica que esses teores de água são os mais indicados para a crioconservação das sementes de algodão colorido da cultivar BRS-Verde, visto que neste intervalo as médias dos fatores utilizados para se determinar o TALC, não diferiram do ponto de vista da estatística.

Médias inferiores a estas foram oriundas de teores de água mais altos, devido provavelmente às concentrações de água presente se encontrarem em valores onde a viabilidade e o vigor da semente são reduzidos durante o congelamento (STANWOOD, 1985; 1987). Este mesmo autor apresentou valores de teor de água críticos para congelamento de sementes de diversas espécies, dentre elas feijão, alho, gergelim entre outras, onde salienta a queda drástica do percentual de germinação quando da utilização de teores de água acima do nível crítico. Utilizando o mesmo método Almeida *et al.* (2002), determinando o TALC para sementes de mamona de duas variedades, chegaram à faixa de 6 a 10% de teor de água, como os valores mais apropriados para as duas variedades consideradas no estudo.

Na literatura, existem diversos trabalhos com diferentes produtos onde se observa que é necessário identificar o teor de água limite para crioconservação de sementes. Este

fato foi constatado por Roos e Stanwood (1981) que chegaram à conclusão de que a semente de alface sofria dano em sua qualidade fisiológica, quando eram criopreservadas com teores de água acima de 18% base úmida. De acordo com Stanwood (1987), igual ocorrência, também se verifica com a criopreservação de *Sesamum indicum* para teores de água acima de 12% b.u. O mesmo autor salientou que para uma taxa de congelamento de $200^{\circ}\text{C min}^{-1}$, ocorrem graves danos nas sementes de *Sesamum* com teores de água inferiores a 6% b.u., levando a conclusão que a taxa de resfriamento pode interagir com o teor de água das sementes, afetando sua sobrevivência.

Chandel *et al.*, (1995), criopreservando sementes recalcitrantes de chá (*Camellia sinensis* L. Kuntze) e jaca (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) notaram que o melhor teor de água para a criopreservação seria de 14% e que, acima desse valor, as sementes perdem sua capacidade germinativa.

Touchell e Dixon (1994) alertam que, em geral, um incremento no teor de água da semente resulta em um declínio na viabilidade e no vigor após a imersão em nitrogênio líquido ou à exposição ao vapor de nitrogênio. Para justificar tal afirmativa, os autores, trabalharam com várias espécies da flora australiana, entre estas, *Loxocarya gigas*, que apresentando um teor de água de aproximadamente 12%, após a imersão em nitrogênio líquido, não houve germinação de nenhuma semente. Já para sementes de *Jacksonia floribunda*, que com um teor de água em torno de 7,5%, observou-se uma alta germinação, chegando a mais de 85%. Os autores constataram assim uma tendência geral entre o declínio do teor de água das sementes e uma sobrevivência crescente, em termos de germinação.

Wetzel *et al.* (2003), estudando diversas espécies nativas do Cerrado brasileiro, observaram que sementes da espécie *Qualea parviflora* Mart Warm., embora contendo, inicialmente, teor de água das sementes que pode ser considerado elevado (25,17%), após a secagem até um teor de 8,46%, a exposição à temperatura de -196°C não afetou a sua alta germinação, podendo ser conservada dessa forma e a exemplo do presente trabalho, em criotânques. Já as sementes da espécie *Tabebuia umbellata* (Sond.) Sandw., apresentaram

um aumento de germinação com a diminuição do teor de água, comportamento também auferido no presente estudo.

Embora concorde com a maioria dos autores, acerca da influência do teor de água limite para a criopreservação, Almeida *et al.*, (2000), salientam também que a perda de viabilidade observada em determinadas espécies expostas a criopreservação, pode ser resultante de danos físicos sofridos pelas sementes durante a criopreservação. Os autores orientam, dessa maneira, a utilizar-se de diferentes velocidades de congelamento e descongelamento.

Ospina *et al.*, (2000), trabalhando com duas espécies do gênero *Passiflora*, chegaram a valores diferentes para o TULC de cada uma das espécies, que variou de 11% em *P. edulis*, e em torno de 9% para *P. ligularis*. Os autores salientam que esta diferença realça uma sensibilidade às condições de secagem; enquanto *P. ligularis* se apresenta mais sensível a secagem, *P. edulis*, suporta um nível mais forte de dessecação. Esta diferenciação, em sementes de uma mesma espécie, se apresenta como uma das mais marcantes características para o estabelecimento dos protocolos de criopreservação, ou seja, a especificidade dos fatores de cada protocolo em particular, ou como relata Dickie e Smith (1995), tais fatores são espécie-específicos e requerem estudos e avaliações para cada espécie.

Nas Figuras 3 e 4, encontram-se as equações que representam as variações do comportamento da viabilidade e do vigor, para os diferentes tratamentos empregados na determinação do TALC das sementes de algodão, cultivares BRS Verde e BRS 200 Marrom.

Na Figura 3 pode-se observar que o comportamento germinativo de ambas as cultivares foram muito parecidos nas duas temperaturas utilizadas para a determinação do TALC, evidenciando mais uma vez que o fator temperatura não influenciou no processo de germinação das sementes.

Embora tenham expressado comportamentos praticamente idênticos, tanto no que se refere à germinação, como no vigor, as curvas ajustadas dos dados obtidos para estas duas variáveis, não apresentaram coeficientes de determinação (R^2) apropriados, que segundo Ribeiro Júnior (2001), quanto mais próximos da unidade, melhor representariam a qualidade do ajuste do modelo aos pontos de dispersão, ou seja, menor seria a influência atribuída às causas aleatórias.

Assim, em ambas as temperaturas, os teores de água utilizados não explicariam a contento, e isoladamente, o incremento ou não dos valores obtidos de germinação e vigor, e apesar da variável temperatura não ser fator de influência, destaca-se dessa maneira o que foi exposto por Vertucci *et al.*, (1994), de que o TALC não pode ser considerado independentemente da temperatura.

Outro fator que não pode ser desconsiderado nesta análise refere-se às diferenças inerentes entre as duas cultivares, explicitadas pelo comportamento das curvas de ajuste de dados utilizadas na determinação do TALC. Pode-se observar nas Figuras 3 e 4, comportamentos simétricos das curvas, independentemente de tratar-se de germinação ou vigor.

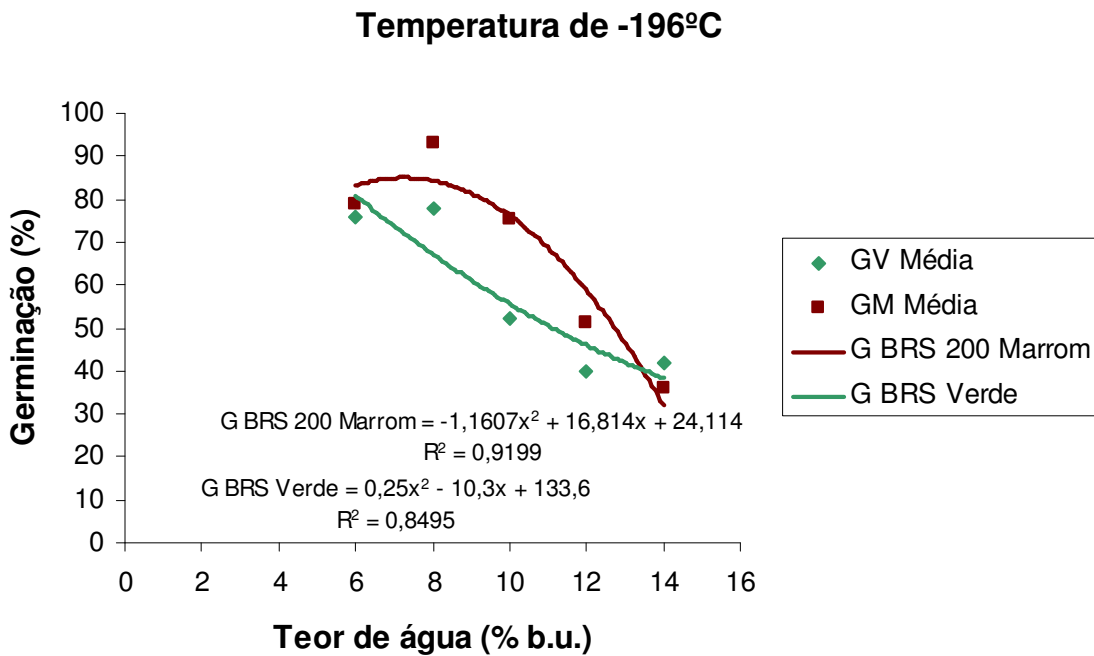
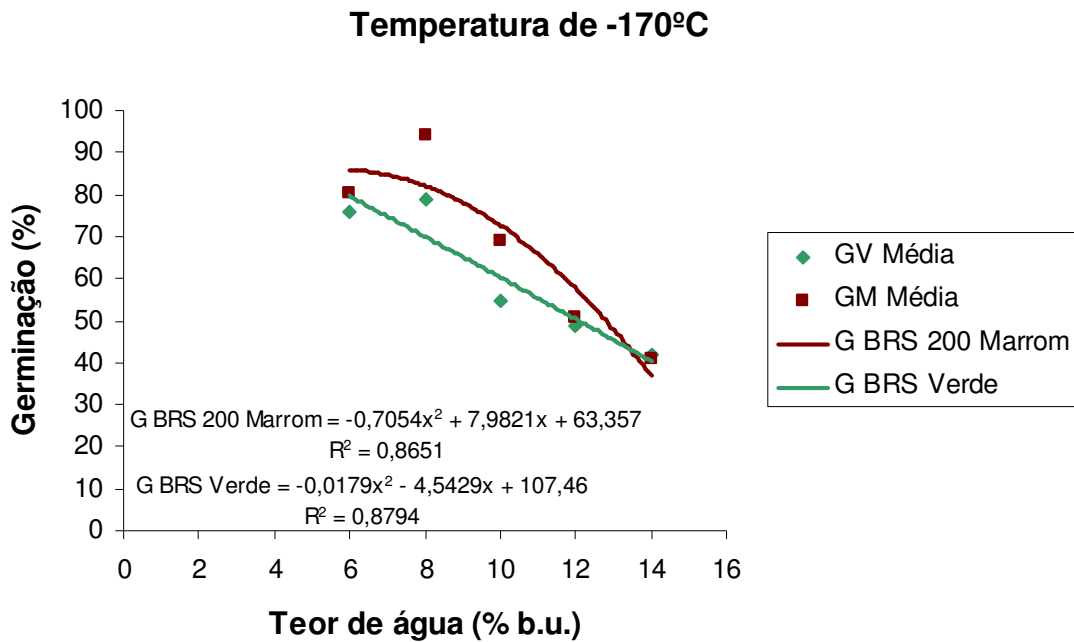


FIGURA 3 - Equações que representam a germinação em função do teor de água para a determinação do TALC.

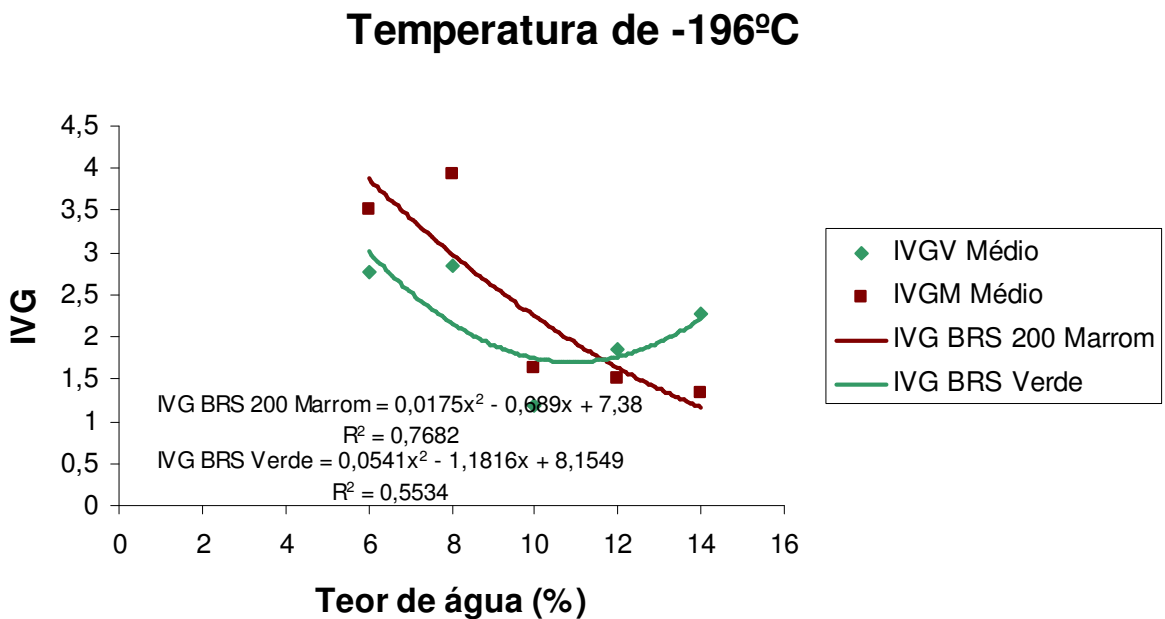
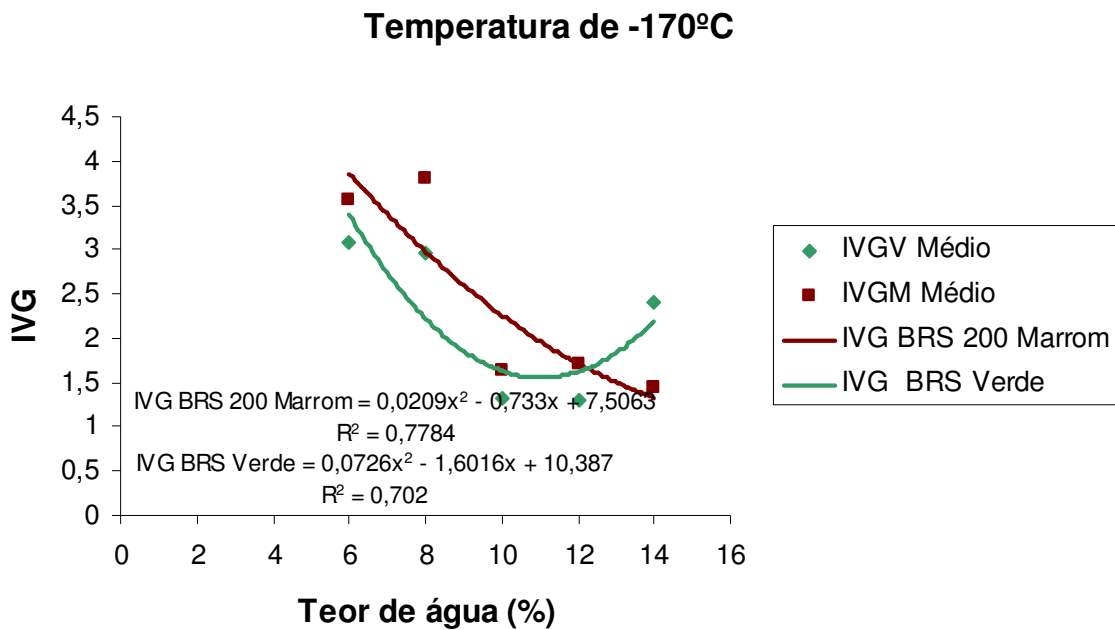


FIGURA 4– Equações que representam o vigor (IVG) em função do teor de água para a determinação do TALC.

CONCLUSÕES

- O Teor de Água Limite para a Crioconservação (TALC) das sementes de algodão das cultivares BRS Verde situa-se entre 6-8% base úmida e da cultivar BRS 200 Marrom é de 8% base úmida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

DICKIE, J.B.; SMITH, R.D. Observations on the survival of seeds of *Agathis* spp stored at low moisture contents and temperatures. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.5, p.5-14, 1995.

ENGELMANN, F.; ENGELS, J.M.M. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In: ENGELS, J.M.M.; RAO, V.R.; BROWN, A.H.D.; JACKSON, M.T. (Eds.) **Managing plant genetic diversity**, Cap. 9, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 89-103, 2002.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, Madison, Wisconsin, v. 2, n.1, p. 176-187, 1962.

MEDEIROS, A.C. de S.; CZARNESKI, C.M.; FREITAS, G.F. de. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (FR. ALL.) Engl.). In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2, São Paulo, 1992. **Resumos**. São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente/Instituto Florestal, 1992. p.544-547.

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

POPINIGIS, F. Fatores que afetam a qualidade das sementes. In: PUIGNAU, J.P. (ed.) **Conservación de germoplasma vegetal**. Montevideo: IICA, 1996. p. 99-104. IICA-PROCISUR, Dialogo, 45.

RIBEIRO JÚNIOR, J.I. **Análises estatísticas no SAEG**. Viçosa: UFV, 301p., 2001.

ROBERTS, E.H. Lost of viability: ultrastructural and physiological aspects. **Seed Science and Technology**, Zurich, v.1, p. 539-545, 1973

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

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

STANWOOD, P.C.; ROSS, E.E. Seed storage of several horticultural species in liquid nitrogen (-196°C). **HortScience**, Alexandria, Virginia, v.14, p. 628-530, 1979.

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

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

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

TOLEDO, F.F. de; MARCOS FILHO, J. Secagem de sementes. In: TOLEDO, F.F. de; MARCOS FILHO, J. **Manual das sementes: Tecnologia da produção**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1977, p.123-144.

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

VERTUCCI, C.W.; ROSS, E.E.; CRANE, J. Theoretical basis of protocols for seed storage III. Optimum moisture contents for pea seeds stored at different temperatures. **Annals of Botany**, London, v. 74, p. 531-540, 1994.

WETZEL, M.M.V.S; REIS, R.B.; RAMOS, K.M. Metodologia para crioconservação de sementes de espécies florestais nativas. **Circular Técnica**, Brasília, n.26, p. 1-5, set. 2003.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

CINÉTICA DO CONGELAMENTO CRIOGÊNICO DE SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO.

RESUMO

No processo de congelamento, um produto passa por vários estágios com o decorrer do tempo atingindo diferentes regiões deste, sendo que a maior velocidade de congelamento é obtida na superfície e é mais lenta próxima ao seu centro. Esta velocidade é dependente de vários fatores, tais como, método de congelamento, tamanho do produto, composição química, teor de água entre outros. O processo de congelamento gera uma curva típica que apresenta três etapas distintas: resfriamento, congelamento e pós-congelamento. Em produtos com teores de água reduzidos estas etapas não se verificam, e a curva tem semelhança com a curva típica do resfriamento. Pesquisou-se neste trabalho o comportamento das curvas de congelamento de sementes de algodão de duas cultivares (BRS 200 Marrom e BRS Verde) com diferentes teores de água (7,5, 9, 12, e 13,5% b.u.) e em diferentes temperaturas (-25, -45, -170 e -196°C). As curvas obtidas, principalmente nas temperaturas de -25, -45 e -170°C, apesar da maior similaridade com as curvas de resfriamento, apresentam, ainda que de forma discreta, as três fases características da curva de congelamento da água pura. Com relação à difusividade térmica efetiva, concluiu-se que esta aumenta com o aumento do teor de água, e não apresenta um comportamento simétrico com a oscilação da temperatura.

PALAVRAS-CHAVE: congelamento, resfriamento, difusividade térmica

KINETIC OF THE CRYOGENIC FREEZING OF COLORED COTTON SEEDS.

ABSTRACT

In the freezing process, a product goes by several stages with elapsing of the time reaching different areas, and the largest freezing speed is obtained in the surface and it is slower close to his center. This speed is dependent of several factors, such as, freezing method, size of the product, chemical composition, moisture content among others. The freezing process generates a typical curve that it presents three different stages: cooling, freezing and after-freezing. In products with moisture contents reduced these stages are not verified, and the curve has similarity with the typical curve of the cooling. It was investigated in this work the behavior of the curves of freezing of seeds of cotton of two cultivate (BRS 200 Brown and BRS Green) with different moisture contents (7,5, 9, 12, e 13,5% w. b.) and in different temperatures (-25, -45, -170 and -196°C). It was verified that the curves of freezing of these seeds mainly in the temperatures of -25, -45 and -170oC, in spite of the largest similarity with the cooling curves, they present, although in discrete way, the three characteristic phases of the curve of freezing of the pure water. Regarding the effective thermal diffusivity, it was ended that this increases with the increase of the humidity tenor, and it doesn't present a symmetrical behavior with the oscillation of the temperature.

KEYWORDS: freezing, cooling, thermal diffusivity.

INTRODUÇÃO

A forma fundamental da atividade da matéria, para qual todas as formas de atividade que são conhecidas no mundo estão relacionadas, é o movimento das partículas constituintes da matéria, moléculas, ou átomos, que estão continuamente em um estado de agitação, cada qual vibrando sobre suas posições de equilíbrio ou chocando-se umas com as outras. Este movimento constante determina o quão um corpo ou material biológico está em uma determinada temperatura (INCROPERA e DE WITT, 1992).

Desse modo o método geralmente usado para aumentar ou diminuir a temperatura de um corpo é colocá-lo em contato com outro que está aquecido ou frio, para que o rápido movimento das moléculas do corpo quente, ou frio, possa acelerar o choque direto e constante das moléculas mais lentas do corpo adjacente, e pela sua inércia abaixar a taxa de movimento das moléculas mais rápidas, resfriando-o ou aquecendo-o. Esta interação pode ser concebida como uma transferência de um pouco de energia (calor) de um corpo para o outro (INCROPERA e DE WITT, 1992; POTTER, 1978).

Quando a temperatura de um corpo, por exemplo água, é elevada ou abaixada gradualmente, a elevação ou diminuição na taxa de movimento molecular pode ser descontínua. Em geral há duas interrupções importantes na continuidade, uma no ponto de congelamento, e a outra no ponto de ebulição. As duas interrupções são chamadas de pontos de transição entre os três estados da matéria (INCROPERA e DE WITT, 1992).

Os três estados da matéria, sólido, líquido e gasoso, são caracterizados principalmente por taxas muito diferentes de mobilidade molecular e o grau de ordem no arranjo das moléculas. No estado de gás as moléculas em agitação incessante estão caoticamente distribuídas no espaço; no estado sólido (cristalino) elas são organizadas regularmente em posições relativamente fixas, e no estado líquido as moléculas são compreendidas por ter uma ordenação em uma faixa estreita, isto é, as moléculas estão

associadas em grupos que são fortuitamente organizados (INCROPERA e DE WITT, 1992; POTTER, 1978).

Por outro lado, quando se resfria um produto sólido, o frio vai progredindo através dele pela retirada do calor. Há formação de um gradiente térmico em direção ao centro geométrico da peça, onde a porção mais fria é a superficial e a mais quente é a interna. É interessante esclarecer que o centro geométrico será a porção do produto mais distante da periferia, o ponto quente (BARUFFALDI e OLIVEIRA, 1998).

Deve-se, entretanto, ter em mente que, na realidade, não se tem um produto agrícola sólido, pois em todos eles encontra-se sempre uma quantidade de água na forma líquida. É correto, no entanto, admitir-se que em todos aqueles de baixa umidade ou então de textura sólida haverá uma predominância da transmissão de calor por condução (BARUFFALDI e OLIVEIRA, 1998).

Neves Filho (1991), salienta que, quando as funções vitais de animais ou vegetais são interrompidas, tem início uma série de transformações que adquirem características de fenômenos de decomposição. Tais processos sucedem-se rapidamente à temperatura ambiente, com a conseqüente inutilização do produto.

À medida que se provoca o abaixamento da temperatura, retardam-se consideravelmente estes fenômenos promovidos pela ação de agentes deteriorantes como microrganismos, enzimas e reações químicas. Assim, ainda segundo o mesmo autor, um maior tempo de preservação do produto é obtido quando são utilizadas baixas temperaturas. Como é de se esperar, o estado de conservação da matéria-prima, manuseio e o método de resfriamento ou congelamento adotado irão influenciar na qualidade do produto final. Gruda e Postolski (1996), reforçam que a velocidade de congelamento de um produto depende de distintos fatores, entre estes, método de congelamento, tamanho do produto, composição química, propriedades físicas (densidade, calor específico e difusividade térmica) e do tipo de embalagem ou envoltório.

Neves Filho (1991) ainda relata que, no processo de congelamento há a conversão da maior parte da água contida no produto em gelo, fenômeno que depende da composição e estrutura deste produto, sua forma física, temperatura e condições do meio empregado.

O aspecto mais destacado do congelamento é a mudança de estado, de líquido a sólido, que sofre uma parte da água presente nos alimentos e produtos agrícolas. Isso permite a conservação durante longos períodos. Contudo, a formação de cristais de gelo é uma das principais causas de certas modificações indesejáveis durante o congelamento.

Na cristalização ou formação de fase sólida organizada sistematicamente a partir de uma solução, podem-se distinguir duas etapas: a nucleação e o crescimento dos cristais. Durante o congelamento, essas duas etapas são solapadas no tempo, mas é possível controlar a velocidade relativa de cada uma delas e, dessa forma, modificar as características do sistema final (PEREDA *et al.*, 2005).

A nucleação, segundo Pereda *et al.*(2005), consiste na associação de moléculas de água para formar uma pequena partícula ordenada e estável. O ponto de início do congelamento de um alimento (N) pode ser definido como a temperatura na qual um diminuto cristal de gelo coexiste em equilíbrio com a fase líquida. A temperatura de fusão do gelo puro é de 0°C. Ao contrário, não se formam cristais de gelo quando a temperatura da água não alcança essa temperatura. A nucleação é um fenômeno difícil, porque as moléculas de água em estado líquido não se associam facilmente entre si para formar um sólido. Para que isso ocorra, é necessário que a temperatura seja inferior ao ponto em que se inicia o congelamento. É provável que durante esse *super-resfriamento* formem-se agregados cristalinos de tamanho diminuto e de caráter instável, que não chegam a alcançar tamanho crítico.

Ainda segundo os mesmos autores, existem dois tipos de nucleação. A *nucleação homogênea* que ocorre em soluções puras e a *heterogênea*, em que núcleos formam-se sobre partículas estranhas suspensas, sólidos insolúveis, superfícies de películas ou paredes de embalagens; ela tem maior importância nos alimentos e estruturas vivas. Esses agentes

facilitam a organização das moléculas de água para formar núcleos estáveis. O impacto mecânico e as variações locais de solutos também contribuem para a nucleação heterogênea.

A nucleação terá início quando a temperatura alcançar o valor crítico (N) característico de cada amostra. Como se observa na Figura 5, quando diminui a temperatura, aumenta rapidamente a velocidade de formação de núcleos. Ou seja, quanto maior for a velocidade a que se elimina o calor do alimento, maior será o número de núcleos formados.

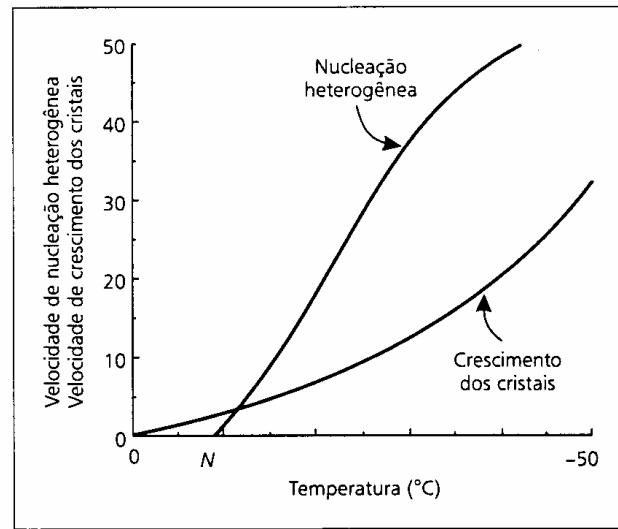


FIGURA 5 - Influência do super-resfriamento inicial e da velocidade de resfriamento na nucleação e no crescimento dos cristais de gelo. Fonte: Fennema (1996).

Na etapa de crescimento de cristais, ocorre a adição organizada de moléculas de água aos núcleos formados, que, assim, aumentam de tamanho. O crescimento dos cristais de gelo depende da difusão e da orientação de moléculas de água na superfície do núcleo. O número de moléculas de água que se unem ao núcleo deve ser maior que o das que se afastam dele. Diferentemente da nucleação, o crescimento dos cristais pode ocorrer em temperaturas muito próximas ao ponto de fusão. De fato, as moléculas de água têm maior tendência a migrar e a associar-se com núcleos já existentes do que a formar novos núcleos. A velocidade de crescimento dos cristais também depende da velocidade de resfriamento,

embora o efeito seja mais moderado que o observado para a nucleação (Figura 5). Em temperaturas muito baixas (em torno de -80°C), a velocidade de crescimento dos cristais de gelo chega a reduzir-se, devido à elevada viscosidade do meio nessas baixas temperaturas, limitando o movimento das moléculas de água aos cristais. A presença de diversos solutos e estruturas nos alimentos podem dificultar o crescimento dos cristais de gelo no mesmo sentido (FENEMMA, 1996; FELLOWS, 1994).

Quando se comparam as velocidades de nucleação e de crescimento dos cristais em função da velocidade de resfriamento, deduz-se que é possível regular o tamanho dos cristais de gelo, controlando a velocidade de transferência de calor (Figura 5). Quando esta é muito rápida, a velocidade de nucleação aumenta consideravelmente, provocando a formação de muitos núcleos: mas isso não ocorre com a velocidade de crescimento dos cristais: por isso, eles são pequenos. Contudo, em amostras que são congeladas lentamente (quando a temperatura do alimento mantém-se entre 0°C e N), ocorre o contrário, formando-se poucos núcleos e sendo os cristais resultantes relativamente grandes (PEREDA *et al.*, 2005; GRUDA e POSTOLSKI, 1996).

Também parece haver diferenças quanto à forma dos cristais conforme a velocidade de resfriamento: quando é lenta, os cristais têm a forma alongada (como agulha), ao passo que, quando é rápida, eles têm formas mais arredondada (PEREDA *et al.*, 2005).

O número, o tamanho e a forma dos cristais podem variar inclusive de uma área a outra do alimento, especialmente nos produtos sólidos ou de grande viscosidade. Nas partes periféricas que estão em contato com o meio de resfriamento, no qual a temperatura diminui rapidamente, forma-se número maior de cristais de menor tamanho do que nas zonas mais profundas, nas quais a transferência de calor ocorre de forma mais lenta. Isso é importante porque o número, o tamanho e a forma dos cristais influem bastante na qualidade dos produtos congelados segundo Gruda e Postolski (1996).

Pode-se considerar que a diminuição da temperatura durante o congelamento divide-se em três etapas. A primeira consiste no resfriamento do produto até a temperatura

em que se inicia seu congelamento (eliminação de calor sensível). Na segunda etapa, produz-se a cristalização da maior parte da água presente no alimento (subtração do calor latente correspondente à formação de cristais de gelo). Essa etapa é justamente a que requer mais energia pelo elevado calor latente de fusão da água (335 kJ kg a 0°C e pressão atmosférica). Na terceira etapa, ocorre a posterior redução da temperatura do produto congelado até a temperatura final desejada (é preciso eliminar novamente calor sensível) (PEREDA *et al.*, 2005).

O registro da temperatura durante o congelamento lento de uma amostra de água permite obter uma curva como a que se apresenta na Figura 6a. A temperatura da água deve diminuir abaixo dos 0°C para que se inicie a nucleação (super-resfriamento, ponto S). No momento em que os núcleos adquirem o tamanho crítico e começam a formarem-se os primeiros cristais de gelo, a velocidade de liberação do calor latente devido à cristalização é maior do que a velocidade em que se elimina esse calor da amostra, e a temperatura eleva-se a 0°C (temperatura de equilíbrio de congelamento da água pura; ponto B). A mistura de água e gelo mantém-se a essa temperatura, enquanto se produz a mudança de estado (segmento BC). Somente quando se completa a transformação da água líquida em gelo é que a temperatura diminui até aproximar-se da temperatura do meio de resfriamento (segmento CD). Vale destacar que, por ser o calor específico do gelo menor que o da água, a diminuição da temperatura do gelo é muito mais rápida agora do que na água, antes de seu congelamento (KASAHARA *et al.*, 1986; PEREDA *et al.*, 2005).

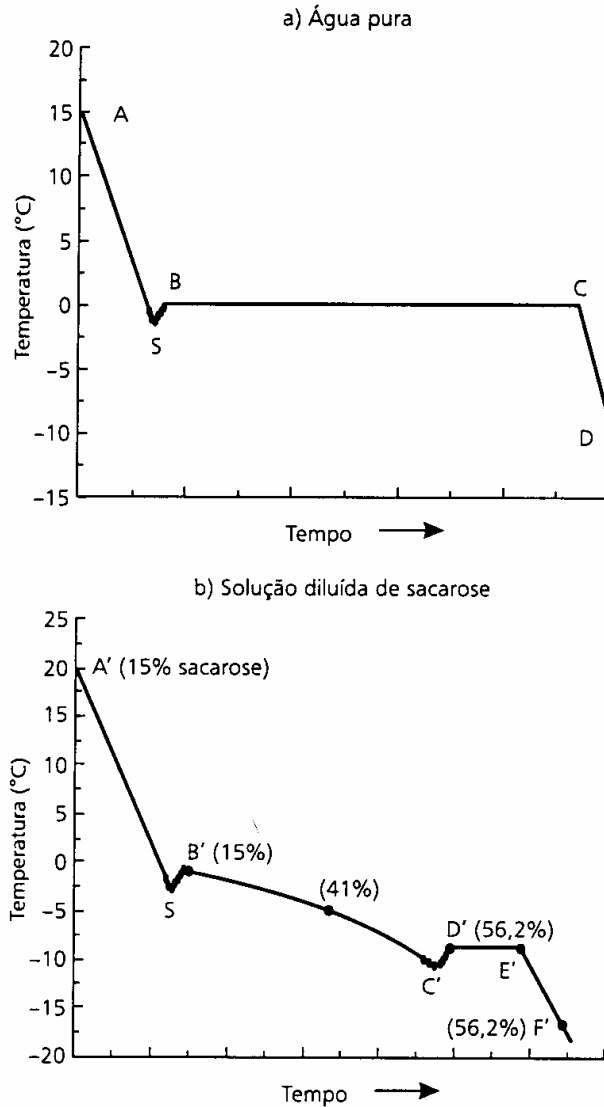


FIGURA 6 – Curvas de congelamento de (a) água pura e (b) uma solução diluída de sacarose. Fonte: Pereda *et al.*, (2005).

Segundo Pereda *et al.* (2005), a curva de congelamento da solução diluída do composto (sacarose, neste exemplo) é ligeiramente diferente, como se pode observar na Figura 6b. Em primeiro lugar, o super-resfriamento (diminuição da temperatura com relação ao ponto de fusão) não é tão acentuado como na água pura, visto que predominam os mecanismos de nucleação heterogênea. A temperatura aumenta ao liberar-se o calor latente de fusão durante a formação de gelo. Em segundo lugar, a temperatura em que começa o congelamento da solução (B') é inferior à da água pura, pela depressão do ponto de congelamento (lei da diminuição crioscópica de Raoult). Essa diminuição do ponto de

congelamento depende da concentração de solutos em solução. A formação de cristais de gelo tem como consequência imediata o aumento da concentração do soluto na fração líquida restante e a resultante diminuição de seu ponto de congelamento. É por essa razão que o segmento B'C' tem ligeira pendente negativa. Durante essa etapa, forma-se a maior quantidade de cristais de gelo na solução e, vale dizer, trata-se de cristais de gelo puro. Não é correto, portanto, falar da temperatura de congelamento de uma solução, mas sim da *temperatura de início do congelamento*, para indicar que se trata do ponto de fusão ou congelamento da solução antes que este se modifique pela crioconcentração.

Quando a concentração do soluto atinge a saturação (*ponto eutético*), ele começa a cristalizar à mesma velocidade que a água, ao mesmo tempo em que libera o calor latente correspondente à mudança de estado. A partir desse ponto (D'), a água e a sacarose cristalizarão juntas na mistura eutética (segmento D'E'), sem que a concentração de sacarose na solução se modifique. Uma vez finalizada a cristalização, em temperatura constante, continua caindo a temperatura do sólido congelado (segmento E'F).

Ainda segundo Pereda *et al.* (2005), a diminuição do ponto de congelamento pela presença de um soluto e as condições em que se formam as misturas eutéticas, no caso de uma solução diluída de sacarose, são apresentadas no diagrama de fases representado na Figura 7. A linha aE é a curva de congelamento das soluções de sacarose em água, isto é, os pontos em que a solução está em equilíbrio com cristais de gelo, e a linha bE é a curva de solubilidade da sacarose ou os pontos em que a solução está em equilíbrio com cristais de sacarose. Essas duas linhas encontram-se no ponto E (ponto eutético), onde estão em equilíbrio sacarose em solução, cristais de gelo e cristais de sacarose. O ponto eutético é um ponto invariável e característico de cada composto, sendo, neste exemplo, uma concentração de sacarose de 56,2% a $-9,5^{\circ}\text{C}$, condições em que começarão a se formar simultaneamente cristais de gelo e de sacarose.

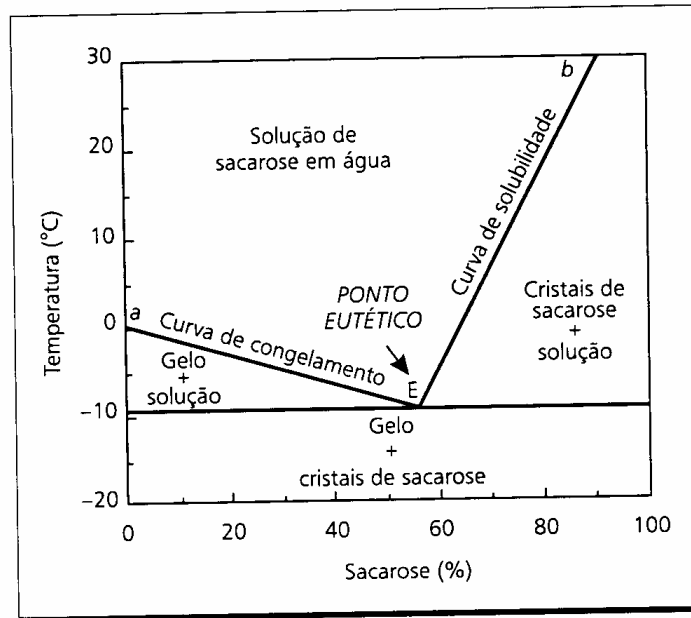


FIGURA 7 – Diagrama das fases de uma mistura binária (sacarose-água). Fonte: Pereda *et al.*, (2005).

Nos alimentos com grande quantidade de compostos em solução, as curvas de congelamento são muito mais complexas. O super-resfriamento não costuma ultrapassar 10°C, embora muitas vezes não seja visível. A temperatura de início do congelamento dependerá da composição do alimento (Tabela 4). Durante o processo, não se formará apenas uma mistura eutética, mas várias, e de tamanha complexidade que, em geral, é difícil perceber os pontos de inflexão das diferentes misturas eutéticas (final do segmento BC e segmento CD na Figura 8). As curvas de congelamento de diversos alimentos de origem animal e vegetal são similares e dependem da velocidade de congelamento (Figura 9) (POTTER, 1986; FELLOWS, 1994).

TABELA 3 – Temperaturas em que se inicia o congelamento em diversos alimentos.

Tipo de alimento	Quantidade de água (%)	Temperatura de início do congelamento (°C)
Hortaliças	78-92	-0,8 a -2,8
Frutas	87-95	-0,9 a -2,7
Carne	55-70	-1,7 a 2,2
Peixe	65-81	-0,6 a -2,0
Leite	87	-0,5
Ovo	74	-0,5

Fonte: Fellows (1994).

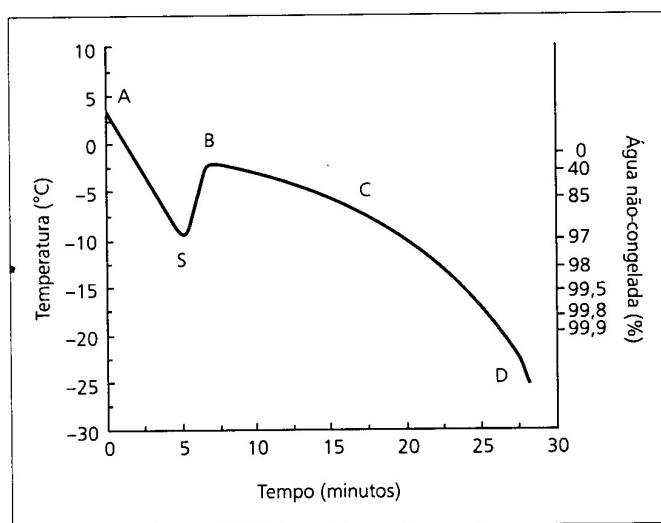


FIGURA 8 – Curva de congelamento de um alimento(carne), indicando a porcentagem de água não-congelada. S, super-resfriamento. Fonte: Fenemma (1996).

O congelamento do alimento é considerado completo quando sua temperatura atinge a da mistura eutética mais baixa (temperatura de fim do congelamento). Contudo, raramente se consegue isso durante o congelamento dos alimentos, e nem é seu objetivo, visto que exigiria a diminuição da temperatura a valores muito baixos (p. ex. no peixe seria de -55°C), implicando custos muito elevados.

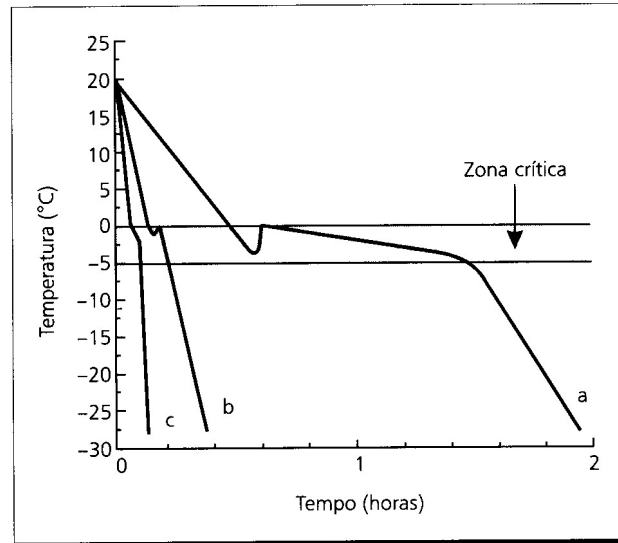


FIGURA 9 – Evolução da temperatura durante o congelamento de alimento com resfriamento lento (a), rápido (b) e muito rápido (c). Fonte: Fenemma (1996).

Considerando tudo o que foi exposto e, com o intuito de conhecer o comportamento da água presente nas sementes das duas cultivares de algodão colorido, durante o processo de congelamento criogênico, o objetivo do presente capítulo foi o de estudar a cinética do congelamento criogênico, e determinar a difusividade efetiva, às temperaturas de -25, -45, -170 e -196°C.

MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande-PB. Utilizaram-se sementes deslintadas das cultivares BRS Verde e BRS 200 Marrom, obtidas junto a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, unidade Algodão, localizada em Campina Grande. As sementes cedidas foram da safra 2003.

Após a determinação do teor de água inicial de cada variedade de sementes essas foram secas ou umedificadas até que atingissem os teores de água de 7,5, 9, 12, e 13,5% b.u.. Como as sementes tinham um teor de água inicial de aproximadamente 10,5% b.u., foi feita uma secagem para a obtenção dos teores de 7,5 e 9% b.u. e um umedecimento para a obtenção dos teores de 12 e 13,5% b.u. A quantidade de água evaporada ou adsorvida, em gramas, foi determinada com a seguinte expressão:

$$A_e = P_i \times [(100 - U_i) / (100 - U_f)]$$

em que

A_e = quantidade de água a ser evaporada ou adsorvida (g) ;

P_i = peso inicial das sementes (g) ;

U_f = teor de água final das sementes (% b.u.) ;

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

Para a secagem das sementes das amostras de algodão foram colocadas em um dessecador (Figura 10) contendo como material dessecante sílica gel. As amostras foram pesadas a cada 24 horas, até atingirem os pesos referentes aos teores de água desejados. Para este fim foi utilizada uma balança eletrônica Mettler modelo PC 440, com precisão de 0,01g.

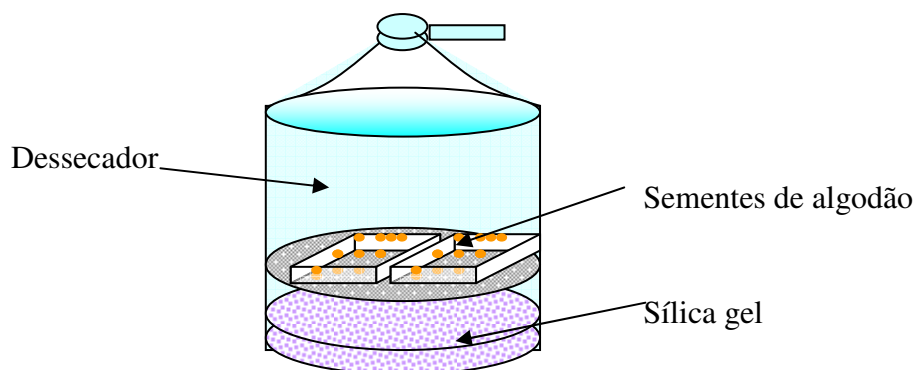


FIGURA 10 - Dessecador utilizado na secagem das sementes de algodão.

Para o umedecimento das sementes as amostras foram colocadas em pequenas cestas de arame, suspensas por um anel de PVC e colocadas no interior de recipientes de

vidro hermeticamente fechados contendo água (Figura 11) e posteriormente colocadas em câmaras a 10°C. As cestas com as amostras foram pesadas a cada 24 horas, utilizando-se uma balança eletrônica Mettler modelo PC 440, com precisão de 0,01g, até que atingissem os pesos referentes aos teores de água desejados.

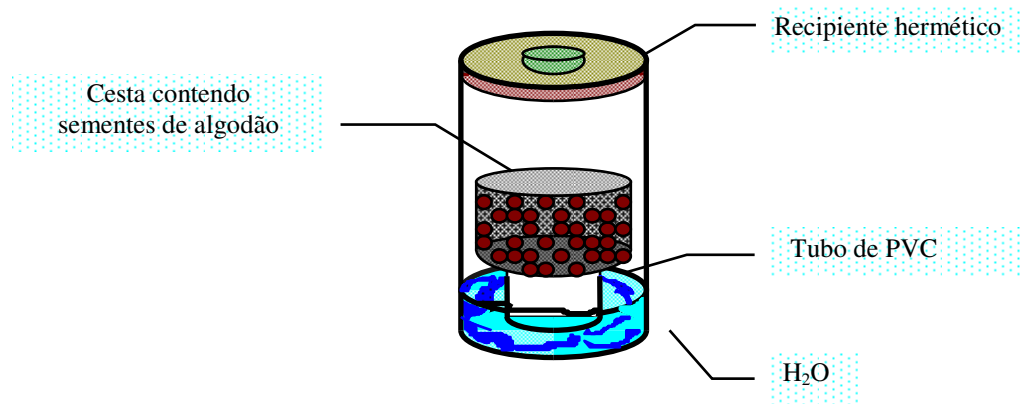


FIGURA 11– Recipiente hermético para o processo de umedecimento das sementes de algodão.

As sementes oriundas das operações de secagem e umidificação e nos respectivos teores de água foram selecionados manualmente, escolhendo aquelas que aparentavam os mesmos tamanhos e formas. Foram utilizadas três sementes para cada tipo de congelamento (congelamento em freezer, câmara criogênica, nitrogênio líquido e nitrogênio a vapor). Dessa maneira, foram obtidas curvas de congelamento em 4 temperaturas; -25°C, -45°C, -170° e -196°C em função do tempo.

Para proceder à tomada dos dados da evolução do processo de congelamento em função da temperatura e do tempo, efetuou-se um furo no centro geométrico de cada semente escolhida nos respectivos teores de água. Este centro geométrico foi determinado através dos valores de comprimento, espessura e largura de cada semente. Monitorando a temperatura no interior da semente foi colocado um termopar conectado a um registrador multicanal marca Digi-sensi. Da mesma maneira, outro termopar foi afixado no interior do ambiente onde se dava cada leitura, ou seja, no freezer, na câmara criogênica, no nitrogênio líquido e nitrogênio a vapor, com o intuito de verificar a temperatura de equilíbrio, ponto final do processo. As tomadas de temperatura foram realizadas inicialmente a intervalos de

5 segundos, até a marca de 60 segundos, donde passou-se a observar o processo a intervalos de 1 minuto, até que se atingisse o patamar dos 5 minutos. Doravante tomaram-se dados a cada 5 minutos, até o final do processo.

Para a execução do tratamento matemático, tomaram-se os dados experimentais das curvas de congelamento das sementes de algodão, e foram obtidos os parâmetros fator de atraso (J) e difusividade térmica (α), utilizando-se a equação de Fourier de acordo com Plug e Blaisdell, citados por Cavalcanti Mata et al., (2003). A equação utilizada foi:

$$RT = \frac{T - T_{\infty}}{T_0 - T_{\infty}} = J \cdot \exp(k * T)$$

em que,

$$J = \frac{2 \cdot \text{sen} \mu_n - \mu_n \cdot \text{cos} \mu_n}{\mu_n - \text{sen} \mu_n \cdot \text{cos} \mu_n} \text{ (fator de atraso)}$$

$$k = \frac{\mu_n \cdot \alpha}{r^2}$$

onde:

RT - Razão de temperatura, adimensional

k – condutividade térmica, $\text{W} \cdot \text{m}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$

T – Temperatura em cada momento, $^{\circ}\text{C}$

T_{∞} - Temperatura do meio de congelamento, $^{\circ}\text{C}$

T_0 - Temperatura inicial do produto, $^{\circ}\text{C}$

α – difusividade térmica, $\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$;

μ_n – raiz transcendental;

r – raio da semente, mm

Para obtenção dos parâmetros das equações que regeram as curvas de congelamento foi utilizado o método de regressão não linear *Quase-Newton* empregando-se o programa computacional Statistica 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16, encontram-se as curvas de congelamento das sementes de algodão das duas cultivares, nas temperaturas estudadas. As curvas obtidas, principalmente nas temperaturas de -25, -45 e -170°C, apesar da maior similaridade com as curvas de resfriamento, apresentam, ainda que de forma discreta, as três fases características da curva de congelamento da água pura. A Fase 1 corresponde ao resfriamento do produto, e vai, da temperatura ambiente até o início da temperatura de congelamento desse produto. Esse período é caracterizado por uma típica curva exponencial. A Fase 2 é constituída pelo congelamento do produto, onde a fração de água, que é a maior parte do produto, absorve a energia para formar os cristais de gelo. Nessa fase, a curva característica é praticamente uma reta com pequena inclinação, pois, quase toda a energia é utilizada para formar os cristais de gelo. A Fase 3 corresponde ao pós-congelamento do produto, que consiste em baixar a temperatura do produto já congelado até temperaturas mais baixas e que se aproximam dos valores da substância congelante. Nessa fase a curva característica volta a ser uma exponencial.

Esta dificuldade com que distinguem as fases no presente estudo deve-se aos conteúdos de água reduzidos (7,4; 9; 10,5; 12 e 13%) das sementes utilizadas. Esta afirmação encontra consonância com Kasahara *et. al* (1986) e Farias (2003), ao salientarem que os produtos agrícolas, com conteúdos de água em torno de 70 a 90%, base úmida, apresentam de maneira evidente as três fases distintamente.

Nas curvas de congelamento das sementes por imersão em nitrogênio líquido (-196°C), não se distingue com clareza as três fases típicas devido a maior velocidade de congelamento e um maior gradiente térmico a que estão expostas as sementes.

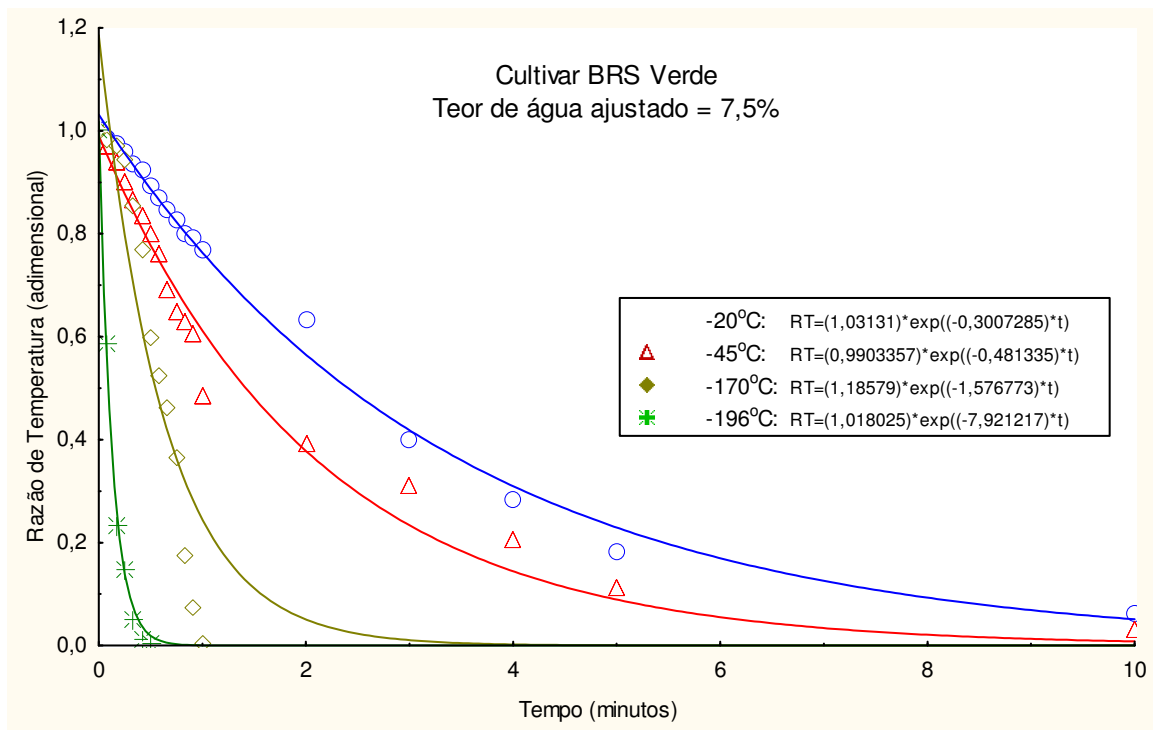
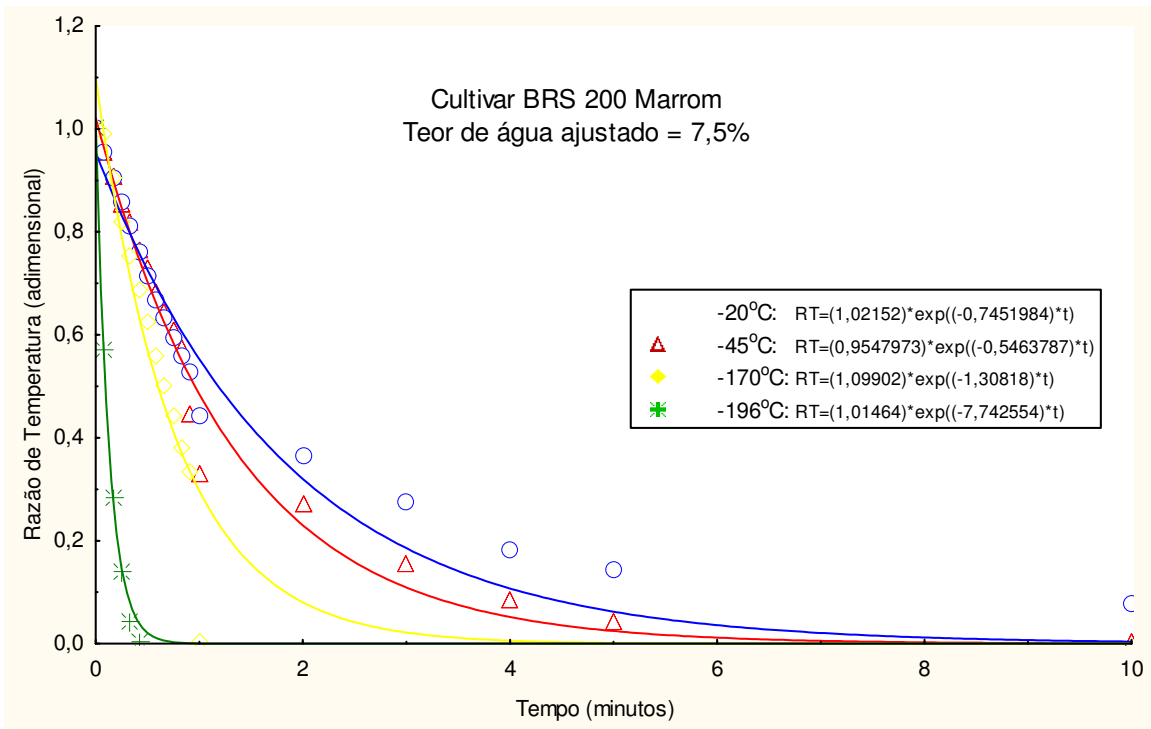


FIGURA 12 - Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água ajustado para 7,5% b.u.

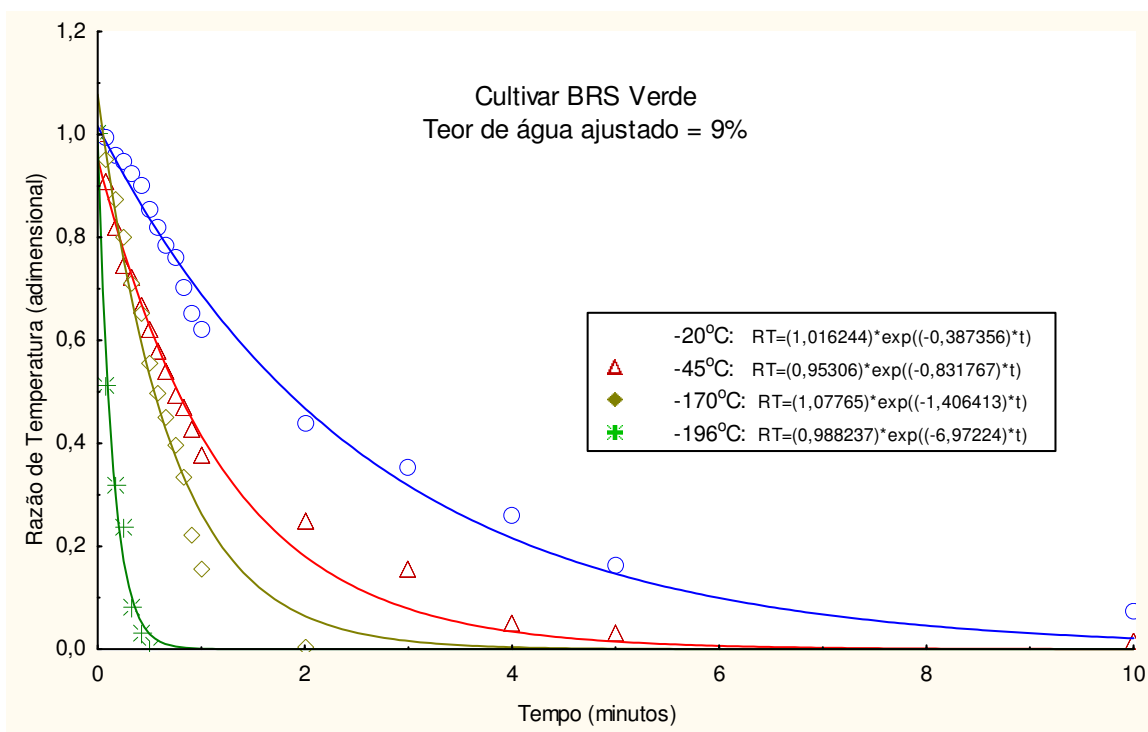
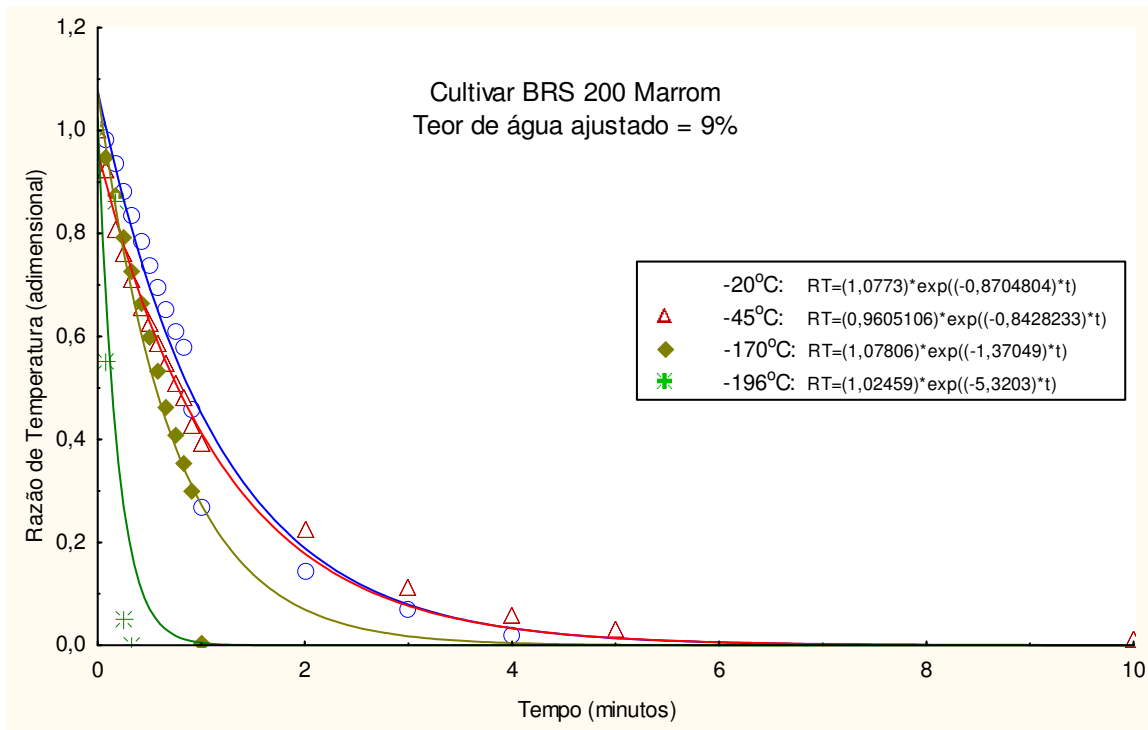


FIGURA 13 - Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água ajustado para 9% b.u.

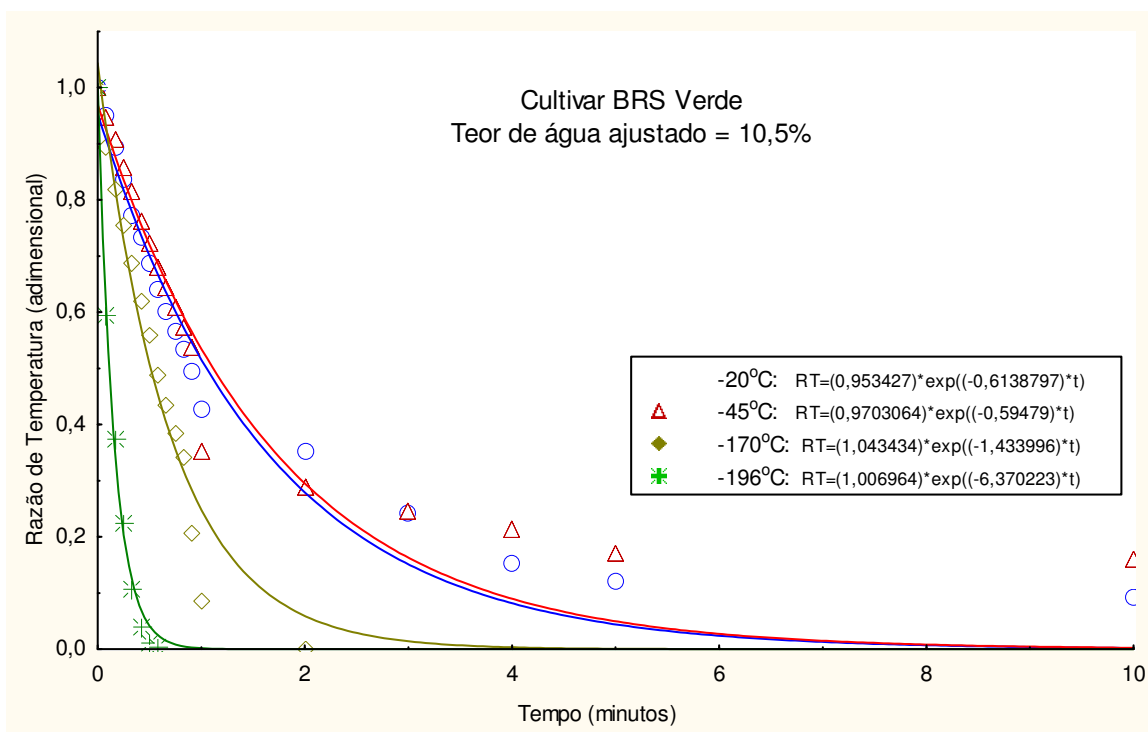
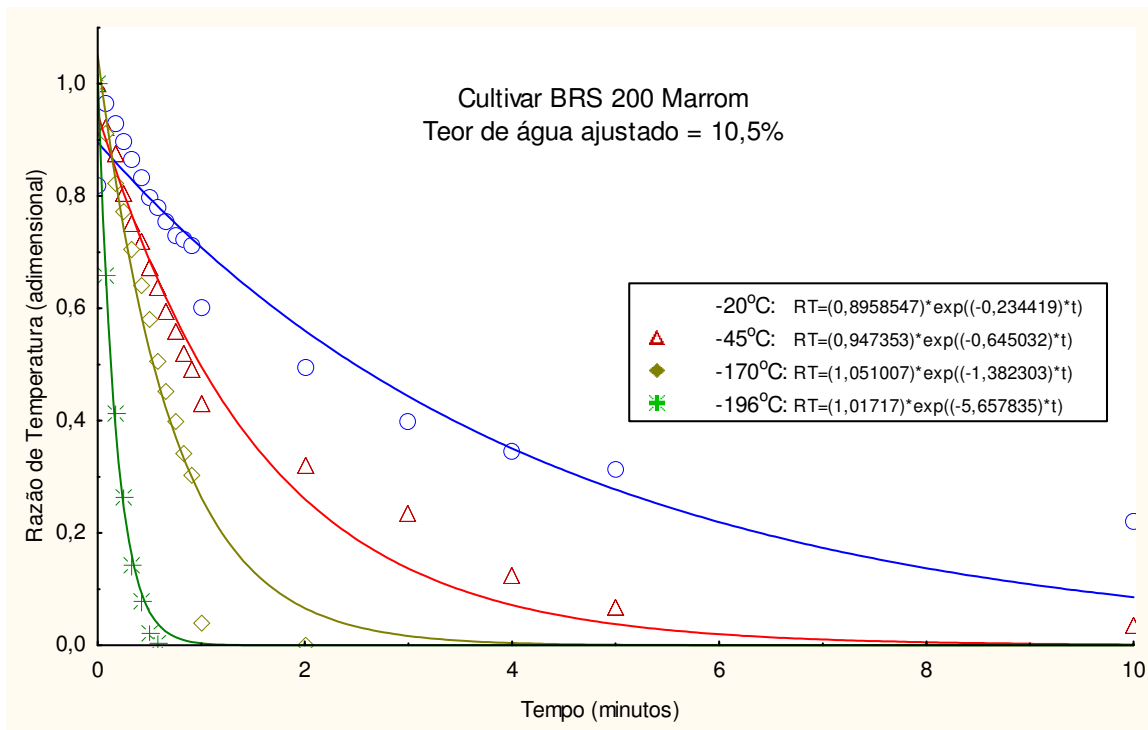


FIGURA 14 - Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água inicial de 10,5% b.u.

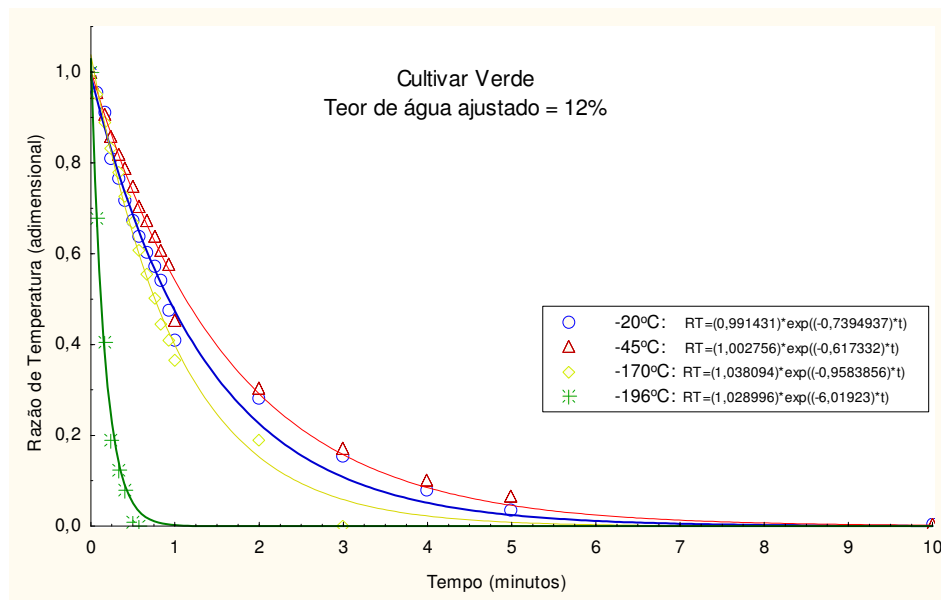
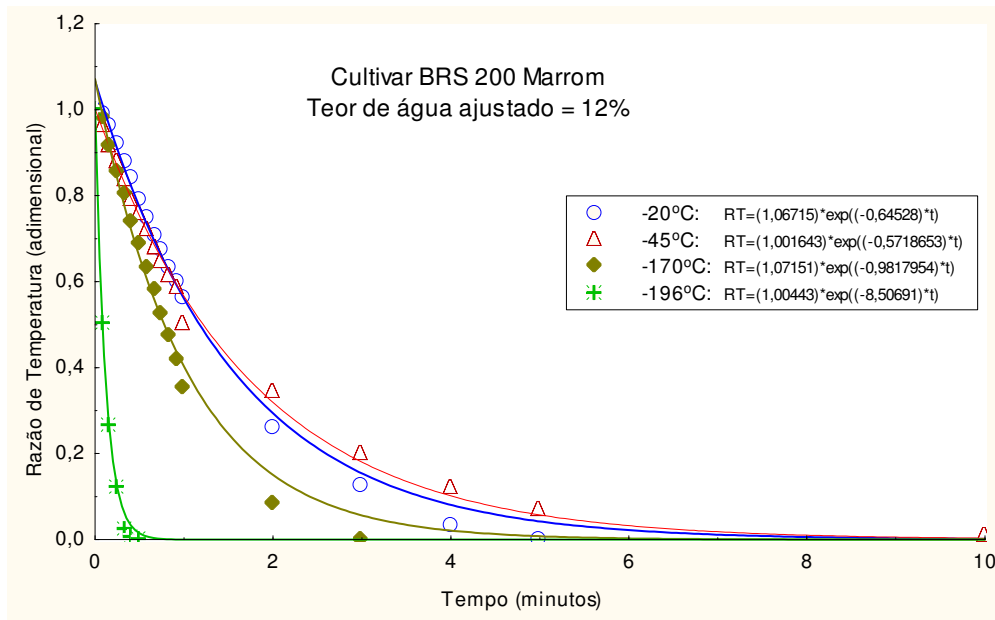


FIGURA 15 - Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água ajustado para 12% b.u.

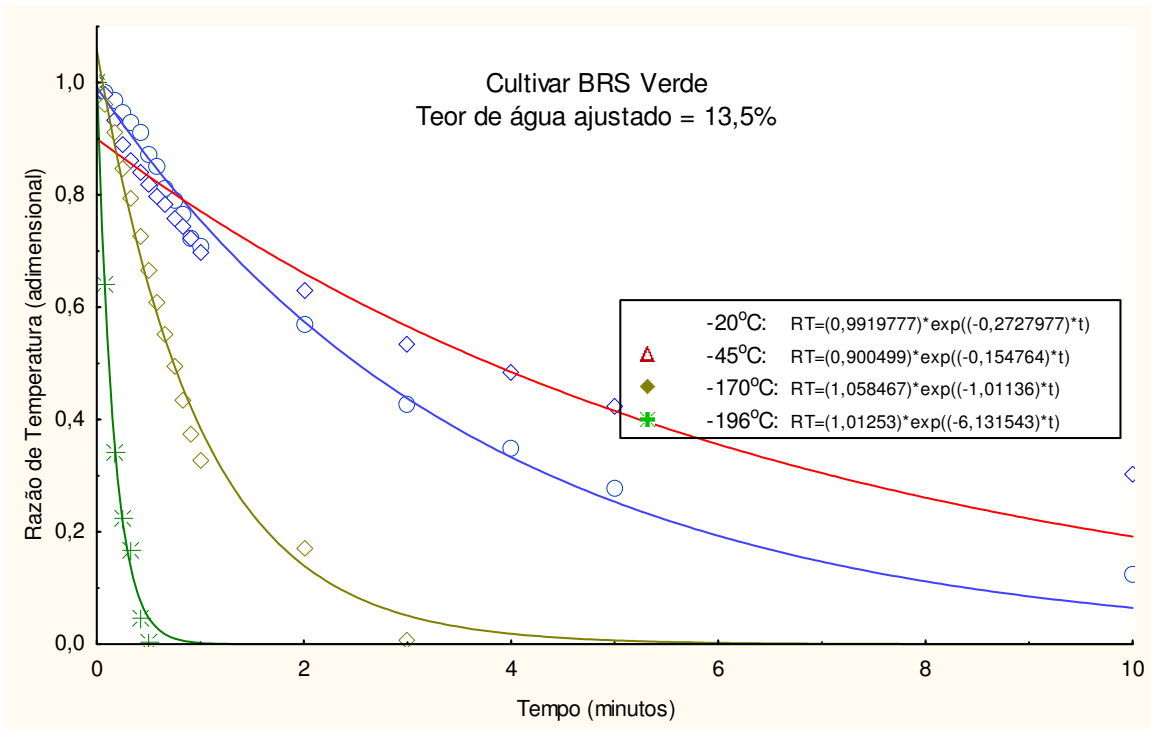
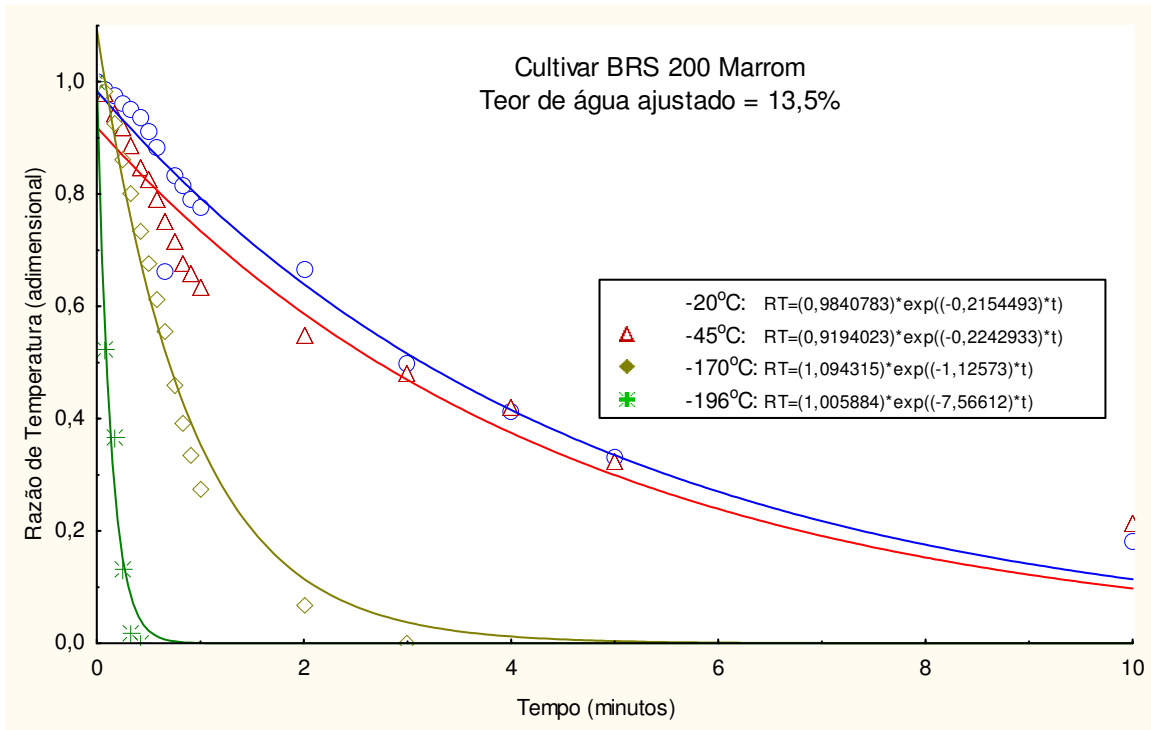


FIGURA 16- Curvas experimentais e calculadas pela equação de Fick das sementes das duas cultivares de algodão colorido com teor de água ajustado para 13,5% b.u.

As sementes de algodão das duas cultivares apresentaram um conteúdo de água de aproximadamente 12% base úmida (b.u), ou seja, baixa percentagem de água. Como as curvas de congelamento das sementes de algodão não apresentam as três fases distintas, anteriormente descritas, pode-se dizer que o seu conteúdo de água, embora passe pelas três fases, não é suficientemente marcante de modo a conferir a essas curvas de congelamento um aspecto de uma curva sigmóide, tendo predominância à curva característica de matéria seca que é uma curva exponencial.

Depreende-se ainda da análise das curvas apresentadas nas Figuras 12 a 16, que se demanda mais tempo para se alcançar o estado final de congelamento, àquelas sementes com um teor de água mais elevado, comportamento este totalmente esperado. Observando a Figura 16, que contém as curvas de congelamento para um teor de água de 13,5%, pode-se inferir que as sementes de ambas as cultivares demandaram um tempo de aproximadamente 20 minutos para efetivar o congelamento da água disponível, nas temperaturas mais baixas (-25 e -45°C), enquanto que, observando a Figura 12, que contém as curvas de congelamento para um teor de água ajustado de 7,5%, chega-se a valores de 10 a 15 minutos, também naquelas temperaturas mais amenas.

Farias (2003), em seu estudo sobre crioconservação e cinética de congelamento de sementes de jatobá, também obteve curvas de congelamento a diferentes temperaturas (-30, -150, -170 e -196°C) com formas assemelhadas às curvas exponenciais, observadas no presente trabalho. A autora salienta que as sementes de jatobá utilizadas no estudo, continham um teor de água inicial de aproximadamente 13%, bastante próximo ao teor de água inicial das sementes de algodão aqui utilizadas.

Pode-se ainda observar nas Figuras 12 a 16, um comportamento semelhante das duas cultivares, em todos os teores de água e em todas as temperaturas, refletindo o ajuste realizado para se obter os teores de água almejados, como também a escolha das sementes, quanto à forma e dimensões. Farias (2003), observou igual comportamento com a cinética de congelamento de sementes de jatobá.

A relação entre temperatura e difusividade térmica a diferentes conteúdos de água são mostradas nas Figuras 17 e 18. Pode-se observar que para ambas as cultivares, a difusividade térmica aumenta com o aumento do teor de água em todas as temperaturas. Para os valores dentro de um mesmo teor de água, observa-se uma oscilação destes valores, sem constituir um padrão definido de aumento ou diminuição, com a conseqüente variação da temperatura. Este comportamento provavelmente deve-se ao fato de que os valores de difusividade são dependentes de vários fatores, tais como dimensões das sementes, por exemplo.

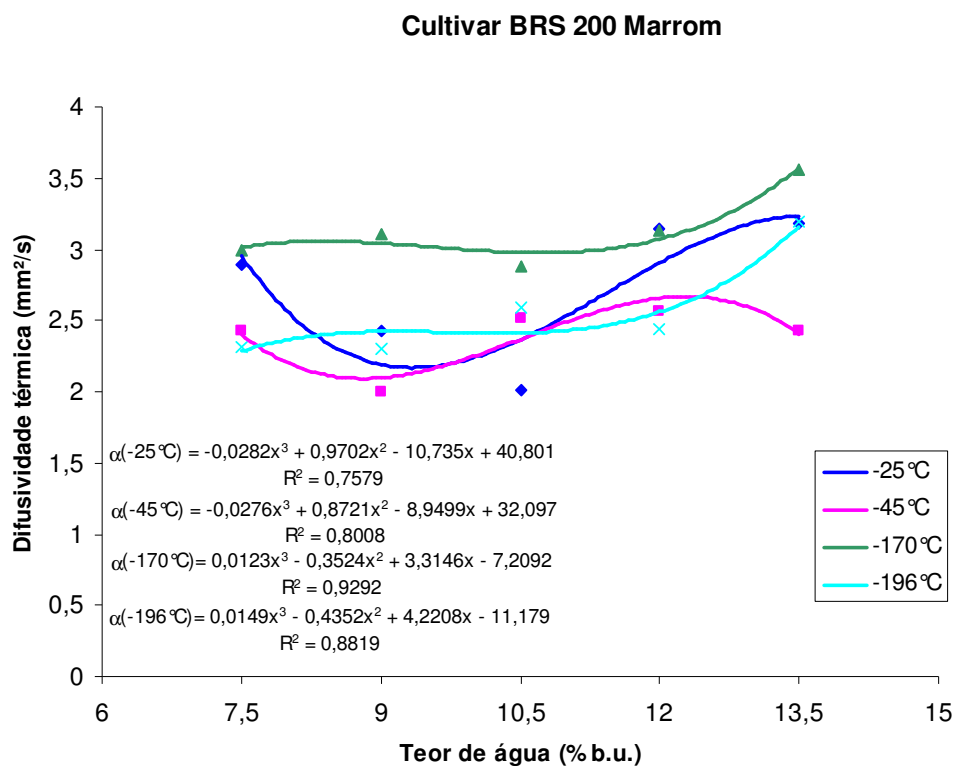


FIGURA 17 – Variação na difusividade térmica de sementes de algodão da cultivar BRS 200 Marrom com a temperatura e o teor de água.

Yang *et al.*, (2002) verificaram, para sementes de borage (*Borago officinalis*), uma espécie selvagem, que os valores encontrados para difusividade também são acrescidos com o aumento do conteúdo de água das sementes e da temperatura (de 6 para 20°C), e que estes cresciam como uma função de primeira ordem. Subramanian e Viswanathan (2003), trabalhando com grãos de milho miúdo (“minor millet”), obtiveram valores decrescentes da

difusividade térmica com o aumento do teor de água dos grãos. Singh e Goswami (2000), investigando a difusividade térmica de sementes de cominho também observaram um decréscimo dos valores da difusividade com o aumento do teor de água, embora depois estes valores viessem a aumentar obedecendo a uma relação polinomial de 2ª. Ordem. Por outro lado, estes autores mostraram que a difusividade aumentava com o aumento da temperatura (de -50 para 50°C). Farias (2003) relatou, contrariamente, que a difusividade térmica das sementes de jatobá aumentava com a diminuição da temperatura de -30°C para -196°C.

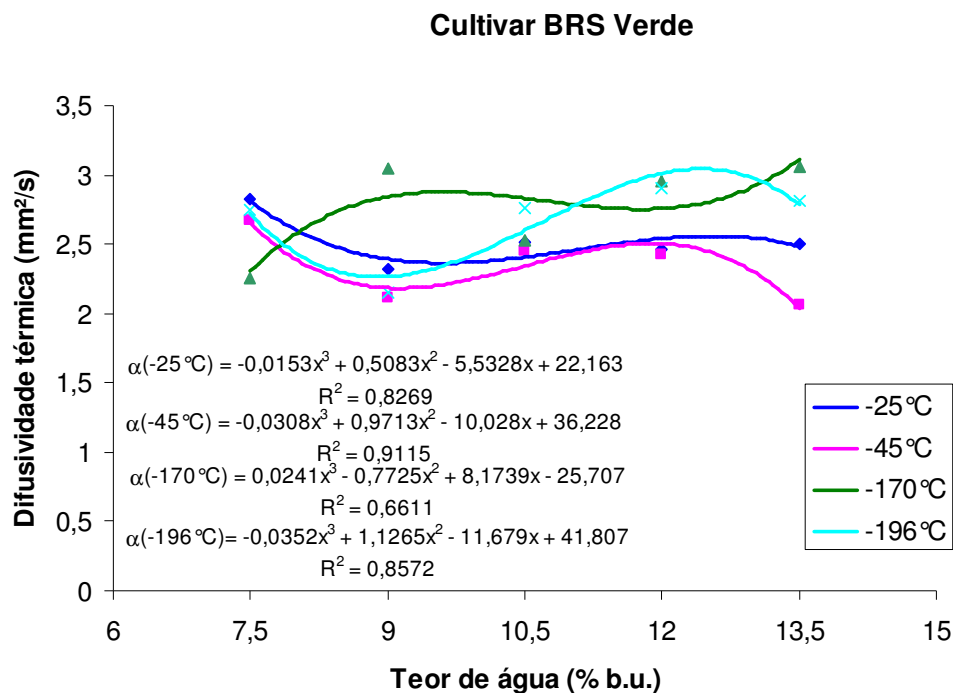


FIGURA 18– Variação na difusividade térmica de sementes de algodão da cultivar BRS Verde com a temperatura e o teor de água.

CONCLUSÕES

- As curvas de congelamento obtidas para as temperaturas de -25, -45 e -170°C se assemelham à curva de congelamento da água pura;
- As curvas de congelamento obtidas para a temperatura de -196°C não se distinguem as três fases típicas das curvas de congelamento da água pura;

- Para ambas as cultivares, a difusividade térmica aumenta com o aumento do teor de água em todas as temperaturas;

- Para os resultados da difusividade térmica dentro de um mesmo teor de água, observa-se uma oscilação destes valores, sem constituir um padrão definido de aumento ou diminuição, com a conseqüente variação da temperatura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. de. Conservação de alimentos pelo emprego do frio. In: BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M.N. de. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, Vol. 3, 1998. Cap. 4, p.63-82.

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

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

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

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

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

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

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

NEVES FILHO, L. de C. **Resfriamento, congelamento e estocagem de alimentos**. São Paulo: Instituto Brasileiro do Frio, 1991. 165p.

PEREDA, J.A.O.; RODRIGUEZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L. de la H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Vol. 1, Porto Alegre: Artmed, 2005. 294p.

POTTER, N.N. **Food science**. 3rd.ed. Connecticut: AVI Publishing, 1986. 502p.

SINGH, K.K.; GOSWAMI, T.K. Thermal properties of cumin seeds. **Journal of Food Engineering**, Essex, England, v.45, p.181-187, 2000.

SUBRAMANIAN, S.; VISWANATHAN, R. Thermal properties of minor millet grains and flours. **Biosystems Engineering**, London, v.84, n.3, p.289-296, 2003.

YANG, W.; SOKHANSANJ, S.; TANG, J; WINTER, P. Determination of thermal conductivity, specific heat and thermal diffusivity of borage (*Borago officinalis*) seeds. **Biosystems Engineering**, London, v.82, n.2, p.169-176, 2002.

CAPÍTULO 3

CAPÍTULO 3

QUALIDADE FISIOLÓGICA DAS SEMENTES DE ALGODÃO COLORIDO DURAMENTE O ARMAZENAMENTO EM TEMPERATURAS SUBZERO.

RESUMO

O método de crioconservação compreende a conservação de material biológico a temperaturas ultra-baixas, geralmente em nitrogênio líquido, a -196°C , ou em sua fase de vapor, a -170°C , onde a divisão celular e os processos metabólicos cessam ou são paralisados e mantidos em estado latente, podendo o material permanecer armazenado por tempo indefinido sem que sofra modificações ou alterações. O presente trabalho teve como objetivo testar a influência da técnica de crioconservação em imersão no nitrogênio líquido, e na sua fase de vapor (-170°C), como também a -20°C , sobre a qualidade fisiológica de sementes de duas cultivares de algodão colorido (BRS 200 Marrom e BRS Verde), submetidas a um período de armazenamento de 360 dias, sendo descongeladas por três técnicas (temperatura ambiente, banho termostatizado a 40°C e microondas). A qualidade das sementes foi avaliada antes do armazenamento e a cada dois meses, através dos testes: germinação e vigor (avaliação do comprimento do hipocótilo). Observou-se que o aumento do período de armazenamento das sementes proporcionou decréscimo na viabilidade e do vigor das sementes, em quaisquer das temperaturas e dos métodos de descongelamento utilizados.

PALAVRAS-CHAVE: crioconservação, descongelamento, viabilidade, vigor.

PHYSIOLOGICAL QUALITY OF COLORED COTTON SEEDS DURING STORAGE IN SUBZERO TEMPERATURES

ABSTRACT

The cryoconservation method understands the conservation of biological material to ultra-low temperatures, usually in liquid nitrogen, to -196°C , or in his vapor phase, to -170°C , where the cellular division and the metabolic processes cease or they are paralyzed and maintained in latent state, being able to the material to stay stored by indefinite time without it suffers modifications or alterations. The present work had as objective tests the influence of the cryoconservation technique in immersion in the liquid nitrogen, and in his vapor phase (-170°C), as well as to -20°C , in the physiologic quality of colored cotton seeds of two cultivates (BRS 200 Brown and BRS Verde), submitted a storage period of 360 days, being thawed by three techniques (room temperature, thermostated bath to 40°C and microwaves). The quality of the seeds was evaluated before the storage and every two months, through the tests: germination and vigor (evaluation of the hypocotyl length). It was observed that the increase of the storage period of the seeds provided decrease in the viability and vigor of the seeds, in any temperatures and thawing methods used.

KEYWORDS: cryoconservation, defrosting, viability, vigor

INTRODUÇÃO

Como processo natural todo material biológico está sujeito ao envelhecimento; a estrutura e a função dos organismos mudam e se perdem com o tempo, até alcançar a morte. Por estas razões, desde tempos remotos se tem realizado esforços para deter o relógio biológico dos organismos e na maioria dos casos, se buscou experimentar com a manipulação da temperatura e do teor de água para lograr este propósito. As técnicas de refrigeração permitem retardar o processo de deterioração, mas a utilização de temperaturas muito mais baixas permite o armazenamento de organismos vivos em um estado de suspensão animada por períodos extensos. Este processo de congelamento a ultra baixas temperaturas tem provado ser um método eficiente para deter o relógio biológico dos organismos e se conhece como crioconservação o sistema criogênico, ou seja, a utilização de nitrogênio líquido para o armazenamento (ABDELNOUR, 1999; ZHENG *et al.*, 1998; PITA *et al.*, 1997).

O método de crioconservação consiste em levar o material biológico desde sua temperatura fisiologicamente normal, até ultra-baixas temperaturas (geralmente em nitrogênio líquido, a -196°C , ou em seu vapor, em torno de -170°C). A esta temperatura, segundo diversos autores, entre estes, Hor *et al.* (2005), Theilade e Petri (2003), Popova *et al.* (2003) e Abdelnour (1999), a divisão celular e os processos metabólicos cessam ou são paralisados e mantidos em estado latente, podendo o material permanecer armazenado por tempo indefinido sem que sofra modificações ou alterações.

Há mais de 40 anos, quando se demonstrou pela primeira vez a possibilidade de crioconservar eficientemente esperma animal, a técnica tem se difundido para armazenar células vivas por largos períodos ou indefinidamente. A crioconservação se emprega para o armazenamento de esperma e embriões humanos, que se utilizam para inseminações artificiais e fertilizações *in vitro*. Também se utiliza para o armazenamento de eritrócitos e tem sido otimamente empregado para a conservação da diversidade microbiana. Em plantas, a possibilidade de crioconservar desde células até órgãos tem sido demonstrada amplamente, do mesmo modo que sua utilidade para a conservação de germoplasma e de

material gerado em condições de laboratório (ABDELNOUR, 1999; ENGELMANN e ENGELS, 2002; SANTOS, 2000).

Por outro lado, a erosão genética tem ocorrido também devido à substituição de cultivares domésticas e raças locais (“landraces”), selecionadas por agricultores e povos indígenas devido a seu valor nutricional, alta produtividade ou resistência a doenças e estresses ambientais, por cultivares melhoradas que possuem diversidade genética mais restrita (SAKAI, 2002). A conservação de germoplasma como uma atividade científica foi proposta nos anos 70 para prevenção desta erosão genética e para o melhoramento da produtividade agrícola (ENGELMANN e ENGELS, 2002). A conservação de germoplasma de raças locais, cultivares domésticas e parentes silvestres de espécies agronômicas tem sido uma das mais importantes áreas de pesquisa na Botânica desde então. Seu principal objetivo é o desenvolvimento de técnicas para a conservação a longo prazo da variabilidade genética de espécies vegetais com a máxima integridade genética e biológica possível (SAKAI, 2002; SANTOS, 2000; ABDELNOUR, 1999).

Existem duas estratégias básicas de conservação: conservação *in situ* e *ex situ* (CGIAR, 1993). Conservação *in situ* refere-se à manutenção das espécies selecionadas no seu habitat natural em parques, reservas biológicas ou reservas ecológicas. Conservação *ex situ* é a conservação de espécies vegetais fora do seu ambiente natural, através de coleções de plantas no campo, de sementes em bancos de sementes, ou de coleções de plântulas em bancos *in vitro*.

Entre os métodos de conservação *ex situ*, o armazenamento de sementes, se tem mostrado como o mais eficaz. As sementes são, em geral, de pequeno tamanho, possuem constituições genéticas diferentes e, de forma natural, são capazes de manter-se viáveis durante longos períodos de tempo. Além disso, se forem mantidas com um baixo teor de água, a baixas temperaturas, teoricamente, o período de conservação se incrementa a centenas ou milhares de anos (ALMEIDA *et al.*, 2000; ROBERTS, 1973).

Os estudos de armazenamento de sementes provaram que vários fatores influenciam no comportamento das sementes durante o armazenamento, tais como: a qualidade fisiológica inicial das sementes (viabilidade e vigor), o teor de água, a temperatura, condições de secagem, beneficiamento inapropriado, umidade relativa do ar, colheita imprópria, entre outros (WETZEL *et al.*, 2003); ou seja, o conjunto de atributos que determinam o nível de qualidade de um determinado lote de sementes (FREITAS *et al.*, 2000).

As sementes de algodão, ricas em óleo (25 – 40%), exigem cuidados especiais durante o período de conservação, para que mantenham sua qualidade. Entretanto, mesmo havendo cuidados durante o armazenamento, a deterioração ocorre em velocidade e intensidades variáveis, de acordo com o estado fisiológico das sementes e com as condições ambientais (FREITAS *et al.* 2000).

O potencial de conservação das sementes é determinado pela velocidade do processo de deterioração e pode ser variável entre diferentes lotes da mesma espécie e mesma cultivar, armazenadas sob as mesmas condições (FREITAS *et al.* 2000).

A conservação de sementes em nitrogênio líquido oferece inúmeras vantagens e se destaca sobre os demais métodos de conservação por garantir preservação indefinida do germoplasma armazenado (MEDEIROS *et al.*, 1992). Muitos outros autores relatam que o uso de nitrogênio líquido a -196°C tem sido recomendado como meio de conservação potencial para germoplasma – semente a longo prazo - visto que as atividades bioquímicas que eventualmente resultam em danos às células e em declínio na viabilidade das sementes, presumivelmente, poderiam ser inibidas na temperatura do nitrogênio líquido (MEDEIROS *et al.* 1992).

A semente é a forma pela qual a planta sobrevive o máximo de tempo com o mínimo de atividade fisiológica. Na conservação de sementes, deve-se prestar atenção às características fisiológicas que afetam a longevidade de cada espécie quando submetidas a baixos níveis de umidade e temperatura abaixo de zero. Segundo Roberts (1973) as sementes são classificadas como ortodoxas quando são capazes de manter a sua viabilidade

após serem desidratadas e expostas a baixas temperaturas e são recalcitrantes quando não suportam desidratação e baixas temperaturas de armazenamento. Segundo Ellis *et al.* (1990), através de novos estudos, surgiu o conceito de comportamento “intermediário”, ou seja, que são sensíveis ou a desidratação ou a temperaturas baixas.

O estabelecimento de um protocolo, ou seja, o conjunto de instruções, padrões e especificações que regem a técnica de crioconservação de sementes, está condicionado ao conhecimento de suas propriedades físicas e químicas e da determinação do conteúdo de água ideal, bem como das taxas apropriadas de congelamento e descongelamento (SALOMÃO *et al.* 2002). Tais fatores são espécie-específicos e requerem estudos e avaliações para cada espécie (POTTS e LUMPKIN, 1997).

O descongelamento é uma operação fundamental para evitar a perda de qualidade dos produtos congelados antes de seu emprego ou consumo. O tempo requerido para isso geralmente é superior ao necessário para o congelamento, devido às diferenças de condutividade e de difusividade térmica da água e do gelo e à impossibilidade de aplicar elevado gradiente de temperatura (PEREDA *et al.*, 2005).

Pita Villamil (1997), salienta que, em um banco de germoplasma a baixas temperaturas, não só o processo de crioconservação deve ser levado em consideração, mas também o processo de descongelamento, pois segundo o autor tanto a velocidade de congelamento quanto a de descongelamento influem no percentual de germinação e quanto mais rápido ocorrer o descongelamento das sementes, melhor deve ser a preservação de suas características fisiológicas. Desta forma, durante o descongelamento das sementes, quando destinadas à multiplicação genética, o método de descongelamento lento (temperatura ambiente) se torna questionável, uma vez que existe a possibilidade de ocorrer um *recongelamento* durante este período, necessitando, desta forma, de estudos em relação a outros métodos mais rápidos, como o descongelamento em banho termostático (temperatura em torno de 40°C) ou a utilização de microondas.

Ainda de acordo com Pita Villamil (1997), em alguns bancos criogênicos, como os da Universidade Politécnica de Madrid tem-se utilizado o banho termostatizado a 40°C com sucesso, para o descongelamento das sementes. Diniz *et al.* (1999), relatam a utilização do microondas em descongelamento de sementes de milho de quatro variedades crioconservadas a -196°C. Segundo os autores, que testaram ainda os métodos mais convencionais (temperatura ambiente e banho termostatizado), o uso do microondas não diferiu em alguns casos, dos outros métodos, produzindo valores de germinação e vigor compatíveis com estes.

Apesar de proporcionar, nos materiais vegetais, tais como as sementes, uma conservação quase que infinita, e de ser considerado um dos métodos mais suaves de conservação, o congelamento, segundo Pereda *et al.*, (2005), sempre podem afetar em certo grau as características dos produtos congelados. De fato, ainda segundo os autores, essa é a principal causa da diminuição da qualidade dos produtos congelados. A magnitude desse dano depende, em grande parte, da velocidade de congelamento e características do produto, e da conseqüente formação de cristais de gelo. O número, tamanho e a forma desses cristais dependem da velocidade de resfriamento, sendo responsáveis por algumas das modificações que se produzem nos produtos congelados.

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo, estudar as alterações que ocorrem na viabilidade e no vigor de sementes de duas cultivares de algodão colorido (BRS 200 Marrom e BRS Verde) quando essas sementes são submetidas à conservação em temperaturas sub zero (-25, -170 e -196°C), por um período de tempo de 12 meses, e descongeladas por diferentes métodos: temperatura ambiente, banho termostatizado a 40°C e em aparelho de microondas.

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Setor de Criogenia do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas da Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, Campus I em Campina Grande, PB, e também

no Laboratório de Sementes, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal da Paraíba, Campus II, Areia, PB.

Para a execução do trabalho foram utilizadas duas variedades de sementes (Figura 19) de algodão de pluma colorida (BRS 200 Marrom e BRS Verde), cedidas pela Embrapa Algodão, localizada em Campina Grande-PB.



FIGURA 19 – Sementes das duas cultivares de algodão utilizadas no experimento. (a) cv BRS 200 Marrom; (b) cv BRS Verde.

Inicialmente as sementes foram secas em uma cabina de secagem contendo como agente dessecante sílica gel (Figura 20), até atingirem o teor de água de 8% base úmida, valor este recomendado através do teor de água limite para a crioconservação, determinado no Capítulo 1, do presente estudo.

Posteriormente, as sementes com 8%b.u., foram colocadas dentro de tubos cilíndricos (canisters) e imersas em nitrogênio líquido (N_2L) e em vapor de nitrogênio, acondicionados em botijões criogênicos (Figura 21), a temperaturas de -196 C e -170°C , respectivamente, durante um período de 360 dias. As sementes foram também acondicionadas em papel alumínio e submetidas à temperatura de -20°C pelo mesmo período.



FIGURA 20 – Cabina de secagem contendo sílica gel como dessecante (última bandeja).



FIGURA 21 – Botijão criogênico, onde se pode ver na parte superior os canisters.

A cada período de tempo pré-estabelecido para avaliação das sementes crioconservadas (60, 120, 180, 240, 300 e 360 dias), as sementes foram submetidas a 3 métodos de descongelamento:

- a) descongelamento lento; consistiu no descongelamento à temperatura ambiente de $27\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante tempo suficiente para que as sementes fossem totalmente descongeladas;
- b) descongelamento em banho-termostatizado; que consistiu no descongelamento das sementes a uma temperatura de 40°C controlada por um banho termostatizado;
- c) descongelamento em microondas; que consistiu no descongelamento das sementes em microondas a uma potência de 70W durante 1 minuto (para as sementes à -20°C), 2 minutos e 30 segundos (para as sementes congeladas no vapor de nitrogênio) e 4 minutos (para aquelas sementes congeladas a -196°C). Neste método, realizava-se a cada 30 segundos de funcionamento do microondas, uma agitação do recipiente que continha as sementes, com o intuito de uniformizar a temperatura entre as sementes.

Antes e após a crioconservação, foram feitas análises da qualidade fisiológica que consistiu no teste de germinação e vigor das sementes, para cada variedade, seguindo-se as “Regras de Análise de Sementes” (BRASIL, 1992).

Para a determinação do percentual de germinação das sementes de algodão, foram utilizadas bandejas de plástico de 45 cm de comprimento por 30 cm de largura e 7cm de altura contendo substrato de areia, previamente passada em uma peneira 4 de malha fina (No 16-ABNT) e esterilizada em autoclave a 135°C por 12 horas. A areia foi umedecida com água destilada sendo repostada à medida que o substrato era ressecado pelo ar ambiente. Para cada determinação foram utilizadas duas bandejas com duas repetições contendo cada uma 50 sementes. A percentagem de germinação foi obtida pela contagem das plântulas saudáveis, emersas do quarto até o décimo segundo dia da realização do teste. O vigor foi determinado, após a finalização do teste de germinação, através da medição das plântulas normais, ao final do teste de germinação.

O delineamento experimental utilizado neste trabalho foi inteiramente casualizado com arranjo fatorial $3 \times 3 \times 7$ (3 temperaturas \times 3 métodos de descongelamento \times 7 períodos de armazenagem: 0, 60, 120, 180, 240, 300, 360 dias) com quatro repetições.

Optou-se por analisar individualmente cada cultivar utilizada, com o intuito de facilitar a interpretação dos resultados, já que se incluíssemos o fator cultivar teríamos um fatorial de 4. As análises de variância foram procedidas pelo programa computacional ASSISTAT (SILVA, 1996). As médias dos fatores foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade (SANTANA e RANAL, 2004). As equações de regressão não linear foram obtidas, utilizando o programa STATISTICA versão 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sínteses da análise de variância da germinação e vigor de cada cultivar são mostrados na Tabela 4.

Os resultados da análise de variância para a germinação das sementes da cultivar BRS-200 Marrom (Tabela 4) indicam efeito significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F para todos os fatores estudados e suas interações, exceto para a interação períodos de armazenamento x método de descongelamento, a qual foi significativa a 1% de probabilidade. Nas outras interações não houve significância. Já com relação a cultivar BRS Verde, a análise de variância apresentada na Tabela 4, evidencia efeito significativo ao nível de 5% probabilidade para o fator temperatura e suas interações com períodos de armazenamento e métodos de descongelamento. O fator períodos de armazenamento apresentou significância de 1% de probabilidade pelo teste F.

Os resultados médios das alterações da germinação e vigor das duas cultivares (BRS-200 Marrom e BRS Verde) de sementes de algodão colorido a um teor de água de 8%b.u., quando submetidas à técnica de crioconservação, por imersão das sementes em nitrogênio líquido e em vapor de nitrogênio, e na temperatura de -20°C, como também a influência dos períodos de armazenamento (0, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 dias) e das técnicas utilizadas para o descongelamento (temperatura ambiente, banho-maria termostatizado e microondas) são mostrados nas Tabelas 5 e 6 (avaliação da germinação, através do teste de germinação, e vigor, avaliado pela medição do comprimentos das plântulas normais).

TABELA 4 – Síntese da análise de variância da germinação e vigor das sementes de algodão colorido das duas cultivares.

FV	GL	Cultivar			
		BRS 200 Marrom		BRS Verde	
		Germinação (SQ) ¹	Vigor (SQ)	Germinação (SQ)	Vigor (SQ)
Período de armazenamento (F1)	6	61034,55**	782,64**	100240,95**	1035,81**
Temperatura de armazenamento (F2)	2	3232,67**	3,46ns	208,89*	11,22**
Método de descongelamento (F3)	2	367,36**	24,77**	164,54ns	17,95**
Interação F1xF2	12	2841,34**	45,12**	686,59*	46,32**
Interação F1xF3	12	1011,31*	4,20**	501,45ns	43,10**
Interação F2xF3	4	242,05ns	10,41**	358,63*	8,61*
Resíduo	189	7074,50	143,47	5609,94	153,77
Total	251	76650,71	1130,72	108852,92	1401,65

¹ SQ = soma dos quadrados; * = Significativo ao nível de 5% de probabilidade; ** Significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns = não significativo.

Constata-se nas Tabelas 5 e 6 que, ambas as cultivares apresentaram um melhor nível de germinação quando ainda não armazenadas, ou seja, no período de armazenamento zero ou inicial. Vale salientar que os percentuais de germinação e os valores do vigor, para ambas as cultivares, no ponto zero (ou seja quando ainda não crioconservadas) foram obtidos com um teor de água ajustado para 8% b.u.. A partir da primeira avaliação (60 dias), ambas as cultivares já iniciaram um decréscimo na germinação, bastante acentuado aos 180 dias na cultivar verde. Apesar de também experimentar este decréscimo no seu percentual de germinação as sementes da cultivar marrom chegaram aos 300 dias de armazenamento ainda com mais de 50% de germinação (aproximadamente 60% da germinação no período zero).

Com relação ao vigor, medido pelo comprimento do hipocótilo das plântulas, observa-se que, para ambas as cultivares, estabeleceu-se um marco divisório aos 180 dias, quando as plântulas experimentaram os maiores valores de comprimento, sendo a partir daí, a exemplo da germinação um decréscimo constante. Chandel *et al.*, (1995), caracterizaram tal situação, ou seja, perda de germinação e vigor, à injúria das sementes pelo frio, e segundo os autores depende da espécie e do período de crioconservação.

González-Benito *et al.*, (1998), investigando o efeito da crioconservação em sementes de cinco cultivares de algodão (CNPA 4M, CNPA 5M, CNPA Precoce 1, CNPA Precoce 2, Coker 312), constataram que para as cultivares CNPA 4M, CNPA Precoce 1 e Coker 312, não houve efeito significativo da imersão em nitrogênio líquido e/ou dessecação na germinação. As sementes não-dessecadas e congeladas das cultivares CNPA 5M, 4M, Precoce 1 e Cooker 312 não tiveram sua germinação reduzida significativamente em comparação com as sementes controle, relatam ainda os autores. Contudo, a crioconservação teve um efeito negativo na germinação de sementes com teores de água altos (15,6% na cultivar CNPA Precoce 2). As cultivares CNPA 5M e Precoce 2, mostraram-se sensíveis à dessecação mas, quando dessecadas e imersas em nitrogênio líquido, observou-se segundo os autores, um incremento no índice de germinação, tal que as porcentagens finais não eram significativamente diferentes das sementes controle.

Lacerda *et al.*, (2002) trabalhando com sementes crioconservadas de pau-ferro (*Caesalpineae ferrea* Mart.), durante 105 dias verificou que estas sementes, quando crioarmazenada em nitrogênio líquido, mantiveram sua viabilidade e vigor pelo período estudado. Também Iriondo *et al.*, (1992), testando a influência da crioconservação em sementes de diversas espécies importantes (aveia, arroz, etc) e selvagens constataram que na maioria das espécies nenhuma diferença significativa foi detectada entre a porcentagem de germinação de amostras de semente com conteúdos de água diferentes, nem entre amostras de semente com tempo de exposição ao nitrogênio líquido diferentes.

TABELA 5 – Valores médios da germinação e vigor das sementes de algodão das cultivares BRS 200 Marrom, para os fatores período de armazenamento, temperaturas de armazenamento e métodos de descongelamento.¹

Período de Armazenamento (dias)	Germinação (%)	Comprimento de hipocótilo (cm)
0	90,03 a	11,09 b
60	79,00 b	11,07 b
120	67,61 c	10,86 b
180	66,22 c	12,19 a
240	54,39 d	8,09 c
300	53,56 d	7,95 c
360	40,03 e	7,50 c

Temperatura de armazenamento (°C)	Germinação (%)	Comprimento de hipocótilo (cm)
-20	59,38 b	9,99 a
-170	66,36 a	9,73 a
-196	67,48 a	9,75 a

Método de descongelamento	Germinação (%)	Comprimento de hipocótilo (cm)
Temperatura ambiente	65,99 a	10,13 a
Banho-maria	64,17 ab	9,95 a
Microondas	63,06 b	9,39 b

¹ Nas colunas, as médias seguidas da mesma letra, dentro de cada fator, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Quanto à temperatura de armazenamento, constata-se que as temperaturas de nitrogênio líquido (-196°C) e de sua fase de vapor (-170°C), proporcionaram as melhores médias de germinação, em ambas as cultivares. Já com relação ao vigor, para a cultivar marrom não houve influência do fator temperatura, ou seja, poder-se-ia utilizar qualquer das temperaturas para o armazenamento. Inversamente, a melhor temperatura para se armazenar as sementes da cultivar verde seria a -20°C, embora as outras temperaturas também tenham produzido médias de comprimentos de plântulas bastante próximas à

temperatura de -20°C. Almeida *et al.*, (2002) num ensaio de crioconservação das sementes de duas cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.), com 6% de água, também obtiveram, a exemplo do presente trabalho, os melhores resultados para germinação à temperatura de -170 e -196°C.

TABELA 6 – Valores médios da germinação e vigor das sementes de algodão das cultivares BRS Verde, para os fatores período de armazenamento, temperaturas de armazenamento e métodos de descongelamento.¹

Período de Armazenamento (dias)	Germinação (%)	Comprimento de hipocótilo (cm)
0	87,79 a	12,03 bc
60	57,83 b	12,51 b
120	43,78 c	11,84 c
180	37,28 d	13,25 a
240	31,56 e	8,51 d
300	30,56 e	7,80 e
360	26,61 f	9,06 d
Temperatura de armazenamento (°C)	Germinação (%)	Comprimento de hipocótilo (cm)
-20	43,74 b	11,00 a
-170	45,79 a	10,52 b
-196	45,61 ab	10,62 b
Método de descongelamento	Germinação (%)	Comprimento de hipocótilo (cm)
Temperatura ambiente	45,99 a	11,03 a
Banho-maria	45,17 a	10,74 a
Microondas	44,02 a	10,38 b

¹ Nas colunas, as médias seguidas da mesma letra, dentro de cada fator, não diferem entre si, pelo Teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em relação ao fator método de descongelamento, verifica-se que para a cultivar marrom, os menores valores de germinação se relacionaram com a utilização do

microondas para a técnica de descongelamento. Mesmo na cultivar verde onde não se revelaram diferenças entre os métodos de descongelamento, o menor resultado também foi obtido com o uso do microondas. Estes resultados se reproduzem da mesma forma com relação ao vigor, medido pelo comprimento dos hipocótilos, em ambas as cultivares. Pereda *et al.*, (2005) procura explicar tal comportamento, sugerindo que o principal problema ao se utilizar este método de descongelamento, é a falta de homogeneidade dos produtos agrícolas (com partes congeladas e descongeladas) e da interação diferente das ondas eletromagnéticas com a água líquida e o gelo. Segundo os autores, devido a esse problema a zona descongelada poderia atuar como barreira, impedindo o descongelamento das partes internas. Estes resultados contrastam também com suposições feitas por Pita Villamil (1997), de que métodos mais rápidos de descongelamento se adaptam melhor à criopreservação, pois métodos lentos, segundo o autor, possibilitam o recongelamento das sementes.

Por outro lado, os resultados aqui obtidos encontram ressonância com àqueles obtidos por Diniz *et al.*, (1999), que trabalhando com sementes de milho de quatro variedades, obteve médias de germinação superiores utilizando-se do descongelamento à temperatura ambiente.

Na Tabela 7, estão as médias da interação para os fatores períodos de armazenamento e temperaturas de armazenamento da cultivar BRS-200 Marrom e da cultivar BRS Verde, nas variáveis germinação e vigor, este avaliado pelo comprimento de hipocótilos das plântulas normais.

Nesta tabela, analisando as médias de germinação da cultivar BRS Verde, percebe-se que à temperatura de -25°C , os melhores percentuais de germinação ocorreram no período zero (sem armazenamento), seguindo-se do período de 60 dias de armazenamento. Os períodos de 120 até 360 dias proporcionaram à cultivar BRS Verde as menores médias de germinação. De maneira geral, a cultivar verde foi mais sensível à duração do período de armazenamento criogênico, independentemente da temperatura, no que tange à sua viabilidade, demasiadamente afetada pelo período e temperaturas utilizadas no estudo,

apesar de não haverem diferença significativa no que tange aos períodos de armazenamento. Ao fim do armazenamento, a cultivar alcançou aproximadamente ¼ dos valores de germinação obtidos no início do estudo. Além disso, essa drástica diminuição se deu já a partir dos 180 dias de armazenamento, quando os percentuais de germinação chegaram a 40% daqueles do início, em todas as temperaturas de armazenamento, chegando de certa forma, a inviabilizar o armazenamento criogênico, para esta cultivar, pelo menos em períodos superiores a 120 dias.

TABELA 7 – Valores médios¹ do desdobramento da interação períodos de armazenamento versus temperaturas de armazenamento para a variável percentual de germinação das sementes das duas cultivares de algodão colorido.

Período de Armazenamento (dias)	Cultivares					
	BRS 200 Marrom			BRS Verde		
	Temperatura de armazenamento (°C)					
	-25	-170	-196	-25	-170	-196
0	87,92aA	91,17aA	91,00aA	57,08aA	88,83aA	87,46aA
60	78,83bA	79,5bA	78,67bA	57,67bA	55,33bA	60,50bA
120	67,83cA	68,83cA	66,17cdA	42,17cA	46,33cA	42,83cA
180	62,67cB	66,33cdAB	69,67cA	35,33dA	39,50dA	37,00cdA
240	44,00dB	57,67eA	61,50deA	33,17dA	30,67eA	30,83deA
300	43,33dB	59,83deA	57,50eA	25,83eB	32,83eA	33,00deA
360	31,08eC	41,17fB	47,83fA	25,17eA	27,00eA	27,68eA

¹ As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade. DMS colunas = 7,44; 6,63, cv marrom e cv verde, respectivamente (letras minúsculas); DMS linhas = 5,90; 5,25, cv marrom e cv verde, respectivamente (letras maiúsculas).

Por outro lado, apesar de apresentar um comportamento de queda no poder germinativo de suas sementes no transcorrer do armazenamento, as sementes da cultivar BRS 200 Marrom, chegaram ao fim do armazenamento com praticamente mais da metade do stand inicial em todas as temperaturas, exceção se faça a temperatura de -25°C que proporcionou uma redução mais acentuada do percentual de germinação. Freitas *et al.*, (2000) alega, na explicação desta diferença entre cultivares, que o potencial de conservação

das sementes é determinado pela velocidade do processo de deterioração e pode ser variável entre diferentes lotes da mesma espécie e mesma cultivar, armazenadas sob as mesmas condições.

Almeida *et al.*, (2002), verificaram um comportamento heterogeneamente semelhante, onde no período de crioconservação de sementes de mamona aos 30 dias, maior germinação, retornando esta ao nível inicial, aos 60 dias da crioconservação. De maneira inversa aos resultados do presente trabalho, Batista (2000) obteve para duas variedades de *Sesamum indicum*, maior porcentagem de germinação depois de 60 dias da sementes imersas em nitrogênio líquido, frente à germinação calculada aos 5 e 30 dias de crioconservação. Esta heterogeneidade também foi notada por Medeiros *et al.*, (2000) em ensaios de armazenamento a baixas e ultra baixas temperaturas com sementes de aroeira.

Na Tabela 8, que confronta os períodos de armazenamento com os métodos de descongelamento, para a germinação das sementes da variedade BRS 200 Marrom, vê-se que os métodos de descongelamento produziram médias de germinação bastante próximas, equiparando-se. Percebe-se também que, no decorrer do armazenamento houve um decréscimo gradual das médias de germinação, independentemente do método de descongelamento.

Estes resultados não concordam com as afirmações de Pita Villamil (1997) segundo o qual os métodos de descongelamento rápidos produziriam melhores resultados, devido ao fato destes métodos não possibilitarem o fenômeno do recongelamento, altamente prejudicial à viabilidade e ao vigor das sementes.

TABELA 8 - Valores médios¹ do desdobramento da interação períodos de armazenamento versus método de descongelamento para a variável percentual de germinação das sementes da cultivar BRS 200 Marrom de algodão colorido.

Período de Armazenamento (dias)	Método de descongelamento		
	Temperatura Ambiente	Banho-maria	Microondas
0	89,75 aA	90,33 aA	90,00 aA
60	82,33 aA	81,33 bA	73,33 bB
120	72,00 bA	66,50 cAB	64,33 cB
180	67,83 bA	63,83 cA	67,00 bcA
240	53,50 cA	54,17 dA	55,50 dA
300	53,00 cA	55,33 dA	52,33 dA
360	43,50 dA	37,67 eA	38,92 eA

¹ As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade. DMS colunas = 7,44 (letras minúsculas); DMS linhas = 5,90 (letras maiúsculas).

As sementes da cultivar BRS Verde, ao contrário da cultivar marrom, sofreram influência da temperatura de armazenamento quando do momento da aplicação do método de descongelamento, como pode ser visto na Tabela 9. Vê-se nesta tabela, que os resultados de germinação foram significativamente iguais quando se utilizou o descongelamento à temperatura ambiente ou com o uso do microondas. Mas, se observarmos o fator temperatura, não se constata diferenças entre os métodos, a não ser quando da utilização do microondas no descongelamento das sementes a -170°C. Este comportamento distinto também foi observado por Diniz *et al.*, (1999), que salientaram a influência dos métodos de descongelamento sobre a germinação de sementes de milho, como ainda que os métodos diferem entre si de uma maneira genérica. Salomão *et al.*, (2002) testando a possibilidade de crioconservar sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr (Caesalpinaceae), observaram que o descongelamento lento tiveram efeito favorável sobre a germinação das sementes, o que, de certa forma, não constatado neste trabalho.

TABELA 9 - Valores médios¹ do desdobramento da interação temperaturas de armazenamento versus método de descongelamento para a variável percentual de germinação das sementes da cultivar BRS Verde de algodão colorido.

Temperatura de Armazenamento (°C)	Método de descongelamento		
	Temperatura Ambiente	Banho-maria	Microondas
-25	44,89 aA	43,30 bA	43,12 aA
-170	45,91 aAB	48,16 aA	43,29 aB
-196	47,16 aA	44,03 bA	45,64 aA

¹ As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade. DMS colunas = 3,43 (letras minúsculas); DMS linhas = 3,43 (letras maiúsculas).

Stanwood (1980) testando a tolerância de sementes de diversas espécies obteve valores significativamente distintos entre si e observou que a extensão do tempo de exposição ao nitrogênio líquido aumentou na maioria dos casos o percentual de germinação. Em outros casos, diferentemente e a exemplo do presente trabalho, houve diminuição expressiva do percentual de germinação.

Os resultados obtidos para o vigor das sementes das duas cultivares (Tabelas 10, 11 e 12), através do uso da avaliação de plântulas (comprimento de hipocótilo), revelam sobretudo a influência do período de armazenamento sobre o vigor das sementes. Da observação da Tabela 10, depreende-se que, para a cv marrom, houve ao longo do período de armazenamento, uma certa similaridade dos resultados obtidos, em todas as temperaturas. Esta situação também ocorre também para a cv verde.

Se tomarmos, no entanto, o fator temperatura de armazenamento, notam-se comportamentos bem distintos. Para as três temperaturas e ambas as cultivares, observa-se que até os 180 dias não se percebem grandes diferenças absolutas, e até mesmo a níveis de significância, dos valores do vigor. Só a partir dos 240 dias, e também para as duas cultivares e todas as temperaturas, ocorrem diferenças significativas, mais acontecem ainda níveis de oscilação (aumenta e diminui) nos resultados. Almeida *et al.*, (2002), também obtiveram a similaridade anotada anteriormente. No entanto, apesar de atestar a oscilação

de resultados, esta se apresentou mais sutil. Em seu estudo, Diniz *et al.*, (1999) não salientaram este comportamento. De maneira geral, os autores relataram que os valores encontrados para o vigor das sementes das diversas cultivares de milho perdem um percentual significativo até os 30 dias, experimentando a partir daí a manutenção da qualidade fisiológica das sementes.

TABELA 10 - Valores médios¹ do desdobramento da interação períodos de armazenamento versus temperaturas de armazenamento, para a variável comprimento de hipocótilo das plântulas da cultivar BRS Verde de algodão colorido.

Período de Armazenamento (dias)	Cultivares					
	BRS 200 Marrom			BRS Verde		
	Temperatura de armazenamento (°C)					
	-25	-170	-196	-25	-170	-196
0	10,95bA	11,21aA	11,11abA	12,80aA	11,46bB	11,85bcB
60	11,30bA	11,05aA	10,86bA	12,88aA	11,86bB	12,79abA
120	10,93bA	11,16aA	10,49bA	12,23aA	11,94bA	11,37cA
180	13,13aA	11,31aB	12,13aB	12,72aB	13,53aAB	13,88aA
240	8,25cA	8,31bA	7,73cdA	8,77bcA	8,98cA	7,77dB
300	8,27cA	7,02cB	8,56cA	8,27cA	7,02dB	8,11dA
360	7,08dB	8,04bcA	7,38dAB	9,40bA	9,23cA	8,57dA

¹ As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade. DMS colunas = 1,06; 1,09, cv marrom e cv verde, respectivamente (letras minúsculas); DMS linhas = 0,84; 0,87, cv marrom e cv verde, respectivamente (letras maiúsculas).

Dos resultados da Tabela 11, que contém a interação período de armazenamento versus método de descongelamento, percebe-se, de maneira geral que ao isolar-se o fator período de armazenamento, não há diferenças significativas quanto ao método de descongelamento que se utiliza para descongelar as sementes de ambas as cultivares. Apenas em casos isolados, principalmente quanto ao microondas, ocorrem diferenças significativas, aos 300 dias de armazenamento. Esta situação tão adversa da maior parte dos resultados pode dever-se, provavelmente, a um aquecimento maior imposto às sementes no

ato de descongelar. Esta equivalência dos métodos de descongelamento ao longo dos períodos de armazenamento, também foi relatada por Diniz *et al.*, (1999).

Se considerarmos, no entanto os métodos de descongelamento particularmente, observamos o que foi preconizado por Stanwood e Bass (1981) e também por Salomão *et al.*, (2002), ou seja, que de maneira geral os melhores resultados seriam alcançados pelos métodos de descongelamento lentos.

TABELA 11 - Valores médios¹ do desdobramento da interação períodos de armazenamento versus método de descongelamento para a variável comprimento de hipocótilo das plântulas das cultivares BRS 200 Marrom e BRS Verde de algodão colorido.

Período de Armazenamento (dias)	Cultivares					
	BRS 200 Marrom			BRS Verde		
	Método de descongelamento*					
	TA	BM	MO	TA	BM	MO
0	11,00bA	11,30bA	10,97aA	12,36aA	12,20bA	11,54bA
60	11,26bA	11,15bA	10,80aA	12,86aA	12,57abA	12,10abA
120	11,15bA	11,12bAB	10,31aB	12,63aA	11,05cB	11,85bAb
180	12,93aA	12,36aA	11,29aB	13,15aA	13,55aA	13,06aA
240	8,01dA	8,20cA	8,07bA	8,44bA	8,47dA	8,61cA
300	9,17cA	8,27cB	6,40cC	8,72bA	8,27dA	6,40dB
360	7,36dA	7,26cA	7,89bA	9,046bA	9,07dA	9,08cA

¹ As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade. DMS colunas = 1,06; 1,09, cv marrom e cv verde, respectivamente (letras minúsculas); DMS linhas = 0,84; 0,87, cv marrom e cv verde, respectivamente (letras maiúsculas); *TA = temperatura ambiente; BM = banho-maria; MO = microondas.

Da Tabela 12, constata-se mais uma vez, que os métodos de descongelamento a temperatura ambiente e através do uso do banho-maria, favorecem a qualidade fisiológica das sementes, por alcançarem quando da utilização destes métodos os melhores resultados de vigor, nas três temperaturas e em ambas as cultivares de sementes de algodão.

Para o fator de variação temperatura de armazenamento, os valores encontrados foram significativamente diferenciados. Destaque-se que as sementes de ambas as cultivares, congeladas a temperatura de -25°C , podem ser descongeladas por qualquer dos métodos sem que haja diferença significativa entre os métodos, exceto pela utilização do microondas, na cv marrom.

Nas temperaturas de -170 e -196°C , sobressai-se outra vez, o método de descongelamento à temperatura ambiente (lento), produzindo os maiores valores para o vigor das sementes das duas cultivares.

TABELA 12 - Valores médios¹ do desdobramento da interação temperaturas de armazenamento versus método de descongelamento para a variável comprimento de hipocótilo das plântulas das cultivares BRS 200 Marrom e BRS Verde de algodão colorido.

Temperatura de Armazenamento ($^{\circ}\text{C}$)	Cultivares					
	BRS 200 Marrom			BRS Verde		
	Método de descongelamento					
	TA	BM	MO	TA	BM	MO
-25	10,14aA	10,48aA	9,34aB	11,04aA	11,01aA	10,97aA
-170	10,19aA	9,52bB	9,47aB	11,09aA	10,44bB	10,03bB
-196	10,96aA	10,77abA	10,13bB	12,63aA	11,05cB	11,85bAb

¹ As médias seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, em 5% de probabilidade. DMS colunas = 0,55; 0,57, cv marrom e cv verde, respectivamente (letras minúsculas); DMS linhas = 0,55; 0,57, cv marrom e cv verde, respectivamente (letras maiúsculas). *TA = temperatura ambiente; BM = banho-maria; MO = microondas.

CONCLUSÕES

- A germinação e o vigor das sementes da cultivar BRS 200 Marrom, são afetados negativamente pela utilização da criopreservação, experimentando um decréscimo nestes valores, com o decorrer do armazenamento;
- A cultivar BRS Verde foi mais sensível à criopreservação, apresentando um decréscimo considerável nos valores de germinação e vigor, já a partir dos 180 dias, sem que houvesse uma estabilização destes valores;
- As melhores médias de germinação para o fator temperatura de armazenamento foram obtidas nas temperaturas de -170 e -196°C; já para o vigor houve uma igualdade nos resultados obtidos nas três temperaturas;
- Os métodos de descongelamento temperatura ambiente (27°C±3°C) e banho-maria a 40°C produziram os maiores valores de germinação e vigor em ambas as cultivares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELNOUR, A. Criopreservacion de plantas, estado actual de la investigacion em Costa Rica. **Agronomia Costarricense**, San José, Costa Rica, v. 23, n. 2, p. 205-214, 1999.
- ALMEIDA, F. de A.C.; MORAIS, A.M. de; CARVALHO, J.M.F.C.; GOUVEIA, J.P.G. de. Criopreservação de sementes de mamona das variedades nordestina e pernambucana. **Revista Bras. de Eng. Agríc. e Ambiental**, Campina Grande – PB, v. 6, n.2, p.295-302, 2002
- BATISTA, R.C. **Cultivo *in vitro* e criopreservação de sementes de gergelim (*Sesamum indicum* L.)**. 83p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola), Departamento de Engenharia Agrícola. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande – PB, 2000.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. **Regras para análise de sementes**. Brasília. 1992. 365p.

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

CGIAR (Consultive Group on International Agricultural Research) **People and plants: the development agenda**. Rome, IBPGR, 1993. Available in: <http://www.ipgri.org>.

DINIZ, P.S.C.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; BRAGA, M.E.D. Influência das técnicas de descongelamento na qualidade fisiológica de sementes de milho crioconservadas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande – PB, v. 1, n.1, p.1-12, 1999.

ELLIS, R.H.; HOMG, T.D.; ROBERTS, E.H. An intermediate category of seed storage behaviour. I. Cofee. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 41, p. 1167-1174, 1990.

ENGELMANN, F.; ENGELS, J.M.M. Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In: ENGELS, J.M.M.; RAO, V.R.; BROWN, A.H.D.; JACKSON, M.T. (Eds.) **Managing Plant Genetic Diversity**, Cap. 9, International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 89-103, 2002.

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

GONZÁLEZ-BENITO, M.E.; CARVALHO, J.M.F.C.; PÉREZ,C. Effect of desiccation and cryopreservation on the germination of embryonic axes and seeds of cotton. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília – DF, v.33, n.1, p. 25-28, 1998.

HOR, Y.L.; KIM, Y.J.; UGAP, A.; CHABRILLANGE, N.; SINNIH, U.R.; ENGELMANN, F.; DUSSERT, S. Optimal hydration status for cryopreservation of intermediate oily seeds: *Citrus* as case study. **Annals of Botany**, London, v. 95, p. 1153-1161, 2005.

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

LACERDA, S.N.B.; CAVALCANTI MATA, M.E.R.M.; BRAGA,M.E.D.; SILVA, F.de A. S. e. Estudo comparativo da crioarmazenagem de sementes de pau-ferro (*Caesalpiniae ferrea* Mart.) com as técnicas convencionais de armazenagem. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande – PB, v.4, n.1, p.7-14, 2002.

MEDEIROS, A.C. de S.; CZARNESKI,C.M.; FREITAS, G.F. de. Crioconservação de sementes de aroeira (*Astronium urundeuva* (FR. ALL.) Engl.). In: CONGRESSO NACIONAL SOBRE ESSÊNCIAS NATIVAS, 2, São Paulo, 1992, **Resumos**. São Paulo: Secretaria de Meio Ambiente/Instituto Florestal, 1992. p.544-547.

MEDEIROS, A.C. de S; SMITH, R.; PROBERT, R.; SADER, R. Comportamento fisiológico de sementes de aroeira (*Myracrodruon urundeuva* Fr. All.). **Bol. Pesq. Fl. Colombo**, Colombo – PR, n. 40, p. 85-98, 2000.

PEREDA, J.A.O.; RODRIGUEZ,L.F.; SANZ,M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L. de la H.; CORTECERO,M.D.S. **Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos**. Vol. 1, Porto Alegre: Artmed, 2005. 294p.

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

PITA, J.M.; BARRERO, S.; ESCUDERO, A. Cryopreservation: na alternative method for the conservation of endangered populations of two iberian pines (*Pinus nigra* ARNOLD and *Pinus sylvestris* L.). **Silvae Genetica**, Frankfurt, Germany, v. 46, n.4, p.250-252, 1997.

POPOVA, E.V.; NIKISHINA, T.V.; KOLOMEITSEVA, G.L.; POPOV, A.S. The effect of seed cryopreservation on the development of protocorms by the hybrid orchid *Bratonia*. **Russian J. of Plant Physiol.**, Moscow, V. 50, n. 5, p. 672-677, 2003.

POTTS,S.E.; LUMPKIN,T.A. Cryopreservation of *Wasabia* spp. **Cryo-Letters**, London, v. 18, p.185-190, 1997.

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

SAKAI, A. Development of cryopreservation techniques. In: ENGELMANN, F. and TAKAGI, H. (Eds.) **Cryopreservation of Tropical Plant Germplasm – Keynotes**. Japan International Centre for Agricultural Sciences, Tsukuba/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, p. 1-7, 2002.

SALOMÃO, A.N.; SANTOS, I.R.I.; MUNDIM, R.C. Estabelecimento de método para congelamento e descongelamento de sementes de *Apuleia leiocarpa* (Vog.) Macbr (Caesalpinaceae), **Circular Técnica**, Brasília, n.19, p. 1.-3, set. 2002.

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

SANTOS, I.R.I. Crioconservação: potencial e perspectivas para a conservação de germoplasma vegetal. **R. Bras. Fisiol. Veg.**, Londrina – PR, v.12, n. especial, p. 70-84, 2000.

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

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

STANWOOD, P.C.; BASS, L.N. Seed germplasm preservation using liquid nitrogen. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 9, p.423-437, 1981.

THEILADE, I.; PETRI, L. Conservation of tropical trees *ex situ* through storage and use. **Guidellines and Technical Notes**, n.65, Danida Forest Seed Centre, Humlebaek, Denmark, 15p. 2003.

WETZEL, M.M.V.S; REIS, R.B.; RAMOS, K.M. Metodologia para crioconservação de sementes de espécies florestais nativas. **Circular Técnica**, Brasília – DF, n. 26, p. 1-5, set. 2003, 5p.

ZHENG, G.H.; JING, X.M.; TAO, K.L. Ultradry seed storage cuts cost of gene bank. **Nature**, London, v.393, p. 223-224, 1998.

CAPÍTULO 4

CAPÍTULO 4

POSSIBILIDADE DE DEGRADAÇÃO DOS COMPONENTES QUÍMICOS DE RESERVA DURANTE A CRIOARMazenAGEM.

RESUMO

A deterioração das sementes envolve uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e físicas que, eventualmente, causam a perda de viabilidade e até a morte das sementes. Dentre as principais alterações envolvidas, destacam-se, o esgotamento das reservas alimentares, a alteração da composição química, como a oxidação dos lipídios e a quebra parcial das proteínas. Por outro lado, a longevidade das sementes é bastante influenciada pelas condições de armazenamento, sobretudo pelo teor de água e pela temperatura do armazenamento. Assim buscou-se com o presente trabalho, avaliar o efeito da crioconservação por um período de doze meses na composição química centesimal de sementes de duas cultivares de algodão colorido (BRS 200 Marrom e BRS Verde), congeladas a -25, -170 e -196°C e descongeladas por três métodos (temperatura ambiente, banho-maria termostatizado a 40°C e microondas regulado a 20% da potência máxima). Os resultados obtidos permitem concluir que as sementes das duas cultivares tem composição química similares e que de maneira geral houve uma diminuição das concentrações dos componentes químicos de reserva no decorrer do armazenamento, com exceção dos minerais.

PALAVRAS-CHAVE: deterioração, longevidade, crioconservação, descongelamento,

DEGRADATION POSSIBILITY OF CHEMICAL RESERVATION COMPONENTS DURING CRYOSTORAGE.

ABSTRACT

The deterioration of the seeds involves a series of physiologic, biochemistries and physics alterations that, eventually, cause the viability loss and to the death of the seeds. Among the main involved alterations, they stand out, the exhaustion of the alimentary reservations, the alteration of the chemical composition, as the oxidation of the lipids and the partial break of the proteins. On the other hand, the longevity of the seeds is quite influenced by the storage conditions, above all for the moisture content and for the temperature of the storage. It was looked for like this with the present work, to evaluate the effect of the cryoconservation for a period of twelve months in the centesimal chemical composition of seeds of two cultivate of colored cotton (BRS 200 Brown and BRS Green), frozen to -25, -170 and -196°C and thawed by three methods (room temperature, thermostat bath at 40 °C and microwaves regulated to 20% of the maximum potency). The obtained results allow to conclude that the seeds of the two cultivate has similar chemical composition and that in a general way there was a decrease of the concentrations in chemical reservation components in elapsing of the storage, except for the minerals.

KEYWORDS: deterioration, longevity, cryoconservation, defrosting.

INTRODUÇÃO

O armazenamento das sementes deve ser iniciado na maturidade fisiológica, e o maior desafio é conseguir que as sementes, após um certo período, ainda apresentem elevada qualidade fisiológica. Assim sendo, o objetivo é manter a qualidade das sementes durante o período em que ficam armazenadas, visto que seu melhoramento não é possível mesmo sob condições ideais.

A deterioração das sementes envolve uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e físicas que, eventualmente, causam a morte das sementes. As alterações são progressivas e determinadas por fatores genéticos, bióticos e abióticos (clima, insetos e microrganismos), procedimentos de colheita, de secagem, de beneficiamento, de manuseio e de armazenamento (VILLELA e PERES, 2004).

Dentre as principais alterações envolvidas na deterioração das sementes, destacam-se, segundo Villela e Peres (2004), o esgotamento das reservas alimentares, a alteração da composição química, como a oxidação dos lipídeos e a quebra parcial das proteínas, a alteração das membranas celulares, com redução da integridade, aumento da permeabilidade e desorganização, as alterações enzimáticas e alterações de nucleotídeos. Ainda de acordo os mesmos autores, a longevidade das sementes é bastante influenciada pelas condições de armazenamento, sobretudo pelo teor de água e pela temperatura do armazenamento. Peres (2001), salienta que, outro fator contributivo para a preservação da qualidade fisiológica de sementes sob determinadas condições ambientais de temperatura e umidade relativa do ar é o tipo de embalagem utilizada.

Delouche (2002) descreve que a deterioração das sementes pode ser vista como um complexo de mudanças que ocorrem com o passar do tempo, causando prejuízos a sistemas e funções vitais e resultando na diminuição no grau de capacidade e desempenho da semente. A deterioração começa depois que a semente alcança a maturidade fisiológica (deterioração zero) e continua até ela perder sua capacidade de germinar. A duração do processo de deterioração é determinada principalmente pela interação entre herança genética, o grau de hidratação da semente e temperatura.

O autor evidencia que os organismos vivos envelhecem e morrem eventualmente, e as sementes não constituem exceção. Uma semente tomada individualmente nunca apresentará, amanhã, qualidade superior àquela de hoje, e mais provavelmente será inferior em viabilidade e vigor, em consequência dos processos de deterioração. Embora a deterioração seja inevitável, lembra o autor que, a sua velocidade poderá, até certo ponto, ser controlada pelo emprego de técnicas adequadas de colheita, secagem, beneficiamento, manuseio e armazenamento.

Carvalho e Nakagawa (2000), relatam que, levando em conta o objetivo básico do armazenamento (manter o nível de qualidade das sementes) não seria lógico pensar-se em tipos de armazenamento. Tendo em vista, contudo, o fim que se vai dar às sementes, os autores consideram até 4 tipos de armazenamento: para sementes comerciais, para estoques reguladores, sementes básicas e sementes em bancos de germoplasma. Neste último, procurar-se-ia manter a viabilidade das sementes pelo maior período possível. Usualmente, segundo os autores, nele se utilizam os dois principais elementos de conservação de sementes: baixa temperatura e baixa umidade relativa do ar. Inúmeros trabalhos de pesquisa têm demonstrado a possibilidade de se armazenar sementes sob temperatura de nitrogênio líquido (-196°C).

Evidentemente se busca com o armazenamento, seja qual for o destino que queira dar-se às sementes, que estas após o período de armazenamento, apresentem níveis de viabilidade e vigor que sejam compatíveis ou aceitáveis quando comparadas àquelas de lotes frescos. Não é muito lembrar que proceder com cuidados no armazenamento das sementes pode garantir, em boa parte a perpetuação da espécie, e, embora muito do interesse humano por sementes esteja associado, do ponto de vista nutricional, à sua composição, a finalidade biológica de uma semente é germinar e estabelecer uma nova planta.

Durante o processo de germinação, ocorrem, ocorrem alterações na composição química da semente e no consumo de substâncias de reserva, tais como carboidratos,

lipídios e proteínas, s quais fornecem energia e material plástico para o desenvolvimento do embrião. Borges e Rena (1993) relatam que estudos demonstram que a velocidade de utilização das reservas durante a germinação varia de acordo com a espécie e com o ambiente.

Buckeridge *et al.*, (2004), reforçam ainda, que as reservas das sementes têm basicamente duas funções que se relacionam com a manutenção e o desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula que apresente a capacidade de se manter de forma autotrófica. As reservas podem funcionar como fonte de energia para manter processos metabólicos em funcionamento e/ou como fonte de matéria para construção de tecidos vegetais que irão constituir a plântula. Em geral, os compostos acumulados em sementes (carboidratos, lipídeos e proteínas) podem ser utilizados tanto para produzir energia como para construir fisicamente as células.

Estes mesmos autores relatam que há uma enorme variação na composição de sementes, mas as substâncias armazenadas em grandes quantidades constituem os carboidratos, os lipídeos e as proteínas. Os dois primeiros servem como fonte de energia e carbono para a germinação das sementes e o desenvolvimento das plântulas, enquanto as proteínas têm como função armazenar principalmente nitrogênio e enxofre, essenciais para a síntese de proteínas, ácidos nucléicos e compostos secundários na plântula em crescimento.

Por outro lado, Buckeridge *et al.*, (2004) expõem que com o desenvolvimento da biotecnologia, as sementes têm sido estudadas quanto à composição química de suas reservas. Tal interesse, conforme os autores, se dá não só por seu teor nutritivo, mas por apresentarem propriedades físico-químicas especiais, formando soluções altamente viscosas, sendo, por isso, úteis como aditivos na confecção de alimentos industrializados.

Os principais sinais do envelhecimento das sementes são o atraso na germinação, redução na taxa de germinação, incapacidade de germinar nos extremos do seu limite ambiental, maior susceptibilidade ao ataque de microrganismos, diminuição do

crescimento, mudanças de cor, aumento do número de plântulas anormais e baixa sobrevivência no campo (EICHELBERGER *et al.*, 2002).

Segundo dados de Stanwood (1985), a criopreservação pode reduzir a deterioração de sementes a tais níveis que seria possível falar-se em conservação “infinita”, possibilidade esta sem dúvida do maior interesse de bancos de germoplasma. A criopreservação envolve, de acordo com o autor, uma fase de secagem das sementes através da sublimação da água seguida de um resfriamento contínuo e em etapas até a temperatura do nitrogênio líquido. Algumas espécies parecem não suportar a fase de secagem e outras parecem não suportar temperaturas tão baixas; no entanto, Stanwood (1985), salienta que a maioria das espécies agrícolas e hortícolas suportam bem tanto a secagem como a temperatura do nitrogênio líquido.

As sementes de algodão, ricas em óleo (25-40%), exigem cuidados especiais durante o período de conservação, para que mantenham sua qualidade. Entretanto, mesmo havendo cuidados durante o armazenamento, a deterioração ocorre em velocidade e intensidade variáveis, de acordo com o estado fisiológico das sementes e com as condições ambientais (FREITAS *et al.*, 2000).

Levando em consideração as questões relativas a longevidade, aos vários tipos de armazenamentos utilizados na conservação de sementes, principalmente a criopreservação e, que o acúmulo e a mobilização das reservas químicas disponíveis nas sementes, com a finalidade de promover a germinação são fatores relevantes na tecnologia de sementes, buscou-se com o presente trabalho aferir os efeitos da criopreservação na degradação de substâncias químicas de reserva durante o período de armazenamento de doze meses, das sementes de duas cultivares de algodão colorido.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento constou de análises dos componentes químicos das sementes de algodão de duas cultivares, BRS 200 Marrom e BRS Verde. As análises realizadas buscaram quantificar os conteúdos de lipídeos (%), proteínas (%), fração mineral (cinzas) e carboidratos totais. As metodologias empregadas para a determinação destes constituintes estão referenciadas nas Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Utilizaram-se três repetições para a análise de cada componente.

As sementes empregadas para a efetivação destas análises foram àquelas oriundas dos ensaios de crioconservação realizados durante o período de doze meses. Os ensaios constaram da utilização de diferentes temperaturas de armazenamento, -25, -170 e -196°C, como também de três métodos de descongelamento, temperatura ambiente, banho-maria termostaticado a 40°C e microondas regulado à potência baixa (própria do aparelho) por diferentes períodos de tempo (dependente de cada temperatura de congelamento). As sementes foram assim coletadas em três momentos distintos do período de armazenamento de doze meses: aos 60, 180 e 360 dias. As sementes de cada cultivar, após cada coleta foram moídas em moinho de martelo, trituradas em gral, peneiradas, sendo em seguida analisadas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 13 encontra-se uma síntese das médias dos resultados para os compostos químicos analisados (minerais, proteínas, lipídios e carboidratos totais) em função do período de crioconservação (três períodos, 60, 180 e 360 dias), das temperaturas na armazenagem (-25, -170 e -196°C) e dos métodos de descongelamento utilizados (temperatura ambiente, banho-maria termostaticado a 40°C e microondas, ajustado para uma potência de 20% do total disponível no aparelho).

Desta tabela, para o composto químico minerais, que fornece uma indicação da riqueza da amostra em elemento minerais (substâncias inorgânicas) principalmente os

cátions cálcio, potássio, sódio, ferro e cobre, e os ânions, sulfatos, cloretos, fosfatos (SILVA e QUEROZ, 2002), observa-se uma diminuição, ainda que moderada, ao longo do período de crioconservação, o que pode indicar que os compostos inorgânicos presentes nas sementes podem ser susceptíveis às baixas temperaturas envolvidas.

TABELA 13 – Composição química das sementes de algodão colorido da cultivar BRS 200 Marrom crioconservadas por três períodos em três temperaturas e descongeladas por três métodos de descongelamento.

Composto Químico	TC ¹	Resultados (%) por Tratamentos ²									
		1MA	1MB	1MO	2MA	2MB	2MO	3MA	3MB	3MO	TM
Minerais	60	4,37	4,45	4,55	4,56	4,28	4,62	4,39	4,53	4,57	4,27
	180	3,73	3,69	3,71	3,9	4,04	3,89	3,86	3,67	3,80	3,95
	360	3,74	4,34	4,03	3,61	3,82	3,82	3,79	4,05	3,88	3,61
Proteínas	60	26,56	24,62	27,66	24,14	26,84	27,27	26,73	27,51	27,61	24,76
	180	20,96	19,35	22,35	19,26	18,08	18,65	18,15	18,18	20,86	22,36
	360	22,48	20,83	23,85	20,50	22,09	21,24	21,15	23,01	21,96	20,63
Lipídeos	60	32,12	35,96	35,76	45,72	41,01	45,29	42,07	35,23	47,84	43,63
	180	24,33	24,73	23,04	29,69	25,67	22,49	26,31	28,02	25,68	24,54
	360	28,28	25,67	28,20	27,78	27,78	27,25	28,07	26,65	30,71	27,38
Carboidratos ³	60	27,78	26,81	23,88	17,14	20,17	15,34	18,98	25,05	12,67	18,20
	180	41,97	41,98	42,02	37,35	42,17	45,24	41,83	40,21	39,85	39,40
	360	37,67	38,82	36,27	41,68	38,33	40,16	39,97	39,09	37,50	40,53

¹TC:tempo de crioconservação (em dias); ²Tratamentos:3 temperaturas (indicadas pelos números, 1=-25°C; 2=-170°C e 3=-196°C) e 3 métodos de descongelamento (indicados pelas letras A=ambiente; B=banho-maria a 40°C e O=microundas, regulado à potência de 20% do máximo do aparelho); ³Carboidratos totais, obtidos por diferença.

O mesmo comportamento se observa para as proteínas e os lipídeos. Os lipídeos foram os compostos que se apresentaram como mais susceptíveis à crioconservação,

experimentando quedas bem acentuadas com o decorrer da armazenagem. Ao tomar-se, por exemplo, o tratamento 2MO (temperatura de crioconservação de -170°C e descongelamento no microondas) aos 60 e 180 dias, nota-se uma queda de 22,8% do teor desta substância no transcorrer do armazenamento. Esta queda pode dever-se em parte à utilização do microondas como método de descongelamento, que afetaria, com a alta concentração de calor em pequeno espaço de tempo a estabilidade dos lipídeos. Outro aspecto que pode ser relevante é a questão da sensibilidade dos lipídeos à ultra-baixas temperaturas, principalmente imersa direta em nitrogênio líquido. Vertucci (1989) alerta que as sementes com alto teor de lipídeos são sensíveis a altas taxas de congelamento. Pence (1991) também encontrou um aumento na sensibilidade ao nitrogênio líquido de sementes de *Ampelemus albidus* comparado com *Asclepias syriaca*, com teores de água similares, e alto conteúdo de lipídios. Estas afirmativas não são plenamente concordantes com o presente estudo. Ao se observar novamente a Tabela 13, vemos que nas temperaturas ultra-baixas (tratamentos 2 e 3), o declínio nos teores de lipídeos se apresentaram mais acentuados nos tratamentos 2MO e 3MO, embora nos tratamentos 2MB e 3MA, ocorreram decréscimos consideráveis.

Comparando os resultados da composição química das sementes de ambas as cultivares estudadas no decorrer da crioconservação, com a germinação destas sementes, obteremos comportamentos similares, ou seja, a medida que decorre o tempo de armazenamento, ocorre para todos os tratamentos uma diminuição nos percentuais de germinação (vide capítulo anterior) concomitantemente com o decréscimo das substâncias químicas presentes. Esta relação também foi verificada por Almeida *et al.*, (2000), levando-os a comentar que a perda de viabilidade observada em algumas amostras poder dever-se a diferenças na composição química das sementes. Os mesmos autores ressaltam, citando Stanwood, que estes efeitos podem ser verificados até mesmo entre cultivares da mesma espécie.

Na Tabela 14 estão expostas as médias dos resultados das análises químicas para a cultivar BRS Verde. De maneira análoga a cultivar marrom, os compostos químicos analisados também experimentaram um decréscimo de seus valores ao longo da crioconservação.

TABELA 14 – Composição química das sementes de algodão colorido da cultivar BRS Verde crioconservadas por três períodos em três temperaturas e descongeladas por três métodos de descongelamento.

Composto Químico	TC ¹	Resultados (%) por Tratamentos ²									
		1VA	1VB	1VO	2VA	2VB	2VO	3VA	3VB	3VO	TV
Minerais	60	4,35	4,21	4,17	4,43	4,20	4,63	4,38	4,38	4,44	4,72
	180	3,76	3,70	3,76	3,70	3,88	3,59	3,61	3,67	3,77	3,55
	360	3,62	3,74	3,64	3,39	3,58	3,53	3,67	3,81	3,71	3,76
Proteínas	60	28,06	29,39	28,71	29,40	29,24	27,46	31,64	31,95	31,88	28,65
	180	24,01	28,01	26,44	30,29	23,61	26,19	23,93	27,46	23,57	23,28
	360	23,75	23,34	25,52	23,42	23,35	23,71	22,53	23,49	24,51	24,30
Lipídeos	60	31,87	35,00	28,65	46,77	43,29	42,41	35,09	42,82	43,32	31,10
	180	24,01	28,01	26,44	30,29	23,61	26,19	23,93	27,46	23,57	23,28
	360	26,48	26,54	27,14	29,91	27,07	27,47	26,40	26,21	26,78	29,10
Carboidratos ³	60	24,50	21,24	28,14	11,04	15,10	16,28	20,88	12,59	12,24	26,28
	180	39,62	39,50	35,67	36,46	39,37	39,31	39,60	37,23	42,24	37,80
	360	26,70	38,58	34,84	34,60	38,75	38,40	40,86	36,33	38,56	25,23

¹TC:tempo de crioconservação (em dias); ²Tratamentos:3 temperaturas (indicadas pelos números, 1=-25°C; 2=-170°C e 3=-196°C) e 3 métodos de descongelamento (indicados pelas letras A=ambiente; B=banho-maria a 40°C e O=micronadas, regulado à potência de 20% do máximo do aparelho); ³Carboidratos totais, obtidos por diferença.

Não foram observadas grandes diferenças entre as duas cultivares no que tange à composição química centesimal. A não ser no componente proteínas que na cultivar verde apresentou valores superiores aos anotados para a cultivar marrom. De uma maneira geral as sementes que foram estocadas em temperaturas ultra-baixas obtiveram resultados superiores àquelas estocadas na temperatura do freezer (-25°C), como também as perdas

decorrentes do período de armazenamento também foram mais amenas, o que pode denotar o efeito benéfico da crioconservação.

CONCLUSÕES

- As sementes das duas cultivares não apresentaram grandes diferenças quanto a composição química centesimal;
- Os lipídeos foram os componentes predominantes em ambas as cultivares e os que experimentaram as maiores perdas durante a crioconservação;
- Nas temperaturas do nitrogênio líquido (-196 e -170°C) as perdas decorrentes do armazenamento foram menos intensas;
- Os métodos de descongelamento não influenciam na manutenção dos percentuais de cada componente químico analisado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BORGES, E.E. de L. e; RENA, A.B. Germinação de sementes. In: AGUIAR, I.B. de; PIÑA-RODRIGUES, F.C.M.; FIGLIOLIA, M.B. (Coords.) **Sementes florestais tropicais**. Brasília: ABRATES, 1993, Cap. 3, p. 83-136.

BUCKERIDGE, M.S.; AIDAR, M.P.M.; SANTOS, H.P. dos; TINÉ, M.A.S. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.) **Germinação: do básico ao aplicado**. 1ª. Ed., Porto Alegre: Artmed, 2004, Cap.17, p. 265-282.

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

DELOUCHE, J.C. Germinação, deterioração e vigor da semente. **Seed News**, v.6, n.6, nov/dez, 2002. Disponível em:

<http://www.seednews.inf.br/portugues/seed66/artigocapa66.shtml>, acessado em 10/01/2006.

EICHELBERGER, L.; MAIA, M. de S.; PESKE, S.T.; MORAES, D.M. de. Composição química de sementes de azevém em resposta ao retardamento da secagem e ao armazenamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília – DF, v.37, n.5, p.693-701, 2002.

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

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ª. Ed, São Paulo: O Instituto, vol. 1, 1985. 533p.

PENCE, V.C. Cryopreservation of seeds of Ohio native plants and related species. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 19, p.235-251, 1991.

PERES, W.B. **Manutenção da qualidade de grãos e sementes**. Pelotas: UFPel, 2001. 78p.

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

SILVA, J.D.; QUEROZ, A.C. de. **Análise de alimentos: método químicos e biológicos**. 3ª. Ed. Viçosa: UFV, 2002. 235p.

VERTUCCI, C.W. Relationship between thermal transitions and freezing injury in pea and soybean seeds. **Plant Physiology**, Washington – DC, v.90, p.1121-1128, 1989.

VILLELA, F.A.; PERES, W.B. Coleta, beneficiamento e armazenamento. In: FERREIRA, A.G.; BORGHETTI, F. (Orgs.) **Germinação: do básico ao aplicado**. 1ª. Ed., Porto Alegre: Artmed, 2004, Cap.17, p. 265-282.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Testar outras variedades/cultivares;
- Adotar outras temperaturas para crioconservação entre -18°C e -170°C (-70, -80, -100°C etc);
- Aumentar a possibilidade da utilização de crioprotetores;
- No descongelamento por microondas, testar outras potências e tempos;
- Testar a utilização de embalagens (para as sementes);
- Determinar na composição química, outros componentes (açúcares redutores, não-redutores, amido) e frações de lipídeos, tais como ácidos linoleico, linolênico, palmítico etc.

NOVIDADES/INOVAÇÕES PRESENTES NESTE TRABALHO

- Prazo de armazenamento criogênico;
- Protocolos para congelar e descongelar;
- Cinética de congelamento das sementes em diferentes temperaturas e teores de água;
- Caracterização da composição físico-química das sementes aferindo a degradação de compostos importantes para o processo germinativo e o estabelecimento das plântulas.