

UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

Metabolismo e Expressão Gênica em *Crambe abyssinica*
Hochst. ex. R.E. Fries sob Diferentes Condições de Cultivo
Visando Aplicação Industrial

Diego de Mello Conde de Brito

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**METABOLISMO E EXPRESSÃO GÊNICA EM *Crambe abyssinica*
HOCHST. EX. R.E. FRIES SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE
CULTIVO VISANDO APLICAÇÃO INDUSTRIAL**

DIEGO DE MELLO CONDE DE BRITO

Sob a orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

e Co-orientação dos Professores
Rosane Nora Castro e Flávio Couto Cordeiro

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutor em**
Ciências, no Programa de Pós-Graduação
em Química, Área de Concentração em
Bioquímica

Seropédica, RJ
Junho de 2012

633.85

B862m

T

Brito, Diego de Mello Conde de,
1982-

Metabolismo e expressão gênica em
Crambe abyssinica Hochst. ex. R.E.
Fries sob diferentes condições de
cultivo visando aplicação industrial
/ Diego de Mello Conde de Brito -
2012.

182 f. : il.

Orientador: Sonia Regina de
Souza.

Tese (doutorado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro,
Curso de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 89-104.

1. Crambe abyssinica - Cultivo -
Teses. 2. Plantas oleaginosas -
Cultivo - Teses. 3. Plantas - Efeito
do Nitrogênio - Teses. 4.
Biocombustíveis - Teses. 5. Óleos
vegetais como combustível - Teses.
I. Souza, Sonia Regina de, 1962-.
II. Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro. Curso de Pós-
Graduação em Química. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**


DIEGO DE MELLO CONDE DE BRITO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Bioquímica.

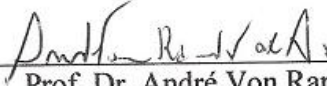
TESE APROVADA EM 23/07/2012



Prof.^a.Dr.^a. Sonia Regina de Souza (DEQUIM-ICE-UFRRJ)
(Orientadora)



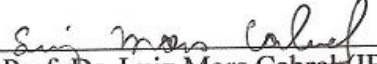
Prof. Dr. Aurélio Baird Buarque Ferreira (DEQUIM-ICE-UFRRJ)



Prof. Dr. André Von Randow de Assis (DTA-IT-UFRRJ)



Prof. Dr. Ednaldo da Silva Araújo (CNPAB-EMBRAPA)



Prof. Dr. Luiz Mors Cabral (IB-UFF)

À Isabela Silva de Castro, que me orienta em todas as minhas decisões e me ajuda a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus Pais, Odair Conde de Brito e Rosemary Machado de Mello que me acompanharam durante toda minha trajetória.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Professora Sonia Regina de Souza pela orientação e compromisso, fundamentais para a execução desse trabalho de tese.

Ao meu grande amigo e co-orientador Flávio Couto Cordeiro, e sua esposa Daiana Carolina da Silva Fernandes, pelo auxílio fundamental no trabalho de tese, pela valorização do meu trabalho e por demonstrar amizade verdadeira, algo raro nos dias de hoje, mantendo sua postura, mesmo quando não seria politicamente interessante, sem deixar de apontar meus erros e acertos.

À Professora Rosane Nora Castro pela co-orientação, pela amizade que sempre demonstrou e, também, por sua prontidão e apoio nas análises do perfil do óleo de Crambe.

À Isabela Silva de Castro por seu auxílio e companheirismo, mesmo nos momentos mais difíceis da execução desse projeto.

À Rosemary Machado de Mello e Odair Conde de Brito por terem viabilizado o desenvolvimento de meus estudos.

Ao meu amigo de longa data, Osmário José Lima de Araújo, pela ajuda nas coletas e companheirismo.

Ao meu amigo, Marcus Vinicius Loss Sperandio, pela grande ajuda e comprometimento nas análises de expressão gênica, fundamentais a conclusão desse trabalho de tese.

À minha grande amiga, Marcela Jacques Lemos Neves, pela ajuda e conselhos valiosos.

À Silvana Constantino Rocha Barreto pela colaboração nas coletas de solo e material, na adubação e nas análises de material vegetal.

Aos bolsistas de iniciação científica do Laboratório de Bioquímica de Plantas, em especial, Glória Lúcia Reis de Queiroz, Raíssa do Nascimento Rainha e Carla Patrícia pelo auxílio nas análises laboratoriais.

À CAPES e ao PPGQ pela concessão da bolsa e apoio, e ao CNPq pelo fomento fundamentais à realização dessa pesquisa.

BIOGRAFIA

Diego de Mello Conde de Brito, filho de Odair Conde de Brito e Rosemary Machado de Mello, nasceu no dia 31/05/1982 na cidade do Rio de Janeiro-RJ. Após a conclusão do ensino fundamental e do ensino médio, o último no Instituto de Educação do Estado do Rio de Janeiro, ingressou para o curso de graduação em biologia da UFRRJ no ano de 2003. Durante o curso, no ano de 2005, foi aprovado no concurso de monitoria em Bioquímica, o que possibilitou uma maior aproximação com os trabalhos de pesquisa do Laboratório de Bioquímica de Plantas, onde iniciou seu primeiro estágio, sob a orientação da professora Sonia Regina de Souza. Dando prosseguimento a esse trabalho, no ano de 2006, foi bolsista de iniciação científica PIBIC-CNPq e, após concluir a graduação em 2007, seguiu para realizar o mestrado em Química, na área de Química Agrária, do Programa de Pós-graduação em Química da UFRRJ, sendo bolsista CAPES. Com a conclusão de seu mestrado, em 2009, iniciou o doutorado no mesmo programa, agora na área de Bioquímica, sendo também bolsista CAPES durante essa etapa. Em 2011, foi aprovado em concurso para professor substituto do setor de Bioquímica, pertencente ao Departamento de Química, vinculado ao Instituto de Ciências Exatas da UFRRJ.

RESUMO

BRITO, Diego de Mello Conde. **Metabolismo e expressão gênica em *Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries sob diferentes condições de cultivo visando aplicação industrial.** 2012. 113p Tese (Doutorado em Química, Bioquímica). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries) é uma oleaginosa, pertencente à família das crucíferas, que é tóxica para a alimentação humana e apresenta um grande potencial para emprego na agroenergia ou como fonte de ácido erúico. Atualmente, existe apenas uma variedade de crambe desenvolvida no Brasil e adaptada às suas condições, denominada FMS Brilhante. As principais características que colocam essa variedade como uma opção de mercado promissora são a precocidade, a alta produtividade de grãos, o baixo custo de produção e o elevado teor de óleo nas sementes. Entretanto, ainda existem poucas informações sobre o metabolismo dessa cultura. No contexto da nutrição vegetal, o nitrogênio se destaca, pois, além de ser geralmente o elemento requerido em maiores concentrações, está intimamente relacionado aos custos da produção e pode acarretar sérios impactos ambientais. Assim, o objetivo principal desse trabalho foi avaliar a influência da variação nas doses de N, na forma de nitrato, sobre diversos aspectos do metabolismo de plantas de crambe (FMS Brilhante), incluindo a expressão de genes, visando principalmente sua relação com os parâmetros de produtividade. Foi avaliada também a influência do pH do meio de cultivo sobre alguns aspectos metabólicos da cultura. Foram realizados três experimentos, com três repetições em delineamento inteiramente casualizado. Nos experimentos I e II as plantas foram cultivadas em hidroponia a diferentes doses de N-nitrato (0,2; 2 e 4 mM) e a variação do pH (5,0; 5,5; 6,0 e 6,5), respectivamente, e coletadas ao fim da fase vegetativa. No experimento III as plantas foram cultivadas, em terra proveniente de um solo do tipo argissolo, com doses crescentes de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) e foram realizadas três coletas: uma no início e outra no fim do florescimento e a última ao término da maturação de sementes. Os resultados obtidos no experimento I reiteram o papel do caule no armazenamento do nitrato nessa espécie. Entretanto, no experimento II observou-se que a variação do pH do meio de cultivo não exerceu influência significativa sobre a produção de massa e que, além disso, as plantas cultivadas sob pH 6,0 desenvolveram os processos relacionados a redução e assimilação do nitrogênio, com maior intensidade. Dentre os principais resultados obtidos com o experimento III, é possível destacar que na dose de 1,6 mM de N-nitrato houve uma elevada produção de sementes, óleo e, também, um perfil de ácidos graxos adequado, tendo-se em vista o emprego do crambe na indústria do biodiesel. Além disso, observou-se aumento na concentração de ácido erúico no óleo de crambe, com a redução do suprimento de N-nitrato. Outro ponto importante é que o gene da 3-cetoacil-CoA sintase (KCS) pode não ser um dos principais fatores envolvidos na síntese de ácido erúico. Entretanto, a expressão do gene da lisofosfatidil aciltransferase (LPAT) parece ter uma forte relação com a síntese de ácido erúico nessa espécie. Assim, seja visando seu uso na agroenergia ou para extração de ácido erúico (Utilizado na indústria de plásticos, lubrificantes etc.) é possível o cultivo de crambe com baixos suprimentos de N-nitrato, o que além de reduzir os custos envolvidos na produção e impactos ao ambiente favorece os parâmetros de produtividade.

Palavras-chave: Biocombustíveis, Metabolismo do nitrogênio, Produção de óleo.

ABSTRACT

BRITO, Diego de Mello Conde. **Metabolism and gene expression in *Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries under different growth conditions aiming industrial use.** 2012. 113p Thesis (Doctor Science in Chemistry, Biochemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries) is an oleaginous culture that belongs to the cruciferae family, and is toxic for human feed, which presents a great potential for use in biofuel industry as well as a source of erucic acid. Nowadays, there is only one variety of *crambe* developed in Brazil and adapted to its conditions, designated FMS Brillhante. The main characteristics that highlight this variety as a promising option of market are precocity, high grain yield, low production cost and high oil percentage in seeds. However, few information about the metabolic aspects of this culture are available. In the context of vegetal nutrition, nitrogen must be mentioned because is generally the element required in major concentrations and is strongly related to the production costs and can cause serious environmental problems. Thus, the major objective of this work was evaluate the influence of variation in N levels, in nitrate form, under different aspects of *crambe* metabolism (FMS Brillhante variety), including gene expression, aiming primarily its relation with yield parameters. Also was evaluated the pH influence of cultivation medium under some metabolic aspects of this culture. Three experiments were done, with three replicates arranged in a completely randomized experimental design. In the experiments I and II plants were submitted in hydroponic system to different nitrate-N doses (0,2; 2 and 4 mM) and pH variation (5,0; 5,5; 6,0 and 6,5), respectively, and harvested at the end of vegetative period. In the experiment III plants were cultivated in a argisol soil under crescent nitrate-N supply (0,8; 1,6; 2,4 and 3,2 mM) and three harvests were done: One at initiation and the other one at end of flowering and the last at final of seed maturation. The results obtained with experiment I highlight the role of stem in nitrate storage in this specie. On the other hand, in experiment II was observed that variation in pH of nutrient solution do not influence significantly the mass production and that plants cultivated under pH 6,0 showed an increase in the processes related to nitrogen reduction and assimilation. Among the main results obtained with the experiment III is possible to highlight that with 1,6 mM of nitrate-N was obtained a high seed and oil yield and also a satisfactory fatty acid composition of oil, aiming the use of *crambe* in biodiesel industry. Furthermore, was observed an increase in erucic acid concentration of *crambe* oil with the reduction of nitrate-N supply. Important information is that the 3-cetoacil-CoA sintase (KCS) gene cannot be one of the main factors involved in erucic acid synthesis. However, the expression of lysophosphatidyl aciltransferase (LPAT) gene seems to be strongly related with the synthesis of erucic acid in this specie. Thereby, *crambe* cultivation is possible with low nitrate-N supply, for use of culture in biodiesel industry or for erucic acid extraction (Used in plastic, lubricants and other industries), and that contribute for a reduction in production costs and environmental impacts and for an increase in yield parameters.

Keywords: Biofuels, Nitrogen metabolism, Oil yield.

LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

BTL	Liquefao de biomassa (“Biomass to Liquid”)
PNPUB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
HATS	Sistema de transporte de alta afinidade (“High-Affinity Transport System”)
LATS	Sistema de transporte de baixa afinidade (“Low-Affinity Transport System”)
NR	Nitrato Redutase
NiR	Nitrito Redutase
NAD⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzida
GS	Glutamina Sintetase
GOGAT	Glutamato Sintase
NRT	Transportador de nitrato
KCS	3-Cetoacil-CoA Sintase
FAE	Complexo de alongamento de ácidos graxos (“Fatty Acid Elongase”)
LPAT	Lisofosfatidil Aciltransferase
DAG	Dias após a germinação
Bt	Bacillus thuringiensis
CG-DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrmetro de Massas
TRIS	2-(2-hidroxietil)amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol
DEPC	Dietil-pirocarbonato

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Características apresentadas pela espécie crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), variedade FMS Brilhante, cultivada na região sul do estado do Mato Grosso do Sul (Adaptado de Fundação MS, 2010).....	14
Tabela 2. Percentual de ácidos graxos no óleo de diferentes espécies: Crambe (Adaptado de Springdale Group, 2005), canola, dendezeiro, girassol e soja (Adaptado de Briscoe <i>et al.</i> , 1992).....	15
Tabela 3. Descrição das doses de N-nitrato (Experimento I) e diferentes valores de pH (Experimento II) utilizados no cultivo de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), variedade FMS Brilhante. No experimento I a aplicação dos tratamentos ocorreu seis dias após o transplante e no experimento II após sete dias.....	24
Tabela 4. Concentrações de N-nitrato utilizadas no cultivo de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), variedade FMS Brilhante, em cada vaso, nos diferentes tratamentos para o experimento III.....	26
Tabela 5. Nome dos genes, dados de registro, proteínas relacionadas e sequências dos “primers” (“Forward e reverse”) que foram utilizados na análise de PCR em tempo real.....	34
Tabela 6. Resultado da análise química do solo utilizado no experimento III visando o cultivo de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), variedade FMS Brilhante. A análise química foi realizada segundo EMBRAPA (1997), no laboratório de fertilidade da UFRRJ.....	43
Tabela 7. Teores ($\mu\text{moles} \cdot \text{g.m.f}^{-1}$) e conteúdos ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$) de nitrato em caules e folhas de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	45
Tabela 8. Teores ($\text{mg} \cdot \text{g.m.s}^{-1}$) e conteúdos ($\text{mg} \cdot \text{planta seca}^{-1}$) de N-total, fósforo e potássio em caules e folhas de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	48
Tabela 9. Teores ($\mu\text{moles} \cdot \text{g.m.f}^{-1}$) e conteúdos ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$) de nitrato em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	51
Tabela 10. Teores ($\text{mg} \cdot \text{g.m.s}^{-1}$) e conteúdos ($\text{mg} \cdot \text{planta seca}^{-1}$) de N-total, fósforo e potássio em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	54
Tabela 11. Teores ($\mu\text{moles} \cdot \text{g.m.f}^{-1}$) e conteúdos ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$) de nitrato em caules e sementes de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	57

Tabela 12. Teores ($\text{mg} \cdot \text{g.m.s}^{-1}$) e conteúdos ($\text{mg} \cdot \text{planta seca}^{-1}$) de N-total, fósforo e potássio em caules e sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade)..... 61

Tabela 13: Teores de ácidos graxos no óleo (%) de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries) submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). A determinação foi realizada com base na comparação entre os tempos de retenção das amostras com os obtidos a partir de padrões comerciais (Sigma-Aldrich®). Além disso, são relatados os percentuais de ácidos graxos em sementes comerciais de crambe (Springdale Group, 2005). Espaços vazios são referentes a ácidos graxos não encontrados. Letras iguais em uma mesma linha indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade)..... 63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representando o processo de obtenção do bioetanol. Adaptado de Hahn-Hägerdal <i>et al.</i> (2006).....	6
Figura 2. Reação de transesterificação de um triacilglicerol. O agente catalisador pode ser uma base, um ácido ou uma enzima (Van Gerpen, 2005).....	6
Figura 3. Mecanismos de transesterificação alcalina (A) e ácida (B) de um triacilglicerol. Adaptado de Ramos <i>et al.</i> (2011).....	8
Figura 4. Produção mensal de biodiesel puro (B100) no Brasil em m ³ obtida nos período de 2005 até 2010 (ANP, 2012).....	12
Figura 5. Crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries) em sistema hidropônico (a); A inflorescência (b), as sementes (c) e o óleo produzido (d) (Brito, 2009).....	13
Figura 6. Estrutura química do ácido erúico, um ácido graxo monoinsaturado ômega-9 (Leonard, 1993).....	16
Figura 7. Estrutura química dos ácidos oléico, linoléico e linolênico, compostos presentes no óleo de crambe (Springdale Group, 2005).....	16
Figura 8. Esquema da absorção do nitrato (NO ₃ ⁻) e amônio (NH ₄ ⁺) através da membrana plasmática em plantas. (1) Bomba de prótons (P-H ⁺ ATPase), (2) transportador de nitrato (simporte) e (3) transportador de amônio (uniporte). Retirado de Souza & Fernandes (2006).....	18
Figura 9. Principais rotas do nitrato (NO ₃ ⁻) no interior de plantas e transportadores envolvidos em cada etapa do processo. Adaptado de Dechorgnat <i>et al.</i> , (2011).....	19
Figura 10. Esquema da catálise realizada pelo complexo FAE, onde a enzima 3-Cetoacil-CoA sintase (KCS) atua. FAE, “Fatty acid elongase complex” (Baud & Lepiniec, 2010).....	21
Figura 11. Esquema da catálise realizada pela enzima delta 12 desaturase (Baud & Lepiniec, 2010)..	22
Figura 12. Esquema da catálise realizada pela enzima lisofosfatidil aciltransferase (LPAT) (Baud & Lepiniec, 2010).....	23
Figura 13. Massa fresca (A), teores de nitrato (B), atividade da nitrato redutase (C) e teores de N-amônio (D), N-amino (E) e açúcares solúveis (F) em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato na solução nutritiva (0,2, 2 e 4 mM), coletadas ao fim da fase vegetativa. Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	37
Figura 14. Massa fresca (A), massa seca (B), teores de nitrato (C) e atividade da nitrato redutase (D) em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes valores de pH na solução nutritiva (5; 5,5; 6,0 e 6.5), coletadas ao fim da fase vegetativa. Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	40
Figura 15. Teores de N-amônio em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes valores de pH na solução nutritiva (5; 5,5; 6,0 e 6.5), coletadas ao fim da fase vegetativa. Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	41
Figura 16. Teores de N-amino (A) e açúcares solúveis (B) em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes valores de pH na solução nutritiva (5; 5,5; 6,0 e 6.5), coletadas ao fim da fase vegetativa. Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade)....	42

Figura 17. Massa fresca (A) e seca (B) em caules e folhas de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	44
Figura 18. Atividade da nitrato redutase em caules e folhas de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	46
Figura 19. Teores de açúcares solúveis (A) e N-amino (B) em caules e folhas de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	47
Figura 20. Massa fresca (A) e seca (B) em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	50
Figura 21. Atividade da nitrato redutase em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	52
Figura 22. Teores de açúcares solúveis (A) e N-amino (B) em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	53
Figura 23. Massa fresca (A) e seca (B) de caules e sementes de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	55
Figura 24. Massa fresca de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), em diferentes períodos do desenvolvimento (37, 63 e 90 DAG), submetidas à variação nas doses de N-nitrato em solo: 0,8 (A); 1,6 (B); 2,4 (C) e 3,2 (D) mM. Letras iguais em uma mesma coleta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	56
Figura 25. Conteúdo ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$) de nitrato de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), em diferentes períodos do desenvolvimento (37, 63 e 90 DAG), submetidas a variação das doses de N-nitrato em solo: 0,8 (A); 1,6 (B); 2,4 (C) e 3,2 (D) mM. Letras iguais em uma mesma coleta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	58
Figura 26. Atividade da nitrato redutase (A) e teores de N-amônio (B) de caules e sementes de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-	

nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	59
Figura 27. Teores de açúcares solúveis (A) e N-amino (B) de caules e sementes de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	60
Figura 28. Produção de óleo extraído a partir de sementes de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	62
Figura 29. Expressão relativa dos genes das enzimas delta 12 desaturase (A) e lisofosfatidil aciltransferase - LPAT (B) em sementes de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Como controle endógeno foi utilizada a actina 2 (GenBank NM 180280.1). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).....	64
Figura 30. Correlação entre o teor de ácido erúico no óleo (%) e a expressão relativa do gene da enzima lisofosfatidil aciltransferase - LPAT em sementes de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), coletadas ao fim do ciclo de vida (90 DAG). Como controle endógeno foi utilizada a actina 2 (GenBank NM 180280.1).....	65
Figura 31. Expressão relativa do gene da enzima 3-cetoacil-CoA sintase (KCS) em sementes de plantas de crambe (<i>Crambe abyssinica</i> Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Como controle endógeno foi utilizada a actina 2 (GenBank NM 180280.1). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade)....	66

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 HIPÓTESE CIENTÍFICA E OBJETIVOS.....	4
2.1 Hipótese Científica.....	4
2.2 Objetivos.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Biocombustíveis.....	5
3.2 Crambe.....	13
3.3 Nitrogênio.....	17
3.4 3-Cetoacil-CoA sintase, delta 12 desaturase e lisofosfatidil aciltransferase.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Condução dos experimentos I e II.....	24
4.2 Análises laboratoriais dos experimentos I e II.....	25
4.3 Condução do experimento III.....	25
4.4 Análises laboratoriais do experimento III.....	27
4.5 Descrição detalhada das análises.....	27
4.5.1 Atividade da nitrato redutase.....	27
4.5.2 Determinações de metabólitos solúveis.....	28
4.5.3 Determinações de N-total, fósforo e potássio.....	29
4.5.4 Análises quantitativa e qualitativa do óleo.....	31
4.5.5 Avaliação da expressão gênica.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	36
5.1 Experimento I.....	36
5.2 Experimento II.....	39
5.3 Experimento III.....	43
5.3.1 Plantas de crambe ao início do florescimento (37 DAG).....	43
5.3.2 Plantas de crambe ao final do florescimento (63 DAG).....	50
5.3.3 Plantas de crambe ao final da maturação de sementes (90 DAG).....	55
6 CONCLUSÕES.....	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68
8 ANEXOS.....	79
Anexo A – Concentrações dos Padrões e Modo de Preparo.....	79
Anexo B – Cromatogramas das amostras de óleo.....	87
Anexo C – Aceite e artigo a ser publicado em periódico.....	127

1 INTRODUÇÃO

No âmbito da produção de biocombustíveis, o Brasil é colocado como o país de maior potencial, pois apresenta grande diversidade vegetal e a maior área cultivável do mundo (Bilich & Silva, 2006; Sallet & Alvim, 2011). Várias medidas políticas foram tomadas visando o desenvolvimento nacional dessa matriz energética, sendo a principal delas a criação do Programa Nacional de Produção e uso do Biodiesel (PNPB). Entretanto, o desenvolvimento dessa nova matriz é acompanhado por várias críticas relacionadas à sua implantação, como a de que sua utilização em larga escala poderia acarretar uma inflação nos preços dos alimentos, uma vez que parte da produção agrícola seria desviada para a indústria de biocombustíveis.

A principal fundamentação para essa crítica encontra-se na constatação de que, atualmente, as plantas mais utilizadas para fins energéticos são a soja, o milho, a cana-de-açúcar, o girassol e a canola, ou seja, culturas que também são empregadas na indústria de alimentos (Osaki & Batalha, 2011; Simioni, 2006). A utilização dessas culturas, na indústria da agroenergia, é justificada pelo potencial apresentado por tais espécies, pela grande quantidade de informação existente sobre seus cultivos e do arcabouço elaborado em torno da produção.

Entretanto, já são visíveis os reflexos econômicos resultantes da competição existente entre os mercados. Em pesquisa realizada pelo IFPRI (“International Food Policy Research Institute”) foi constatado que o crescimento na demanda por biocombustíveis, ocorrido no período de 2000 a 2007, foi responsável por 30% do aumento ocorrido no preço médio dos principais grãos utilizados na alimentação, com destaque para o milho, que sofreu o maior impacto, calculado em 39% (Rosegrant, 2008).

Dessa forma, torna-se extremamente necessária a busca por fontes de biomassa para a produção de biocombustíveis, que não tenham emprego na indústria de alimentos. O Brasil também assume grande destaque nesse contexto, pois apresenta uma ampla gama de oleaginosas, adaptadas as suas condições, que não são utilizadas na alimentação.

No ano de 2008, ocorreu a divulgação de que o crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), uma planta de ciclo curto pertencente à família das crucíferas, pode ser uma fonte promissora de biodiesel, devido as suas diversas vantagens. Dentre elas, pode-se destacar a precocidade, caracterizada por um ciclo de aproximadamente 90 dias, a alta produtividade (1000 a 1500 kg. ha⁻¹), o baixo custo de produção e um percentual de óleo total nos grãos que fica entre 36 e 38%, o que supera até mesmo o apresentado pela soja (Pitol, 2008). Além disso, o crambe não pode ser utilizado na alimentação humana por ser tóxico e, portanto, não compete diretamente com a produção de alimentos. Vale ressaltar que a torta representa uma importante fonte de proteína para ruminantes (30 a 32% de proteína bruta) podendo ser utilizada também como fertilizante. Com essas características, essa crucífera de inverno tem se apresentado como uma opção promissora para a safrinha (Fundação MS, 2007). No entanto, embora exista um grande potencial no crambe, como matéria-prima para a indústria de biodiesel, essa espécie ainda carece de pesquisas que tenham como objetivo determinar a forma de cultivo e os tratamentos culturais adequados, o que possibilitaria uma otimização em sua produção.

Assim, abre-se um vasto campo para pesquisas que tenham como objetivo desenvolver os potenciais dessa cultura. Um importante aspecto a ser estabelecido é um melhor entendimento sobre as interações dos fatores bióticos e abióticos do meio de cultivo, com o metabolismo da planta, visando assim, promover uma melhoria nos tratamentos culturais.

Nesse contexto, um dos principais pontos que devem ser determinados para a produção de crambe é sua nutrição, pois não existem recomendações específicas para essa cultura. Portanto, são necessários estudos que visem avaliar as melhores doses dos nutrientes requeridos pelo metabolismo vegetal, evitando a deficiência ou o desperdício, devido ao seu uso em quantidades inadequadas, o que traz sérias consequências à produtividade das culturas, ao meio ambiente e, também, aos custos da produção.

Dentre os nutrientes requeridos pelo metabolismo vegetal, o nitrogênio destaca-se, pois, além de ser essencial, é geralmente o elemento exigido em maiores quantidades (Malavolta, 1980). Por isso, a agricultura, em geral, faz uso de fertilizantes nitrogenados em larga escala visando aumentar a produtividade. Entretanto, o uso inadequado desses fertilizantes pode acarretar redução da produtividade, poluição de rios, ou até mesmo sua eutrofização, e contaminação do solo e da atmosfera (Choudhury *et al.*, 2007). A preocupação com os compostos nitrogenados, em especial, tem sido cada vez maior, já que um efeito destacado desses compostos é sua contribuição para a destruição da camada de ozônio e para o aumento do efeito estufa (Abrol *et al.*, 2007). Dessa forma, o estabelecimento das doses adequadas de nitrogênio para a cultura de crambe torna-se primordial para o desenvolvimento da produção.

Outro fator de grande influência no metabolismo vegetal é o pH, que além de acarretar efeitos diretos, pode modificar a disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo. De acordo com Malavolta (1980) é possível observar que elementos como o nitrogênio, enxofre, potássio e fósforo, macronutrientes indispensáveis ao desenvolvimento da planta, tem sua disponibilidade reduzida em meio ácido. Por outro lado, em meio alcalino, elementos como ferro, cobre, manganês e zinco, micronutrientes essenciais, é que apresentam uma redução na sua disponibilidade. Desse modo, para o desenvolvimento de uma cultura, é essencial determinar a faixa de pH no qual a espécie se desenvolva melhor, tendo em vista tanto os efeitos diretos quanto indiretos causados pela variação do pH. Tendo em vista o cultivo de plantas com potencial agroenergético, isso também é fundamental, pois proporcionará uma otimização do manejo e, assim, um melhor aproveitamento de todas as vantagens que essa matriz energética oferece.

Um ponto que deve ser ressaltado é que o desenvolvimento da produção dos biocombustíveis na matriz energética Brasileira oferece vantagens sociais, ecológicas e econômicas. Dentre as vantagens sociais pode-se destacar o avanço nas condições de emprego e renda do campo, possibilitada através do aumento da demanda por produtos agrícolas. No âmbito ecológico, o desenvolvimento da agroenergia oferece a possibilidade de diminuir o avanço do “efeito estufa”, pois na queima dos biocombustíveis somente parte do CO₂, captado pelas plantas durante seu desenvolvimento, é liberado para a atmosfera. Na economia, a expansão da agroenergia possibilita uma perspectiva de maior participação do Brasil no mercado energético mundial, pois oferece uma rota alternativa ao mercado do petróleo, cada vez mais marcado por tensões políticas, problemas ambientais e por seu previsível fim (Rathmann *et al.*, 2005).

A grande vantagem comparativa do Brasil em relação aos demais países é a biodiversidade. Nesse contexto, pode-se destacar a ampla variedade de oleaginosas com potencial para fins agroenergéticos. Assim, o Brasil possui fontes alternativas, como o crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), que permitem o desenvolvimento da indústria energética com menores perigos sobre os preços dos alimentos (Fundação MS, 2007). Entretanto, embora haja um grande potencial apresentado por essa cultura, ainda são necessárias pesquisas que visam desenvolver sua produção, uma vez que seu cultivo carece de recomendações específicas.

Assim, são justificados os estudos sobre as exigências nutricionais dessa cultura, pois a partir dessas investigações será possível um melhor entendimento sobre o metabolismo da planta e, conseqüentemente, um avanço na manipulação das ferramentas de cultivo tendo em vista a melhoria da produção.

Para os estudos de nutrição vegetal, a hidroponia representa uma ferramenta de ampla utilidade, pois permite excluir a influência exercida pelo solo nos processos de transferência iônica que ocorrem na superfície das raízes possibilitando, assim, o fornecimento dos nutrientes a uma taxa constante. Deve ser destacada também a maior facilidade na manipulação dos nutrientes nesse sistema de cultivo (Baligar, 1986). Outro ponto a ser considerado, é que no cultivo em solução nutritiva, são eliminados alguns fatores de influência no metabolismo, como doenças e ervas daninhas associadas ao solo (Sheikh, 2006). Portanto, a utilização do sistema hidropônico permite uma avaliação mais precisa sobre a interação entre nutrientes e processos metabólicos em plantas. Embora os efeitos nutricionais sobre os processos metabólicos sejam importantes, deve-se ressaltar também a grande influência exercida por fatores genéticos nesses processos.

Um ponto importante, segundo Weselake *et al.* (2009), é que a produção de óleo de uma cultura está intimamente ligada a fatores genéticos, e as interações entre o genótipo e o meio que irão ocorrer durante seu desenvolvimento. Assim, a determinação dos genes que controlam fortemente o metabolismo do óleo e a elucidação da influência dos principais fatores de cultivo sobre a expressão desses genes, torna-se extremamente relevante, quando se busca a otimização dos aspectos quantitativos e qualitativos do óleo produzido por plantas.

De acordo com Baud & Lepiniec (2010), o gene que codifica a lisofosfatidil aciltransferase (LPAT), enzima que atua no retículo endoplasmático catalisando a acilação do ácido lisofosfatídico produzindo ácido fosfatídico e Coenzima A livre, encontra-se intimamente relacionada à produção de óleo em sementes e, além disso, também está associada à formação de ácido erúcido, um dos ácidos graxos de maior importância comercial do crambe. Nesse âmbito, Nath *et al.* (2009) destacam que foi possível um aumento de 22% no teor de ácido erúcido, em plantas obtidas a partir do cruzamento de linhagens transgênicas de colza (*Brassica napus* L.), que expressam a enzima LPAT de *Limnanthes Alba* e uma cópia extra do gene *FAEI* ("Fatty acid elongase") de colza, com uma variedade de colza com alto teor de ácido erúcido.

Outra enzima importante na síntese de triacilgliceróis é a 3-cetoacil-CoA sintase (KCS), também chamada de FAE, localizada no complexo de alongação microssomal participando da síntese dos ácidos graxos de cadeia longa (>18 carbonos), os precursores dos triacilgliceróis em plantas (Beaudoin *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2010). Além disso, Mietkiewska *et al.* (2007) destacam que a KCS é a enzima que controla o processo de síntese de ácidos graxos de cadeia longa em sementes. Cabe ressaltar também, a enzima delta 12 desaturase, que em plantas é a responsável pela conversão do ácido oléico, um componente que reflete uma melhoria na qualidade do perfil do óleo, tendo em vista seu uso para a síntese de biodiesel, em ácido linoléico (Guan *et al.*, 2011; Pinzi *et al.*, 2009).

Assim, a obtenção de informações básicas sobre a nutrição do crambe, juntamente com o entendimento sobre a expressão de genes importantes na via de síntese do óleo, pode contribuir para uma produção mais eficiente da cultura no cenário agroenergético Brasileiro e, conseqüentemente, fornecer uma opção viável ao uso do petróleo sem influência direta sobre o preço dos alimentos.

2 HIPÓTESE CIENTÍFICA E OBJETIVOS

2.1 Hipótese Científica

A variação nos níveis de nitrogênio do meio de cultivo, sob a forma de nitrato, exerce influência sobre diferentes aspectos do metabolismo de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), principalmente, a expressão dos genes que codificam a lisofosfatidil aciltransferase (LPAT), 3-cetoacil-CoA sintase (KCS) e delta 12 desaturase, a produtividade de grãos e óleo e também sobre a qualidade do óleo, considerando tanto sua aplicação na indústria de biodiesel como seu uso para a extração de ácido erúico. Além disso, diferentes valores de pH ou doses de nitrato em hidroponia também afetam o metabolismo dessa cultura.

2.2 Objetivos

Este projeto visa avaliar aspectos do metabolismo e a expressão dos genes relacionados às enzimas lisofosfatidil aciltransferase (LPAT), 3-cetoacil-CoA sintase (KCS) e delta 12 desaturase, em plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), quando submetidas à variação nas doses de nitrogênio e pH, tendo em vista, principalmente, os efeitos sobre parâmetros relacionados à produção de óleo e seu uso, seja para a produção de biodiesel ou para a extração de ácido erúico.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Biocombustíveis

De acordo com a definição proposta por Reijnders (2006), o conceito de biocombustíveis diz respeito a todos os combustíveis, líquidos ou gasosos, que são empregados no setor de transporte e produzidos, predominantemente, a partir de biomassa. Além disso, é importante destacar que a biomassa é uma fonte de energia renovável, assim como a energia eólica, solar e a hidroelétrica. Nesse âmbito, vale ressaltar que uma fonte de energia é considerada renovável quando pode ser naturalmente regenerada, em uma pequena escala de tempo, e é proveniente direta ou indiretamente do sol, como no caso da biomassa, ou ainda de outros eventos e mecanismos do ambiente (Verma, 2011). Dessa forma, o petróleo e produtos oriundos de fontes inorgânicas não representam fontes renováveis de energia.

Dentre as fontes renováveis de energia, a biomassa destaca-se, já que tem mostrado uma perspectiva de crescimento promissora em sua demanda. Panwar *et al.* (2011), nesse contexto, relatam que ocorreu um crescimento de 30% no consumo de biomassa no mundo, considerando somente o período de 2001 a 2011. Além disso, os autores projetam um grande aumento da demanda dessa fonte de energia renovável, indicando que seu consumo provavelmente deverá triplicar até o ano de 2040. Dentre os combustíveis oriundos de biomassa, o bioetanol e o biodiesel são os que mais se destacam no mercado atual e, com isso, deverá ocorrer um grande crescimento em sua demanda dentro de poucas décadas (Rosegrant, 2008). Entretanto, é importante ressaltar que existem inúmeras diferenças nas cadeias de produção desses dois biocombustíveis.

O bioetanol é um álcool que pode ser obtido a partir de açúcar ou amido, quando submetidos a processos de hidrólise enzimática, fermentação e destilação (**Figura 1**). Tal produto pode substituir parcialmente ou totalmente a gasolina (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006).

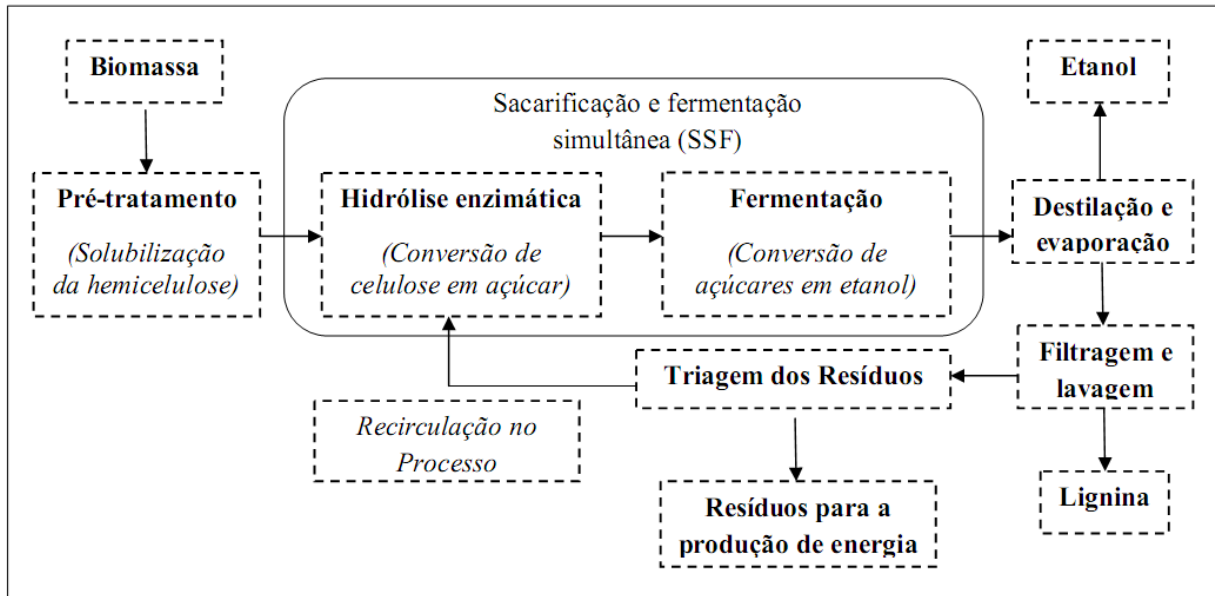


Figura 1. Esquema representando o processo de obtenção do bioetanol. Adaptado de Hahn-Hägerdal *et al.* (2006).

O biodiesel, por sua vez, pode ser produzido de qualquer óleo vegetal ou gordura animal. No processo, caracterizado quimicamente como uma transesterificação, o óleo ou gordura reage com um álcool (metanol ou etanol) na presença de um catalisador, que pode ser um ácido, uma base ou uma enzima. Os produtos obtidos na reação são: glicerina e uma mistura de ésteres, denominada biodiesel (**Figura 2**). Esse biocombustível pode ser misturado ao diesel de petróleo ou utilizado integralmente (Van Gerpen, 2005).

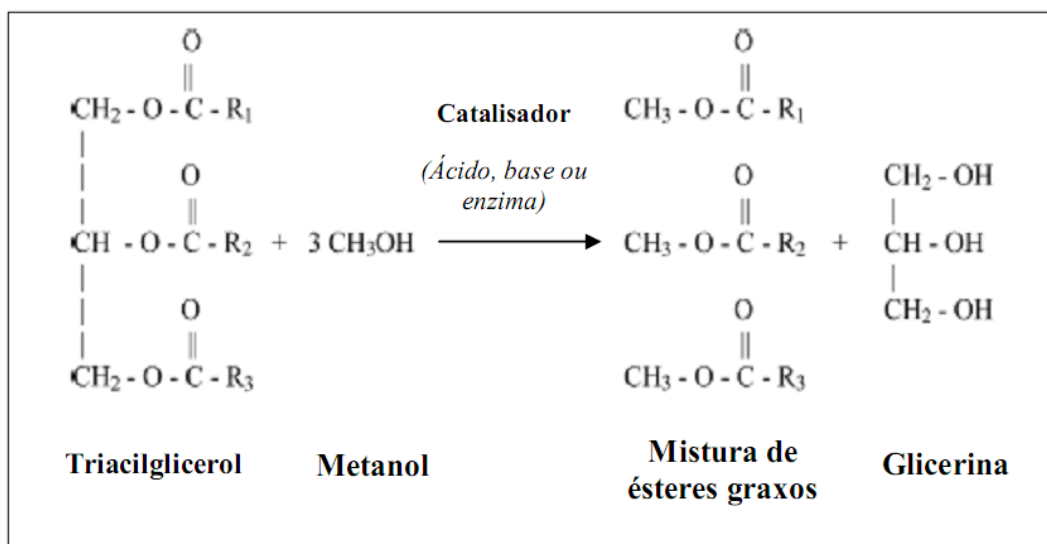


Figura 2. Reação de transesterificação de um triacilglicerol. O agente catalisador pode ser uma base, um ácido ou uma enzima (Van Gerpen, 2005).

Os agentes catalisadores que podem ser utilizados na transesterificação de um triacilglicerol, visando à produção de biodiesel, atuam por mecanismos diferentes. Embora a biocatálise, que envolve o uso de lipases, tenha se mostrado uma opção promissora, o principal processo de produção de biodiesel utilizado é a transesterificação metílica de óleos vegetais em meio alcalino homogêneo (Ramos *et al.*, 2011). Nesse processo, inicialmente, os íons alcóxidos presentes no meio reacional realizam um ataque nucleofílico no carbono pertencente à carbonila do triacilglicerol. Com esse ataque um intermediário tetraédrico é formado e, em seguida, ocorre a liberação de uma molécula de éster metílico e de diacilglicerol, que por sua vez, irá contribuir para a formação de um novo alcóxido. O mecanismo de transesterificação metílica de triacilglicerol em meio alcalino homogêneo encontra-se detalhado na **figura 3A**. É importante citar que, após a repetição desse mecanismo por mais dois ciclos tem-se, no meio reacional, a formação de uma molécula de glicerol e de três moléculas de ésteres metílicos.

Outro processo de transesterificação de triacilglicerol é aquele realizado em meio ácido homogêneo. Os principais ácidos utilizados nesse processo são o sulfônico e o sulfúrico (Schuchardt *et al.*, 1998). No mecanismo de reação ocorre primeiramente a protonação da carbonila do triacilglicerol que, por sua vez, leva a formação de um carbocátion. Consequentemente, o álcool realiza um ataque nucleofílico no carbocátion, levando a formação de um intermediário tetraédrico. Com a transferência de próton, ocorre a formação de uma molécula de éster graxo e um diacilglicerol. O mecanismo completo de transesterificação metílica de triacilglicerol em meio ácido homogêneo é descrito na **figura 3B**. A repetição do mecanismo por mais dois ciclos leva a formação, ao fim do processo, de três moléculas de ésteres graxos e uma molécula de glicerol no meio reacional. A diferença entre os mecanismos dos processos de transesterificação em meio ácido e alcalino tem implicações importantes sobre a produção de biodiesel e sua qualidade, porém o perfil de ácidos graxos do óleo também exerce uma importância fundamental.

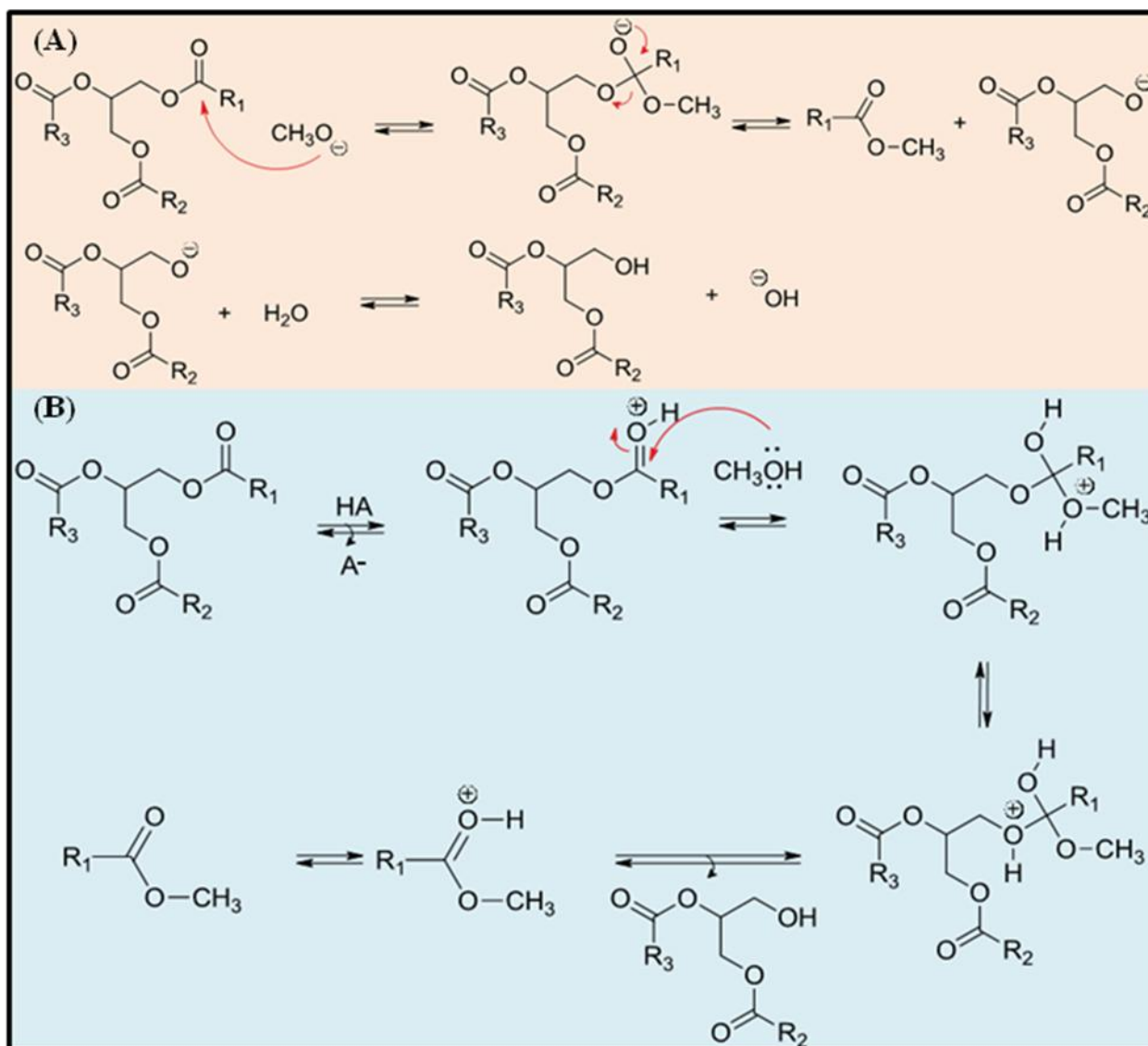


Figura 3. Mecanismos de transesterificação alcalina (A) e ácida (B) de um triacilglicerol. Adaptado de Ramos *et al.* (2011).

Um aspecto que pode afetar tanto o processo de produção como a qualidade do biodiesel é o perfil de ácidos graxos no óleo (Pinzi *et al.*, 2009). No contexto da produção, Warabi *et al.* (2004) observaram, a partir da alquil esterificação de diferentes ácidos graxos em álcool supercrítico, que ácidos graxos de cadeia saturada, como palmítico e esteárico, têm menor reatividade, quando comparados a ácidos graxos insaturados, como oléico, linoléico e linolênico. Stavarache *et al.* (2007) destacaram que, em reações de transesterificação auxiliada por ultrassom, ácidos graxos saturados reagem principalmente no início do processo, enquanto os ácidos graxos insaturados são somente consumidos em etapas mais tardias da reação. Segundo os autores, tal diferença estaria relacionada à maior preferência dos ácidos graxos saturados pela posição 1 e 3 do triacilglicerol, duas regiões que sofrem reação nas primeiras etapas do processo.

Em relação aos principais parâmetros de qualidade do biodiesel, afetados pelo perfil de ácidos graxos do material lipídico, pode-se destacar o índice de iodo, índice de cetanos, poder

calorífico, consumo específico de combustível, desempenho em baixas temperaturas e viscosidade (Pinzi *et al.*, 2009).

O índice de iodo é referente ao grau de insaturação do material lipídico e está intimamente relacionado com sua estabilidade oxidativa. O aumento nesse índice provoca uma diminuição da estabilidade oxidativa do material e, conseqüentemente, favorece a formação de produtos de degradação prejudiciais aos componentes do motor (Pinzi *et al.*, 2009). Entretanto, esse índice não é suficiente para avaliar de maneira completa a estabilidade oxidativa do material lipídico, já que não considera os tipos de ácidos graxos saturados e insaturados presentes e, por isso, exclui um fator que tem impacto significativo sobre a estabilidade oxidativa (Knothe, 2002).

O índice de cetanos é considerado um dos principais parâmetros qualitativos do biodiesel, já que é um indicativo da otimização da combustão durante a ignição. Detalhadamente, o índice de cetanos está ligado ao tempo de inércia da ignição (“Ignition time delay”), ou seja, nesse caso, é referente ao período compreendido entre a injeção do combustível no cilindro e o início da ignição (Knothe, 2005). Combustíveis com um baixo índice de cetanos são mais propensos a sofrer uma combustão incompleta e, além disso, favorecer a emissão de poluentes. De maneira geral, o biodiesel apresenta um índice de cetanos maior que o do diesel de petróleo e, assim, uma melhor performance do motor juntamente com uma redução da poluição (Pinzi *et al.*, 2009).

De acordo com Van Gerpen (1996), o índice de cetanos é influenciado pelo perfil de ácidos graxos do material lipídico. O autor destaca que, o maior grau de saturação e o aumento da presença de ácidos graxos de cadeia longa, eleva o índice de cetanos e, com isso, melhora a qualidade do combustível.

Outro aspecto importante, na qualidade de um combustível, é a quantidade de energia gerada durante o processo de combustão, ou seja, seu poder calorífico. Em termos comparativos, o biodiesel vegetal apresenta um poder calorífico cerca de 10% menor em relação ao diesel de petróleo, o que tem como reflexo o maior consumo de combustível. Essa diferença está relacionada ao maior conteúdo de oxigênio nos ésteres metílicos derivados de ácidos graxos de origem vegetal (Agarwal, 2007). De acordo com Knothe (2008), a presença de ácidos graxos de cadeia longa e o aumento no grau de saturação elevam o poder calorífico, devido ao favorecimento de uma maior proporção de carbono e hidrogênio em relação ao oxigênio.

Uma grandeza fundamental, utilizada para aferir a eficiência no uso de um combustível, é o consumo específico de combustível do motor. Essa medida estabelece a relação entre a quantidade de combustível consumida pelo motor e a potência produzida (Pinzi *et al.*, 2009). Devido a menor geração de poder calorífico do biodiesel, quando comparado ao diesel de petróleo, é esperado um aumento de aproximadamente 14% no consumo específico de combustível.

Assim, tanto o poder calorífico quanto o consumo específico de combustível, estão relacionados à proporção entre carbonos e hidrogênios e a quantidade de oxigênio e, conseqüentemente, ao grau de saturação e tamanho da cadeia dos ácidos graxos presentes no material lipídico (Lapuerta *et al.*, 2008).

De acordo com Murugesan (2009), um dos principais problemas no uso do biodiesel é o aumento de sua densidade em ambientes com baixas temperaturas. Esse aumento pode levar ao entupimento dos sistemas de alimentação e, conseqüentemente, ao mau funcionamento do motor (Pinzi *et al.*, 2009). Ramos *et al.* (2009) relatam que, a presença de ácidos graxos saturados de cadeia longa, reduz a fluidez do combustível em baixas temperaturas e, além disso, que o nível de insaturação não tem efeito significativo sobre este parâmetro.

O maior problema relacionado ao uso do biodiesel é sua alta viscosidade, já que motores a diesel modernos apresentam sistemas de injeção sensíveis a essa característica. Dentre os efeitos relacionados ao alto nível de viscosidade, pode-se destacar o favorecimento a combustão incompleta e a ocorrência de problemas nos injetores de combustível e em outros componentes do motor (Wang *et al.*, 2006). Allen *et al.* (1999), na elaboração de um modelo que relaciona a viscosidade do biodiesel e o perfil de ácidos graxos no material lipídico, destacaram que o aumento no nível de insaturação acarreta uma diminuição da viscosidade. Além disso, os autores também indicaram que o aumento no número de carbonos eleva o nível de viscosidade do combustível.

Assim, a partir da consideração dos parâmetros de qualidade estabelecidos para o biodiesel, fica evidenciado que não é possível estabelecer um perfil de ácidos graxos ótimo. Entretanto, de acordo com Knothe (2008), ésteres metílicos derivados do ácido oléico, palmitoléico e decanóico afetam positivamente a qualidade global do biodiesel e, conseqüentemente, é desejável o maior teor desses compostos no material lipídico.

Outro aspecto que também pode influenciar os parâmetros envolvidos na produção de biodiesel é o método de extração de óleo utilizado no processo. Um método que tem sido apontado como uma opção promissora, já que os custos têm diminuído nos últimos tempos frente à extração convencional realizada a partir do uso de solvente, é a extração com fluido supercrítico (Prado *et al.* 2012). Essa extração é considerada uma tecnologia limpa e é realizada com a utilização de uma substância em seu estado supercrítico, alcançado por meio de aumentos de temperatura e pressão, o que favorece diversos parâmetros importantes que um solvente deve ter em uma extração eficiente, como solubilidade, em razão do aumento da densidade da substância nesse estado, e difusividade combinados com uma baixa viscosidade (Gómez *et al.*, 1996).

A substância mais utilizada atualmente na extração com fluido supercrítico é o dióxido de carbono, principalmente devido ao fato de ser uma substância de baixo custo, atóxica, não inflamável, com alta pureza e com baixa pressão (73,8 atm) e temperatura (31,1 °C) crítica (Halim *et al.*, 2012). Rajaei *et al.* (2005) observaram que com o uso de dióxido de carbono em estado fluido supercrítico foi possível, em geral, obter aumentos significativos no rendimento da extração de óleo de chá verde (*Camellia sinensis*), quando comparado a extração com solvente. Além disso, Gómez *et al.*, (1996) relataram que foi possível uma elevação na qualidade do óleo extraído a partir de sementes de uva branca (variedade *airen*), frente àquele obtido com o uso de solvente no processo de extração. Assim, o avanço das tecnologias envolvidas nas etapas que constituem a cadeia produtiva do biodiesel pode contribuir significativamente para otimizar tanto os parâmetros quantitativos quanto qualitativos da produção desse combustível.

Uma tecnologia de grande potencial também consiste no chamado “biodiesel sintético”, que se baseia no conceito BTL (liquefação de biomassa). O processo de produção BTL inicia-se com a trituração e secagem da biomassa que, em seguida, é comprimida. Por meio de um processo de gaseificação em baixas temperaturas, a biomassa é convertida em gás e uma fração sólida (carvão). Após a purificação, o gás é liquefeito através da reação de “Fischer-Tropsch”, onde hidrocarbonetos são formados pela reação entre o monóxido de carbono e o hidrogênio. O líquido resultante é isomerizado, para aumentar sua estabilidade, e posteriormente destilado ou hidro-tratado. Do total obtido, 60% do destilado podem ser usados diretamente como biodiesel, enquanto a parcela restante pode ser convertida em gasolina, querosene ou ser utilizada na indústria química. A vantagem mais marcante do biodiesel sintético, quando comparado ao

biodiesel comum, é a possibilidade de utilizar toda a planta como matéria-prima para o processo, e não apenas o óleo, o que garante um aumento significativo na produção (USDA, 2005).

Independente do processo de síntese, os biocombustíveis podem apresentar, do ponto de vista social, uma grande importância na matriz energética do Brasil. Isso está justificado na perspectiva de possibilitar o desenvolvimento das regiões mais pobres. O Brasil se destaca por possuir um grande potencial agroenergético, isso se justifica por sua diversidade de climas, solos e plantas. Assim, nos estados do nordeste temos a possibilidade de desenvolver a agroenergia a partir das culturas de mamona, palma e algodão, plantas com grande potencial para esse fim e bem adaptadas a essas regiões. A mamona também se apresenta como uma opção para as regiões do semi-árido, uma das regiões mais pobres do Brasil (Pousa *et al.*, 2007). Na região norte, as culturas mais promissoras são o dendê e o babaçu, por outro lado, na região centro-oeste o crambe pode ser cultivado e no sudeste a soja apresenta grande viabilidade. Vale ressaltar que a soja também tem se mostrado viável na região nordeste, assim como o pinhão manso. Por fim, na região sul do Brasil, embora a soja também apresente um grande potencial, o girassol destaca-se como a principal cultura (Moeri, 2005).

Entretanto, o desenvolvimento social só poderá ocorrer se existirem ações políticas que visam a dar-lhe sustentabilidade. Neste aspecto, o governo decretou em 2003 a criação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPUB), que tem como objetivo promover o desenvolvimento da agroenergia na matriz energética nacional. O programa tem como diretrizes básicas a promoção da inclusão social com sustentabilidade, garantir o suprimento de biodiesel com qualidade e a preços competitivos, e produzir biodiesel a partir de diferentes fontes oleaginosas em regiões diversas. Deve também ser destacada a lei nº 11.097, que obriga a adição de um mínimo de biodiesel a todo diesel de petróleo comercializado no mercado nacional. Esse percentual deverá ser de 2% de biodiesel (B2) entre 2008 e 2012 e, de 5% (B5) a partir de 2013 (Portal do Biodiesel, 2004).

Vale ressaltar que, segundo dados do Ministério de Minas e Energia (2004), a produção de biodiesel necessária para atender ao percentual de 2% sobre o diesel de petróleo deverá gerar mais de 150 mil empregos nos primeiros anos, especialmente na agricultura familiar. Além disso, também é prevista a utilização do biodiesel para a geração de energia elétrica em comunidades isoladas, como as do norte do país.

A implantação do PNPUB pelo setor público brasileiro, além da participação de vários agentes envolvidos na cadeia produtiva do biodiesel pertencentes ao setor privado, já tem possibilitado resultados importantes no âmbito da produção dessa energia renovável ao longo dos últimos anos. Segundo dados da ANP (2012), a produção brasileira de biodiesel puro (B100) tem mostrado um crescimento mensal acentuado, considerando o período de 2005 até 2010 (**Figura 4**). Além disso, a agência revela que no somatório da produção de biodiesel anual, em 2011 produziu-se cerca de 16.955.989 barris equivalentes de petróleo de B100, uma produção muito maior que a obtida em 2005, que foi cerca de 4.670. Esse crescimento da produção de biodiesel, já faz com que, atualmente, o Brasil ocupe a quarta posição dentre os maiores produtores mundiais dessa energia alternativa, atrás apenas da Alemanha, Estados Unidos e França, que respectivamente ocupam a primeira, segunda e terceira posição, um resultado importante quando se considera também os efeitos positivos de seu uso no contexto ambiental (Ramos *et al.*, 2011).

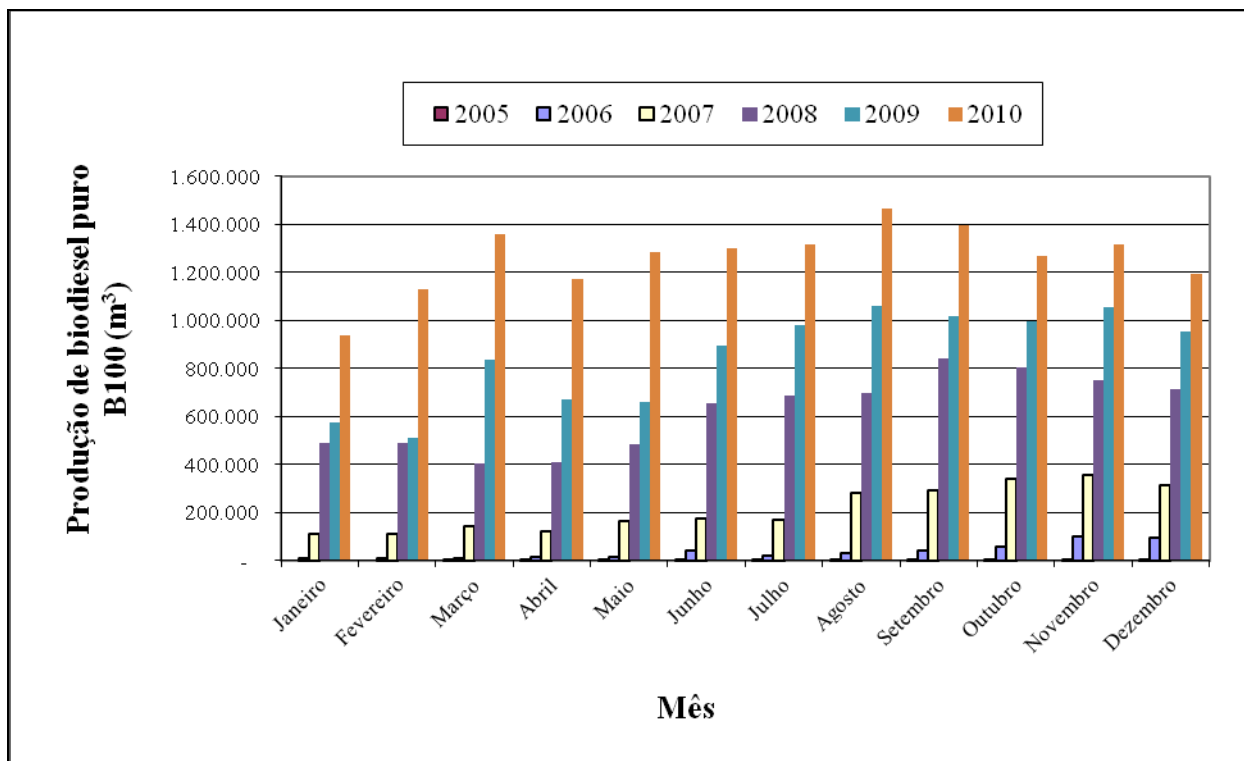


Figura 4. Produção mensal de biodiesel puro (B100) no Brasil em m³ obtida nos período de 2005 até 2010 (ANP, 2012).

A utilização dos biocombustíveis também é impulsionada por seus aspectos ecológicos. Estudos recentes afirmam que um dos efeitos positivos poderá ser a substituição da agricultura intensiva pelo cultivo de plantas nativas, relacionadas à agroenergia (WWF, 2006). É importante também destacar que a queima do biodiesel libera, em geral, 78% menos dióxido de carbono, quando comparado ao diesel de petróleo, além de não liberar o enxofre, principal causador da chuva ácida (Sheehan *et al.*, 1998b).

Em contrapartida, diversos estudos têm ressaltado aspectos negativos relacionados ao uso de biocombustíveis. Um deles é sobre o aspecto ambiental, e envolve o fato de que o consumo de água na cadeia de produção dos biocombustíveis (nesse caso, o biodiesel) é cerca de três ordens de grandeza superior ao consumo estimado para a produção do diesel de petróleo. Outros se referem basicamente ao fato de que produção de matéria prima para biocombustíveis pode trazer problemas como, a substituição de florestas nativas, inflação nos preços dos alimentos, maior liberação de compostos nitrogenados no ambiente e desertificação (WWF, 2006). Por outro lado, o crescente uso de tecnologias que empregam o aproveitamento de resíduos como, por exemplo, o óleo oriundo de fritura, para a produção de biodiesel, representa uma alternativa positiva do ponto de vista ambiental (Iglesias *et al.*, 2012).

Assim, é importante considerar tanto os aspectos positivos quanto negativos apresentados pelos biocombustíveis, pois somente dessa maneira poderá ocorrer um desenvolvimento sustentável da agroenergia. Vale ressaltar, também, que é fundamental a participação dos agentes envolvidos no processo produtivo na promoção da sustentabilidade e do desenvolvimento social.

3.2 Crambe

O crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries) é uma espécie alohexaplóide, pertencente à família Cruciferae e situado na seção *Leptocrambe*, provavelmente originária do mediterrâneo (Fundação MS, 2010). Essa planta é caracterizada como uma erva anual e ereta, com altura que varia de 70 a 90 centímetros (**Figura 5a**). Usualmente, seu florescimento ocorre aos 35 dias, em um ciclo de aproximadamente 90 dias, evidenciado pelo aparecimento de flores brancas, numerosas e pequenas, que se encontram dispostas em um longo racemo (**Figura 5b**) (Brito, 2009; Pitol, 2008). Vale ressaltar ainda que o crambe apresenta polinização cruzada, o que em muitos casos pode gerar problemas, principalmente quando se deseja a manutenção da pureza das variedades (Fundação MS, 2010).

As sementes de crambe são pequenas cápsulas de coloração marrom que têm cerca de 2 milímetros de diâmetro e que contém o óleo em seu interior (**Figuras 5c e 5d**). A cápsula normalmente permanece em torno das sementes, mesmo após a colheita. Entretanto, em casos de atraso na colheita, chuvas fortes ou problemas de desenvolvimento a cápsula pode se romper (Springdale Group, 2005). Na **tabela 1** são detalhadas as principais características do crambe, baseado na variedade brasileira FMS Brilhante, em cultivo na região sul do estado do Mato Grosso do Sul.

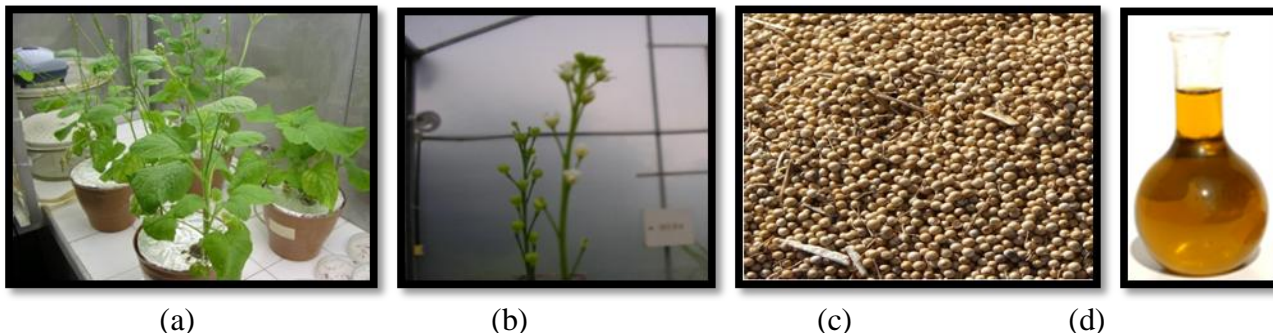


Figura 5. Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries) em sistema hidropônico (a); A inflorescência (b), as sementes (c) e o óleo produzido (d) (Brito, 2009).

Tabela 1. Características apresentadas pela espécie crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), variedade FMS Brilhante, cultivada na região sul do estado do Mato Grosso do Sul (Adaptado de Fundação MS, 2010).

Características	Descrição
Altura média	80 cm
Aspecto da planta	Herbáceo
Tipo de caule	Ramificado
Sistema radicular	Pivotante
Ciclo de vida	90 dias
Início do florescimento	35 dias
Tipo de inflorescência	Rácemo
Cor da flor	Branca
Tipo de polinização	Indireta ou cruzada
Tipo de fruto	Cápsula
Formato do grão	Redondo
Cor do grão	Marrom claro
Tamanho do grão	2 mm
Teor de óleo (com casca)	Entre 36 e 38%
% de casca	22%
Produtividade de óleo	420 kg.ha ⁻¹
Produtividade de grãos	Entre 1000 e 1500 kg.ha ⁻¹

No âmbito agrônomo, nos Estados Unidos e em vários países da Europa, o crambe já é uma cultura relativamente difundida, entretanto, no Brasil, só recentemente o crambe ganhou papel de destaque, principalmente por ser uma cultura altamente adaptável e, assim, possivelmente viável em diversas regiões do país e de cultivo amplamente mecanizável (Fundação MS, 2010). Para Pitol (2008) cabe destacar a grande tolerância à seca, durante sua fase vegetativa, e ao frio. Todavia, vale ressaltar que na fase de florescimento esta espécie não tolera temperaturas baixas ou geadas. O cultivo normalmente se dá em regiões de clima tropical e subtropical, onde a cultura apresenta melhor adaptação, durante a entressafra.

Além disso, uma importante característica das plantas de crambe é a baixa ocorrência de pragas, fato que pode estar relacionado à presença de glicosinolatos na planta, composto que quando metabolizado pode produzir componentes tóxicos, o que diminui os custos de sua produção (Fundação MS, 2010). A ocorrência de doenças também é baixa, estando geralmente ligadas a um aumento na umidade do solo e do ar, entretanto, cabe ressaltar que a doença mais comum está relacionada a ataques de *Alternaria sp.* (Brito, 2009).

Em relação às condições do solo, o crambe se destaca por apresentar uma baixa tolerância a solos ácidos, exigindo assim um bom trabalho de correção. Nesse contexto, é importante destacar que, com um solo bem corrigido, essa espécie, devido a um forte aprofundamento das raízes, pode ser considerada uma recicladora de nutrientes (Fundação MS, 2010). Na fase de semeadura, é indicado corrigir o pH para valores entre 5,8 e 7,5. Deve-se também ter uma atenção especial com os níveis de alumínio no solo, o que pode afetar a tolerância à seca da cultura e a sua produtividade de maneira significativa.

No que diz respeito à demanda nutricional, ainda não se tem informações bem estabelecidas. Entretanto, a sugestão existente se baseia em 50 a 80 kg de nitrogênio (50% na base e 50% na cobertura aos 20 dias), 50 kg de P₂O₅ e 40 kg de K₂O por hectare (AgroPrecisa, 2008). Outra sugestão recomenda o uso de até 150 kg de fertilizante NPK, com formulação

semelhante ao 06-20-20, por hectare (Pitol, 2008). Além disso, o autor destaca que, na safrinha brasileira e em boas condições de solo e clima, a produtividade pode variar entre 1000 e 1500 kg.ha⁻¹, com um teor de óleo na semente por volta de 36 e 38%. Por outro lado, em diversos locais dos Estados Unidos e na Europa, onde é plantado no período da safra principal, existem registros de que a produtividade do crambe possa atingir 3000 kg.ha⁻¹ (Fundação MS, 2010).

A composição do óleo é uma das principais vantagens econômicas do crambe. Isso se justifica devido ao alto percentual de ácido erúcido, quando comparado a diversas oleaginosas comerciais (**Tabela 2**). O ácido erúcido é um ácido graxo monoinsaturado ômega-9 que é tóxico para o consumo humano, por estar associado a danos no coração, mas que pode ser empregado na indústria como lubrificante, inibidor da corrosão, matéria-prima para a produção de borracha sintética, plástico, etc. (**Figura 6**) (Leonard, 1993). Nesse contexto, vale destacar que, atualmente, o maior consumidor de óleo de crambe no mundo é o Reino Unido, visando principalmente extrair o ácido erúcido para fins industriais (Fundação MS, 2010). Além disso, o óleo demonstra viabilidade para o uso pela indústria farmacêutica, de cosmético e, principalmente, de biodiesel, onde se enquadra sem dificuldades nas normas internacionais de qualidade. Dentre as características do óleo de crambe podem ser citadas, por exemplo, sua alta estabilidade oxidativa e seu baixo ponto de fusão, aspectos possibilitados, principalmente, pela grande quantidade de ácidos graxos monoinsaturados presente (Springdale Group, 2005). Além do ácido erúcido, conforme pode ser observado na **tabela 2**, outros componentes majoritários do óleo de crambe que podem ser citados são os ácidos oléico, linoléico e linolênico (Briscoe *et al.*, 1992). A estrutura química desses ácidos graxos encontra-se ilustrada na **figura 7**.

Tabela 2. Percentual de ácidos graxos no óleo de diferentes espécies: Crambe (Adaptado de Springdale Group, 2005), canola, dendezeiro, girassol e soja (Adaptado de Briscoe *et al.*, 1992)

Ácidos Graxos	Percentual de ácidos graxos				
	Crambe	Canola	Dendezeiro	Girassol	Soja
Caprílico (8:0)	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
Cáprico (10:0)	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0
Láurico (12:0)	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0
Mirístico (14:0)	0,0	0,1	1,3	0,1	0,1
Palmítico (16:0)	1,8	3,9	43,9	6,0	10,3
Esteárico (18:0)	0,7	3,1	4,9	5,9	4,7
Oléico (18:1)	17,2	60,2	39	16,0	22,5
Linoléico (18:2)	8,7	21,1	9,5	71,4	54,1
Linolênico (18:3)	5,2	11,1	0,3	0,6	8,3
Eicosanóico (20:0)	3,4	0,0	0,0	0,0	0,0
Erúcido (22:1)	58 – 66	0,5	0,0	0,0	0,0
Brassídico (22:1)	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Tetracosanóico (24:1)	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0
Nervônico (24:1)	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
Outros	2,5	0,0	0,0	0,0	0,0

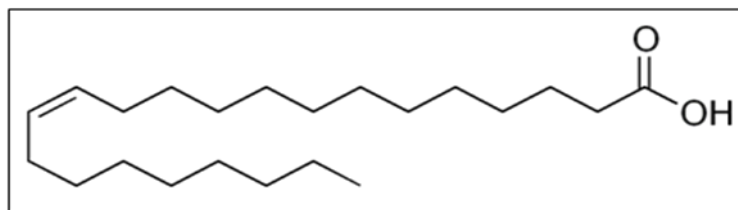


Figura 6. Estrutura química do ácido erúxico, um ácido graxo monoinsaturado ômega-9 (Leonard, 1993).

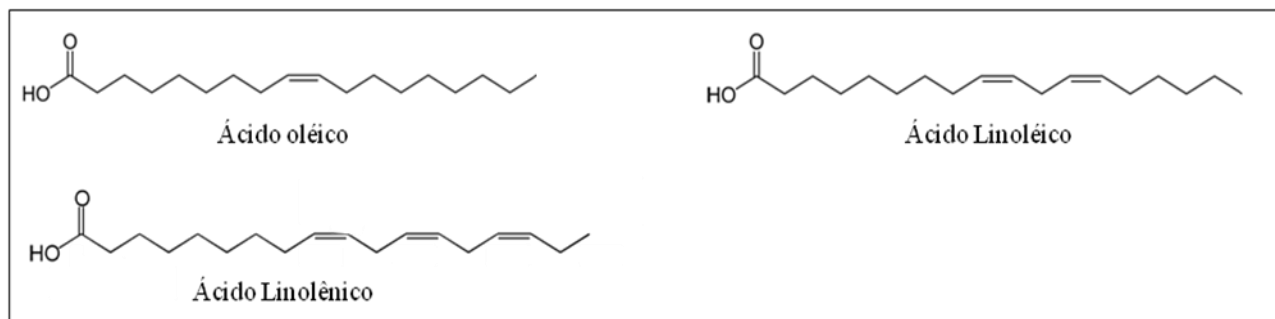


Figura 7. Estrutura química dos ácidos: oléico, linoléico e linolênico, presentes no óleo de crambe (Springdale Group, 2005).

Diversos estudos comprovam que a composição do óleo é afetada por fatores ambientais e genéticos. Fontana *et al.* (1998) avaliando os aspectos agrônômicos de diferentes genótipos de crambe, relataram que a influência genética foi altamente significativa sobre o metabolismo. Os autores descrevem que ocorreram diferenças marcantes em relação à taxa de emergência, a produção de sementes, a produção de óleo e na composição do óleo dos genótipos pesquisados. Em relação à influência ambiental, Francois & Kleiman (1990) citam o efeito da salinidade sobre a diminuição nas concentrações dos ácidos oléico, linoléico e eicosanóico. Entretanto, os autores constataram que não houve mudança significativa nas concentrações de ácido erúxico, em diferentes condições de salinidade.

Um ponto que deve ser destacado, é que ao longo das décadas algumas variedades de crambe foram registradas por diversas instituições de pesquisa do mundo. Nos Estados Unidos, a variedade registrada nesse país mais difundida é a Prophet, embora existam outras importantes como a Indy, Meyer, C-22, C-29 e C-37. Já na Europa, as variedades desenvolvidas nessa região mais comuns são a Galactica, Nebula, Charlotte, Carmen e Mario (Fundação MS, 2010). No Brasil, a única variedade de crambe registrada é a FMS Brilhante, desenvolvida na Fundação MS e bem adaptada às condições brasileiras.

Assim, é fundamental que sejam realizados estudos sobre a interação do metabolismo das diferentes variedades de crambe, principalmente aquelas que sejam adaptadas às condições brasileiras, com fatores bióticos e abióticos. Isso se justifica pelo seu potencial agroenergético, recentemente descoberto, e pela carência de informações sobre essa cultura.

3.3 Nitrogênio

O nitrogênio é um elemento que ocorre em abundância na natureza, estando principalmente sob a forma de gás (N_2), o que representa aproximadamente 78% da composição da atmosfera terrestre. Nos organismos vivos, esse elemento também é amplamente encontrado, isso porque o nitrogênio tem papel fundamental na constituição das biomoléculas, como por exemplo as proteínas, e conseqüentemente na formação da maior parte das enzimas (Mokhele *et al.*, 2012). Além disso, esse macronutriente também participa da formação de outros compostos indispensáveis às plantas, como purinas, pirimidinas, pafininas e coenzimas (Lehninger *et al.*, 1995).

O nitrogênio é um dos elementos exigidos em maiores quantidades pelas plantas, sendo um dos nutrientes que mais limitam o crescimento. Para as plantas, entretanto, o nitrogênio atmosférico não se encontra disponível, devido à baixa reatividade da molécula de N_2 . Assim, as formas de nitrogênio que são preferencialmente absorvidas pelas plantas são o nitrato e o amônio, disponibilizados, em sua maior parte, em virtude da fixação biológica (Souza *et al.*, 2002). Entretanto, vale ressaltar que a maior parte do processo de fixação biológica do nitrogênio só ocorre em leguminosas, desde que devidamente associadas simbioticamente com bactérias, principalmente, as pertencentes ao gênero *Rhizobium* (Mokhele *et al.*, 2012). Nesse contexto, é importante destacar que os organismos fixadores de nitrogênio não apenas contribuem para a disponibilização desse nutriente para as plantas, mas também, devido à produção de diversas substâncias (Hormônio, sideróforos e etc.) auxiliam no enriquecimento do solo (Kumar & Rao, 2012).

No processo de absorção de nitrogênio pelas plantas, o nitrato é translocado pela membrana plasmática por um sistema de simporte com dois prótons, enquanto o amônio segue através dessa membrana por um sistema de transporte caracterizado como uniporte (**Figura 8**) (Souza & Fernandes, 2006). Na absorção do nitrato em plantas, dois sistemas podem atuar, o sistema de alta afinidade (“High-affinity transport system” – HATS), que tem atividade quando as concentrações desse ânion no meio de cultivo são iguais ou menores que 1 mM, e o sistema de baixa afinidade (“Low-affinity transport system” – LATS), que atua em concentrações de nitrato superiores a 1 mM (Dechornat, 2011). É importante citar que os componentes do HATS e LATS podem ser constitutivos ou induzidos.

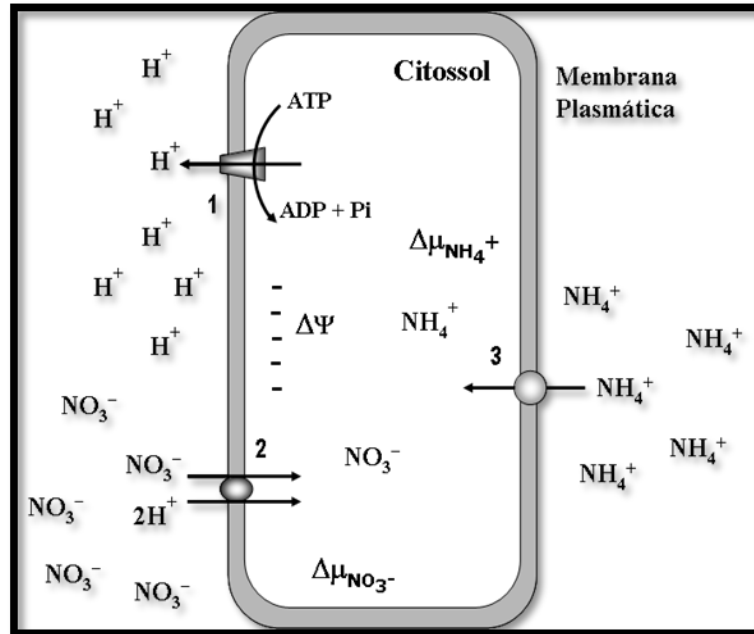


Figura 8. Esquema da absorção do nitrato (NO_3^-) e amônio (NH_4^+) através da membrana plasmática em plantas. (1) Bomba de prótons (P-H^+ ATPase), (2) transportador de nitrato (simporte) e (3) transportador de amônio (uniporte). Retirado de Souza & Fernandes (2006).

Após a absorção, o amônio pode ser prontamente incorporado em esqueletos de carbono, enquanto o nitrato tem que ser reduzido. Primeiramente, o nitrato é reduzido a nitrito no citossol, pela ação da nitrato redutase (NR). Em seguida, o nitrito segue para o cloroplasto, onde é convertido em amônio, por meio da ação da nitrito redutase (NiR). Vale ressaltar, a participação essencial de co-fatores nessas reações, como o NAD^+ (NR) e a ferredoxina (NiR). O amônio resultante pode seguir pela via chamada GS-GOGAT, onde será incorporado a um esqueleto de carbono preexistente e, em seguida, utilizado em diversas rotas (Oaks & Hirel, 1985). Vale ressaltar ainda que as plantas podem absorver nitrogênio do meio de cultivo sob forma de aminoácidos, e que esse suprimento pode ter um papel importante na agricultura (Godlewski & Adamczyk, 2007).

O nitrato, após ser absorvido nas raízes, pode não ser metabolizado nesse local e seguir para os diversos órgãos na planta, auxiliado por um sistema complexo de transporte. Uma etapa importante, na distribuição do nitrato para a parte aérea da planta, é a sua entrada no xilema, processo no qual o transportador NRT1.5 parece exercer um papel fundamental. Com a entrada do nitrato no xilema, esse ânion pode seguir para os pecíolos, um órgão caracterizado por possuir geralmente altas concentrações de nitrato, e posteriormente, atingir as folhas (Dechorgnat *et al.*, 2011).

O nitrato, após sua entrada nas células vegetais, pode também seguir para o vacúolo, sendo armazenado para restituir o suprimento de nitrogênio em períodos de carência desse elemento e também atuando no controle osmótico. Isso é importante, por exemplo, no desenvolvimento de novas folhas, uma vez que parte do suprimento de nitrato necessário pode seguir do vacúolo de folhas velhas, via floema, até esses locais (Souza & Fernandes, 2006). A **Figura 9** ilustra as principais rotas que o nitrato pode seguir na planta após sua absorção, além dos transportadores fundamentais para o processo.

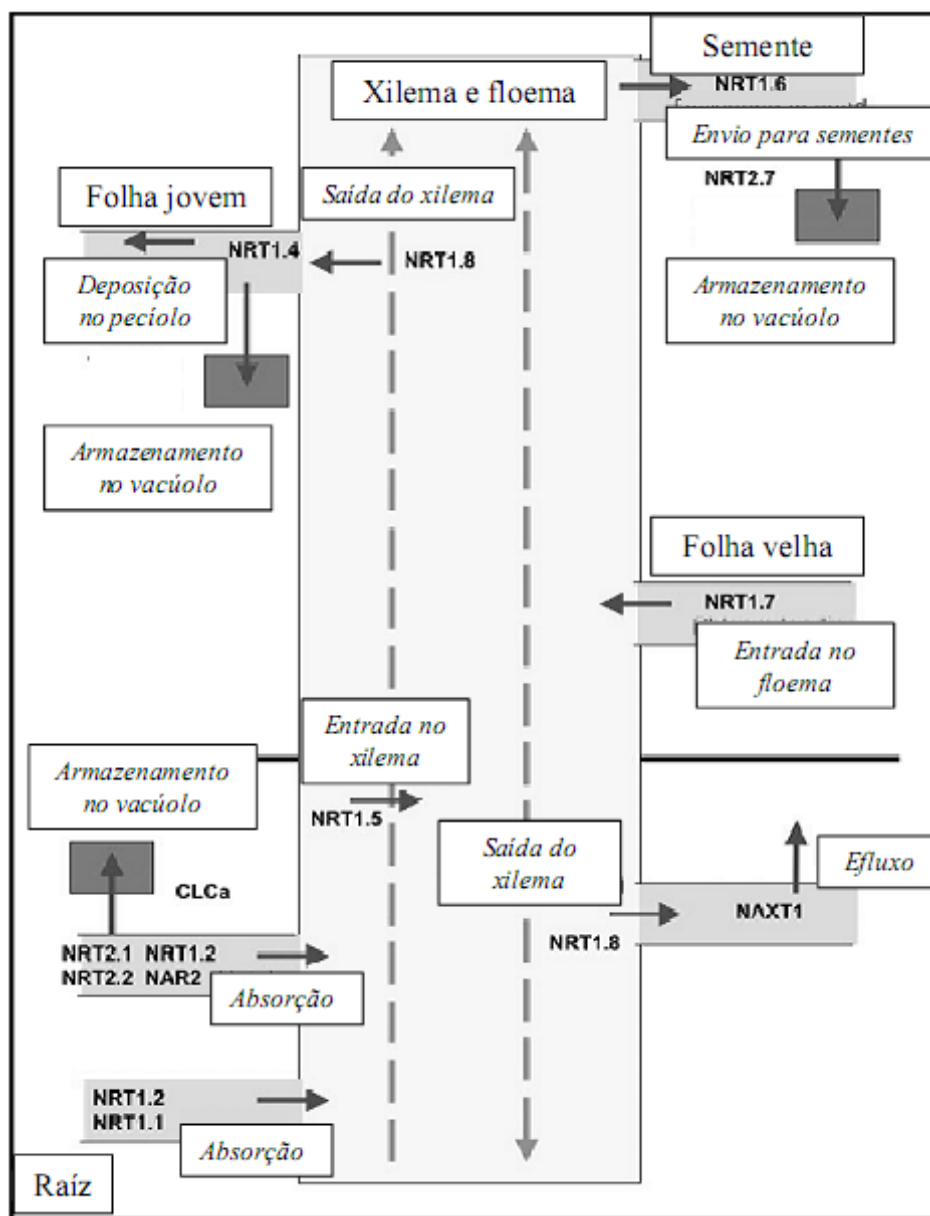


Figura 9. Principais rotas do nitrato (NO₃⁻) no interior de plantas e transportadores envolvidos em cada etapa do processo. Adaptado de Dechornat *et al.*, (2011).

Algumas espécies, a absorção do nitrato pelas raízes pode ser completamente reprimida durante o florescimento, não atuando durante o desenvolvimento das sementes. Assim, o suprimento de nitrogênio para a síntese de proteínas nas sementes vem, principalmente, a partir da mobilização via folhas velhas (Souza *et al.*, 2002). Entretanto, nas sementes, o nitrato não é geralmente a principal forma de nitrogênio presente, pois é em sua maioria utilizado na síntese de proteínas, mas por outro lado, é importante na regulação e quebra da dormência desse órgão (Alboresi *et al.*, 2005).

A importância do conhecimento sobre o metabolismo do nitrogênio em plantas deve-se a sua grande influência na produtividade das culturas. Castro *et al.* (1998) observaram, em

experimento realizado com girassol (*Helianthus annuus*), que a produtividade de grãos sofreu influência significativa das diferentes doses de nitrogênio. Os autores destacam que um aumento da produtividade ocorreu até a dose de 90 kg ha⁻¹. Resultados semelhantes, no que diz respeito ao rendimento de grãos, foram observados por Valério *et al.* (2003), que em experimento com feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), observaram um aumento no rendimento em função das maiores doses de nitrogênio no plantio. Entretanto, resultados obtidos por Crusciol *et al.* (2003) ressaltam que em plantas de feijão, o fornecimento de 25 kg ha⁻¹ durante a semeadura não teve influência significativa sobre o rendimento de grãos.

Taylor *et al.* (1991) observaram em plantas de canola (*Brassica napus* L.), uma crucífera, tal como o crambe, um aumento na produção de óleo com as menores doses de nitrogênio fornecidas. Além disso, outros autores destacam uma estagnação, ou até mesmo uma redução, na produção de grãos em canola, com o aumento do suprimento de nitrogênio (Gammelvind *et al.*, 1996; Sieling & Christen., 1997). Rathke *et al.* (2006) ressaltam que existe uma possível correlação inversa entre a quantidade de óleo produzida e o teor de proteína no grão em crucíferas, entretanto, os autores destacam que outros fatores podem alterar esse comportamento.

Além de influenciar a produção de óleo nas sementes de uma determinada cultura, o suprimento de nitrogênio pode afetar significativamente o perfil de ácidos graxos presentes e, com isso, modificar a qualidade do óleo. Segundo Steer & Seiler (2006), em experimento com girassol (*Helianthus annuus* L.), o aumento do suprimento de nitrato, fornecido antes do início do florescimento, acarretou um incremento na concentração dos ácidos palmítico e linoleico, por outro lado, a concentração dos ácidos esteárico e oleico diminuiu. Os autores sugerem que o suprimento de nitrogênio pode afetar a taxa de hidrólise dos complexos com ácidos graxos, ou seu transporte do proplastídeo para o citossol. Além disso, Ahmad & Abdin (2000) observaram, em plantas de colza (*Brassica campestris* L.) e mostarda (*Brassica Juncea* L. Czern. and Coss.), que a elevação nas doses de nitrogênio fornecidas promoveu um aumento significativo na formação dos ácidos erúico, eicosanóico e linolênico no óleo dessas plantas.

Assim, são importantes os estudos que tenham por objetivo viabilizar uma aplicação adequada de nitrogênio em uma determinada cultura, pois erros nesse processo podem trazer sérios impactos econômicos na produção. Nesse âmbito, de acordo com Abrol *et al.* (2007) a maior parte do nitrogênio aplicado no solo é perdida, principalmente via processos de lixiviação e desnitrificação, um prejuízo que anualmente, segundo Raun & Johnson (1999), está em torno de 15.9 bilhões de dólares.

Além dos prejuízos econômicos existe o aspecto ambiental, isso se justifica devido ao fato de que, o uso inadequado de nitrogênio inorgânico, pode ocasionar sérios problemas nesse âmbito. Camargo & Alonso (2006) analisando a questão ambiental, citam que os maiores problemas estão relacionados ao aumento na concentração de prótons na água, o que leva a uma acidificação e, conseqüentemente, no estímulo ao desenvolvimento de algas (produtores primários). Tal estímulo provoca, por sua vez, uma maior possibilidade de eutrofização do ecossistema aquático, devido a proliferação de microorganismos que atuam na decomposição dessas algas. Além disso, os autores ressaltam que os efeitos da poluição por nitrogênio orgânico podem atingir a saúde das populações e também grandes impactos sobre a economia.

Desse modo, frente a crescente preocupação com a questão ambiental, tornam-se necessárias alternativas que visam possibilitar uma maior sustentabilidade da atividade humana. Dentro desse aspecto, cabe ressaltar a necessidade de trabalhos de pesquisa que proporcionem uma maior produtividade a uma determinada cultura, minimizando os efeitos danosos sobre o ambiente, através do estabelecimento das quantidades adequadas dos insumos exigidos.

3.4 3-Cetoacil-CoA sintase, delta 12 desaturase e lisofosfatidil aciltransferase

A enzima 3-Cetoacil-CoA sintase (KCS) é uma das quatro que integram o complexo, que encontra-se ligado ao retículo endoplasmático, responsável pela síntese de ácidos graxos de cadeia longa (com mais de 18 carbonos) em plantas. Essa síntese é realizada, em sua maioria, a partir de ácidos graxos com até 18 carbonos, como o oléico (C18:1), que por sua vez são formados no plastídeo, e de grupamentos malonil-CoA (**Figura 10**) (Guo *et al.*, 2009). Esse complexo é fundamental, por exemplo, na síntese do ácido erúico (C22:1) (Tian *et al.*, 2011). Nesse âmbito, é importante destacar também que, segundo Millar *et al.* (1997), a atividade da enzima KCS nesse complexo representa a etapa que limita a velocidade global da síntese de ácido erúico na maioria das plantas.

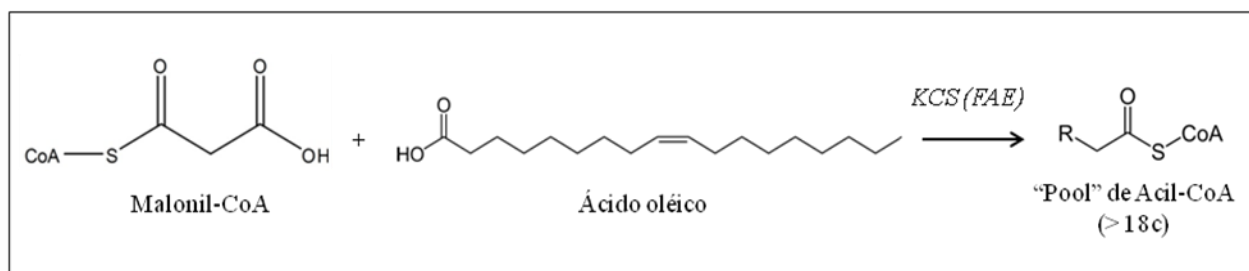


Figura 10. Esquema da catálise realizada pelo complexo FAE, onde a enzima 3-Cetoacil-CoA sintase (KCS) atua. FAE, “Fatty acid elongase complex” (Baud & Lepiniec, 2010).

Kanrar *et al.* (2006), em experimento com plantas transgênicas de mostarda indiana (*Brassica juncea*), obtiveram um aumento de 36% na quantidade de ácido erúico com a superexpressão do gene relacionado à KCS (*BjFAEI*). Além disso, Mietkiewska *et al.* (2007) destacam que um crescimento de 12 vezes na proporção de ácido erúico, no óleo de *Arabidopsis thaliana*, foi possível a partir da expressão em sementes do gene que codifica essa enzima em plantas de *Crambe abyssinica*. Entretanto, em alguns casos é desejável uma redução na concentração de ácido erúico em uma determinada cultura, principalmente, quando se tem o objetivo de viabilizar o óleo para o consumo humano, devido aos efeitos prejudiciais desse ácido graxo no organismo.

A redução na expressão do gene que codifica a enzima KCS em plantas, também acarreta alterações importantes nas concentrações de ácido erúico do óleo. Tian *et al.* (2011) relatam que a partir do silenciamento do gene *FAEI*, relacionado a KCS, em plantas de canola (*Brassica napus*), foi possível uma redução significativa nos níveis dos ácidos erúico e eicosanóico do óleo. Em resultados obtidos por Zebarjadi *et al.* (2006) foi possível uma diminuição nos percentuais de ácido erúico, mais precisamente de 48 para 33%, a partir do emprego do gene *FAEI* na orientação antisense, também em plantas de canola (*Brassica napus*). Assim, os resultados obtidos, tanto no sentido de aumentar ou reduzir a concentração de ácido erúico no óleo de plantas da família *Brassicaceae*, revelam que o gene relacionado à enzima KCS tem um papel fundamental nesse controle.

Outra enzima que exerce uma forte influência no perfil de ácidos graxos presente no óleo da maioria das plantas é a Delta 12 desaturase. Essa enzima atua no retículo endoplasmático, sendo fundamental na conversão do ácido oléico (C18:1) em linoléico (C18:2) que ocorre em sementes, a primeira etapa na via de formação de ácidos graxos poliinsaturados (**Figura 11**) (Ray *et al.*, 1993). Para as plantas, a síntese desses ácidos graxos apresenta diversas importâncias fisiológicas como, por exemplo, resistência ao frio, regulação de canais iônicos, e na formação

de ácido jasmônico, um componente fundamental na defesa contra herbivoria (Jung *et al.*, 2011). Por outro lado, quando se tem em vista o uso do óleo para a síntese de biodiesel, e geralmente desejável uma menor atividade da Delta 12 desaturase, uma vez que ésteres metílicos provenientes do ácido oléico influenciam positivamente a qualidade global do biodiesel (Knothe, 2008).

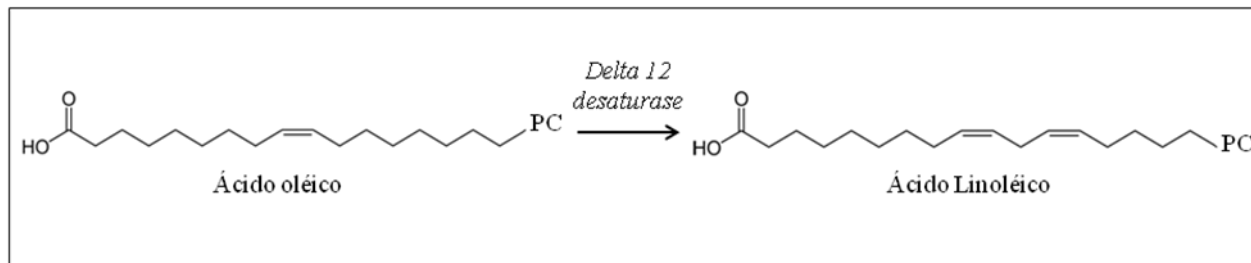


Figura 11. Esquema da catálise realizada pela enzima delta 12 desaturase, PC representa o grupamento fosfatidilcolina (Baud & Lepiniec, 2010).

Diversos estudos demonstram a forte correlação entre a atividade da Delta 12 desaturase e os percentuais de ácido oléico presentes no óleo de plantas. Jung *et al.* (2011) destacam que a expressão de um gene relacionado a essa enzima (*BrFAD2-1*), na orientação antisense, possibilitou o desenvolvimento de variedades transgênicas de canola (*Brassica napus*) com altos percentuais de ácido oléico no óleo. Além disso, de acordo com Stoutjesdijk *et al.* (2000), a partir do silenciamento de genes relacionado a desaturases foi possível obter aumentos significativos na concentração de ácido oléico, tanto em *Brassica napus* (89%) quanto em *Brassica juncea* (73%). Dessa forma, a enzima Delta 12 desaturase representa um alvo importante para estudos que utilizam ferramentas de biologia molecular, que tem em vista uma melhora no perfil do óleo para a produção de biodiesel em plantas da família *Brassicaceae*, devido aos reconhecidos efeitos positivos do ácido oléico sobre os parâmetros de qualidade internacionais.

Diferentemente das enzimas KCS e delta 12 desaturase, que atuam diretamente sobre a síntese de ácidos graxos, a enzima lisofosfatidil aciltransferase (LPAT) exerce um papel fundamental na síntese de triacilgliceróis. A LPAT atua no interior do retículo endoplasmático das células de sementes, catalisando a formação de fosfatidato a partir da acilação do lisofosfatidato (**Figura 12**) (Baud & Lepiniec, 2010). Essa etapa é considerada um passo regulatório no processo de síntese de triacilgliceróis em sementes. Além disso, o fosfatidato exerce uma reconhecida participação para a formação da membrana e também possui função sinalizadora, pois atua como segundo mensageiro (Testerink & Munnik, 2011).

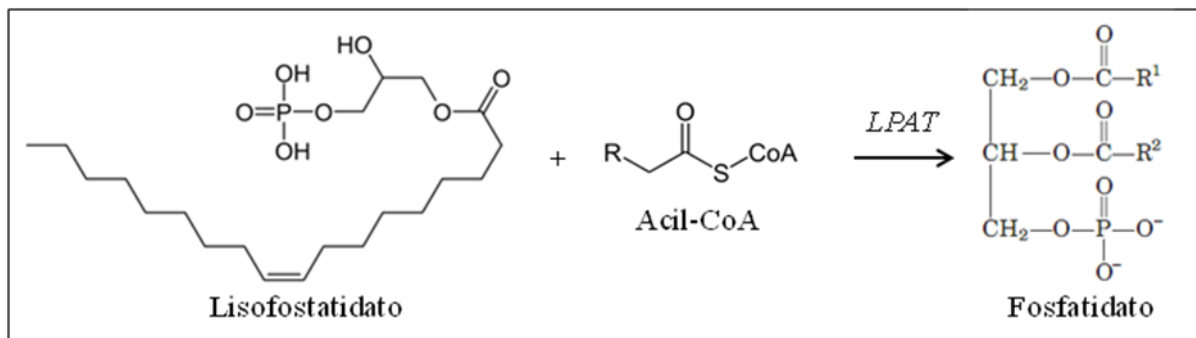


Figura 12. Esquema da catálise realizada pela enzima lisofosfatidil aciltransferase (LPAT) (Baud & Lepiniec, 2010).

Diversos estudos relatam a relação próxima entre os aspectos quantitativos do óleo de plantas e a atuação da enzima LPAT. Um dos mais importantes foi realizado por Xu *et al.* (2010), onde a partir da expressão do gene da LPAT, proveniente de *Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries, em plantas de canola (*Brassica napus*) foi possível obter um aumento significativo na quantidade de óleo produzido, sem influência sobre sua composição. Zou *et al.* (1997), por sua vez, obtiveram que aumentos de 8 até 48% no conteúdo de óleo, a partir da expressão de um gene proveniente de fungo (*Saccharomyces cerevisiae*), relacionado a um produto com atividade semelhante a LPAT, em plantas pertencentes à família brassicaceae. Por outro lado, vale ressaltar também que, indiretamente, a atuação da LPAT parece exercer um efeito positivo sobre a concentração de ácido erúcido em diversas espécies dessa família (Nath *et al.*, 2009; Zou *et al.*, 1997).

Dessa forma, tendo em vista o uso do óleo de *Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries, tanto na produção de biodiesel quanto para a extração de ácido erúcido, torna-se relevante avaliar a expressão dos genes relacionados a 3-Cetoacil-CoA sintase, delta 12 desaturase e lisofosfatidil aciltransferase, frente aos principais fatores que atuam no cultivo. Essas informações irão possibilitar não apenas um melhor entendimento sobre os aspectos metabólicos da variedade de interesse, nesse caso a FMS Brilhante, e sua relação com o manejo, mas também a identificação de futuros alvos para estudos moleculares.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Condução dos experimentos I e II

Os experimentos I e II foram conduzidos em casas de vegetação localizadas no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, nos meses de dezembro de 2009 e janeiro de 2010. O experimento I foi conduzido na casa de vegetação pertencente ao Departamento de Química, enquanto o experimento II foi realizado na casa de vegetação do Departamento de Solos. Em ambos os experimentos, foram utilizadas sementes comerciais de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), variedade FMS brilhante, previamente desinfestadas sob agitação em água destilada por 15 minutos, em seguida, em etanol 70% durante 1 minuto e em solução de hipoclorito de sódio 2% por 15 minutos. Após a lavagem das sementes, foi feita a semeadura em substrato comercial (Biomix[®] - mudas e plantio) devidamente esterilizado, em câmara de crescimento.

Ao atingirem cerca de 10 cm de altura, as mudas foram transportadas para a casa de vegetação, onde permaneceram em aclimatação durante oito dias no experimento I e cinco dias no experimento II. Após essa etapa, ocorreu o transplantio das mudas para os vasos do sistema hidropônico ligado a um mecanismo de bombeamento de ar. Em cada vaso foi acondicionada uma planta e as plantas permaneceram, durante seis dias no experimento I e uma semana no experimento II, em solução nutritiva modificada (Hoagland & Arnon, 1950) com 2 mM de N-NO_3^- , demais macronutrientes a ½ de força iônica e micronutrientes a 100% de força iônica. Em seguida, ocorreu a retirada da solução e foi dado início a aplicação dos tratamentos, conforme descrito na **tabela 3**. Vale destacar que os demais macronutrientes foram fornecidos de acordo com o proposto por Hoagland & Arnon (1950) a ½ de força iônica e os micronutrientes disponibilizados a 100% de força iônica.

Tabela 3. Descrição das doses de N-nitrato (Experimento I) e diferentes valores de pH (Experimento II) da solução nutritiva utilizada no cultivo de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), variedade FMS Brilhante. No experimento I a aplicação dos tratamentos ocorreu seis dias após o transplantio e no experimento II após sete dias.

Tratamentos	Experimento I	Experimento II
	Doses de N-NO_3^- (mM)	Valores de pH
T1	0,2	5,0
T2	2,0	5,5
T3	4,0	6,0
T4	---	6,5

No experimento I cada tratamento foi composto por quatro repetições, enquanto que no experimento II cada tratamento foi constituído de três repetições. Em ambos os experimentos as repetições foram distribuídas em delineamento inteiramente casualizado. Ao fim da fase vegetativa, que ocorreu aos 37 dias após a germinação (DAG), foi realizada a coleta das plantas. Além de possibilitar a obtenção de informações sobre a cultura, essa etapa foi importante também para a realização de eventuais ajustes de algumas condições experimentais.

Semanalmente foi feita a troca da solução nutritiva e, a cada dois dias, a verificação e manutenção do pH em 6,3, exceto no experimento II onde o pH era ajustado de acordo com os tratamentos descritos. Além disso, após cada verificação do pH ocorria a manutenção do volume de solução, através da adição de água destilada.

4.2 Análises laboratoriais dos experimentos I e II

Após cada coleta, as plantas tiveram suas raízes, caules e folhas separadas e as massas frescas determinadas. Amostras (0,2 g) de cada parte da planta foram submetidas à análise da atividade da nitrato redutase (Javorsky, 1971). Também foram separadas amostras (0,5 g) de material fresco de cada parte da planta (em duplicata) para armazenamento em 20 mL de etanol e, posteriormente, preparo do extrato alcoólico. O procedimento para preparo do extrato foi executado a partir da maceração do material vegetal em etanol 80%, filtração do extrato obtido, partição com clorofórmio e elevação do volume da fração polar (menos densa) para 25 mL com etanol 80%. Com o extrato obtido foram feitas as análises das seguintes frações solúveis: N-amino livre (Yemm & Cocking, 1955), N-NH₄⁺ (Felker, 1977), N-NO₃⁻ (Cataldo *et al.*, 1975) e açúcares solúveis (Yemm & Willis, 1954). O material vegetal restante obtido a partir do experimento II, foi submetido à secagem e pesagem (Tedesco, 1982).

4.3 Condução do experimento III

O experimento III foi conduzido em casa de vegetação do Departamento de Química, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Nesse experimento, foram utilizadas sementes comerciais de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries) previamente desinfestadas, conforme o descrito para os experimentos I e II. Após a lavagem das sementes, foi executada a semeadura em substrato comercial (Biomix[®] - mudas e plantio) devidamente esterilizado, em casa de vegetação.

Ao atingirem cerca de 10 cm de altura, as mudas foram transplantadas para vasos, com cerca de 20,7 litros de terra coletada de um solo do tipo argissolo da Embrapa Agrobiologia. Amostras desse solo foram previamente enviadas para a análise química, realizada segundo EMBRAPA (1997), no Laboratório de Fertilidade da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Vale ressaltar que a calagem do solo, realizada a partir da deposição de calcário dolomítico, foi feita por meio do método de saturação por bases elevando-se a 70%.

Em cada vaso foram acondicionadas três plantas e a adubação foi realizada a partir do uso de solução nutritiva modificada (Hoagland & Arnon, 1950), com as doses de N-NO₃⁻ para os tratamentos descritos na **tabela 4**. Os micronutrientes foram fornecidos nas quantidades relativas a 100% de força iônica, de acordo com Hoagland & Arnon (1950), e os demais macronutrientes ajustados.

Tabela 4. Concentrações de N-nitrato utilizadas no cultivo de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), variedade FMS Brilhante, em cada vaso, nos diferentes tratamentos para o experimento III.

Tratamentos	Doses de N-NO ₃ ⁻
	(mM)
T1	0,8
T2	1,6
T3	2,4
T4	3,2

Para o cálculo das doses de N-NO₃⁻ dos diferentes tratamentos, foi utilizado como parâmetro a sugestão fornecida pela AgroPrecisa (2008), juntamente com a recomendação divulgada pela Fundação MS (2010).

Cada tratamento foi composto por 12 repetições de três plantas, sendo quatro para cada coleta. As coletas foram realizadas aos 37 (início do florescimento), 63 (final do florescimento) e 90 (final da maturação das sementes) dias após a germinação (DAG). O experimento foi organizado em delineamento inteiramente casualizado e durante o experimento, foi aplicado o inseticida Dipel® (0,6g L⁻¹), um produto de controle biológico a base de *Bacillus thuringiensis*, e o fungicida Cabrio Top (1,2g L⁻¹).

4.4 Análises laboratoriais do experimento III

Após cada coleta, as plantas tiveram suas raízes, caules, folhas e grãos, quando presentes, separados e as massas frescas determinadas. Amostras (0,2 g) de cada parte da planta foram utilizadas para a determinação da atividade da nitrato redutase (Javorsky, 1971). Também foram separadas amostras (0,5 g) de material fresco de cada parte da planta (em duplicata) para armazenamento em 20 mL de etanol e, posteriormente, preparo do extrato alcoólico. O procedimento para preparo do extrato alcoólico foi o mesmo descrito para os experimentos I e II. Com o extrato obtido foram feitas as análises das seguintes frações solúveis: N-amino livre (Yemm e Cocking, 1955), N-NH₄⁺ (Felker, 1977), N-NO₃⁻ (Cataldo *et al.*, 1975) e açúcares solúveis (Yemm & Willis, 1954). O material vegetal restante foi submetido à secagem, pesagem, trituração e digestão. Com o extrato obtido foram realizadas as análises de nitrogênio, fósforo e potássio (Tedesco, 1982).

Os grãos coletados foram submetidos à secagem, até atingirem peso constante, e tiveram o óleo extraído em aparelho extrator de Soxhlet durante 2 horas com éter de petróleo. Após a evaporação do solvente em rotoavapor, as amostras de óleo foram pesadas para a determinação do rendimento (análise quantitativa) e, posteriormente, armazenadas para a análise do perfil de ácidos graxos. Visando essa análise, foi previamente realizada a conversão dos ácidos graxos das amostras (0,15g) em seus respectivos ésteres metílicos (Metcalf *et al.*, 1966). Os ésteres metílicos obtidos foram submetidos à análise por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama (CG-DIC) visando determinar a composição e o percentual relativo de ácidos graxos de cada amostra. Vale ressaltar que a uma amostra de óleo e o padrão de ácido erúico foram submetidos à cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).

Além disso, foram congeladas em N₂ líquido e armazenadas a -80 °C amostras de grãos maduros (aproximadamente 0,5g), obtidos após a terceira coleta, visando à avaliação da expressão dos genes que codificam a lisofosfatidil aciltransferase (LPAT – GenBank EF208088.1), 3-cetoacil-CoA sintase (KCS – GenBank AY793549.1), delta 12 desaturase (GenBank DQ518290.1) e actina 2 (GenBank NM 180280.1 – Controle endógeno). A descrição detalhada de todas as análises mencionadas encontra-se no item a seguir.

4.5 Descrição detalhada das análises

4.5.1 Atividade da nitrato redutase

Para a análise da atividade da nitrato redutase (Javorsky, 1973) foram separadas amostras de 200 miligramas de tecido vegetal para inclusão em tubo de ensaio contendo um meio de incubação específico (5 mL). Esse meio foi preparado a partir mistura de tampão fosfato pH 7,5 (909 mL), *n*-propanol (27,2 mL) e KNO₃ (1,84 g). Os tubos de ensaio contendo as amostras em meio de incubação foram cobertos com papel alumínio e colocados em banho-maria durante 30 minutos a temperatura de 30 °C. Após essa etapa, o nitrito produzido foi submetido a reação colorimétrica.

Para a reação colorimétrica, duas alíquotas (0,4 mL) da solução formada pela amostra e pelo meio de incubação foram colocadas em meio reacional composto por sulfanilamida 1% em HCl 3 M (0,3 mL) e *N*-naftil-etileno di-amino 0,02% (0,3 mL).

Após 20 minutos em repouso, foi adicionada água destilada (4 mL) e as amostras tiveram sua absorvância a 540 nanômetros determinada em espectrofotômetro. Para a determinação da concentração de nitrito produzido, foi utilizado como parâmetro uma curva padrão de nitrito de sódio. As amostras das soluções que constituem a curva padrão foram submetidas a reação colorimétrica e determinou-se sua absorvância, conforme o descrito anteriormente.

4.5.2 Determinações de metabólitos solúveis

Dosagem de N-amino livre

Para a determinação de N-amino livre (Yemm & Cocking, 1955), foram utilizadas alíquotas de 0,5 mL das amostras de extrato alcoólico visando a reação colorimétrica em meio reacional específico. O meio reacional foi preparado a partir de tampão citrato (1 mL) e uma mistura de metil celossolve, KCN e ninhidrina (Hidrato de triceto-hidrindeno) (1,2 mL). Para o preparo da mistura, foi inicialmente preparada uma solução de ninhidrina em metil celossolve (5 % p/v). Em seguida, uma solução de KCN em metil celossolve foi preparada a partir de KCN 0,01 M (5mL) dissolvido em metil celossolve até completar 250 mL. Finalmente, a solução contendo a ninhidrina foi misturada à solução contendo o KCN na proporção 1:5.

Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio reacional e submetidas a agitação. Posteriormente, os tubos de ensaio foram fechados com papel alumínio e submetidos a aquecimento em banho-maria a 100 °C por 15 minutos. Após o aquecimento, os tubos de ensaio contendo as amostras em meio reacional foram resfriados em água corrente por 5 minutos e adicionou-se etanol 60% (3 mL) ao seu conteúdo. Após nova agitação, a absorvância a 570 nanômetros foi determinada em espectrofotômetro.

Para a determinação da concentração de N-amino nas amostras, foi utilizado como parâmetro a curva padrão de leucina. As amostras das soluções que constituem a curva padrão foram submetidas à reação colorimétrica e determinou-se sua absorvância, conforme o descrito anteriormente.

Dosagem de N-NH₄⁺

Para a dosagem de N-amônio (Felker, 1977), alíquotas de 0,5 mL das amostras de extrato alcoólico foram submetidas à reação colorimétrica em meio reacional específico. Para o meio reacional, foi preparada previamente uma solução contendo fenol (5 g) e nitroprussiato de sódio (25 mg) diluída até o volume de 500 mL em água destilada. Além disso, preparou-se uma solução contendo dicloroisocianurato de sódio (0,31 g) e hidróxido de sódio (15 g) também diluída até 500 mL com água destilada. De cada solução preparada foram utilizados 2,5 mL para o meio reacional. Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio contendo o meio reacional e submetidas a agitação. Após 30 minutos em temperatura ambiente, realizou-se uma nova agitação e foi determinada a absorvância a 630 nanômetros.

Para a determinação da concentração de N-amônio nas amostras, foi utilizada como parâmetro a curva padrão de cloreto de amônio. As amostras das soluções que constituem a curva padrão foram submetidas a reação colorimétrica e determinou-se sua absorvância, conforme descrito anteriormente.

Dosagem de N-NO₃⁻

Na determinação dos teores de nitrato (Cataldo *et al.*, 1975) foram utilizadas alíquotas de 0,05 mL do extrato alcoólico em meio reacional específico visando a determinação colorimétrica. Para o meio reacional utilizou-se Hidróxido de Sódio 2N (4,75 mL) e uma solução de ácido salicílico 5% em H₂SO₄ concentrado (0,2 mL).

Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio e, posteriormente, foi adicionado vagarosamente o ácido salicílico 5% em H₂SO₄ concentrado. Após a agitação, as amostras foram deixadas 20 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, foi adicionado hidróxido de sódio 2N. Após realizar uma nova agitação, a absorvância a 410 nanômetros foi determinada em contra uma curva padrão de nitrato de potássio, conforme descrito anteriormente.

Dosagem de açúcares solúveis

Para a determinação de açúcares solúveis (Yemm & Willis, 1954), foram utilizadas alíquotas de 0,2 mL das amostras de extrato alcoólico visando a reação colorimétrica em meio reacional específico. O meio reacional foi preparado com antrona (0,4 g) diluída em uma mistura de ácido sulfúrico e água destilada (5:2). Após o preparo, a mistura foi deixada em repouso por aproximadamente 45 minutos e, posteriormente, utilizada para o meio reacional.

Para a reação colorimétrica, a solução de antrona em ácido sulfúrico e água (5 mL) foi colocada em tubos de ensaio de 50 mL em banho de gelo. Após 5 minutos, foi adicionada lentamente a amostra e, posteriormente, etanol 80% (0,8 mL). A mistura foi deixada em repouso por mais 5 minutos em banho de gelo e, em seguida, agitada. Para o desenvolvimento da cor verde, os tubos foram devidamente vedados com papel alumínio e levados ao banho-maria a temperatura de 100 °C por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram resfriados e de seu conteúdo foi determinada a absorvância a 620 nm que, posteriormente, foi comparada ao padrão de glicose.

4.5.3 Determinações dos teores de N-total, fósforo e potássio

Digestão sulfúrica

Para a digestão sulfúrica (Tedesco, 1982), 200 mg de amostra vegetal seca e moída foram transferidas para tubo de digestão. Posteriormente, foi adicionado lentamente H₂O₂ 30% (1,0 mL), H₂SO₄ concentrado (1,5 ml) e a mistura catalisadora (0,7 g) em capela de exaustão. A mistura catalisadora foi preparada a partir da trituração de Na₂SO₄ (100 g), CuSO₄.5 H₂O (10g) e selênio (1g) em almofariz. Após a deposição dos reagentes as amostras foram submetidas a uma seqüência periódica de aquecimento em bloco digestor.

Após esfriar em temperatura ambiente, a solução obtida a partir da digestão foi dissolvida até 50 ml com água destilada. Em seguida, a solução foi filtrada e armazenada, sob refrigeração, até o momento das determinações.

Dosagem de N-total

Na determinação de N-total (Tedesco, 1982) foram utilizadas alíquotas de 20 mL de extrato proveniente da digestão. Para a etapa inicial as alíquotas foram colocadas no balão do destilador de nitrogênio e ao copo do equipamento foi depositado NaOH 50% (10 mL). Em erlenmeyer de 50 mL foi depositada a mistura indicadora contendo ácido bórico (5 mL).

A mistura indicadora foi preparada por meio da adição de água destilada fervida (900 mL) a ácido bórico (20 g), solução de verde de bromo cresol (25 mL) e a uma solução de vermelho de metila (5 mL). A solução de verde de bromo cresol foi preparada a partir da pesagem de 0,025 g dessa substância e sua dissolução até 25 mL com etanol. Para a solução de vermelho de metila foi também pesado 0,025 g e completou-se com etanol até 25 mL.

Após o acréscimo do NaOH 50% à amostra, o equipamento foi ligado e o termostato ajustado para o nível de 7,5. Cerca de 40 mL do destilado foi recolhido em erlenmeyer de 50 mL contendo a mistura indicadora com ácido bórico. Com a solução obtida procedeu-se a titulação com H₂SO₄ 0,05 N padronizado com 2-(2-hidroxi-2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol (TRIS). O volume de ácido sulfúrico gasto para a titulação foi anotado visando os cálculos para a determinação do N-total.

Dosagem de fósforo

Para a determinação de fósforo (Tedesco, 1982) foram utilizadas alíquotas de 5 mL das amostras de extrato proveniente da digestão visando a reação colorimétrica em meio reacional específico. Para o meio reacional foi preparado 1 litro de uma solução de molibdato de amônio 5% e também 1 litro de uma solução de Vanadato de Amônio 0,25% em ácido nítrico. Após o preparo, as soluções foram misturadas em partes iguais e, posteriormente, foram utilizados 2 mL para o processo reacional.

Para a reação colorimétrica, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio e, posteriormente, foi adicionada a solução de molibdato-vanadato. Após a agitação, as amostras foram deixadas 15 minutos em temperatura ambiente e, em seguida, foi determinada a absorvância a 420 nanômetros em espectrofotômetro e utilizada como parâmetro uma curva padrão de fosfato de potássio monobásico, conforme o descrito anteriormente.

Dosagem de potássio

A determinação de potássio (Tedesco, 1982) foi realizada com alíquotas de 5 mL do extrato proveniente da digestão submetidas a análise por fotometria de chama. Para essa análise as alíquotas foram diluídas em água destilada (50 mL) e, posteriormente, foi realizada a detecção da emissão de luz por meio de fotometria de chama.

Para a determinação da concentração de potássio nas amostras, foi utilizado como parâmetro a curva padrão de cloreto de potássio. As amostras das soluções que constituem a curva padrão foram submetidas à análise por fotometria de chama.

4.5.4 Análises quantitativa e qualitativa do óleo

O procedimento para a análise do óleo proveniente das sementes de crambe foi constituído por três etapas, são elas: extração e análise quantitativa, derivatização do óleo e caracterização dos ésteres metílicos presentes no óleo por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (CG-DIC). A descrição de cada etapa encontra-se a seguir:

Extração e análise quantitativa

Após a coleta, as sementes de crambe foram pesadas e, posteriormente, submetidas a secagem em estufa a 50°C por duas noites. Na etapa seguinte, as sementes foram submetidas a uma nova pesagem e colocadas na estufa a 50°C por 30 minutos. Após essa nova secagem o peso foi verificado e, caso a variação do peso obtido em relação ao anterior não fosse significativa, o processo era repetido. Após atingir o peso constante, as sementes foram trituradas em homogeneizador de tecidos, até que as cápsulas estivessem fracionadas. Um papel de filtro foi utilizado para a elaboração de um cartucho necessário ao processo de extração do óleo (Yaniv *et al.*, 1998).

Em extrator de Soxhlet foi colocado o cartucho contendo as sementes obtidas. Em seguida, foi iniciada a extração durante 2 horas com 100 mL de éter de petróleo, em balão de 150 mL conectado ao soxhlet, com condensador de refluxo sob resfriamento. A temperatura da manta foi ajustada para, aproximadamente, 35°C. Após esse processo, o conteúdo do balão foi recolhido e evaporado em rotoavapor por 20 minutos a 35°C. Posteriormente, foi adicionado 10 mL de diclorometano P.A (2 x 5 mL) ao balão, e o conteúdo transferido para um frasco devidamente pesado passando por papel filtro. O frasco contendo a amostra teve o diclorometano evaporado com o auxílio de um soprador durante aproximadamente 24 horas e, posteriormente, pesado para possibilitar o cálculo do primeiro peso do conjunto recipiente + óleo. Em seguida, o processo de evaporação foi repetido por 15 minutos e o peso aferido novamente. Esse processo foi repetido até que não ocorra diferença significativa entre os pesos aferidos. Posteriormente, o peso final foi anotado possibilitando, assim, o cálculo da quantidade de óleo obtida. Após a determinação do peso final, o óleo foi armazenado em recipiente coberto com papel alumínio sob refrigeração até o momento de ser derivatizado para poder ser analisado por cromatografia em fase gasosa (Hagemann *et al.*, 1961).

Derivatização do óleo

Existem várias metodologias para derivatizar amostras contendo ácidos graxos, sendo a mais usual as reações de metilação usando trifluoreto de boro em solução de metanol (BF₃-metanol) (Metcalfé *et al.*, 1966.). Para análise dos ácidos graxos totais presente no óleo de crambe foi necessário inicialmente a saponificação e posterior esterificação.

Assim, foram pesadas alíquotas de 150 mg de material lipídico para o processo de metilação. Em tubos de ensaio contendo as amostras adicionou-se 4 mL de uma solução de hidróxido de sódio em metanol anidro 0,5 N e ferveu-se em banho-maria até que os glóbulos de gordura fossem dissolvidos na solução, essa etapa levou em média 10 minutos. Com a solução ainda quente foram adicionados cuidadosamente 5 mL de BF₃-metanol e a mistura foi aquecida a ebulição por mais 2 minutos em banho-maria. Após esfriar a temperatura ambiente, as soluções obtidas foram particionadas com 20 mL de éter de petróleo. Após agitar vigorosamente por 1 minuto visando favorecer a separação das fases, a solução foi deixada em repouso por 30 minutos. Em seguida, a fase aquosa (mais densa) foi descartada e a fase orgânica coletada em balão volumétrico de 10 mL passando-a por papel filtro com Na₂SO₄. O volume do balão foi

completado com diclorometano e as soluções obtidas foram armazenadas em frascos de 50 mL sob refrigeração e ao abrigo da luz até o momento da análise qualitativa por cromatografia em fase gasosa (Metcalf *et al.*, 1966).

Caracterização dos ésteres metílicos presentes no óleo

A análise dos ésteres metílicos foi realizada através de três injeções das amostras e padrões (1 µL) em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG-DIC). Os padrões foram devidamente pesados (1 mg) e dissolvidos em diclorometano (5 mL). Para a CGAR-FID utilizou-se um cromatógrafo a gás (Agilent, modelo: HP-5890 – Serie II), com detector de ionização de chama a 280°C e injetor com divisão de fluxo a 240 °C, a uma razão de 1:30 para o volume de injeção de 1µL. A coluna capilar utilizada foi a 5% fenilmetilpolisiloxano (Factor Four - VF-5ms; 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm d.f., Varian) e o hélio foi o gás de arraste, em fluxo de 1 mL.min⁻¹ (Pressão: 12 psi). A injeção foi realizada no modo *split* (1:30), com o injetor mantido a temperatura de 240 °C e o detector a 280°C. A temperatura da coluna iniciou-se a 180 °C, por 1 minuto, seguida de taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹ até 240 °C, 0,5 °C min⁻¹ até 270 °C, 10 °C min⁻¹ até 290 °C, onde permaneceu durante 10 minutos.

Após a obtenção dos cromatogramas, os ésteres metílicos foram determinados através da comparação dos seus tempos de retenção com aqueles obtidos pela injeção de padrões de ésteres metílicos autênticos (Sigma-Aldrich®) sob as mesmas condições cromatográficas. É importante destacar também que o padrão de ácido erúico, além de uma amostra de óleo do experimento, foi submetido a CG-EM para auxiliar na identificação dos componentes.

4.5.5 Avaliação da expressão gênica

Para a avaliação da expressão dos genes que codificam a lisofosfatidil aciltransferase (LPAT – GenBank EF208088.1), 3-cetoacil-CoA sintase (KCS – GenBank AY793549.1), delta 12 desaturase (GenBank DQ518290.1) e actina 2 (GenBank NM 180280.1 – Controle endógeno), foram separadas amostras de grãos maduros, obtidos após a terceira coleta, que foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C.

Extração de RNA total

Todo o processo de extração de RNA total, incluindo as centrifugações necessárias, foram executados a 4 °C e toda água utilizada foi tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC), exceto as soluções que apresentarem TRIS em sua composição, visando eliminar a ação de RNases. Os utensílios necessários, como ponteiras, foram esterilizados em autoclave, por 20 minutos, além de serem livres de RNases e DNases. A metodologia de extração de RNA foi baseada no exposto por Gao *et al.* (2001), com os ajustes descritos a seguir.

No momento da extração, as amostras coletadas foram maceradas em nitrogênio líquido, com o auxílio de almofariz e pistilo previamente resfriados, e o produto obtido transferido para microtubos eppendorf de 2,0 mL. Na etapa seguinte, 700 µL de uma solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico e 1000 µL de NTES_{DEPC} (0,2M Tris-Cl pH 8,0; 25mM EDTA pH 8,0; 0,3M de NaCl e 2% de SDS) foram adicionados ao microtubo. Após agitação em vortex por 10 minutos, os microtubos foram centrifugados a 18000 x g por 20 minutos em centrífuga refrigerada a 4 °C. Após a centrifugação, aproximadamente 700 µL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL. Em seguida, foram adicionados 1/10 volume de NaOAc_{DEPC} 2M pH 4,8 (aproximadamente 70 µL) e 1 volume de isopropanol (cerca de 700 µL) e, posteriormente, a solução foi colocada para precipitar a -80 °C por 1 hora. Os

microtubos foram novamente centrifugados a 18000 x g por 20 minutos e o sobrenadante cuidadosamente descartado. O “pellet” obtido foi lavado com 500 µl de EtOH_{DEPC} 70% gelado e a solução submetida a nova centrifugação a 18.000 x g por 10 min. O sobrenadante obtido foi descartado e o “pellet” ressuspensionado em 750µl de H₂O_{DEPC} e, em seguida, adicionou-se 750µl de LiCl_{DEPC} 4M. A solução resultante foi armazenada em geladeira por uma noite.

No dia seguinte, os microtubos foram centrifugados a 18000 x g por 20 minutos, o sobrenadante descartado e o “pellet” redissolvido em 450µl de H₂O_{DEPC} e 50µl de NaOAc_{DEPC} 2M pH 4,8. Em seguida, adicionou-se 1000µl de EtOH absoluto gelado e a solução foi armazenada a -80°C para precipitar por 30 minutos. Os microtubos foram novamente centrifugados a 18000 x g por 20 minutos e o sobrenadante descartado. O “pellet” obtido foi lavado com 500 µl de EtOH_{DEPC} 70% gelado. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados a 18000 x g por 10 minutos e o EtOH_{DEPC} 70% removido cuidadosamente. Após a evaporação do EtOH_{DEPC} 70%, o “pellet” foi dissolvido em 50µl de H₂O_{DEPC} e a solução armazenada a -80°C.

Análise quantitativa e qualitativa de RNA total

Para quantificar o RNA total obtido em cada amostra, alíquotas de 0,5µl do material obtido após a extração de RNA foram examinadas, em duplicata, em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). A pureza do RNA total obtido em cada amostra foi avaliada espectrofotometricamente através das razões de absorvância A_{260}/A_{230} e A_{260}/A_{280} . Essa avaliação foi realizada considerando-se o informado por Loulakakis *et al.* (1996) e Schultz *et al.* (1994), onde a razão A_{260}/A_{230} em torno de 2,5 indica a ausência de contaminação por polissacarídeos ou polifenóis nas amostras. Em relação à avaliação da razão A_{260}/A_{280} , Winfrey *et al.* (1997) foi considerado, o que significa que valores entre 1,8 e 2,2 indicam a não contaminação das amostras por proteínas e fenóis.

Após a quantificação e a análise da pureza do RNA total extraído, uma alíquota desse material, diluída para uma concentração de 1 µg.µL⁻¹, foi utilizada para a visualização em gel de agarose (1,5%), com GelRedTM, para a verificação da integridade do RNA e possível contaminação por DNA, das amostras.

Tratamento com DNase I e síntese do cDNA

Posteriormente, as amostras de RNA total foram tratadas com o Kit “DNase I Amplification grade”, da empresa InvitrogenTM, visando a degeneração das moléculas de DNA presentes na amostra. Para cada 1 µg de RNA total tratado foi empregado 1 µL de tampão de reação (10x), 1 µL da enzima DNase I (1U/µL) e água para o volume total de 10 µL de reação. Em seguida, as amostras foram incubadas em termociclador a 25 °C, durante 15 minutos, e, posteriormente, 1 µL de EDTA a 25 mM foi adicionado para cada µg de RNA tratado. Na etapa seguinte, as amostras foram incubadas em termociclador a 65 °C, durante 10 minutos, para a inativação da DNase.

As amostras de RNA total, devidamente tratadas, foram utilizadas para a síntese do cDNA de fita simples (ss cDNA). O processo foi realizado com o auxílio do kit específico para a síntese de cDNA, “High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit”, da Applied Biosystems e foram obedecidas as recomendações do fabricante. A reação foi realizada em termociclador com a seguinte programação: 25 °C durante 10 minutos, 48 °C durante 30 minutos (etapa da transcrição reversa) e 95 °C durante 5 minutos (inativação da transcriptase reversa).

Desenho dos iniciadores e expressão gênica por RT-PCR em tempo real

Para a análise de PCR em tempo real foi utilizado o equipamento “StepOne Real-Time PCR system” e o Kit “Power SYBR® Green PCR Master Mix”, ambos da empresa Applied Biosystems. As seqüências dos RNAs mensageiros necessários foram obtidas a partir da página virtual do NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). Os “primers” relacionados aos genes que codificam a LPAT, KCS, delta 12 desaturase e actina 2 encontram-se descritos na **tabela 5** e foram desenhados no software Primer Express 3.0 (“Applied biosystem”). Vale destacar ainda que todos os “primers” citados foram enviados para a síntese pela empresa Invitrogen.

Tabela 5. Nome dos genes, dados de registro, proteínas relacionadas e seqüências dos “primers” (“Forward e reverse”) que foram utilizados na análise de PCR em tempo real.

Gene	Registro	Proteína	Primer Forward e Reverse
<i>LPAAT</i>	GenBank- EF208088.1	Lisofosfatidil aciltransferase	F 5'-ATCCTGATCC GCTCCTCTCA-3' R 5'-TCTTTTGGCTTGGCTGGA-3'
<i>KCS</i>	GenBank- AY793549.1	3-Cetoacil-CoA sintase	F 5'-GAAGACGGTCCA AATACGAGCTA-3' R 5'-GCATCGGAAAG ACTTGTCATCA-3'
<i>Delta 12 desaturase</i>	GenBank- DQ 518290.1	Delta 12 desaturase	F 5'-TCAACGTTTCAGGCAGACCTT-3' R 5'-TCGTTGTAGATGGGAGCGTTAG-3'
<i>Actina 2 (Controle)</i>	GenBank- NM 180280.1	Actina 2	F 5'-TCTCACACTGTS CCRATCTACGA-3' F 5'-RTCARTRAGGT CACGWCCWGCRA-3'

Devido à ausência de registros de uma seqüência relacionada a um gene que possa ser utilizado como controle endógeno, pertencente à espécie crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), foi construído um “primer” degenerado para a actina 2. O “primer” degenerado foi elaborado a partir do alinhamento múltiplo, com o uso da ferramenta “on line” ClustalW (Kyoto University Bioinformatics Center), de genes da actina 2 em diversas espécies filogeneticamente próximas do crambe, tais como: *Arabidopsis thaliana* (Registro: NM_180280.1), *Brassica oleracea* (Registro: JQ435879.1), *Brassica napus* (Registro: FJ529167.1), *Brassica napus* (Registro: FJ529168.1), *Cochlearia pyrenaica* (Registro: JQ435883.1), *Cochlearia hollandica* (Registro: JQ435881.1), *Cochlearia anglica* (Registro: JQ435882.1). As regiões de maior homologia entre as seqüências da actina 2, nessas espécies próximas ao crambe, foram utilizadas para a elaboração do “primer”, e as degenerações colocadas nas regiões de não homologia.

As reações de PCR em tempo real ocorreram com as amostras de cDNA obtidas, conforme detalhado anteriormente, em duplicata e de acordo com as seguintes recomendações do fabricante: 3 µL da mistura de “primers” (“forward” e “reverse”) a 3,6 µM, 3 µL da reação de síntese da 1ª fita de cDNA e 6 µL do Kit do fluorocromo “Power SYBR® Green PCR Master Mix” (2X). A solução obtida foi centrifugada na placa, devidamente selada com filme ótico apropriado, a 4000 rpm durante 3 minutos (25 °C) e, em seguida, submetida ao PCR em tempo real. A reação foi realizada no equipamento, configurado com a seguinte programação: 10 min a 95 °C e 40 ciclos de amplificação (95 °C por 15 s e 60 °C por 1 min), durante um total de 2 horas. Os produtos da reação foram detectados através do uso do fluorocromo “Power SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), conforme citado anteriormente. Uma curva de dissociação (“melting”) foi adicionada ao programa através da elevação da temperatura de 60 °C até 95 °C, a cada 0,3 °C, visando identificar reações inespecíficas.

Os cálculos de expressão relativa foram realizados conforme o proposto por Livak & Schmittgen (2001), a partir do uso da sugestão fornecida por AgroPrecisa (2008) e pela Fundação MS (2010) como controle e com os valores de C_T (“*Cicle Threshold*”, ciclo limite) obtidos na reação de PCR.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Experimento I

A massa fresca nas diferentes partes da planta não variou significativamente, em função das doses de nitrato ($N-NO_3^-$) (**Figura 13A**). Nesse contexto, é importante ressaltar que o crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries) é uma espécie que, de acordo com Fundação MS (2010), possui polinização cruzada. Esse tipo de polinização tende a reduzir a homogeneidade genética das sementes e, conseqüentemente, pode ocasionar um aumento do coeficiente de variação nos tratamentos, contribuindo para a ausência de diferenças significativas em diversos casos. Assim, em experimentos com crambe, conforme observado por Brito (2009), é comum a obtenção de coeficientes de variação ligeiramente elevados e esse fator deve ser sempre levado em consideração na interpretação dos resultados obtidos, até que estejam disponíveis no mercado sementes geneticamente mais homogêneas.

Os teores de nitrato elevaram-se significativamente, com o aumento da disponibilidade desse íon na solução nutritiva (**Figura 13B**). No caule, além de um aumento significativo, foram encontrados altos níveis de nitrato. Esse resultado reitera o provável papel do caule, no armazenamento desse íon em plantas de crambe. Nesse âmbito, Chen *et al.* (2004) destacam que em plantas de nabo (*Brassica campestris* L.) e repolho branco chinês “pak choi” (*Brassica chinensis* var.oleifera Makino et Nenoto), plantas da família brassicaceae, assim como o crambe, o caule é preferencialmente o local de acúmulo de nitrato na planta. Além disso, Brito (2009) observou, também em sistema hidropônico, que aumentos significativos nos teores de nitrato do caule são obtidos em função do aumento da disponibilidade desse ânion.

Assim, levando em consideração que a redução do nitrato ocorre preferencialmente em folhas, na maior parte das plantas, e em alguns casos, em raízes, é altamente provável que o caule de plantas de crambe exerça um papel chave no armazenamento de nitrato. De acordo com Crawford (1995), esse mecanismo é observado em diversas espécies vegetais e é colocado como resultado de um processo adaptativo, desenvolvido com o objetivo de estabelecer reservas suficientes para que a planta possa desenvolver seus processos metabólicos, mesmo em períodos de baixa disponibilidade de nitrato.

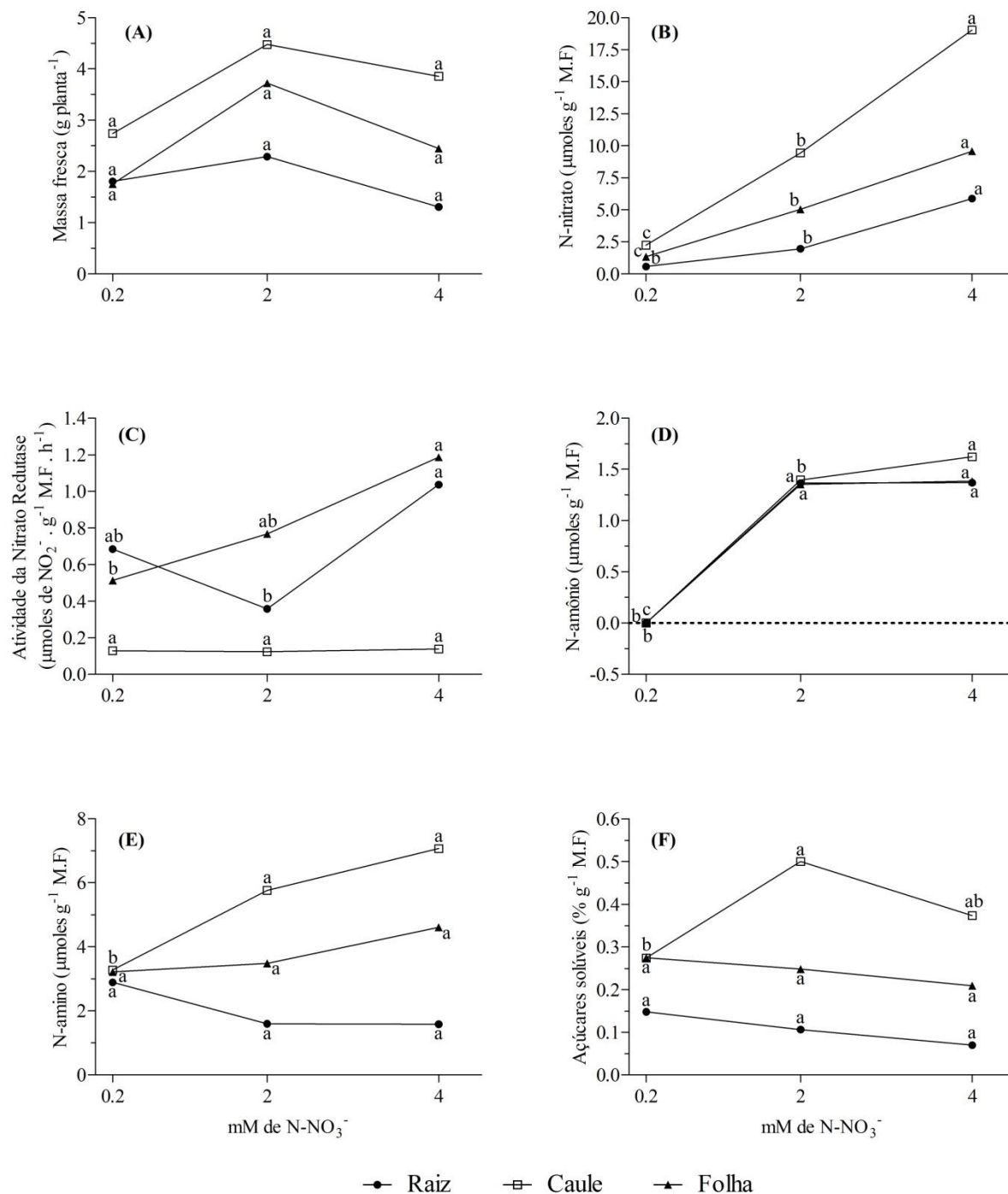


Figura 13. Massa fresca (A), teores de nitrato (B), atividade da nitrato redutase (C) e teores de N-amônio (D), N-amino (E) e açúcares solúveis (F) em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato na solução nutritiva (0,2, 2 e 4 mM), coletadas ao fim da fase vegetativa. Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Em relação à atividade da nitrato redutase, não foram observados, no caule, efeitos significativos dos tratamentos aplicados (**Figura 13C**). Por outro lado, é possível observar que,

na folha, ocorreu uma tendência ao aumento da atividade dessa enzima, com o maior fornecimento de N-nitrato. Dentro desse contexto, é importante destacar que, depois de absorvido, o nitrato pode seguir para duas localizações diferentes na célula. O nitrato que se acumula no citossol é parte do reservatório metabólico (*pool* indutor), intimamente relacionado com a regulação do nível da nitrato redutase, e o que encontra-se no vacúolo constitui o reservatório de reserva (*pool* substrato) (Lillo *et al.*, 2004). Vale ressaltar também que, de acordo Souza & Fernandes (2006), a síntese e a atividade da nitrato redutase é, na maior parte das plantas, mais alta nas folhas sendo influenciada, principalmente, por nitrato e indiretamente pela luz. Os dados obtidos com plantas de crambe demonstram que a atividade da nitrato redutase exibiu altos valores na folha, o que contribui para a hipótese de que o caule esteja funcionando, preferencialmente, como um órgão de armazenamento de nitrato, pois nesse órgão foi detectada uma baixa atividade dessa enzima.

Os níveis de N-amônio apresentaram, além de um comportamento similar nas diferentes partes da planta, algumas diferenças significativas, frente ao aumento do suprimento de N-nitrato na solução nutritiva (**Figura 13D**). No caule, em particular, observou-se um crescimento significativo nos níveis de N-amônio, com o aumento do suprimento de N-nitrato. Entretanto, a diferença apresentada na concentração de N-amônio, um íon fundamental para a síntese protéica, não se refletiu significativamente nos índices de massa fresca. Além disso, vale ressaltar também que, as plantas cultivadas sob a dose de 0,2 mM de N-nitrato, não exibiram quantidades detectáveis de N-amônio nos seus órgãos.

Em relação aos teores de N-amino, é possível destacar que, no caule das plantas submetidas à dose de 0,2 mM de N-nitrato, foram detectados baixos valores (**Figura 13E**). É importante citar que, conforme Souza *et al.* (2002) destacam, o nitrato após ser absorvido pode ser reduzido a amônio e, posteriormente, utilizado na síntese de aminoácidos. Assim, um baixo suprimento de N-nitrato, como o fornecido na dose de 0,2 mM, pode ser a razão para a menor concentração de aminoácidos livres detectada no caule dessas plantas.

Além disso, as plantas submetidas à dose de 0,2 mM de N-nitrato também apresentaram baixos níveis de açúcares solúveis no caule, indicando a ocorrência de uma menor disponibilidade de esqueletos de carbono nesse órgão (**Figura 13F**). É importante ressaltar que, tanto na raiz quanto na folha, os níveis de N-amino e açúcares solúveis não exibiram variação significativa, com os diferentes suprimentos de N-nitrato na solução nutritiva.

Assim, a partir dos dados obtidos, é possível deduzir que em plantas de crambe, da variedade brasileira FMS Brilhante, o caule exerce um papel fundamental no armazenamento do nitrato, o que garante a reserva desse íon em períodos de baixa disponibilidade. Além disso, outro ponto que deve ser abordado, é que as doses de N-nitrato utilizadas nesse experimento (0,2; 2 e 4 mM) não modificaram a produção de massa fresca dessa espécie, ao final da fase vegetativa. Esse é um aspecto importante, já que indica a possibilidade do uso de baixos suprimentos de nitrato quando se considera o uso da cultura visando a alimentação de ruminantes ou seu uso como fertilizante.

5.2 Experimento II

Na **figura 14A**, é possível observar que não ocorreu variação significativa nos índices de massa fresca, frente aos diferentes valores de pH do meio de cultivo. O mesmo resultado foi observado para os índices de massa seca, indicando que não houve diferença significativa no percentual de água das diferentes partes da planta, quando submetidas aos tratamentos executados (**Figura 14B**). Tendo em vista o uso como forrageira, a ausência de influência significativa dos diferentes valores de pH do meio de cultivo sobre a produção de massa de crambe, indica que a correção do pH do solo pode, em alguns casos, ser evitada reduzindo os custos da produção.

Os teores de nitrato mostraram um comportamento similar nas diferentes partes da planta e, além disso, foi detectado um aumento significativo desses teores no caule das plantas cultivadas em pH 5,0 (**Figura 14C**). O aumento observado pode ter ligação direta com a maior acidez desse meio de cultivo, uma vez que o processo de absorção do nitrato pelas plantas é realizado através de simporte com $2H^+$ (Souza & Fernandes, 2006). Assim, a maior disponibilidade de H^+ em pH 5,0, quando comparado aos outros tratamentos, poderia estar contribuindo para o maior influxo de nitrato em direção ao interior das células radiculares.

Provavelmente, no caule, o aumento nos teores de nitrato tornou-se mais evidente, pois esse órgão parece ter um papel fundamental no armazenamento desse ânion em plantas de crambe, conforme visto no experimento I e também de acordo com o observado por Brito (2009). Por outro lado, uma alta atividade da nitrato redutase foi detectada nas folhas das plantas cultivadas em pH 5,5 e 6,0 (**Figura 14D**).

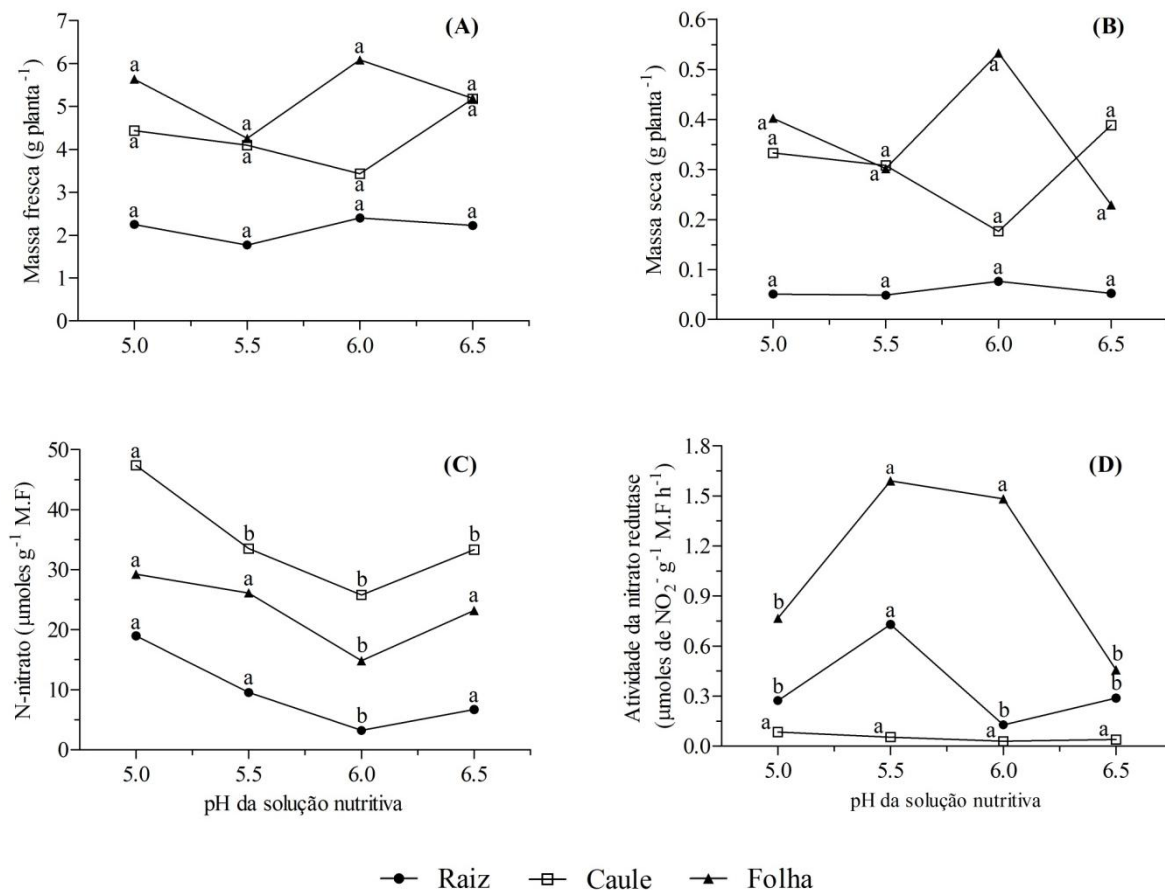


Figura 14. Massa fresca (A), massa seca (B), teores de nitrato (C) e atividade da nitrato redutase (D) em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes valores de pH na solução nutritiva (5; 5,5; 6,0 e 6,5), coletadas ao fim da fase vegetativa. Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

A alta atividade da nitrato redutase nas plantas cultivadas em pH 5,5 pode ser a razão dos elevados teores de N-amônio encontrado nessas plantas (**Figura 15**). Esse efeito está provavelmente relacionado ao papel fundamental dessa enzima na via de redução do nitrato, que tem na formação do amônio, a forma mais reduzida de N dessa via, o produto final (Souza *et al.*, 2002).

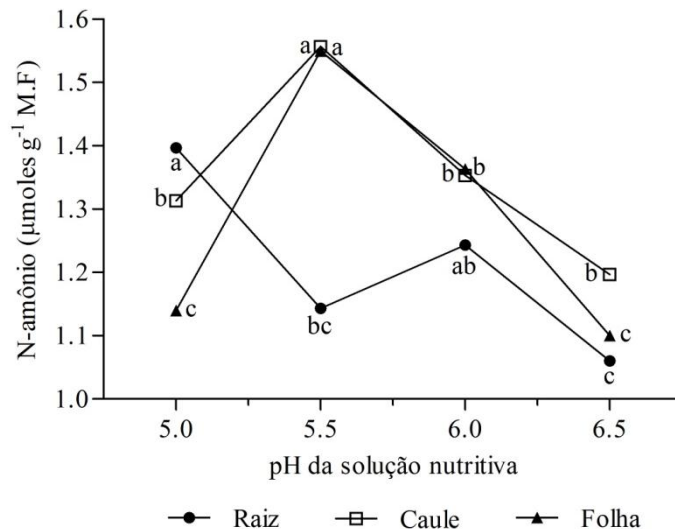


Figura 15. Teores de N-amônio em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes valores de pH na solução nutritiva (5; 5,5; 6,0 e 6,5), coletadas ao fim da fase vegetativa. Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

A esse ponto é importante destacar que, segundo Britto & Kronzucker (2002), o íon amônio pode acarretar sérios problemas de toxidez nas mais diversas culturas. Além disso, os autores classificam as plantas pertencentes à família brassicaceae, onde também inclui-se o crambe, como sensíveis a amônio, ou seja, capazes de desenvolver problemas de toxidez com relativamente pequenas concentrações desse cátion. Entretanto, embora o amônio possa representar uma fonte altamente relacionada à toxidez em crambe, não foram observados sintomas dessa natureza durante o experimento.

Altos teores de N-amino foram observados no caule e na folha das plantas cultivadas em pH 5,5 (**Figura 16A**). Entretanto, na raiz o comportamento foi diferente, já que o maior nível de aminoácidos livres foi encontrado nas plantas sob pH 5,0. Os elevados teores de N-amino, nas plantas cultivadas em pH 5,5, juntamente com os elevados níveis de amônio e a alta atividade da nitrato redutase, sugere a hipótese do maior fluxo de N em direção a redução e assimilação desse elemento em plantas de crambe cultivadas sob tais condições.

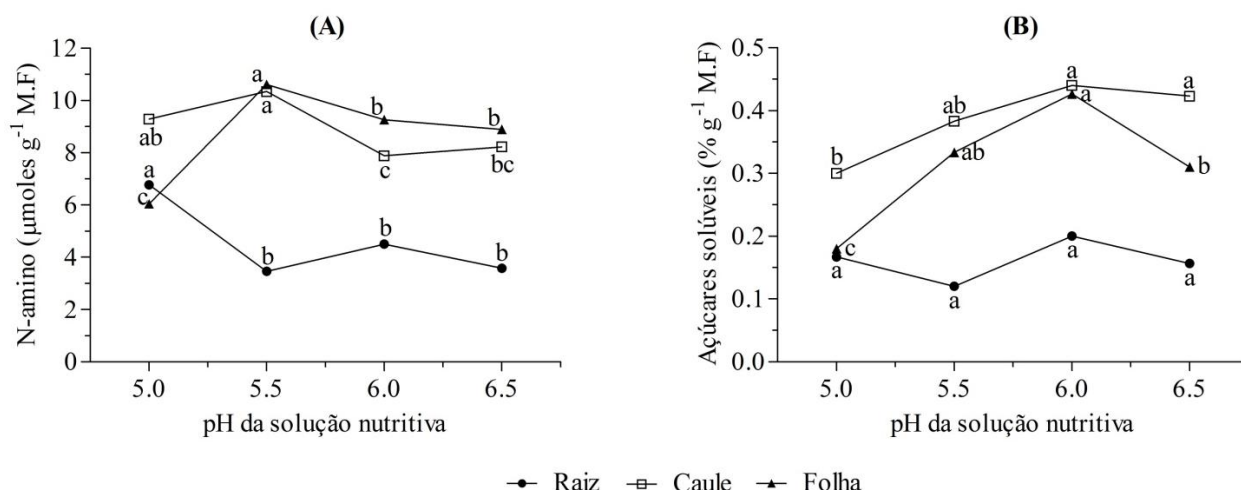


Figura 16. Teores de N-amino (A) e açúcares solúveis (B) em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes valores de pH na solução nutritiva (5; 5,5; 6,0 e 6,5), coletadas ao fim da fase vegetativa. Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Em relação aos percentuais de açúcares solúveis, é possível observar que, na raiz, não ocorreu influência significativa dos diferentes tratamentos aplicados (**Figura 16B**). Por outro lado, na folha e no caule, altos níveis desses compostos foram detectados nas plantas submetidas a pH 6,0. O acúmulo de açúcares solúveis nessas plantas pode estar relacionado a um menor consumo de esqueletos de carbono, um processo fundamental para a síntese de aminoácidos, de acordo com Souza & Fernandes (2006), pois as plantas cultivadas em pH 6,0 também exibiram baixos níveis desses compostos. Assim, é possível ressaltar que, em plantas de crambe da variedade FMS Brilhante, os diferentes valores de pH do meio de cultivo não exerceram influências significativas sobre a produção de massa fresca ou seca da plantas, ao final da fase vegetativa. Por outro lado, é importante destacar que ainda são necessários estudos visando avaliar os efeitos da variação do pH do meio de cultivo, tanto em sistema hidropônico quanto em solo, sobre o crambe, até que seja completada a fase de maturação de sementes. Isso é importante pois irá elucidar a influência desse importante fator sobre aspectos da cultura, como a produção e o perfil de ácidos graxos do óleo, um aspecto que segundo Pinzi *et al.* (2009) está fortemente relacionado a diversos parâmetros de qualidade desse componente. Essas características são extremamente importantes quando se considera, por exemplo, emprego do óleo obtido a partir de plantas de crambe na indústria de biodiesel.

Ao contrário do que ocorreu em relação aos índices de massa fresca e seca, os valores de pH do meio de cultivo exerceram uma importante influência sobre os diferentes aspectos do metabolismo do N avaliados. Nesse âmbito, foi possível observar que, nas plantas de crambe, variedade FMS Brilhante, cultivadas em pH 5,5, ocorreu uma maior ativação dos processos envolvidos na redução e assimilação do N. Essa hipótese ganha sustentação devido a alta atividade da nitrato redutase e, também por causa dos altos níveis de N-amônio e N-amino, que foram detectados nas plantas cultivadas sob essa condição.

5.3 Experimento III

5.3.1 Plantas de crambe ao início do florescimento (37 DAG)

Após a análise do solo, utilizado para o experimento III, verificou-se que a concentração de nitrogênio encontrada foi cerca de 0,13 g por kg, um valor relativamente baixo, o que permitiu um ajuste adequado das doses de N-nitrato a serem utilizadas para o experimento. A descrição dos resultados obtidos com a análise química do solo visando determinar a concentração de outros nutrientes importantes e também avaliar o valor de pH são apresentados na **tabela 6**. Cabe ressaltar que essa análise foi feita segundo EMBRAPA (1997), no laboratório de fertilidade da UFRRJ. Além disso, tendo em vista a correção do pH obtido, realizou-se por meio do método de saturação por bases, a elevação a 70%.

Tabela 6. Resultado da análise química do solo utilizado no experimento III visando o cultivo de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), variedade FMS Brilhante.

Análise do solo	pH (H ₂ O)	Concentração de elementos no solo						
		(cmol _c dm ⁻³)				(mg dm ⁻³)		
		Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H + Al	K	Na	P
Amostra de argissolo	5,43	0,1	1,5	1,6	3,63	0,1	0,03	5,0

Ao início do florescimento em plantas de crambe é possível observar que as diferentes doses de N-nitrato fornecidas (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) não exerceram efeitos significativos sobre a produção de massa fresca no caule, entretanto, na folha o comportamento exibido foi diferente (**Figura 17A**). Nesse local, observa-se que ocorreu uma tendência ao aumento da produção de massa fresca, com o crescimento das doses de N-nitrato disponibilizadas, e que um aumento significativo estabeleceu-se com o suprimento de 3,2 mM desse ânion, frente às demais doses. Esse resultado pode indicar que, mesmo a essa etapa do desenvolvimento, a cultura é sensível a tal aumento nas doses de N-nitrato, a ponto de exibir um incremento na produção de massa de folha, um dado importante quando se considera o uso da cultura como forrageira.

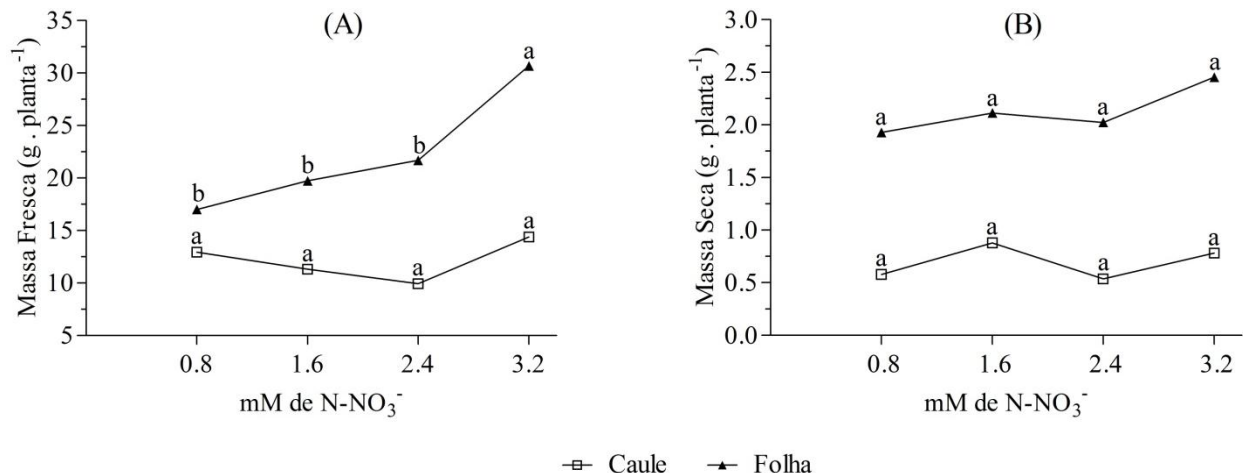


Figura 17. Massa fresca (A) e seca (B) em caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Por outro lado, para uma melhor interpretação, é preciso avaliar os resultados obtidos em relação à produção de massa seca (**Figura 17B**), é importante notar que no caule e na folha não ocorreram diferenças significativas em função das diferentes doses de N-nitrato disponibilizadas. Assim, a partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a maior dose de N-nitrato (3,2 mM) promoveu um aumento, principalmente, na concentração de água presente nas folhas. Entretanto, vale destacar que, embora não significativo, ocorreu uma tendência ao aumento da produção de massa seca na folha, o que pode representar em etapas mais tardias do ciclo uma via para o estabelecimento de diferenças significativas.

A **tabela 7** evidencia a influência das diferentes doses de N-nitrato aplicadas sobre a concentração desse íon, tanto por grama de peso fresco (Teor) quanto pelo total da concentração obtida (Conteúdo), em cada parte de plantas de crambe. Em relação ao teor de nitrato, pode-se destacar que não ocorreram diferenças significativas, a essa etapa do ciclo de vida, nas diferentes partes analisadas, com destaque para as plantas submetidas à dose de 0,8 mM de N-nitrato que não exibiram concentrações detectáveis desse íon.

Tabela 7. Teores ($\mu\text{moles} \cdot \text{g.p.f}^{-1}$) e conteúdos ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$) de nitrato em caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Dose de N-nitrato (mM)	Teor de N-NO_3^- ($\mu\text{moles} \cdot \text{g.p.f}^{-1}$)		Conteúdo de N-NO_3^- ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$)	
	Caule	Folha	Caule	Folha
0,8	0,00a	0,00a	0,00b	0,00b
1,6	0,08a	0,07a	1,26ab	1,41ab
2,4	0,10a	0,07a	1,12ab	1,75a
3,2	0,09a	0,07a	1,44a	2,73a

Os resultados exibidos para teores de nitrato foram diferentes daqueles obtidos no experimento I, em que as plantas também foram submetidas a diferentes doses de N-nitrato e coletadas por volta do mesmo período do ciclo de vida. No experimento I, o crescimento das doses desse ânion provocou aumentos significativos na sua concentração em diferentes partes da planta. Entretanto, é importante destacar que as doses de N-nitrato utilizadas durante o experimento I foram muito diferentes (0,2; 2 e 4 mM), tanto quando comparadas àquelas utilizadas nesse experimento quanto entre si. Além disso, deve-se considerar também o exposto por Baligar (1986), que destaca que em hidroponia, modo de cultivo utilizado no experimento I, a influência exercida pelo solo, nos processos de transferência iônica, que ocorrem na superfície das raízes não ocorre.

Em relação aos conteúdos de nitrato, nas diferentes partes da planta (**tabela 7**) pode ser observado que houve diferenças significativas em função dos tratamentos. Pode ser destacado que, já nesse período do ciclo de vida da planta, a maior dose de N-nitrato fornecida (3,2 mM) provocou o estabelecimento de altos conteúdos desse ânion, tanto no caule quanto na folha. Outro ponto que deve ser ressaltado é que, embora Brito (2009) revele que o caule pareça exercer um papel fundamental no armazenamento do nitrato em plantas de crambe, as folhas exibiram nessa etapa do crescimento, quase o dobro do conteúdo desse íon, frente ao caule, nas plantas submetidas a dose mais alta. Entretanto, é importante notar que esse balanço é dinâmico e pode se modificar, ao longo do desenvolvimento vegetal, com a translocação desse íon (Dechorgnat *et al.*, 2011).

A atividade da nitrato redutase revela um comportamento semelhante em caules e folhas, frente as diferentes doses de N-nitrato disponibilizadas (**Figura 18**). Em ambas as partes ocorreu alta atividade dessa enzima com níveis intermediários de N-nitrato (1,6 e 2,4 mM) fornecidos e, além disso, uma tendência a redução na atividade enzimática com a dose de 3,2 mM desse íon. A esse ponto, é importante citar que, de acordo Souza & Fernandes (2006), a atividade da nitrato redutase é, na maioria das plantas, mais alta nas folhas sendo influenciada, principalmente, por nitrato. Assim, embora tenha ocorrido um aumento na atividade da nitrato redutase com o crescimento da disponibilidade de nitrato no meio de cultivo, isso não estendeu-se nas plantas submetidas a maior dose.

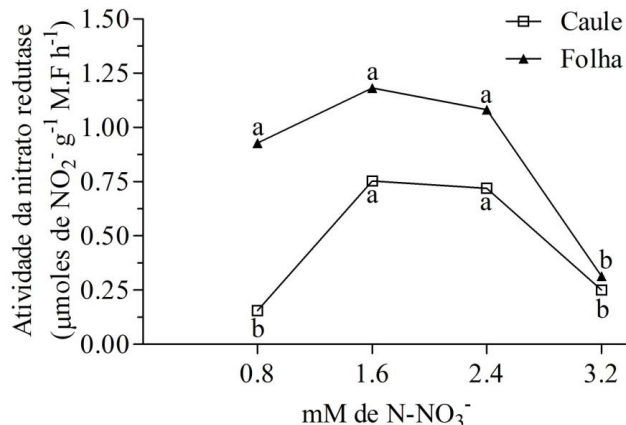


Figura 18. Atividade da nitrato redutase em caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

A queda observada em relação à atividade da nitrato redutase, na maior dose de N-nitrato fornecida (3,2 mM) pode estar ligada a vários fatores. Srivastava (1980) relata que em casos em que a atividade dessa enzima não aumenta, com o maior fornecimento de nitrato, é possível que esteja ocorrendo uma modificação nos “pools” de nitrato na célula vegetal. A esse ponto é importante destacar que, depois de absorvido, o nitrato pode seguir para duas localizações diferentes na célula. O nitrato que se acumula no citossol é parte do reservatório metabólico (*pool* indutor), intimamente relacionado com a regulação da atividade da nitrato redutase, e o que encontra-se no vacúolo constitui o reservatório de reserva (*pool* substrato) (Lillo et al., 2004).

Dessa forma, é possível que a maior dose de N-nitrato (3,2 mM) esteja influenciando a distribuição de nitrato nos diferentes reservatórios, favorecendo um aumento da concentração desse composto no reservatório de reserva e promovendo sua redução no reservatório metabólico. Tal hipótese já foi sugerida por Brito (2009), quando também se observou uma redução da atividade da nitrato redutase, sob altas concentrações de nitrato, em plantas de crambe ao início do florescimento. Essa informação é importante já que a atividade da nitrato redutase é, em diversas culturas, intimamente relacionada ao desenvolvimento e a produtividade (Srivastava, 1980).

Vale ressaltar que, a essa fase do ciclo de vida, as plantas de crambe não exibiram concentrações detectáveis de amônio nos caules e folhas das plantas submetidas aos diferentes tratamentos (Dados não mostrados).

Na **figura 19A** é possível observar que caules e folhas apresentaram comportamentos diferentes, no que diz respeito aos teores de açúcares solúveis, frente ao aumento das doses de N-nitrato no meio de cultivo. No caule, a dose mais elevada de N-nitrato (3,2 mM), provocou uma redução significativa nos teores desses compostos, entretanto, na folha ocorreu um aumento significativo nesses teores. O resultado observado na folha, nas plantas sob essa dose, pode estar relacionado à menor atividade da nitrato redutase exibida por tais plantas.

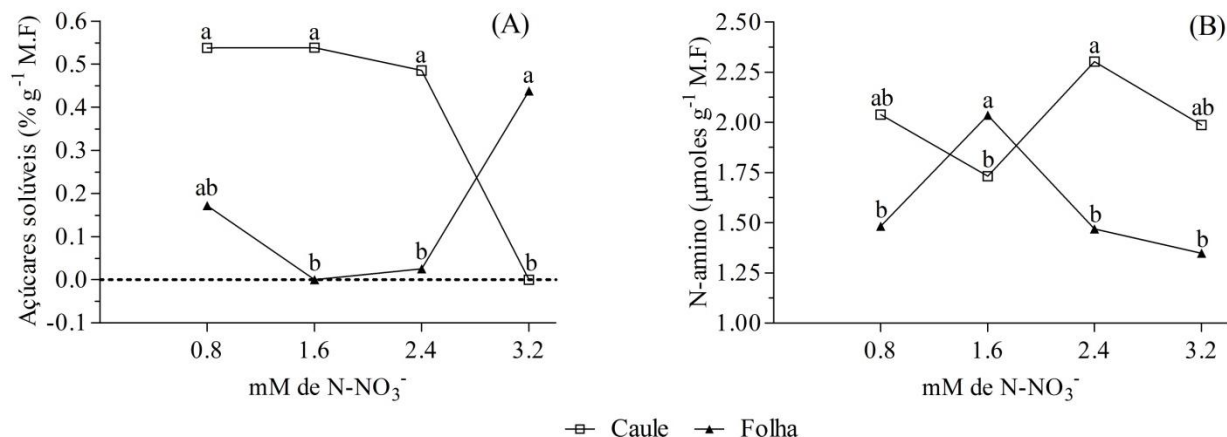


Figura 19. Teores de açúcares solúveis (A) e N-amino (B) em caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Um aspecto importante nesse contexto é que o nitrato, após ser absorvido, é reduzido a nitrito e, em seguida, a amônio, que pode seguir pela via denominada GS-GOGAT, em que será incorporado a esqueletos de carbono preexistentes e, possivelmente, utilizado na síntese de diversos aminoácidos (Oaks & Hirel, 1985). Assim, a redução na atividade da nitrato redutase nas plantas cultivadas sob a dose de 3,2 mM pode ter ocasionado uma menor utilização dos esqueletos de carbono, que provém em sua maioria a partir da degradação de açúcares, provocando a acúmulo desses compostos nas plantas cultivadas nessas condições.

Um resultado que deve ser considerado na discussão relacionando diferentes aspectos do metabolismo do nitrogênio são o teores de N-amino observados (**Figura 19B**). Nesse contexto, é importante ressaltar que na folha foram detectados baixos teores de N-amino nas plantas submetidas a maior dose (3,2 mM). Esse resultado contribui para a hipótese de que a redução da atividade da nitrato redutase tenha provocado o acúmulo de açúcares solúveis, já que um indicador da menor utilização de esqueletos de carbonos é um baixo teor de N-amino presente.

Na **tabela 8** é possível observar que tanto os teores quanto os conteúdos de N-total nas plantas apresentaram um padrão semelhante, em função das diferentes doses de N-nitrato fornecidas. Conforme o esperado, o maior suprimento de nitrogênio, sob forma de nitrato (3,2 mM), possibilitou altos teores e conteúdos de N-total, tanto no caule quanto na folha, das plantas de crambe ao início do ciclo reprodutivo. Entretanto, um resultado importante, que deve ser destacado foram os altos teores e conteúdos de N-total exibidos no caule das plantas submetidas a menor dose (0,8 mM). Esse resultado pode indicar que doses baixas podem estimular suficientemente mecanismos de captação de nitrogênio a ponto de se desenvolverem altas concentrações de nitrogênio na planta, frente a doses maiores. No entanto, são necessárias maiores investigações sobre como esses mecanismos atuam em plantas de crambe.

Tabela 8. Teores ($\text{mg} \cdot \text{g.p.s}^{-1}$) e conteúdos ($\text{mg} \cdot \text{planta seca}^{-1}$) de N-total, fósforo e potássio em caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao início do florescimento (37 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Dose de N-nitrato (mM)	Teor ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco)						
	N-total		P		K		
	Caule	Folha	Caule	Folha	Caule	Folha	
0,8	27,30a	1,56b	0,54a	0,31b	1,14a	0,71ab	
1,6	1,71b	1,98b	0,28bc	0,44ab	1,79a	0,67b	
2,4	3,14b	3,26b	0,16c	0,42ab	1,90a	0,79ab	
3,2	27,68a	33,92a	0,38ab	0,54a	1,89a	0,96a	
	Conteúdo ($\text{mg} \cdot \text{planta seca}^{-1}$)						
	0,8	10,87ab	3,02b	0,42a	0,35b	1,16a	1,08b
	1,6	0,64b	4,59b	0,26ab	0,33b	1,56a	1,43b
	2,4	1,84b	10,14b	0,07b	0,53b	1,01a	1,43b
	3,2	20,97a	74,21a	0,31a	1,40a	1,41a	2,36a

No que diz respeito aos teores e conteúdos de fósforo pode-se destacar que elevados valores foram detectados nas folhas das plantas cultivadas sob a dose de (3,2 mM) (**Tabela 8**). A esse ponto deve-se ressaltar que segundo Araújo & Machado (2006), o fósforo é um nutriente que se encontra relacionado com os processos de transferência de energia na célula. Além disso, devem ser considerados também os custos energéticos envolvidos no processo de redução e assimilação do nitrato. Durante essas etapas, o ATP é requerido tanto de maneira direta, como no caso da atividade da glutamina sintetase (GS), quanto indiretamente, sob a forma de poder redutor (ferredoxina, NADH e NAD(P)H) produzido em vias metabólicas altamente dependentes de ATP (Huppe & Turpin, 1994).

Portanto, o maior teor de fósforo nas folhas das plantas submetidas à dose mais elevada de N-nitrato pode ter relação com o aumento de estímulos visando à captação desse nutriente, devido a maior demanda por energia para os processos relacionados à captação, redução e assimilação do nitrogênio. Isso se justifica, pois altas concentrações de nitrato e nitrogênio foram observadas nas diferentes partes das plantas cultivadas sob 3,2 mM.

A partir da observação da **tabela 8** é possível destacar que os teores e conteúdos de potássio não exibiram variação significativa frente às diferentes doses de N-nitrato. Por outro lado, na folha das plantas sob a maior dose (3,2 mM) ocorreram aumentos importantes, principalmente no conteúdo desse nutriente. De acordo com Meurer (2006), o potássio, embora não seja parte de nenhuma estrutura ou molécula orgânica da célula vegetal, exibe uma ampla variedade de funções. Assim, as causas para as maiores concentrações de potássio nas plantas cultivadas sob a maior dose (3,2 mM) podem ser diversas, a mais provável possivelmente é a

maior necessidade de neutralizar as grandes quantidades de cargas negativas, devido às altas concentrações de nitrato presente nessas plantas.

5.3.2 Plantas de crambe ao final do florescimento (63 DAG)

A essa fase do ciclo de vida da planta, é importante destacar que a variação dos níveis de N-nitrato em solo não produziu diferenças significativas nos índices de massa fresca da inflorescência (**Figura 20A**). Por outro lado, no caule ocorreu uma tendência ao aumento desses índices, frente ao crescimento das doses, um resultado que não foi observado ao início da fase de florescimento (**Figura 17A**). Provavelmente, esse aumento tenha sido resultado da maior síntese proteica, que apenas acentuou-se ao longo do tempo, proporcionada pelos altos suprimentos de N-nitrato. Além disso, a dose de 2,4 mM possibilitou uma alta produção de massa fresca na folha, quando comparada às demais doses, um resultado importante já que de acordo com Fundação MS (2007) a cultura tem potencial como forrageira.

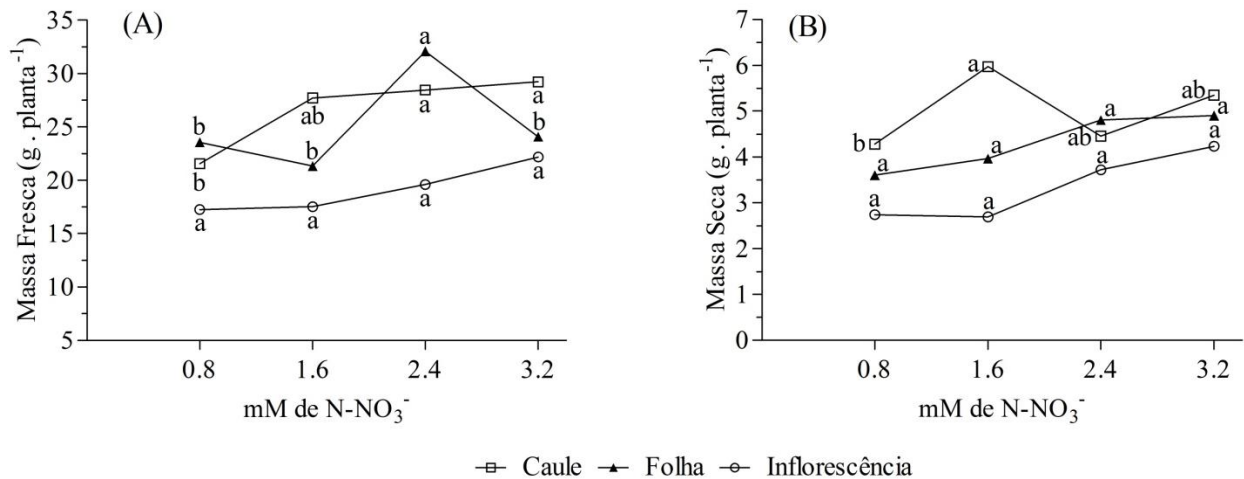


Figura 20. Massa fresca (A) e seca (B) em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Entretanto, outro ponto importante é que as diferenças significativas em relação à produção de massa seca de folha não se estabeleceram o que revela principalmente que tal efeito, observado para os índices de massa fresca, possa ser, principalmente, devido ao acúmulo diferencial de água nos tecidos (**Figura 20B**).

Na **tabela 9** é possível observar que baixos teores de nitrato foram detectados nas plantas cultivadas sob a menor dose (0,8 mM), revelando a influência desse tratamento sobre as concentrações do ânion na planta. Entretanto, os resultados mais importantes foram obtidos quando se considera o conteúdo de nitrato nas diferentes partes analisadas. Primeiramente, no caule, a dose de 1,6 mM possibilitou altos níveis desse íon, enquanto na folha o suprimento de 2,4 mM gerou um efeito semelhante. Porém, um dos resultados mais interessantes foi obtido com a maior dose de N-nitrato (3,2 mM), que acarretou o aparecimento de altas concentrações desse ânion na inflorescência da cultura.

Tabela 9. Teores ($\mu\text{moles} \cdot \text{g.p.f}^{-1}$) e conteúdos ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$) de nitrato em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Dose de N-nitrato (mM)	Teor de N-NO_3^- ($\mu\text{moles} \cdot \text{g.p.f}^{-1}$)			Conteúdo de N-NO_3^- ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$)		
	Caule	Folha	Inflorescência	Caule	Folha	Inflorescência
0,8	0,06b	0,05c	0,24a	1,47c	1,13b	3,52b
1,6	0,24a	0,29a	0,00b	6,01a	1,94b	0,00c
2,4	0,13ab	0,22ab	0,28a	3,70b	6,20a	5,35b
3,2	0,12ab	0,10bc	0,36a	4,02b	2,19b	7,13a

Primeiramente, é importante relatar que, segundo Brito (2009) o caule exerce um papel importante no armazenamento do nitrato em plantas de crambe. Entretanto, com os resultados obtidos nesse experimento, é possível avaliar que o papel do caule nesse armazenamento parece ser altamente influenciado pelo suprimento de N-nitrato e também pela fase do ciclo de vida da planta. Isso se justifica, pois nessa fase do ciclo, com a dose de 1,6 mM ocorreu uma maior tendência ao acúmulo desse composto no caule, já com a dose de 2,4 mM o acúmulo deu-se na folha e, finalmente, com o suprimento mais alto (3,2 mM) a maior concentração de nitrato foi obtida na inflorescência.

Zebarth *et al.* (1995) relatam, em experimento com plantas de brócolis (*Brassica oleracea*), que assim como o crambe pertence à família Brassicaceae, que a inflorescência é um órgão altamente responsivo ao suprimento de nitrato. Os autores revelam que, em alguns casos, até aumentos lineares foram obtidos em relação à concentração de nitrato na inflorescência frente ao crescimento das doses de N-nitrato no meio de cultivo. A razão para o acúmulo de nitrato nesse órgão está, provavelmente, visando o atendimento da demanda de nitrogênio que ocorrerá com o desenvolvimento dos grãos. Nesse âmbito, Souza *et al.* (2002) destacam que, a explicação para a demanda de nitrogênio pelos grãos, é a elevada síntese de proteínas necessária ao seu desenvolvimento. Além disso, os autores revelam que durante o desenvolvimento dos grãos a absorção de nitrogênio do meio é baixa, o que revela a importância desse acúmulo de nitrato nos diferentes órgãos.

Na **figura 21** pode ser observada a atividade da nitrato redutase, nas diferentes partes das plantas de crambe, ao final da fase de florescimento. A atividade enzimática não apresentou diferenças significativas, em função das doses de N-nitrato aplicadas, no caule e na inflorescência. Por outro lado, a maior dose de N-nitrato fornecida (3,2 mM) provocou uma alta atividade da nitrato redutase nas folhas. Esse resultado foi diferente do observado para a atividade enzimática, nas plantas ao início do florescimento, onde essa dose provocou uma baixa atividade dessa enzima (**Figura 18**).

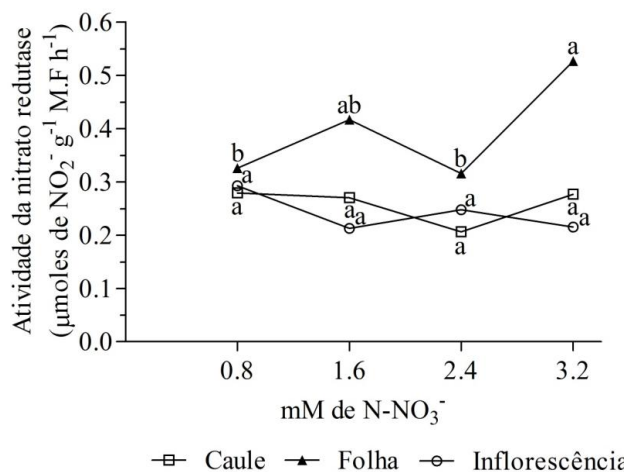


Figura 21. Atividade da nitrato redutase em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Uma hipótese provável, tendo em vista uma análise como um todo dos dados obtidos até o momento, é que o nitrato seja um íon que modifique acentuadamente sua distribuição em plantas de crambe, ao longo do desenvolvimento. Assim, é possível que a maior atividade de nitrato redutase, observada ao final do florescimento, possa ser resultado de uma maior concentração desse íon no “pool” metabólico, altamente relacionado à indução da atividade enzimática (Lillo *et al.*, 2004).

Entretanto, é importante ressaltar que a atividade da nitrato redutase foi bem menor ao fim do florescimento, quando comparado a atividade exibida ao início dessa fase (**Figuras 18 e 21**). Esses resultados estão em concordância com o relatado por Souza *et al.* (2002), que revelam que a atividade dessa enzima tende a diminuir com o avanço do ciclo de vida da planta. Cabe destacar que, a essa fase do desenvolvimento, não foram observadas quantidades detectáveis de amônio nas diferentes partes da planta (Dados não mostrados).

A **Figura 22A** revela que não houve variação significativa nos teores de açúcares solúveis, em função das diferentes doses de N-nitrato fornecidas, nas diversas partes da planta analisadas. Por outro lado, os teores de N-amino exibiram comportamentos interessantes, sendo um deles, os altos níveis desses compostos na inflorescência (**Figura 22B**). Esse dado sugere que esse órgão não é só importante no armazenamento do nitrato, mas que também exerce em plantas de crambe um papel relevante para o acúmulo de aminoácidos livres, provavelmente, para uso posterior na síntese proteica das sementes. Cabe ainda ressaltar que, a essa fase do ciclo, as plantas cultivadas sob 1,6 mM de N-nitrato apresentaram os maiores níveis de N-amino, tanto no caule como na inflorescência.

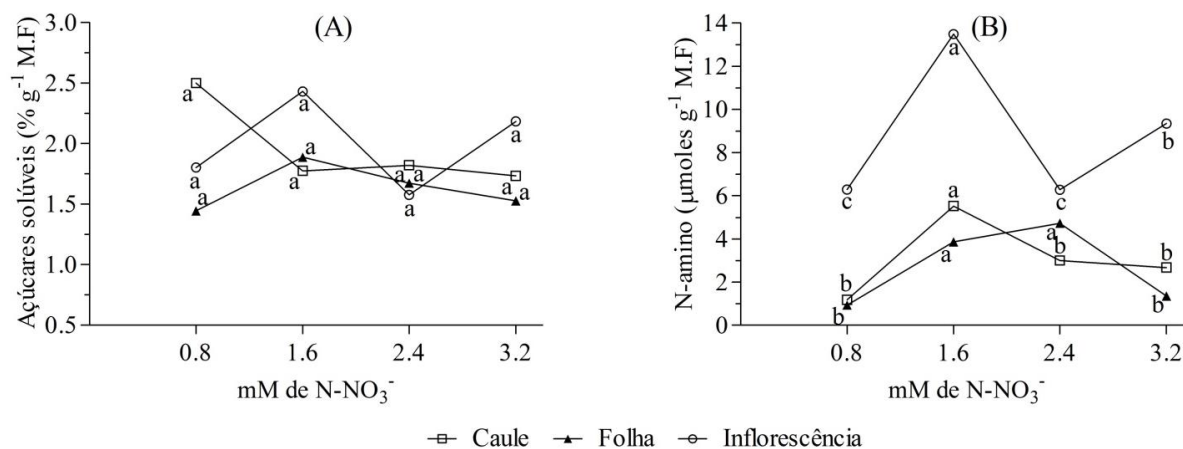


Figura 22. Teores de açúcares solúveis (A) e N-amino (B) em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Na **tabela 10** é possível observar que não ocorreu variação significativa, tanto nos teores quanto nos conteúdos, de nitrogênio no caule das plantas submetidas às diferentes doses de N-nitrato. No entanto, as plantas cultivadas sob a dose de 3,2 mM exibiram altos níveis de nitrogênio nas folhas e inflorescências, com destaque para o elevado conteúdo observado na inflorescência, que comparado ao observado com a dose de 0,8 mM, foi quase o triplo. Uma das razões principais para esse resultado é a grande diferença que se estabeleceu nas concentrações de nitrogênio, sob forma de nitrato, nesse órgão, conforme o relatado na **tabela 9**. Além disso, os dados relatados na **tabela 10** ressaltam ainda mais a importância da inflorescência para o acúmulo de nitrogênio em plantas de crambe.

Tabela 10. Teores ($\text{mg} \cdot \text{g.m.s}^{-1}$) e conteúdos ($\text{mg} \cdot \text{planta seca}^{-1}$) de N-total, fósforo e potássio em caules, folhas e inflorescências de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim do florescimento (63 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Dose de N-nitrato (mM)	Teor ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ massa seca)								
	N-total			P			K		
	Caule	Folha	Infl.	Caule	Folha	Infl.	Caule	Folha	Infl.
0,8	7,29a	18,51c	13,39c	0,00a	0,00a	0,40a	0,73a	0,38a	0,50a
1,6	6,55a	21,30bc	21,85bc	0,00a	0,00a	0,22a	0,58a	0,36a	0,47a
2,4	9,39a	26,87ab	26,74b	0,00a	0,00a	0,25a	0,60a	0,36a	0,46a
3,2	9,29a	31,95a	35,03a	0,00a	0,00a	0,46a	0,64a	0,35a	0,42a
	Conteúdo ($\text{mg} \cdot \text{planta seca}^{-1}$)								
0,8	27,93a	66,08b	51,84b	0,00a	0,00a	1,28b	2,76b	1,30ab	1,56a
1,6	38,22a	87,12b	91,42b	0,00a	0,00a	0,99b	3,05b	1,43ab	1,92a
2,4	37,24a	142,19a	87,08b	0,00a	0,00a	0,46b	3,09b	1,80a	1,55a
3,2	65,59a	105,66ab	140,98a	0,00a	0,00a	2,36a	3,68a	1,10b	1,73a

Outro resultado importante é que, a essa fase do ciclo de vida, as plantas de crambe não apresentaram nos caules e folhas níveis detectáveis de fósforo (**Tabela 10**). Entretanto, na inflorescência foram obtidas concentrações detectáveis desse nutriente e, embora não tenham ocorrido diferenças significativas em relação aos teores, as plantas cultivadas sob a dose de 3,2 mM apresentaram o maior conteúdo de fósforo. Isso possivelmente está relacionado à maior demanda por fósforo, já que esse nutriente é fundamental no metabolismo do nitrogênio, que parece estar ocorrendo mais intensamente nessas plantas (Araújo & Machado, 2006). A maior concentração de fósforo na inflorescência, frente ao detectado no caule e nas folhas, pode indicar que esse seria um dos locais principais para os processos de transferência energética a esse estágio do desenvolvimento. Outro aspecto que pode ser observado na **tabela 10**, é que, exceto em relação ao conteúdo de potássio maior no caule das plantas cultivadas sob 3,2 mM, não ocorreram outras tendências de variações significativas nos níveis de desse nutriente a essa fase do desenvolvimento.

5.3.3 Plantas de crambe ao final da maturação de sementes (90 DAG)

A essa fase do desenvolvimento, não ocorreram diferenças significativas na produção de massa fresca em sementes, em função da variação nas doses de N-nitrato (**Figura 23A**). Por outro lado, as doses de 1,6; 2,4 e 3,2 mM de N-nitrato não provocaram diferenças em relação a produção de massa seca nas sementes (**Figura 23B**). Esse resultado é importante quando considera-se o uso da cultura para a produção de torta, um dos seus principais potenciais (Fundação MS, 2007). Isso se justifica, pois contribui para evitar o uso de doses muito elevadas de nitrogênio para o cultivo de crambe, no entanto, outros aspectos de importância econômica, como produção e perfil do óleo devem ainda ser levados em consideração. Outro aspecto a ser considerado, na **figura 23A**, em virtude do uso da cultura como forrageira, é a maior produção de massa fresca de caule nas plantas cultivadas com 3,2 mM de N-nitrato.

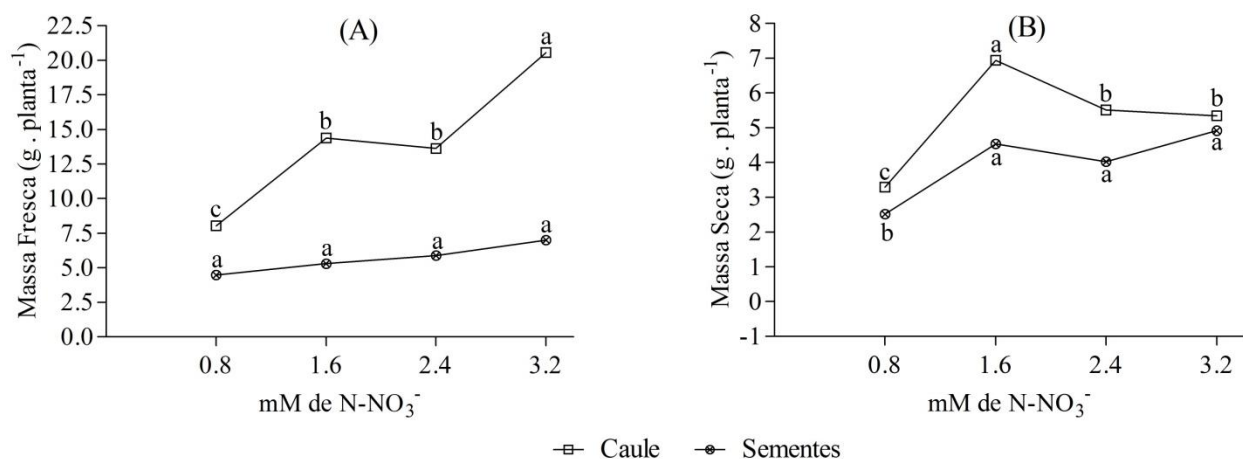


Figura 23. Massa fresca (A) e seca (B) de caules e sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Por outro lado, no que diz respeito aos índices de massa seca, observou-se pela primeira vez um comportamento divergente, quando comparado aos resultados obtidos em relação aos índices de massa fresca (**Figura 23B**). Essa divergência ocorreu somente em relação ao caule, que apresentou uma maior produção de massa seca nas plantas cultivadas sob 1,6 mM. Esse resultado, embora divergente quando comparado à produção de massa fresca, é coerente com os altos valores de massa seca de caule, observados nas plantas de crambe, ao fim do período de florescimento (**Figura 20B**). Assim, a partir de uma análise comparativa da produção de massa fresca e seca ao longo do desenvolvimento, é possível notar que as doses mais altas de nitrogênio tenderam a favorecer a produção de massa fresca, enquanto a dose de 1,6 mM, acentuou a produção de massa seca (**Figuras: 17A, 17B, 20A, 20B, 23A e 23B**).

Vale destacar que Guo *et al.* (2007), em experimento com feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L), observou que existe uma correlação positiva entre a absorção de nitrogênio e o consumo de água pela planta. Dessa forma, uma hipótese possível é que as maiores doses de N-nitrato fornecidas nesse experimento podem estar favorecendo um aumento nos índices de massa fresca, devido a sua influência positiva sobre o percentual de água nos tecidos.

Outro ponto importante é possível observar quando se analisa a produção de massa fresca, ao longo do desenvolvimento de plantas de crambe, em cada uma das doses de nitrato

utilizadas (**Figura 24**). Nesse âmbito, nota-se que aos 37 DAG, as plantas submetidas às doses de 0,8 e 1,6 mM de N-nitrato não apresentaram diferenças significativas entre a produção de massa fresca de caules e folhas (**Figuras 24A e B**). Por outro lado, com o uso de doses maiores de N-nitrato (2,4 e 3,2 mM) ocorreu um aumento significativo na produção de massa fresca de folha a esse período, frente ao observado para o caule (**Figuras 24C e D**). Assim, é possível concluir que o aumento das doses de N-nitrato parece exercer efeitos positivos, sobre a produção de massa fresca de plantas de crambe, principalmente nas folhas, e nos momentos iniciais do desenvolvimento. Esse efeito provavelmente ocorre devido ao maior incremento nos processos de síntese proteica nas plantas cultivadas sob as doses mais altas de N-nitrato.

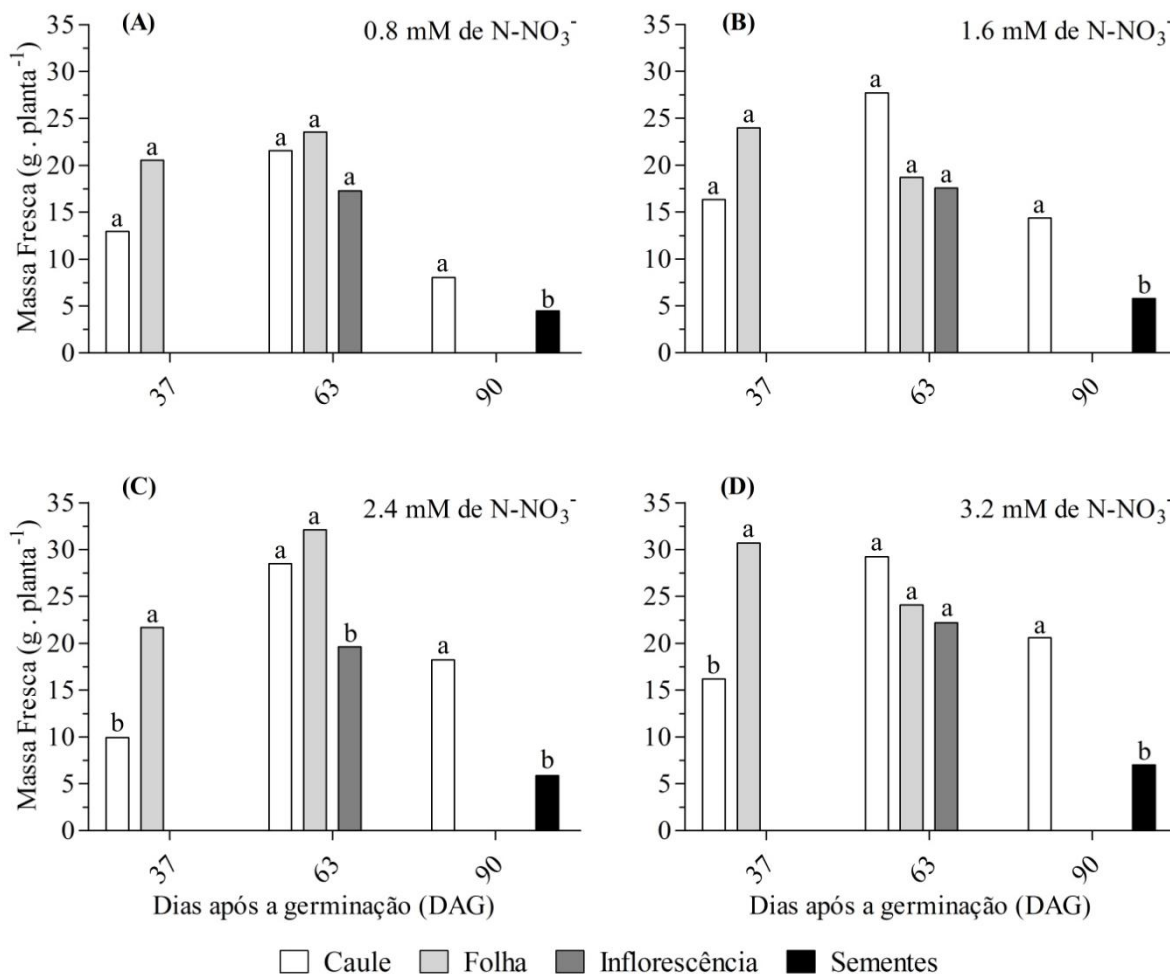


Figura 24. Massa fresca de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), em diferentes períodos do desenvolvimento (37, 63 e 90 DAG), submetidas à variação nas doses de N-nitrato em solo: 0,8 (A); 1,6 (B); 2,4 (C) e 3,2 (D) mM. Letras iguais em uma mesma coleta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

A **tabela 11** revela que, mesmo ao fim do ciclo de vida, as plantas cultivadas sob a maior dose de N-nitrato (3,2 mM) apresentaram altos teores desse ânion no caule, por outro lado, nas sementes não houve variação. Entretanto, no que diz respeito aos conteúdos de nitrato, tanto no caule como nas sementes, foram observados altos valores nas plantas sob 3,2 mM desse íon. Nas sementes, em especial, o conteúdo de nitrato das plantas cultivadas com essa dose foram mais

que o dobro do valor de conteúdo detectado nas plantas cultivadas com a menor dose (0,8 mM). Isso indica que, em plantas de crambe, o acúmulo de nitrogênio nas sementes parece ser altamente responsivo à variação da disponibilidade de nitrato no meio.

Tabela 11. Teores ($\mu\text{moles} \cdot \text{g.m.f}^{-1}$) e conteúdos ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$) de nitrato em caules e sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Dose de N-nitrato (mM)	Teor de N-NO_3^- ($\mu\text{moles} \cdot \text{g.m.f}^{-1}$)		Conteúdo de N-NO_3^- ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$)	
	Caule	Sementes	Caule	Sementes
0,8	0,06b	0,32a	0,48b	1,56b
1,6	0,08ab	0,35a	1,38ab	2,06b
2,4	0,29ab	0,38a	1,78ab	2,19ab
3,2	0,32a	0,42a	2,36a	3,67a

Na **figura 25**, é possível observar como ocorreu a distribuição do nitrato, entre as diferentes partes de plantas de crambe, ao longo do desenvolvimento, em cada uma das doses de N-nitrato utilizadas. Primeiramente, pode-se notar que aos 37 DAG as plantas submetidas às maiores doses de N-nitrato (2,4 e 3,2 mM) exibiram um aumento significativo no conteúdo de nitrato da folha, frente ao observado para o caule (**Figura 25C e D**). Esse resultado reitera a possibilidade de que o aumento na produção de massa fresca na folha, das plantas cultivadas com essas doses, observado aos 37 DAG, tenha ocorrido devido a maior disponibilidade desse ânion.

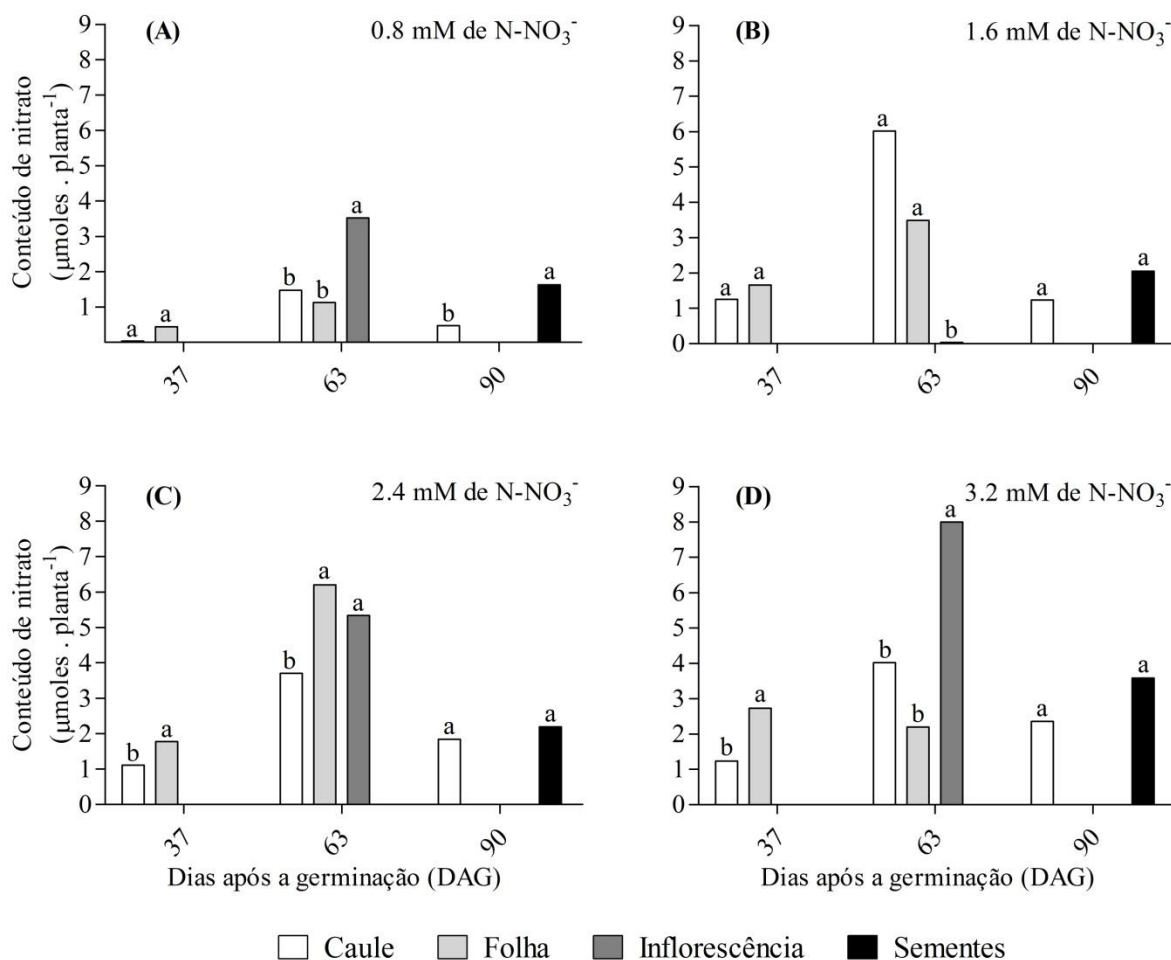


Figura 25. Conteúdo ($\mu\text{moles} \cdot \text{planta}^{-1}$) de nitrato de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), em diferentes períodos do desenvolvimento (37, 63 e 90 DAG), submetidas a variação das doses de N-nitrato em solo: 0,8 (A); 1,6 (B); 2,4 (C) e 3,2 (D) mM. Letras iguais em uma mesma coleta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Aos 63 DAG, as plantas de crambe exibem um comportamento diverso em relação à distribuição do nitrato nas diferentes partes, frente à variação no suprimento de N-nitrato no meio (**Figura 25**). Nesse período, em geral, a inflorescência mostrou-se ser altamente responsiva a variação desse ânion no meio de cultivo, com destaque para os altos conteúdos de nitrato observados nesse local nas plantas cultivadas com 3,2 mM de N-nitrato (**Figura 25D**). Entretanto, vale ressaltar que um resultado distinto dos demais, foi observado nas plantas cultivadas sob 1,6 mM de N-nitrato, onde observou-se um maior acúmulo desse íon no caule e na folha (**Figura 25B**). Dessa forma, pode-se destacar que, embora a inflorescência em plantas de crambe pareça exercer um papel importante no armazenamento do nitrato durante a fase reprodutiva, a variação da disponibilidade desse íon pode modificar também sua distribuição nas diferentes partes da planta.

Um resultado importante é que, embora não tenha ocorrido variação na atividade da nitrato redutase em sementes, em função das diferentes doses de N-nitrato utilizadas, a enzima apresentou ao final do ciclo níveis de atividade nesse órgão, semelhantes àqueles encontrados em caules e inflorescências das plantas de crambe ao final do florescimento (**Figuras 21 e 26A**). Isso indica que a nitrato redutase mantém sua relevância em plantas de crambe, mesmo nos estágios

mais tardios do desenvolvimento. Além disso, a enzima exibiu uma alta atividade nas plantas cultivadas sob 3,2 mM, seguindo o mesmo padrão que se observou a partir do fim do florescimento.

Dessa forma, a partir de uma análise integrada dos dados sobre a atividade da nitrato redutase, ao longo do desenvolvimento, é possível concluir que nos momentos iniciais do ciclo de vida do crambe a enzima parece ser afetada negativamente pelo maior suprimento de N-nitrato, no entanto, nos estágios mais tardios desse ciclo a tendência se modifica, com o estabelecimento de uma influência positiva (**Figuras 18, 21 e 26A**).

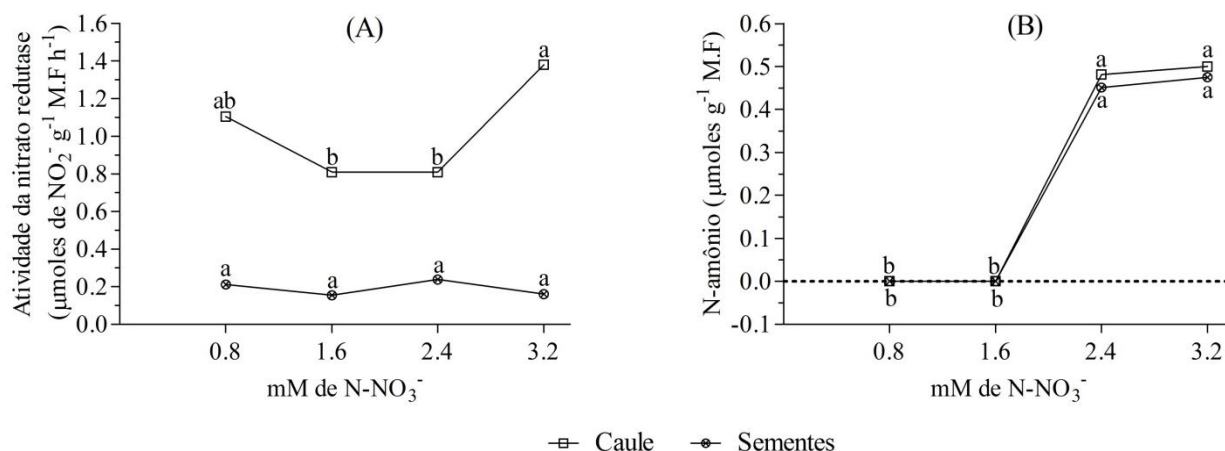


Figura 26. Atividade da nitrato redutase (A) e teores de N-amônio (B) de caules e sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Embora não tenham ocorrido concentrações detectáveis de N-amônio ao início e ao final do florescimento, nessa fase os resultados foram diferentes (**Figura 26B**). As plantas cultivadas sob os níveis de 2,4 e 3,2 mM de N-nitrato apresentaram concentrações detectáveis desse cátion, provavelmente, devido ao maior fluxo de nitrogênio, via produção de N-amônio. Esse aumento na produção de N-amônio é segundo Souza *et al.*, (2002), característico durante o processo de senescência vegetal, em razão da elevação da deaminação de aminoácidos e degradação de proteínas que ocorre nesse período.

A partir da análise da **figura 27A** é possível observar que as maiores doses de N-nitrato fornecidas (2,4 e 3,2 mM) promoveram um aumento significativo nos percentuais de açúcares solúveis presentes em caules e sementes. Além disso, a **figura 27B** também exhibe que altos níveis de N-amino foram detectados nas plantas cultivadas sob tais doses de N-nitrato. Em ambos os casos, é provável que o aumento no suprimento de nitrogênio tenha estimulado a síntese de açúcares e aminoácidos, a ponto de acarretar a maior presença desses compostos até períodos mais tardios do desenvolvimento.

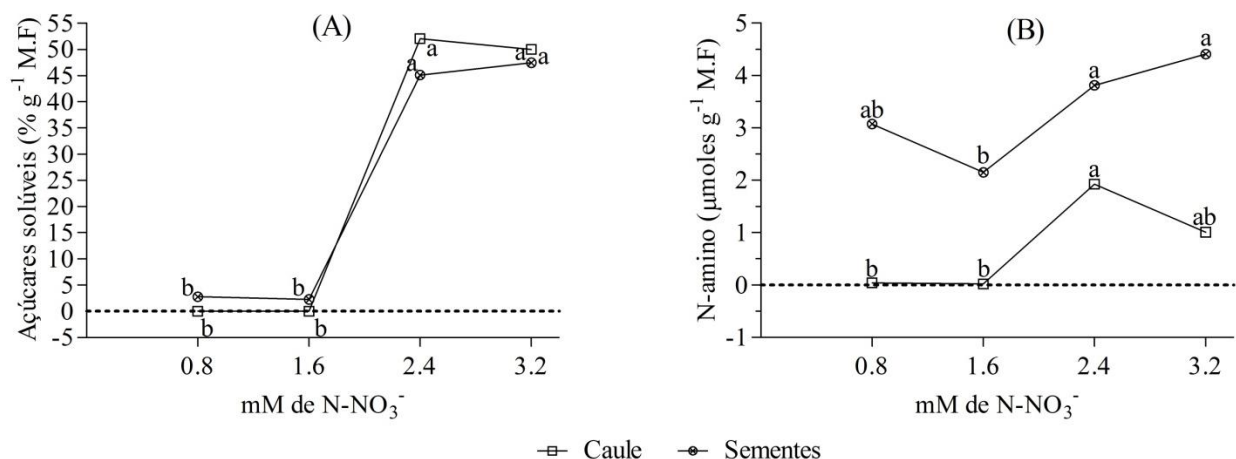


Figura 27. Teores de açúcares solúveis (A) e N-amino (B) de caules e sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

A alta atividade da nitrato redutase no caule das plantas cultivadas com 3,2 mM de N-nitrato, exibida na **figura 26A**, pode estar relacionada também ao elevado nível de açúcares presentes nessa parte da planta. Diversos autores relatam que a presença de açúcares solúveis pode estimular a atividade da nitrato redutase, por mecanismos diretos ou indiretos (Sahulka & Lisá, 1978; Klein *et al.*, 2000; Bartolomé *et al.*, 2004). No entanto, as plantas cultivadas sob a dose de 2,4 mM apresentaram altos níveis de açúcares solúveis e uma baixa atividade da nitrato redutase (**Figuras 26A e 27A**), o que enfraquece a hipótese da relação entre os altos níveis de açúcares e a maior atividade da nitrato redutase em plantas de crambe.

A longa exposição aos altos níveis de nitrogênio no meio, pelas plantas cultivadas sob 2,4 e 3,2 mM de N-nitrato, acarretou elevados conteúdos desse elemento, principalmente, no caule dessas plantas (**Tabela 12**). Esse resultado reitera o papel importante do caule no armazenamento do nitrogênio em plantas de crambe, e revela que isso se estende até as etapas mais tardias do ciclo de vida.

Tabela 12. Teores ($\text{mg} \cdot \text{g.p.s}^{-1}$) e conteúdos ($\text{mg} \cdot \text{planta seca}^{-1}$) de N-total, fósforo e potássio em caules e sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

Dose de N-nitrato (mM)	Teor ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ peso seco)						
	N-total		P		K		
	Caule	Sementes	Caule	Sementes	Caule	Sementes	
0,8	2,74a	24,11a	0,00a	0,39ab	0,74a	0,28a	
1,6	4,87a	29,07a	0,00a	0,48a	0,50b	0,35a	
2,4	9,80a	28,07a	0,00a	0,30b	0,53b	0,27a	
3,2	7,33a	25,75a	0,00a	0,40ab	0,53b	0,25a	
	Conteúdo ($\text{mg} \cdot \text{planta seca}^{-1}$)						
	0,8	16,27c	1,27a	0,00a	0,03a	3,07b	0,01a
	1,6	35,14b	0,62a	0,00a	0,02a	4,13a	0,01a
	2,4	53,68a	0,98a	0,00a	0,01a	3,24b	0,01a
	3,2	39,97ab	1,06a	0,00a	0,02a	2,82b	0,01a

No que diz respeito aos níveis de fósforo observados, é possível ressaltar que não ocorreram diferenças significativas a essa fase do ciclo, nos conteúdos desse elemento em caules e sementes, frente à variação nas doses de N-nitrato (**Tabela 12**). Por outro lado, os conteúdos de potássio no caule exibiram um comportamento irregular, quando comparado àqueles observados ao final da fase de florescimento, exibindo um alto valor nas plantas cultivadas sob 1,6 mM de N-nitrato (**Tabela 12**).

No que diz respeito à produção de óleo nas plantas de crambe, cultivadas sob variação no suprimento de N-nitrato, é possível notar que ocorreu um aumento significativo com o uso de 1,6 mM de N-nitrato, quando comparado a produção obtida com 0,8 mM (**Figura 28A**). No entanto, não ocorreu uma variação significativa na produção de óleo entre as plantas submetidas a 1,6; 2,4 e 3,2 mM de N-nitrato. O rendimento de óleo também apresentou um comportamento semelhante, obtendo-se valores baixos com o uso de 0,8 mM de N-nitrato (cerca de 30%) e índices em torno de 50 a 60% desse composto com o uso das demais doses (**Figura 28B**). Os resultados obtidos com as maiores doses de N-nitrato (1,6; 2,4 e 3,2 mM) foram superiores em relação àqueles relatados por Pitol (2008), que obteve de 36 a 38% de óleo nas sementes de crambe, também da variedade FMS brilhante.

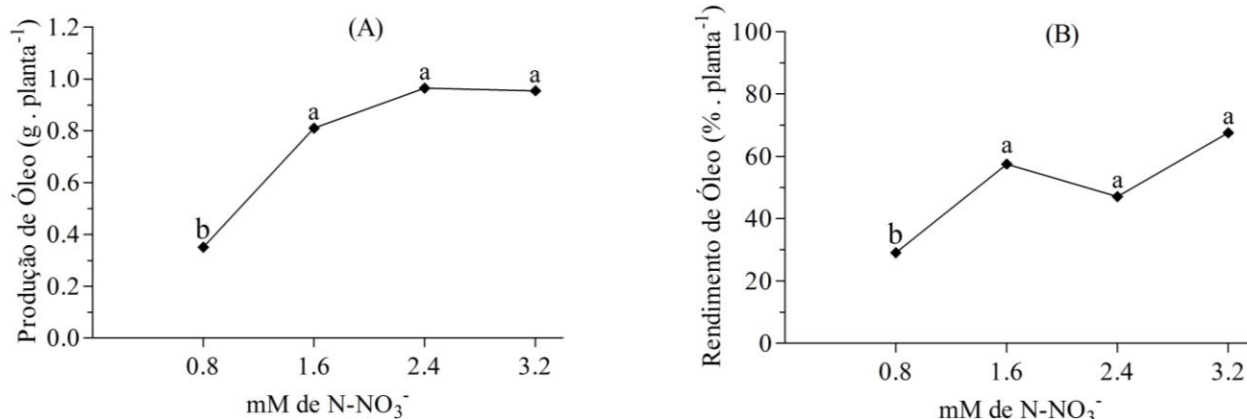


Figura 28. Produção (A) e rendimento (B) de óleo extraído a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey a 5% de probabilidade).

É importante citar que diversos autores relatam em plantas da família brassicacea como a couve e a canola, que o aumento do suprimento de nitrogênio pode, em alguns espectros, provocar uma estagnação ou até mesmo redução na concentração de óleo nas sementes (Rollier, 1970; Ahmad *et al.* 2011). Assim, os resultados obtidos com plantas de crambe indicam a possibilidade do uso de uma dose de 1,6 mM de N-nitrato, visando o cultivo de crambe para a extração de óleo, o que possibilita evitar situações de carência ou desperdício e, conseqüentemente, uma redução nos custos de produção e impactos ao ambiente.

Porém, um ponto central, que deve ser relatado, é que a dose ótima de nitrogênio para uma cultura é significativamente influenciada pelo tipo de cultivar em questão, o ano em que foi cultivada, o local de produção e por diversos outros fatores (Rathke et al. 2006). Assim, deve-se sempre considerar a influência desses fatores quando há o intuito de determinar as doses consideradas ótimas de nitrogênio visando um fim específico. Outro ponto fundamental, é que o perfil de ácidos graxos do óleo é um fator de grande importância tendo em vista seu emprego, seja na indústria de biodiesel ou de lubrificantes (Fundação MS, 2010).

Como pode ser observado na **tabela 13** não houve variação significativa nos percentuais de ácido oléico no óleo, em função dos diferentes níveis de N-nitrato no solo. De acordo com Knothe (2008), ésteres metílicos provenientes do ácido oléico afetam positivamente a qualidade global do biodiesel, pois dentre seus efeitos está à elevação do índice de cetanos e da estabilidade oxidativa desse combustível. Assim, nesse âmbito, é possível relatar que não ocorreu uma contribuição positiva do aumento nas doses de N-nitrato sobre a qualidade do óleo, tendo em vista seu uso para a produção de biodiesel.

Por outro lado, as plantas cultivadas com 2,4 mM de N-nitrato apresentaram um aumento significativo nas concentrações de ácido linoléico e linolênico. O aumento nas concentrações desses ácidos acarreta uma redução da qualidade do biodiesel, pois de acordo com Pinzi *et al.* (2009), ésteres metílicos derivados de ácidos com alto nível de insaturação ocasionam uma elevação no tempo de inércia da ignição (“Ignition time delay”) e uma diminuição no índice de cetanos do biodiesel, o que conseqüentemente gera uma redução na qualidade de combustão.

Dessa forma, levando-se em consideração o uso do óleo de crambe para a produção de biodiesel, é possível destacar a possibilidade de utilização de baixos suprimentos de N-nitrato, como 1,6 mM, no cultivo, uma vez que tal dose proporcionou bons parâmetros de qualidade.

Tabela 13: Teores de ácidos graxos no óleo (%) de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries) submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). A determinação foi realizada com base na comparação entre os tempos de retenção das amostras com os obtidos a partir de padrões comerciais (Sigma-Aldrich®). Além disso, são relatados os percentuais de ácidos graxos em sementes comerciais de crambe (Springdale Group, 2005). Espaços vazios são referentes a ácidos graxos não encontrados. Letras iguais em uma mesma linha indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Ácido Graxo	Dose de N-nitrato (mM)				Springdale Group (2005)
	0,8	1,6	2,4	3,2	
Mirístico (14:0)	0,78b	0,73b	3,76a	0,46b	ND*
Palmítico (16:0)	3,00a	2,88a	4,10a	4,42a	1,80
Esteárico (18:0)	2,03b	1,16b	5,05a	3,33ab	0,70
Oléico (18:1)	8,94a	9,95a	11,06a	11,29a	17,20
Linoléico (18:2)	21,88b	23,64b	29,27a	22,13b	8,70
Linolênico (18:3)	0,31b	0,30b	4,95a	0,25b	5,20
Eicosanóico (20:0)	0,94a	0,89a	1,06a	0,89a	3,40
Araquidônico (20:4)	1,02a	1,07a	0,89a	0,90a	ND*
Behenico (22:0)	2,10a	1,84a	1,83a	1,63a	ND*
Erúxico (22:1)	51,38a	47,97b	43,32c	42,70c	62,00
Tetracosanóico (24:1)	1,16a	1,11a	0,17a	0,89a	0,70
Outros	6,46	8,46	5,73	11,11	2,50

ND* – não detectado

Outro aspecto importante é a aplicação industrial do óleo de crambe, usado em geral, devido ao emprego do ácido erúxico como lubrificante, inibidor da corrosão, matéria-prima para a produção de borracha sintética, plástico e surfactantes (Gonzales & Cihacek, 1991; Leonard, 1993). Nesse contexto, pode-se destacar que ocorreu uma redução significativa nas concentrações de ácido erúxico, com o aumento no suprimento de N-nitrato no solo, até a dose de 2,4 mM. Esse resultado é de extrema importância, pois indica a possibilidade de combinar uma redução no uso de nitrato no cultivo, o que reduz amplamente os custos de produção e impactos ao ambiente, com o aumento nos percentuais de ácido erúxico no óleo de crambe. Dessa forma, tendo em vista a aplicação industrial do óleo, para a extração de ácido erúxico, tornam-se recomendáveis o uso de baixos suprimentos de nitrato durante o cultivo em solo, uma vez que esses suprimentos proporcionam uma melhoria da qualidade do óleo produzido.

A expressão relativa do gene da delta 12 desaturase, em sementes maduras, exibiu altos valores nas plantas cultivadas com a menor dose de N-nitrato (0,8 mM) e baixos valores nas plantas cultivadas sob doses mais altas desse ânion (**Figura 29A**). Uma observação importante

nesse contexto é que a enzima delta 12 desaturase é a responsável pela conversão do ácido oléico em linoléico em plantas. Com isso, sua maior atividade tende a acarretar uma redução na concentração de ácido oléico e, assim, uma queda na qualidade global do óleo, tendo em vista seu uso para a síntese de biodiesel (Guan *et al.*, 2012; Pinzi *et al.*, 2009).

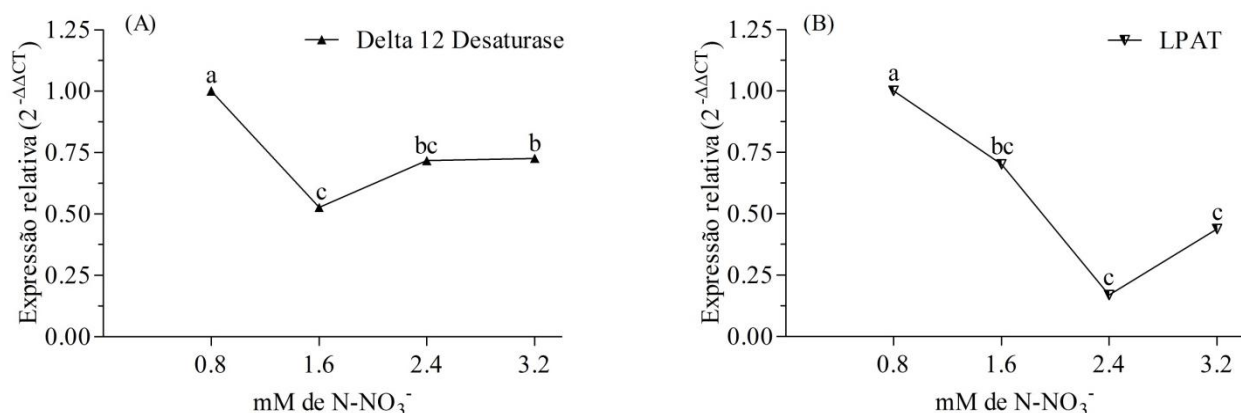


Figura 29. Expressão relativa dos genes das enzimas delta 12 desaturase (A) e lisofosfatidil aciltransferase - LPAT (B) em sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Como controle endógeno foi utilizada a actina 2 (GenBank NM 180280.1). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste t - LSD a 5% de probabilidade).

As plantas submetidas a menor dose de N-nitrato (0,8 mM) apresentaram, juntamente com a elevada expressão relativa do gene da delta 12 desaturase, baixas concentrações de ácido oléico no óleo (**Tabela 13 e Figura 29A**). Embora esse comportamento seja coerente com o esperado, é importante destacar que não ocorreram diferenças significativas nas concentrações desse ácido, frente às diferentes doses de N-nitrato. Assim, é possível concluir que, mesmo com o aumento da expressão relativa do gene da delta 12 desaturase, nas plantas cultivadas com 0,8 mM de N-nitrato, não ocorreu uma alteração significativa sobre os parâmetros de qualidade do óleo produzido, tendo em vista seu emprego na síntese de biodiesel.

De acordo com patente publicada por Debonte *et al.* (2007) o gene relacionado a delta 12 desaturase apresenta, em diversas espécies da família brassicaceae, uma forte relação com o perfil de ácidos graxos do óleo. Os autores destacam, por exemplo, que em canola (*Brassica napus* L.) é possível uma redução na concentração de ácido linoléico do óleo, com uma mutação no gene da delta 12 desaturase que torna seu produto protéico não funcional. Além disso, os autores relatam que outras mutações nesse gene podem provocar um aumento nas concentrações de ácido oléico no óleo de canola. Outros autores também relatam a forte correlação entre a atividade do gene da delta 12 desaturase, e as concentrações de ácido oléico em plantas da família brassicaceae (Falentin *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2011).

Assim, embora nesse experimento a modificação na expressão desse gene não tenha provocado alterações significativas na concentração de ácido oléico no óleo de plantas de crambe, são necessárias outras pesquisas visando verificar tal correlação nessa espécie.

Na **figura 29B** é possível observar que o aumento nas doses de N-nitrato do meio de cultivo provocou uma repressão significativa na expressão relativa do gene relacionado à LPAT. A esse ponto, é importante destacar que a enzima LPAT catalisa a formação de ácido fosfatídico

a partir da acilação do ácido lisofosfatídico no retículo endoplasmático, uma etapa fundamental na via de produção de triacilgliceróis (Baud & Lepiniec, 2010). Além disso, Nath *et al.* (2009) relatam que essa enzima também se encontra associada à formação de ácido erúcido em plantas de colza.

No âmbito da produção de óleo, deve ser destacado que não ocorreu uma correlação positiva entre a expressão do gene da LPAT e a produção de óleo em plantas de crambe, frente à elevação nas doses de N-nitrato (**Figuras 28 e 29B**). Por outro lado, tendo em vista a reconhecida importância da LPAT na formação de ácido erúcido, a redução da expressão da LPAT pode estar relacionada à diminuição nas concentrações de ácido erúcido, uma vez que ambos os efeitos foram observados com o aumento do suprimento de N-nitrato (**Tabela 13 e Figura 29B**). Nesse contexto, é importante ressaltar que Zou *et al.* (1997) observaram que aumentos expressivos nas concentrações de ácido erúcido podem ser obtidos a partir da expressão de um gene de fungo, relacionado a um produto com atividade semelhante a LPAT, em plantas da família brassicaceae.

Assim, os dados obtidos indicam que em plantas de crambe existe uma forte correlação entre a expressão da LPAT e os níveis de ácido erúcido no óleo, e que ambos aspectos parecem ser afetados negativamente pelo aumento nas concentrações de nitrato no meio de cultivo. Essa correlação pode ser observada na **figura 30**. Esse resultado é de grande importância, quando se considera o emprego da cultura seja para extração de ácido erúcido ou para o desenvolvimento de novas pesquisas visando à obtenção de variedades de crambe com alto teor desse composto nas sementes.

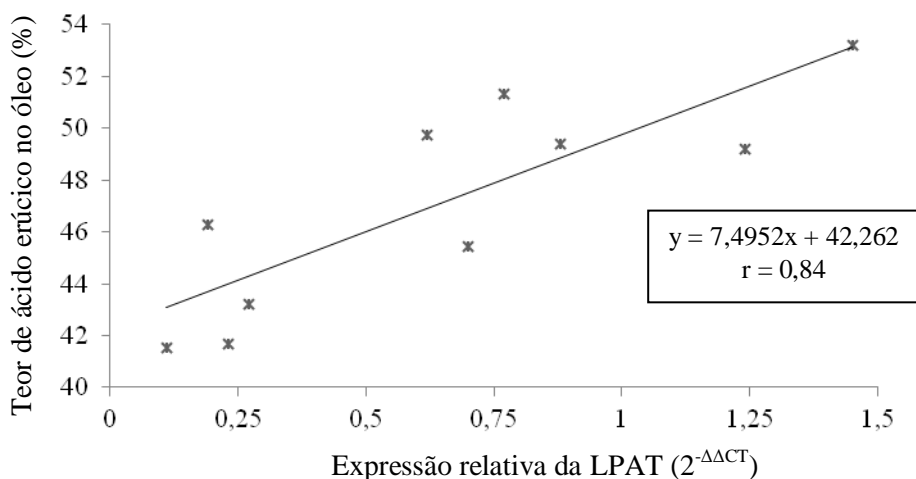


Figura 30. Correlação entre o teor de ácido erúcido no óleo (%) e a expressão relativa do gene da enzima lisofosfatidil aciltransferase - LPAT em sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), coletadas ao fim do ciclo de vida (90 DAG). Como controle endógeno foi utilizada a actina 2 (GenBank NM 180280.1).

Em relação ao gene da 3-cetoacil-CoA sintase (KCS), pode-se observar que com a variação no suprimento de N-nitrato, não ocorreram alterações significativas na expressão relativa desse gene (**Figura 31**). De acordo com Mietkiewska *et al.* (2007), a KCS é uma enzima que encontra-se relacionada ao processo de síntese de ácidos graxos de cadeia longa em sementes de diversas espécies da família brassicaceae. Entretanto, os dados obtidos nesse experimento indicam que o aumento das doses de N-nitrato não acarretou uma elevação

significativa na expressão da KCS e, além disso, uma redução significativa nos percentuais de ácido erúcido, um ácido graxo de cadeia longa, no óleo de plantas de crambe.

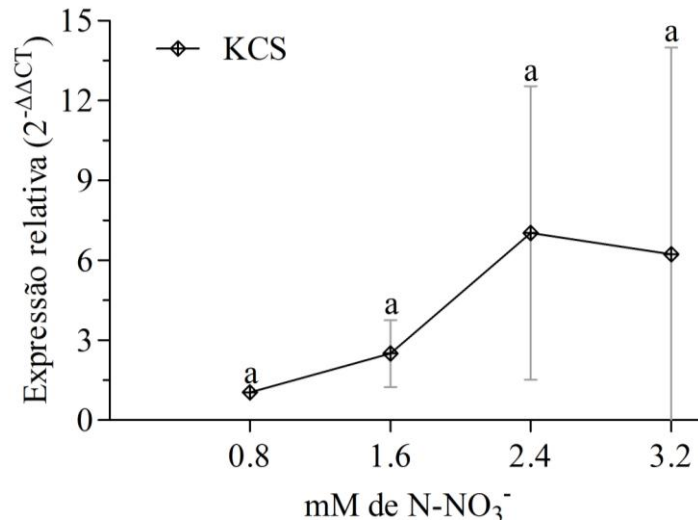


Figura 31. Expressão relativa do gene da enzima 3-cetoacil-CoA sintase (KCS) em sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a diferentes doses de N-nitrato (0,8; 1,6; 2,4 e 3,2 mM) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG). Como controle endógeno foi utilizada a actina 2 (GenBank NM 180280.1). Letras iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa (teste t – LSD a 5% de probabilidade).

Assim, esses resultados indicam que a enzima KCS pode não ser um dos principais elementos que regulam a síntese de ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido erúcido, no metabolismo de sementes de plantas de crambe. Entretanto, vale ressaltar que para expressão relativa do gene da KCS, foram obtidas altas variações entre as repetições, o que contribuiu amplamente para a ausência de diferenças significativas.

6 CONCLUSÕES

- A partir dos dados obtidos com o experimento I, em hidroponia, foi possível reiterar o papel chave do caule no armazenamento de nitrato, em plantas de crambe da variedade brasileira FMS Brilhante, provavelmente visando à manutenção do suprimento desse íon em períodos de baixa disponibilidade. Além disso, a variação nas doses de N-nitrato estabelecidas nesse experimento (0,2; 2 e 4 mM), não modificaram significativamente a produção de massa fresca nas diferentes partes dessa espécie, ao final da fase vegetativa, um resultado importante quando se considera a produção da cultura para a alimentação de ruminantes ou seu uso como fertilizante.
- No experimento II, também em sistema hidropônico, foi possível verificar que a variação do pH (5,0; 5,5; 6,0 e 6,5) não exerceu influência significativa sobre a produção de massa fresca, outro resultado relevante tendo em vista a produção de crambe da variedade brasileira FMS Brilhante para a nutrição de ruminantes ou visando a adubação do solo. Outro aspecto importante, foi observado nas plantas cultivadas sob pH 5,5, onde parece ter ocorrido um maior estímulo dos processos envolvidos na redução e assimilação do nitrogênio.
- No experimento III, conduzido em solo, foi possível observar que as plantas de crambe, da variedade brasileira FMS Brilhante, exibiram bons parâmetros de produtividade, como produção e qualidade do óleo, quando cultivadas com 1,6 mM de N-nitrato, tendo em vista seu uso na indústria de biodiesel. Por outro lado, quando se considera o cultivo de crambe para a extração do ácido erúico do óleo, podem ser recomendadas as doses de 0,8 e 1,6 mM de N-nitrato, porém, deve-se considerar se o aumento na concentração de ácido erúico no óleo, obtido com a menor dose, pode compensar uma eventual redução na quantidade de óleo produzida. No que diz respeito ao gene da LPAT, observou-se uma forte relação da sua expressão em sementes com a síntese de ácido erúico no óleo.
- Tendo-se em vista a produção de crambe seja para a agroenergia, mercado de ácido erúico ou como forrageira, são possíveis bons parâmetros de produtividade com baixas doses de N-nitrato, o que contribui para um melhor manejo da cultura, uma redução nos custos de produção e nos impactos causados pelo uso de fertilizantes a base de nitrato no ambiente.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABROL, Y.P.; RAGHURAM, N.; SACHDEV, M.S. Agricultural nitrogen use & its environmental implications. New Delhi: I.K International publishing house Pvt. Ltd, 2007.

AGARWAL, A.K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 33, p. 233-271, 2007.

AGROPRECISA. *Crambe: Opção lucrativa para o crescente mercado de biodiesel*, 2008. Disponível em: <<http://www.agroprecisa.com.br/site/noticias/?idNoticia=152>>. Acesso em: 23 mar. 2008.

AHMAD, A.; ABDIN, M.Z. Interactive Effect of Sulphur and Nitrogen on the Oil and Protein Contents and on the Fatty Acid Profiles of Oil in the Seeds of Rapeseed (*Brassica campestris* L.) and Mustard (*Brassica juncea* L. Czern. and Coss.). *Journal of Agronomy and Crop science*, v. 185, n. 14, p. 49-54, 2000.

AHMAD, G.; JAN, A.; ARIF, M.; JAN, M.T.; SHAH, H. Effect of nitrogen and sulfur fertilization on yield components, seed and oil yields of canola. *Journal of plant nutrition*, v. 34, n. 14, p. 2069-2082, 2011.

ALBORESI, A.; GESTIN, C.; LEYDECKER, M.; BEDU, M.; MEYER, C. TRUONG, H. Nitrate, a signal relieving seed dormancy in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment*, v. 28, p. 500-512, 2005.

ALLEN, C.A.W. WATTS, K.C. ACKMAN, R.G. PEGG, M.J. Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition. *Fuel*, v. 78, p. 1319-1326, 1999.

ANP. Produção Nacional de Biodiesel Puro - B100 (barris equivalentes de petróleo). Superintendência de Planejamento e Pesquisa: Ministério das Minas e Energias. 2012.

ARAÚJO, A.P.; MACHADO, C.T.T. Fósforo. In: Manlio Silvestre Fernandes. (Org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 215-252, 2006.

BALIGAR, V.C. Interrelationships between growth and nutrient uptake in alfafa and corn. *Journal of Plant Nutrition*, 9:1391-1404, New York, 1986.

BARTOLOMÉ, R.; GONZÁLEZ, C.A.; KENIS, J.D. Nitrate reductase dephosphorylation is induced by sugars and sugar-phosphates in corn leaf segments. *Physiologia Plantarum*, v. 122, n. 1, p. 62-67, 2004.

BAUD, S.; LEPINIEC, L. Physiological and developmental regulation of seed oil production. *Progress in Lipid Research*, v. 49, p. 235-249, 2010.

- BEAUDOIN, F.; WU, X.; LI, F.; HASLAM, R.P.; MARKHAM, J.E.; ZHENG, H.; NAPIER, J.A.; KUNST, L. Functional characterization of the arabidopsis β -ketoacyl-coenzyme A reductase candidates of the fatty acid elongase. *Plant Physiology*, v. 150, p. 1174–1191, 2009.
- BILICH, F.; DA SILVA, R. Análise do potencial Brasileiro na produção de biodiesel. *Biodiesel: O novo combustível do Brasil*. 1 Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel. v. 1, p. 24-29, 2006.
- BRISCOE, B.J.; LUCKHAM, P.F.; REN, S.R. An assessment of a rolling-ball viscometer for studying non-Newtonian fluids. *Colloids and Surfaces*, v. 62, p. 153–162, 1992.
- BRITO, D.M.C. Aspectos do Metabolismo de Plantas de Crambe (*Crambe abyssinica*) Submetidas a Diferentes Doses de Nitrogênio Visando a Produção de Óleo para Biodiesel. 2009. 58p Dissertação (Mestrado em Química, Química Agrária). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.
- BRITTO, D.T.; KRONZUCKER, H.J. NH_4^+ toxicity in higher plants: a critical review. *J. Plant Physiol*, v. 159, p. 567–584, 2002.
- CAMARGO, J.A.; ALONSO, A. Ecological and toxicological effects of inorganic nitrogen pollution in aquatic ecosystems: A global assessment. *Environment International*. v. 32, ed. 6, p. 831-849, 2006.
- CASTRO, C. B.; ANTAL, C. RODRIGUES, V.B. SFREDO, G.J. Levels and methods of nitrogen supply for sunflower. *Sci. agric.* v. 56, n. 4, p. 827-833. 1998. disponível em: (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010390161999000400009&lng=en&rm=iso). Acesso em 16/02/2006
- CATALDO, D.; HARRON, M.; SCHARADER, L.E. e YOUNGS, V.L. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communication in Soil Science and Plant Analysis*, New York, US, v.6, p.853-855, 1975.
- CHEN, B.M.; WANG, Z.H.; LI, S.X.; WANG, G.X.; SONG, H.X.; WANG, X.N. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science*, v.167, p. 635-643, 2004.
- CHOUDHURY, A.T.M.A.; KENNEDY, I.R.; AHMED, M.F.; KECSKÉS, M.L. Phosphorus fertilization for rice and control of environmental pollution problems. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 10, n. 13, p. 2098–2105, 2007.
- CRAWFORD, N.M. Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The plant cell*, v. 7, p. 859-868, 1995.
- CRUSCIOL, C.A.C.; LIMA, E.D.; ANDREOTTI, M.; NAKAGAWA, J.; LEMOS, L.B.; MARUBAYASHI, O.M. Efeito do nitrogênio sobre a qualidade fisiológica, produtividade e características de sementes de feijão. *Revista Brasileira de Sementes*, v.25, n.1, p.108-115, 2003.

- DEBONTE, L.R.; MIAO, G.; FAN, Z. Plants having mutant delta 12 desaturase sequences that confer altered fatty acid profiles. *United States patent*, n. US 7,262,343 B1, 2007.
- DECHORGNAT, J.; NGUYEN, C.T.; ARMENGAUD, P.; JOSSIER, M.; DIATLOFF, E.; FILLEUR, S.; VEDELEL, F. From the soil to the seeds: the long journey of nitrate in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 4, p. 1349-1359, 2011.
- EMBRAPA. Manual de métodos de análise do solo. 2 ed. Rio de Janeiro; CNPS, 212p, 1997.
- FALENTIN, C.; BREGEON, M.; LUCAS, M.O.; RENARD, M. Genetic markers for high oleic acid content in plants. *European patent application*, n. 06290855.3, 2007.
- FELKER, P. Micro determination of nitrogen in seed protein extracts. *Analytical Chemistry*, v.49, 1980, 1977.
- FONTANA, F.; LAZZERI, L.; MALAGUTI, L.; GALLETTI, S. Agronomic characterisation of some *Crambe abyssinica* genotypes in a locality of the Po Valley. *Europ. J. of Agr*, v. 9, p 117–126, 1998.
- FRANCOIS, L.E.; KLEIMAN, R. Salinity effects on vegetation growth, seed yield and fatty acid composition of crambe. *Agron J.* v. 82, p. 1110–1114, 1990.
- FUNDAÇÃO MS. *Crambe: Uma nova opção para produção de biodiesel*, 2007. Disponível em: <<http://www.fundacaoms.com.br/news.php?item.2.1>>. Acesso em: 12 fev. 2012.
- FUNDAÇÃO MS. *Tecnologia e produção: Crambe*. 1 ed. Maracajú. 60 p. 2010.
- GAMMELVIND, L.H.; SCHJOERRING, J.K.; MOGENSEN, V.O.; JENSEN, C.R.; BOCK, J.G.H. Photosynthesis in leaves and siliques of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Soil*, v.186, p. 227–236, 1996.
- GAO, J.; LIU, J.; LI, B.; LI, Z. Isolation and purification of functional total RNA from blue-grained wheat endosperm tissues containing high levels of starches and flavonoids. *Plant Mol. Biol. Rep.* v. 19, p. 185–1185, 2001.
- GODLEWSKI, M.; ADAMCZYK, B. The ability of plants to secrete proteases by roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 45, p. 657-664, 2007.
- GÓMEZ, A. M.; LÓPEZ, C. P.; LA OSSA, E. M.; Recovery of grape seed oil by liquid and supercritical carbon dioxide extraction: a comparison with conventional solvent extraction. *The Chemical Engineering Journal*, v. 61, p. 227–231, 1996.
- GONZALES, P.B.; CIHACEK, L.J. Crambe Fertilization: A literature review. *North Dakota farm research - North Dakota, Agricultural Experiment Station*, v. 49, n. 3, p. 17-19, 1991.

GUAN, L.; WANG, Y.; SHEN, H.; HOU, K.; XU, Y.; WU, W. Molecular cloning and expression analysis of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). *Plant Mol Biol Rep*, v. 30, p. 139-148, 2012.

GUO, S.; SHEN, Q.; BRUECK, H. Effects of local nitrogen supply on water uptake of bean plants in a split root system. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 49, n. 4, p. 472-480, 2007.

GUO, Y.; MIETKIEWSKA, E.; FRANCIS, T.; KATAVIC, V.; BROST, J.M.; GIBLIN, M.; BARTON, D.L.; TAYLOR, D.C. Increase in nervonic acid content in transformed yeast and transgenic plants by introduction of a *Lunaria annua* L. *3-ketoacyl-CoA synthase* (KCS) gene. *Plant Mol Biol*, n. 69, p. 565-575, 2009.

HAGEMANN, J.W. MICOLAJKZAC, K.L. WOLFF, I.A. Purification of erucic-acid by low-temperature crystallization. *Journal of the American Oil Chemists Society*, v. 39, n. 4, p. 196-197, 1962.

HAHN-HÄGERDAL, B.; GALBE, M.; GORWA-GRAUSLUND, M. F.; LIDÉN, G.; ZACCHI, G. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, v. 24, n. 12, 2006.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 709–732, 2012.

HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing plants without soil. *California Agricultural of Experimental Stn. Bull*, v.347, p.1-32, 1950.

HUPPE, H. C.; TURPIN, D. H. Integration of carbon and nitrogen in plant and algal cells. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* v. 45, p. 577-607, 1994.

IGLESIAS, L.; LACA, A.; HERRERO, M.; DÍAZ, M. A life cycle assessment comparison between centralized and decentralized biodiesel production from raw sunflower oil and waste cooking oils. *Journal of Cleaner Production*, v. 10, n. 1, 2012.

JAVORSKY, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical Biophysical Research. Communication*, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.

JUNG, J.H.; KIM, H.; GO, Y.S.; LEE, S.B.; HUR, C.; KIM, H.U.; SUH, M.C. Identification of functional BrFAD2-1 gene encoding microsomal delta-12 fatty acid desaturase from *Brassica rapa* and development of *Brassica napus* containing high oleic acid contents. *Plant Cell Rep*, v. 30, p. 1881-1892, 2011.

KANRAR S.; VENKATESWARI J.; DUREJA P.; KIRTI P.B.; CHOPRA V.L. Modification of erucic acid content in Indian mustard (*Brassica juncea*) by up regulation and down regulation of the *Brassica juncea* Fatty Acid Elongation1 (BjFAE1) Gene. *Plant Cell*, v. 2, n. 25, p. 148-155, 2006.

KLEIN, D.; MORCUENDE, R.; STITT, M.; KRAPP, A. Regulation of nitrate reductase expression in leaves by nitrate and nitrogen metabolism is completely overridden when sugars fall below a critical level. *Plant, Cell and Environment*, v. 23, p. 863-871, 2000.

KNOTHE, G. "Designer" Biodiesel: Optimizing Fatty Ester Composition to Improve Fuel Properties. *Energy & Fuels*, v. 22, p. 1358-1364, 2008.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*, v. 86, p. 1059-1070, 2005.

KNOTHE, G. Structure indices in FA chemistry. How relevant is the iodine value?. *JAOCS*, v. 79, n. 9, p. 847-854, 2002.

KUMAR, S.R.S.; RAO, K.V.B. Biological Nitrogen Fixation : A Review. *International Journal of Advanced Life Sciences*, v. 1, p. 1-9, 2012.

LAPUERTA, M. ARMAS, O. RODRÍGUEZ-FERNÁNDEZ, J. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. *Progress in Energy and Combustion Science*, v. 34, p. 198-223, 2008.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica*. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995.

LEONARD, E. C. High-erucic vegetable oils. *Industrial Crops & Prod.* v. 1, p. 119-123, 1993.

LILLO, C. MEYER, C. LEA, U.S, PROVAN, F. OLTEDAL, S. Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany*, v.55, n. 401, p. 1275-1282, 2004.

LIVAK, K.J. e SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, v. 25, p.402-408, 2001.

LOULAKAKIS, K.A.; ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K.A.; KANELLIS, A.K. Isolation of Functional RNA From Grapevine Tissues Poor in Nucleic Acid Content. *Am. J. Enol. Vitic*, v. 47, n. 2, p. 181-185, 1996.

MALAVOLTA, E. *Elementos de nutrição mineral de plantas*. ed. Agronômica Ceres. São Paulo, SP. 1980. 251p.

METCALFE, L.D. SCHMITZ, A.A. PELKA, J.R. Rapid preparation of fatty acid methyl esters for gas chromatographic analysis. *Analytical Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 514-515, 1966.

MEURER, E.J. Potássio. In: Manlio Silvestre Fernandes. (Org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 215-252, 2006.

MIETKIEWSKA, E.; BROST, J.M.; GIBLIN, E.M.; BARTON, D.L.; TAYLOR, D.C. Cloning and functional characterization of the fatty acid elongase 1 (FAE1) gene from high erucic *Crambe abyssinica* cv. Prophet. *Plant Biotechnology Journal*, v. 5, p. 636–645, 2007.

MILLAR, A.A.; KUNST, L. Very-long-chain fatty acid biosynthesis is controlled through the expression and specificity of the condensing enzyme. *The Plant Journal*, v. 1, n. 12, p. 121-131, 1997.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2004. Disponível em (<http://www.mme.gov.br/site/news/detail.do;jsessionid=DB0DB3E849E8111342FBFDE36BEC A5F9?newsId=542¤tArea=>). Acesso em 13/02/2012.

MOERI, E. Brasil - País dos Sheiks do Óleo Verde – É Pioneiro na Produção de Biodiesel em Larga Escala: Tecnologia de Proporções Continentais. *Swisscam, Brasil*, n. 42, p.08-12, 01 ago. 2005. Disponível em: <www.swisscam.com.br>. Acesso em: 13 jun. 2012.

MOKHELE, B.; ZHAN, X.; YANG, G.; ZHANG, X. Review: Nitrogen assimilation in crop plants and its affecting factors. *J. Plant Sci*, v. 92, p. 399-405, 2012.

MURUGESAN, A. UMARANI, C. SUBRAMANIAN, R. NEDUNCHEZHIAN, N. Bio-diesel as an alternative fuel for diesel engines - A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 13, p. 653-662, 2009.

NATH, U.K.; GOSWAMI, G.; CLEMENS, R.; BECKER, H.C.; MÖLLERS, C. Inheritance and variation of erucic acid content in a transgenic rapeseed (*Brassica napus* L.) doubled haploid population. *Mol Breeding*, v. 23, p. 125–138, 2009.

OAKS, A. HIREL, B. Nitrogen metabolism in roots. *Annual Reviews of Plant Physiology*. v. 36. p. 345±365, 1985.

OSAKI, M.; BATALHA, M.O. Produção de biodiesel e óleo vegetal no Brasil: Realidade e desafio. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, v. 13, n. 2, p. 227–242, 2011.

PANWAR, N. L.; KAUSHIK, S. C.; KOTHARI, S. Role of renewable energy sources in environmental protection: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 15, p. 1513–1524, 2011.

PINZI, S. GARCIA, I.L. LOPEZ-GIMENEZ, F.J. LUQUE DE CASTRO, M.D. DORADO, G. DORADO, M.P. The Ideal Vegetable Oil-based Biodiesel Composition: A Review of Social, Economical and Technical Implications. *Energy & Fuels*, v.23, p. 2325–2341, 2009.

PITOL, C. Cultura do crambe. *Tecnologia e produção: Milho safrinha e culturas de inverno 2008*. Fundação MS, 2008.

PORTAL DO BIODIESEL, 2004. Disponível em (<http://www.biodiesel.gov.br/>). Acesso em 13/02/2012.

POUSA, G.P.A.G.; SANTOS, A.L.F.; SUAREZ, P.A.Z. History and Policy of Biodiesel in Brazil. *Energy Policy*, v. 35, p. 5393-5398, 2007.

PRADO, J. M.; DALMOLIN, I.; CARARETO, N. D.; BASSO, R. C.; MEIRELLES, A. J. A.; OLIVEIRA, J. V.; BATISTA, E. A. C.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of grape seed: Process scale-up, extract chemical composition and economic evaluation. *Journal of Food Engineering*, v. 109, p. 249–257, 2012.

RAJAEI, A.; BARZEGAR, M.; YAMINI, Y. Supercritical fluid extraction of tea seed oil and its comparison with solvent extraction. *Eur Food Res Technol*, v. 220, p. 401–405, 2005.

RAMOS, L. P.; SILVA, F. R.; MANGRICH, A. S.; CORDEIRO, C. S. Tecnologias de Produção de Biodiesel. *Rev. Virtual Quim*, v. 3, n. 5, p. 385-405, 2011.

RAMOS, M.J. FERNÁNDEZ, C.M. CASAS, A. RODRÍGUEZ, L. PÉREZ, A. Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource Technology*, v.100, p. 261–268, 2009.

RATHKE, G.W. BEHRENS, T. DIEPENBROCK, W. Integrated nitrogen management strategies to improve seed yield, oil content and nitrogen efficiency of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 117, p. 80–108, 2006.

RATHMANN, R.; BENEDETTI, O.; PLA, J. A.; PADULA, A. D. SANTOS. Biodiesel: Uma Alternativa Estratégica na Matriz Energética Brasileira?. In: II Seminário de Gestão de Negócios, Curitiba, 2005. Biodiesel: Uma Alternativa Estratégica na Matriz Energética Brasileira?. Curitiba : UNIFAE, 2005. v. 1.

RAUN, W.R.; JOHNSON, G.V. Improving Nitrogen Use Efficiency for Cereal Production. *Agron.J*,v.91,p.357-363,1999.

RAY, T.K.; HOLLY, S.P.; KNAUFT, D.A.; ABBOTT, A.G.; POWELL, G.L. The primary defect in developing seed from the high oleate variety of peanut (*Arachis hypogaea* L.) is the absence of delta 12-desaturase activity. *Plant Science*, v. 91, p. 15-21, 1993.

REIJNDERS, L. Conditions for the sustainability of biomass based fuel use. *Energy Policy*, v. 34, issue 7, p. 863-876, 2006.

ROLLIER, M. Rapeseed and nitrogen. *Oleagineux*, v. 25, n. 2, p. 91-96, 1970.

ROSEGRANT, M.W. Biofuels and grain prices: Impacts and policy responses. *International Food Policy Research Institute*, Washington, 2008. Disponível em: <<http://www.ifpri.org/publication/biofuels-and-grain-prices>>. Acesso em: 18 jun. 2012.

SAHULKA, J.; LISÁ, L. The influence of exogenously supplied sucrose on glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase levels in excised *Pisum sativum* roots. *Biologia Plantarum*, v. 20, n. 6, p. 446-452, 1978.

SALLET, C.L.; ALVIM, A.M. Biocombustíveis: Uma análise da evolução do biodiesel no Brasil. *Economia & Tecnologia*, v. 25, p. 01-13, 2011.

SANTOS, L.A. Efeito da superexpressão dos fatores de transcrição ZmDof1 e OsDof25 sobre a eficiência de uso de nitrogênio em *Arabidopsis*. 2009. 81f. Tese (Doutorado em Agronomia, Ciência do Solo). Instituto de Agronomia, Departamento de Solos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009.

SCHUCHARDT, U.; SERCHELI, R.; VARGAS, R.M. Transesterification of Vegetable Oils: a Review. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 9, n. 1, p. 199-210, 1998.

SCHULTZ, D.J.; CRAIG, R.; COX-FOSTER, D.L.; MUMMA, R.O.; MEDFORD, J. I. RNA isolation from recalcitrant plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 12, n. 4, 1994.

SHEEHAN, V.; CAMOBRECO, J.; DUFFIELD, V.; GRABOSKI, M.; SHAPOURI, H. Life cycle inventory of biodiesel and petroleum diesel for use in an urban bus, final report for U.S. Dept. of Energy's Office of Fuel Development and the U.S. Dept. of Agriculture's Office of Energy. *National Renewable Energy Laboratory*, NREL/SR-580-24089, 1998b.

SHEIKH, B.A. Hydroponics: key to sustain agriculture in water stressed and urban environment. *Pakistan Journal of Agriculture, Agricultural Engineering and Veterinary Sciences*, v. 22, n. 2, p. 53-57, 2006.

SIELING, K. CHRISTEN, O. Effect of preceding crop combination and N fertilization on yield of six oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.). *Eur. J. Agron*, v. 7, p. 301-306, 1997.

SIMIONI, C.A. *Energia Alternativa Renovável e Planejamento Energético Sustentável*. Paraná, 2006. 285 p. Tese (Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento) - Programa de Pós-Graduação em Meio ambiente e Desenvolvimento - PPGMD - Universidade Federal do Paraná, 2006.

SOUZA, S. R.; STARK, E. M. L. M.; FERNANDES, M.S. *Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas*. Artware projetos culturais. 2002.

SOUZA, S.R.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: FERNANDES, M.S. *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 215-252, 2006.

SPRINGDALE GROUP. Crambe (*Abyssinian mustard*). Disponível em (www.ienica.net/crops/crambe.pdf). Acesso em 14/02/2012. 2005.

SRIVASTAVA, H.S. Regulation of nitrate reductase activity in higher plants. *Phytochemistry*, v. 19, p. 725-733, 1980.

STAVARACHE, C. VINATORU, M. MAEDA, Y. Aspects of ultrasonically assisted transesterification of various vegetable oils with methanol. *Ultrason. Sonochem.*, v.14, p. 380–386, 2007.

STEER, B. T.; SEILER, G. J. Changes in fatty acid composition of sunflower (*Helianthus annuus*) seeds in response to time of nitrogen application, supply rates and defoliation. *J. Sci. Food Agric.*, v. 51, p. 11–26, 2006.

STOUTJESDIJK, P.A.; HURLESTONE, C.; SINGH, S.P.; GREEN, A.G. High-oleic acid Australian *Brassica napus* and *B. juncea* varieties produced by co-suppression of endogenous Delta 12-desaturases. *Biochemical Society Transactions*, v. 28, 2000.

TAYLOR, A.J SMITH, C.J. WILSON, I.B. Effect of irrigation and nitrogen fertilizer on yield, oil content, nitrogen accumulation and water use of canola (*Brassica napus* L.). *Fertilizer Research*, v. 29, p. 249-260, 1991.

TAYLOR, D.C.; FALK, K.C.; PALMER, C.D.; HAMMERLINDL, J.; BABIC, V.; MIETKIEWSKA, E.; JADHAV, A.; MARILLIA, E.; FRANCIS, T.; HOFFMAN, T.; GIBLIN, E. M.; VESNA, K.; KELLER, W.A. *Brassica carinata* – a new molecular farming platform for delivering bio-industrial oil feedstocks: case studies of genetic modifications to improve very long-chain fatty acid and oil content in seeds. *Biofuels, bioproducts & biorefining*, v. 4, p. 538-561, 2010.

TEDESCO, M. J. Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com H₂O₂-H₂SO₄. UFRGS. 1982. 23p.

TESTERINK, C. MUNNIK, T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *Journal of Experimental Botany*, v. 62, n. 7, p. 2349–2361, 2011.

TIAN, B.; WEI, F.; SHU, H.; ZHANG, Q.; ZANG, X.; LIAN, Y. Decreasing erucic acid level by RNAi-mediated silencing of fatty acid elongase 1 (*BnFAEI.1*) in rapeseeds (*Brassica napus* L.). *African Journal of Biotechnology*, v. 10, n. 61, p. 13194-13201, 2011.

USDA. Synthetic diesel may play a significant role as renewable fuel in Germany. *Production Estimates and Crop Assessment Division Foreign Agricultural Service*, 2005.

VALERIO, C. R.; ANDRADE, M. J. B.; FERREIRA, D. F. REZENDE, P.M. Resposta do feijoeiro comum a doses de nitrogênio no plantio e em cobertura. *Ciênc. agrotec.*, Lavras. Edição Especial, p.1560-1568, 2003.

VAN GERPEN, J. Cetane Number Testing of Biodiesel. *Liquid Fuel and Industrial Products from Renewable Resources: Proceedings of the 3rd Liquid Fuel Conference*, p. 197–206, 1996.

VAN GERPEN, J. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, n. 86, p. 1097-1107, 2005.

VERMA, S. Review of sustainable energy resources. 2011. 120p Dissertation (Mechanical engineering). California State University, Sacramento, 2011.

WANG, Y.D. AL-SHEMMERI, T. EAMES, P. MCMULLAN, J. HEWITT, N. HUANG, Y. REZVANI, S. An experimental investigation of the performance and gaseous exhaust emissions of a diesel engine using blends of a vegetable oil. *Applied Thermal Engineering*, v. 26, p. 1684–1691, 2006.

WARABI, Y. KUSDIANA, D. SAKA, S. Reactivity of triglycerides and fatty acids of rapeseed oil in supercritical alcohols. *Bioresour. Technol*, v. 91, p. 283–287, 2004.

WESELAKE, R.J.; TAYLOR, D.C.; RAHMAN, M.H.; SHAH, S.; LAROCHE, A.; McVETTY, P.B.E. e HARWOOD, J.L. Increasing the flow of carbon into seed oil. *Biotechnology Advances*, v.27, p.866–878, 2009.

WINFREY, M.R.; ROTT, M.A. e WORTMAN, A.T. *Unraveling DNA: Molecular biology for the laboratory*. Prentice-Hall, 369p, 1997.

World Wide Fund for Nature (WWF). Sustainability Standards for Bioenergy. Germany, 2006.

YANIV, Z. SHABELSKY, E. SCHAFFERMAN, D. GRANOT, I. KIPNIS, T. Oil and fatty acid changes in Sinapis and Crambe seeds during germination and early development. *Industrial Crops and Products*, v.9, p. 1-8, 1998.

YEMM, E. W. e COCKING, E. C. The determination of amino-acids with ninhydrin. *Analytical Biochemistry*, v.80, p.209-213, 1955.

YEMM, E. W. e WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. *Biochemistry*, v.57, p.508-514, 1954.

XU, K.; YANG, Y.; LI, X. Ectopic expression of *Crambe abyssinica* lysophosphatidic acid acyltransferase in transgenic rapeseed increases its oil content. *African Journal of Biotechnology* v. 9, n. 25, p. 3904-3910, 2010.

ZEBARJADI, A.; JAVARAN, M.J.; KARIMZADEH, G.; MOEINI, A.; MOUSAVI, A.; SALMANIAN, A.H. Transformation of rapeseed (*Brassica napus L.*) plants with sense and antisense constructs of the fatty acid elongase gene. *Iranian Journal of Biotechnology*, v. 4, n. 2, 2006.

ZEBARTH, B.J.; BOWEN, P.A.; TOIVONEN, P.M.A. Influence of nitrogen fertilization on broccoli yield, nitrogen accumulation and apparent fertilizer-nitrogen recovery. *J. Plant Sci*, n. 521, p. 717-725, 1995.

ZOU, J.; KATAVIC, V.; GIBLIN, E.M.; BARTON, D.L.; MACKENZIE, S.L.; KELLER, W.A.; HU, X.; TAYLOR, D.C. Modification of seed oil content and acyl composition in the

brassicaceae by expression of a yeast sn-2 acyltransferase gene. *Plant Cell Rep*, v. 9, p. 909-923, 1997.

8 ANEXOS

Anexo A – Concentrações dos Padrões e Modo de Preparo

A.1 Atividade da nitrato redutase

Tabela 14: Concentrações finais das soluções padrão de nitrito de sódio e sua forma de preparo.

μM de NaNO_2	Volume de estoque (mL) de NaNO_2 (0,1 mM) a ser pipetado	Volume Final
50	25,0	
40	20,0	
25	12,5	Completar o
20	10,0	volume até 50 mL
10	5,0	com água destilada
5	2,5	
0	0,0	

A.2 Dosagem de N-amino livre

Tabela 15: Concentrações finais das soluções padrão de Leucina e sua forma de preparo.

Concentração final do padrão (mM de leucina)	Volume do estoque de 2mM de Leucina em HCl 0,1 N a ser pipetado	Volume Final
0,00	0 (somente tampão citrato)	
0,04	0,5	
0,08	1,0	
0,16	2,0	Completar o volume até 25 mL com Tampão Citrato
0,20	2,5	
0,24	3,0	
0,32	4,0	
0,40	5,0	

A.3 Dosagem de N-NH₄⁺

Tabela 16: Concentrações finais das soluções padrão de cloreto de amônio e sua forma de preparo.

Volume da solução estoque (NH ₄ Cl 5mM) a ser pipetado (mL)	Volume final	Concentração Final do Padrão (nmoles de NH ₄ ⁺ /0,5 mL)
0,0		0
0,1	Completar com	10
0,25	água deionizada	25
0,5	até o volume final	50
1,0	de 25 ml	100
2,0		200
3,0		300
4,0		400

A.4 Dosagem de N-NO₃⁻

Tabela 17: Concentrações finais das soluções padrão de nitrato de potássio e sua forma de preparo.

Volume de estoque de KNO ₃ (5g de N/1000 ml) a ser pipetado (ml)	Concentração do Padrão (µg N/0,1ml)	Volume Final
0,05	0,5	
0,1	1,0	
0,25	2,5	Completar em balão volumétrico até 50 ml com água destilada
0,5	5,0	
1,0	10,0	
1,5	15,0	
2,0	20,0	
2,5	25,0	

A.5 Dosagem de açúcares solúveis

Tabela 18: Concentrações finais das soluções padrão de Glicose e sua forma de preparo.

Volume de estoque (50 mg de glicose/50 ml de água dest.) a ser pipetado (ml)	Concentração do Padrão (μg de glicose/1ml)	Volume Final
0,0	0	Completar
0,5	20	em balão volumétrico
1,0	40	até 25 ml
1,25	50	com
2,0	80	Etanol 80%
2,5	100	

A.6 Digestão sulfúrica

Quadro 1: Descrição das temperaturas e seus respectivos períodos utilizados para a digestão sulfúrica.

Temperaturas (°C)	Período (min)
100	0
125	20
150	40
175	50
200	80
225	100
250	35
300	35
330	Até o desenvolvimento da cor verde mar
330	60

A.7 Dosagem de fósforo

Tabela 19: Concentrações finais das soluções padrão de fosfato de potássio e sua forma de preparo.

Concentração do Padrão (ppm de Fósforo)	Volume de Estoque (16 ppm de KH_2PO_4 , pipetado (ml)	Volume Final
0,0	0	
1,6	5	Completar até o volume final de 50 ml com água destilada
3,2	10	
4,8	15	
6,4	20	
8,0	25	
12,8	40	
16,0	50	

A.8 Dosagem de Potássio

Tabela 20: Concentrações finais das soluções padrão de cloreto de potássio e sua forma de preparo.

Concentração do Padrão (ppm de Potássio)	Volume de Estoque pipetado (ml)	Volume Final
0	0,0	
10	1,0	Completar até volume final de 100 ml com água destilada
20	2,0	
30	3,0	
40	4,0	
50	5,0	

Anexo B – Cromatogramas obtidos por CG-DIC

Padrão: Mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME MIX) – C14-C22

Tabela 21: Concentração de ésteres metílicos de ácidos graxos no padrão C14-C22 (Sigma-Aldrich®).

Ácido Graxo	% na solução padrão
Mirístico (14:0)	4
Palmítico (16:0)	10
Esteárico (18:0)	6
Oléico (18:1)	25
Linoléico (18:2)	34
Linolênico (18:3)	5
Araquidônico (20:4)	2
Behênico (22:0)	2

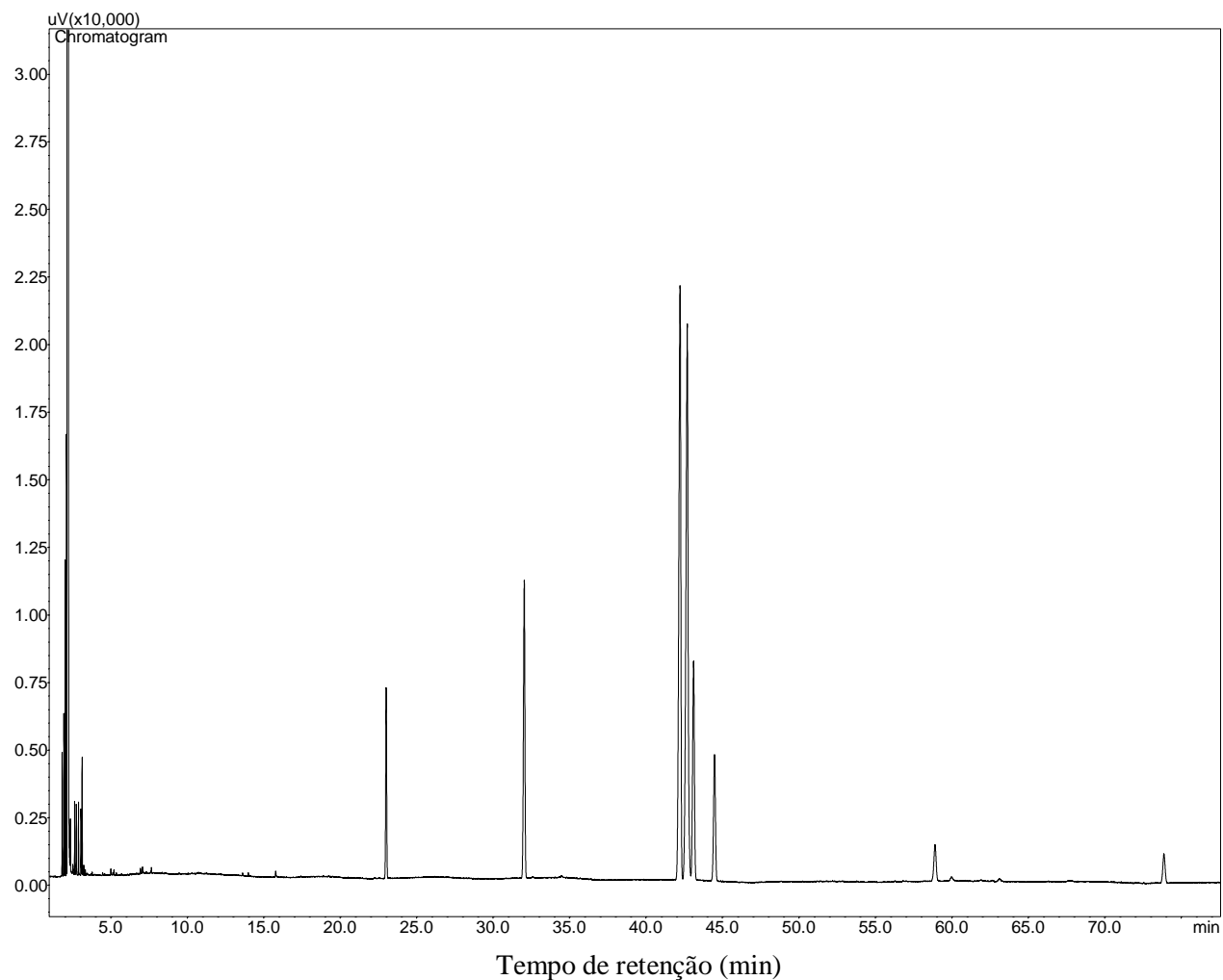


Figura 28. Cromatograma obtido por CG-DIC da mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME MIX) – C14-C22 (Sigma-Aldrich®).

Padrão: Éster metílico do ácido eicosanóico

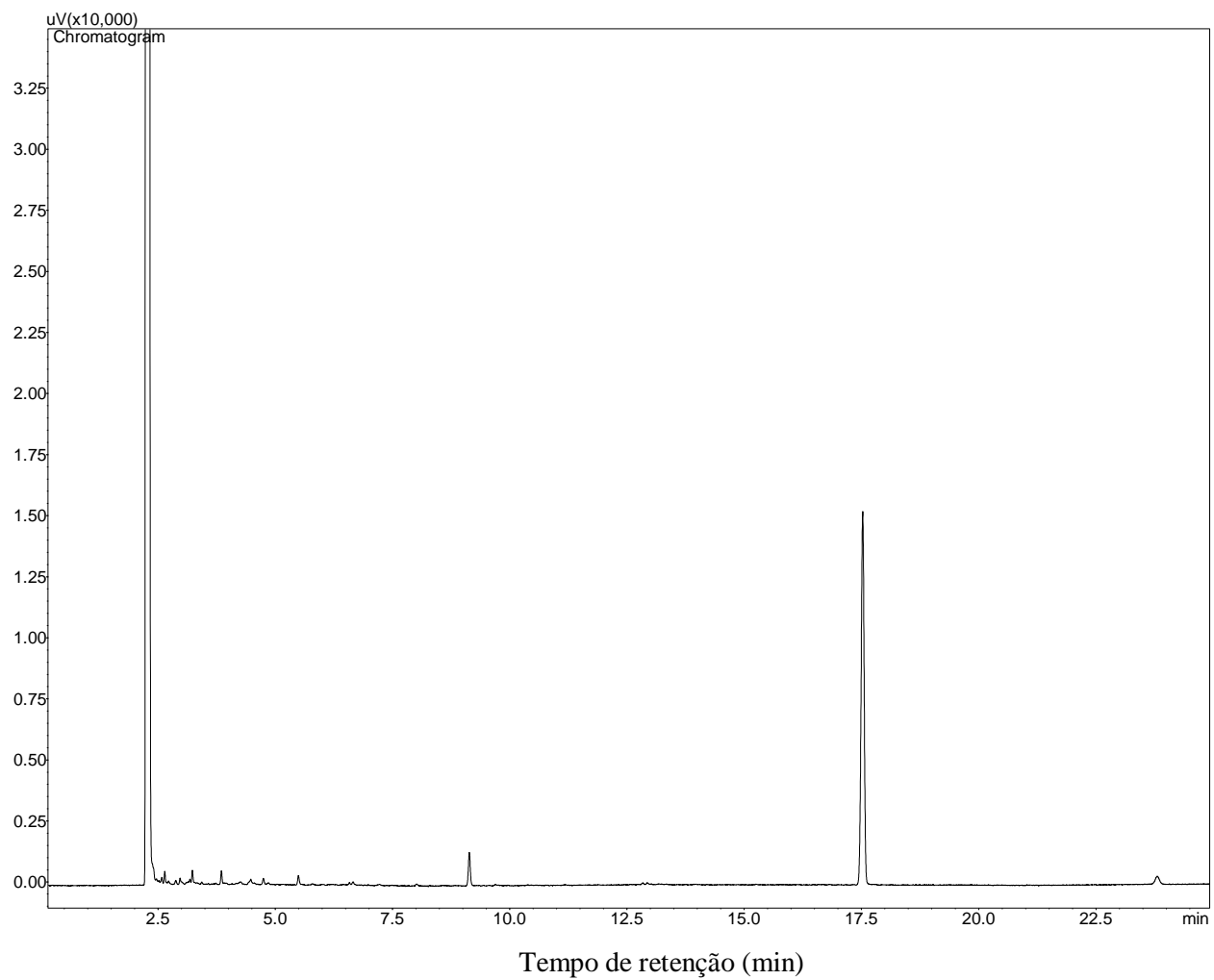


Figura 29. Cromatograma obtido por CG-DIC do padrão do éster metílico derivado do ácido eicosanóico (Sigma-Aldrich[®]).

Padrão: Éster metílico do ácido tetracosanóico

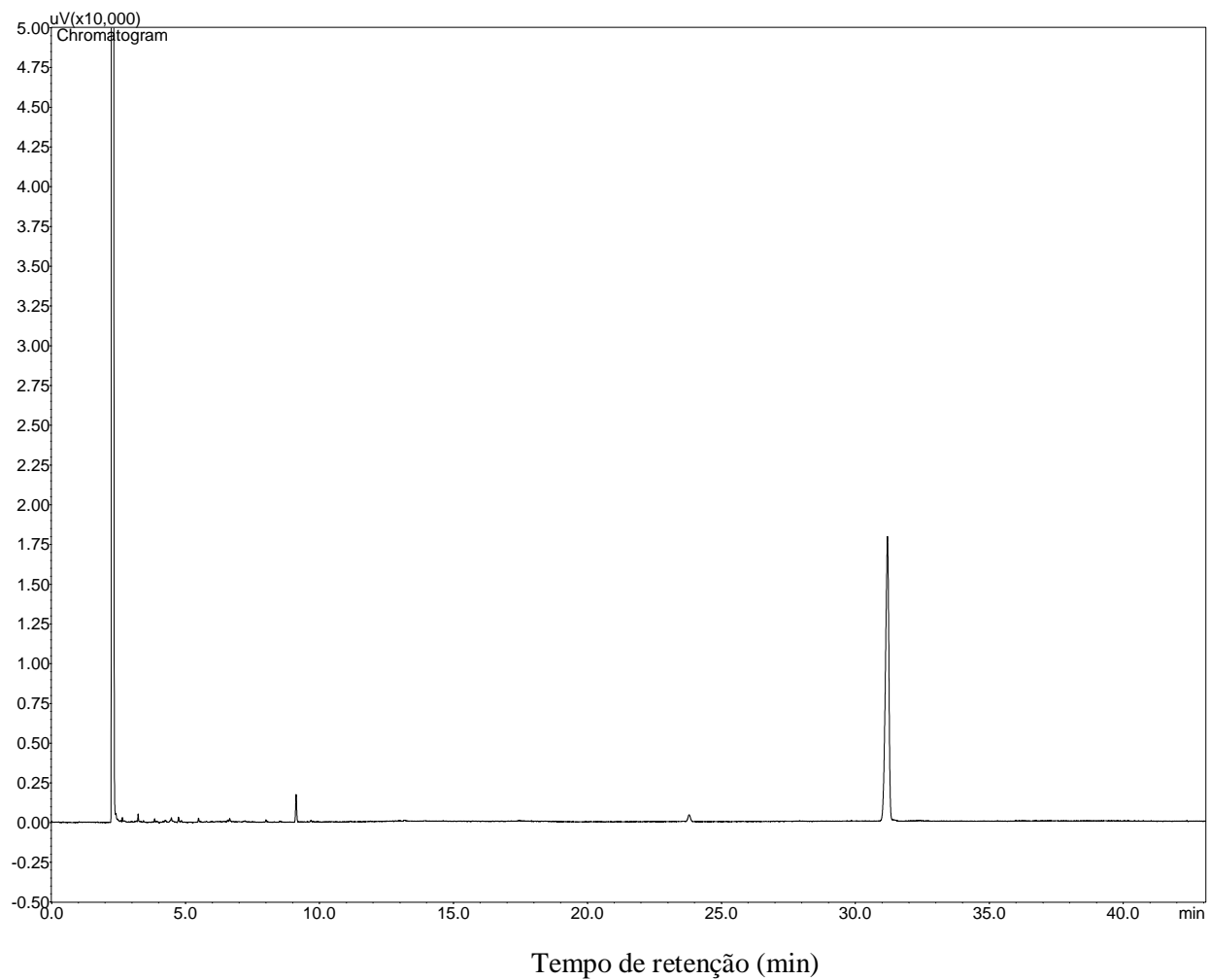


Figura 30. Cromatograma obtido por CG-DIC do padrão do éster metílico derivado do ácido tetracosanóico (Sigma-Aldrich®).

Padrão: Éster metílico do ácido linoléico

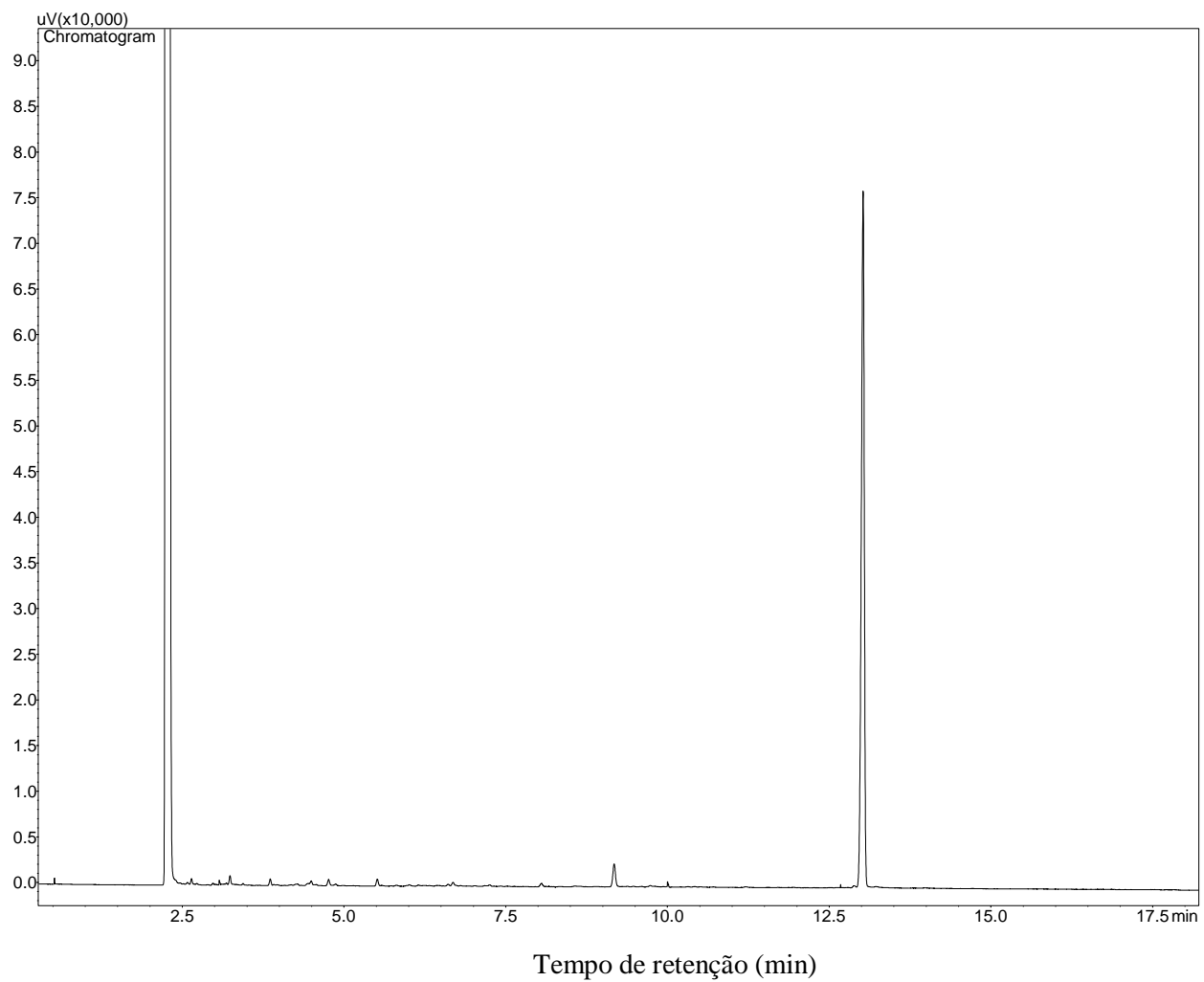


Figura 31. Cromatograma obtido por CG-DIC do padrão do éster metílico derivado do ácido linoléico (Sigma-Aldrich[®]).

Padrão: Éster metílico do ácido erúcido

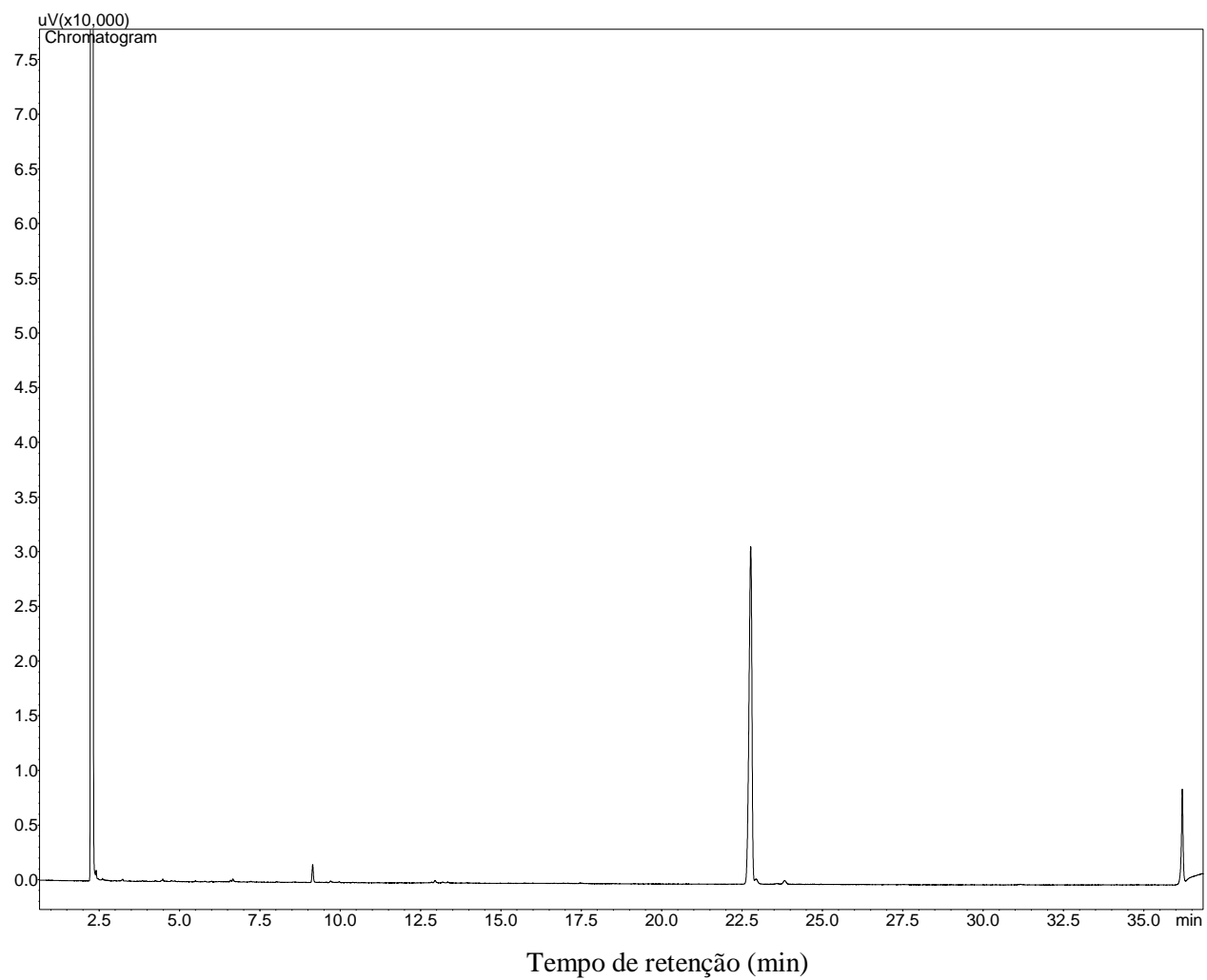


Figura 32. Cromatograma obtido por CG-DIC do padrão do éster metílico derivado do ácido erúcido (Sigma-Aldrich®).

Padrão: Éster metílico do ácido erúcido

Line#:1 R.Time:13.9(Scan#:1370)

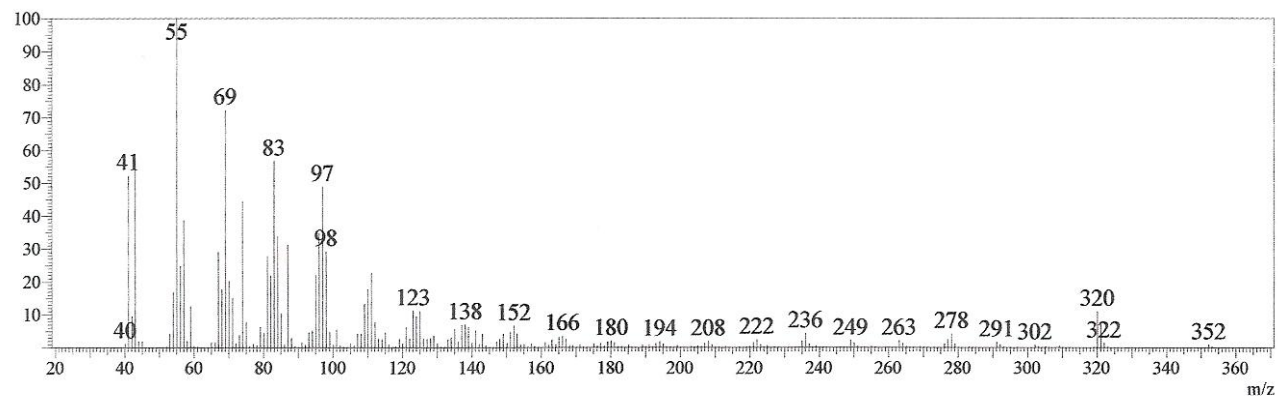


Figura 33. Espectro de massa obtido por CG-EM do padrão do éster metílico derivado do ácido erúcido (Sigma-Aldrich®).

Amostra: 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 1A)

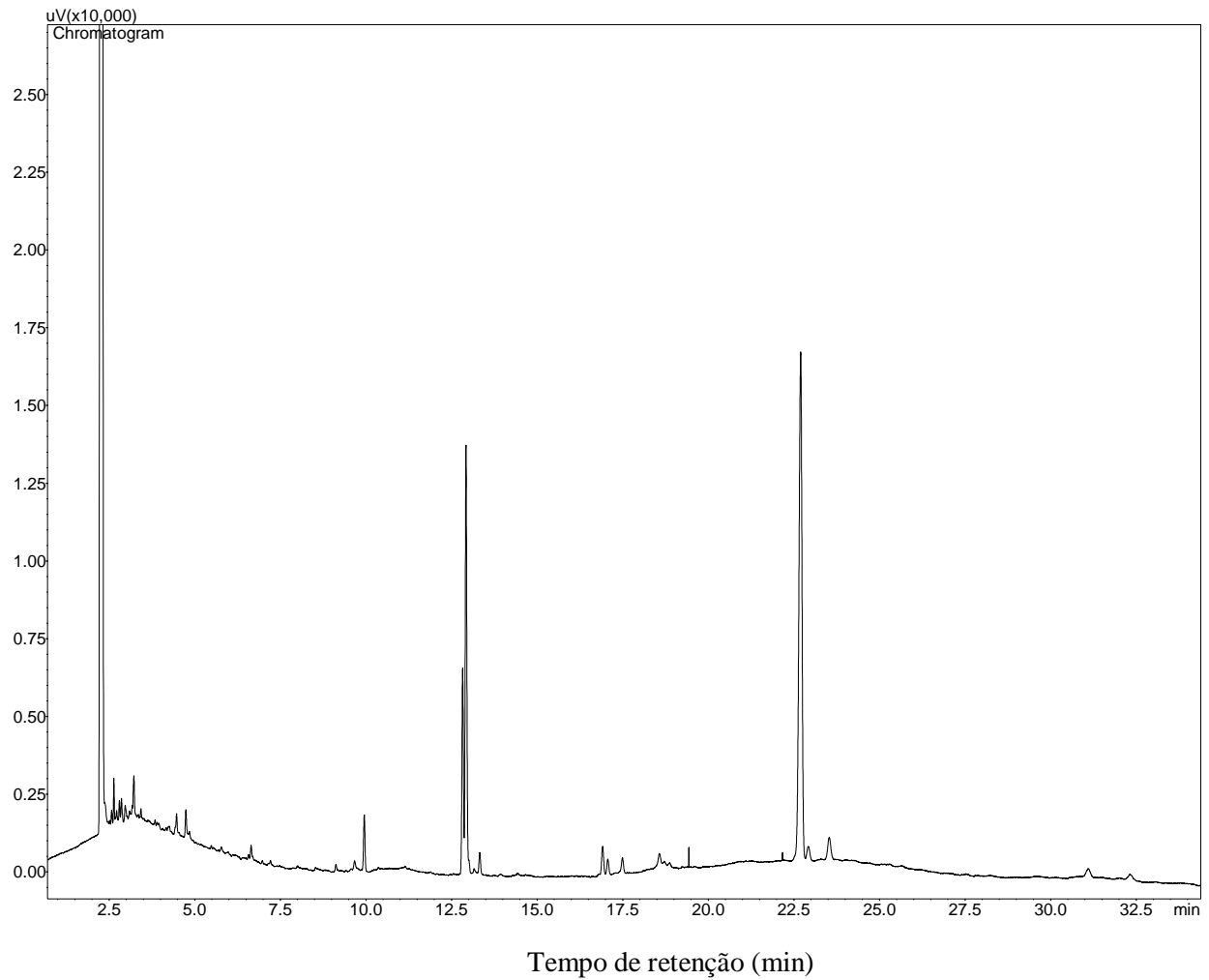


Figura 34. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 1A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 1B)

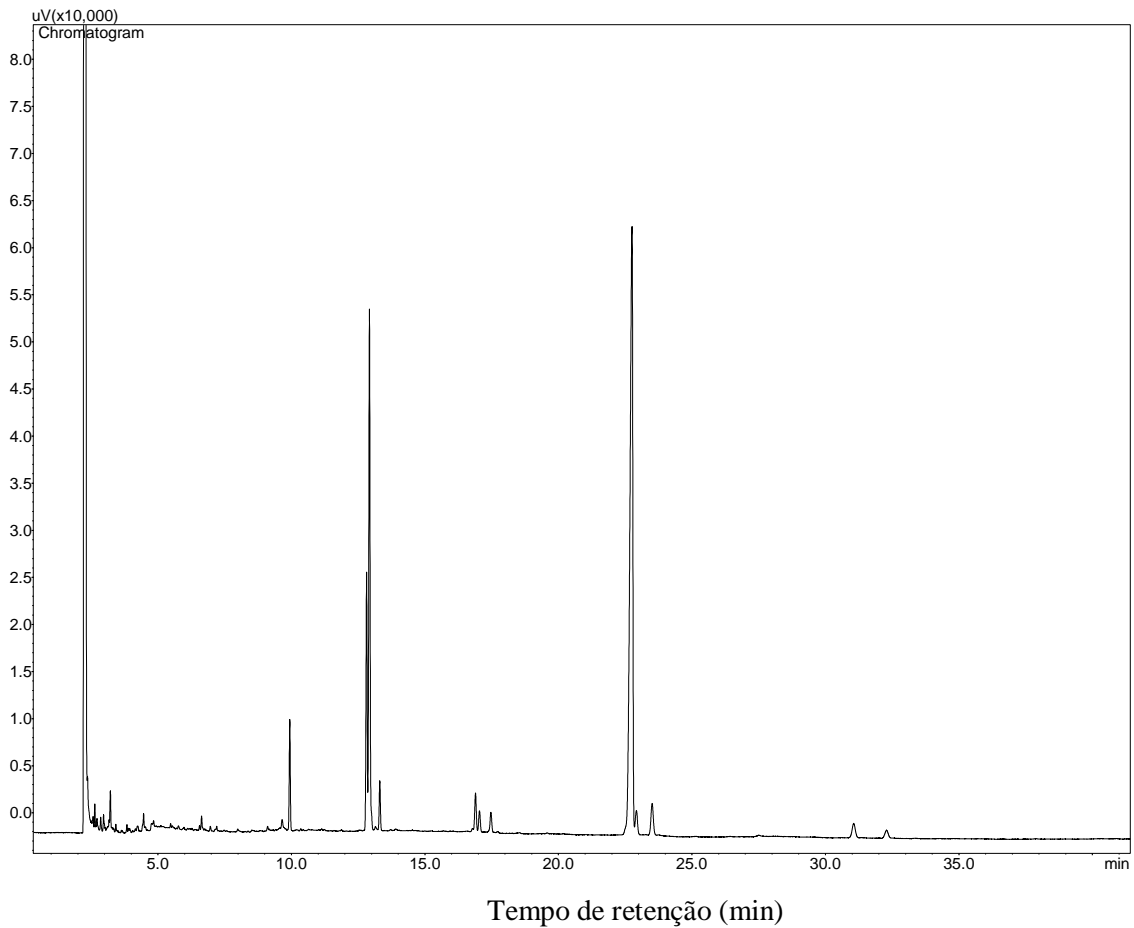


Figura 35. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 1B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 1)

Line#:7 R.Time:13.9(Scan#:1369)

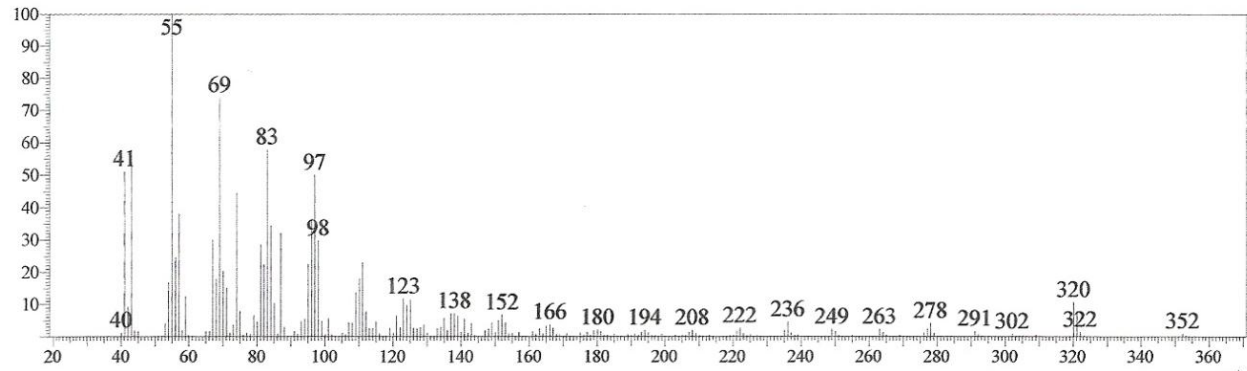


Figura 36. Espectro de massa do ácido erúxico obtido por CG-EM da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 1B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 2A)

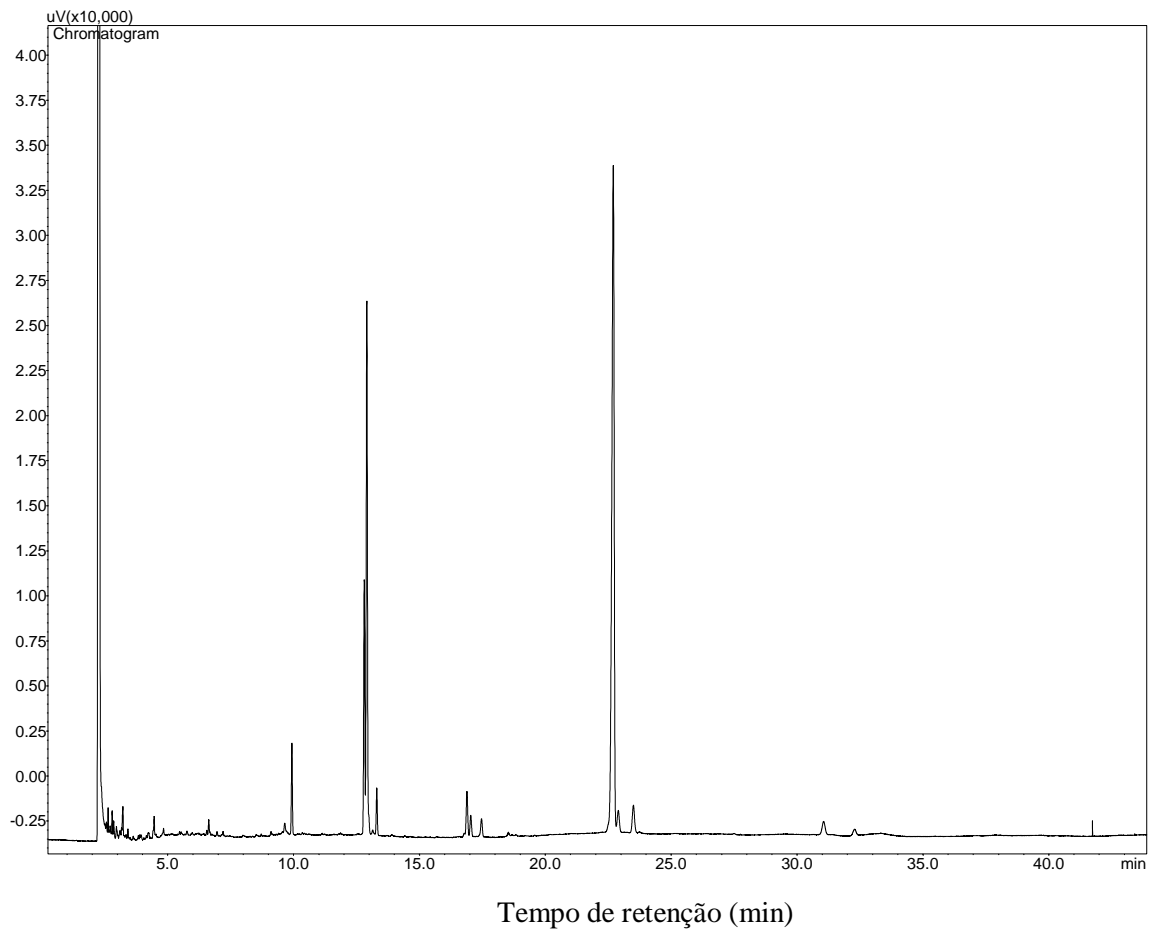


Figura 37. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 2A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 2B)

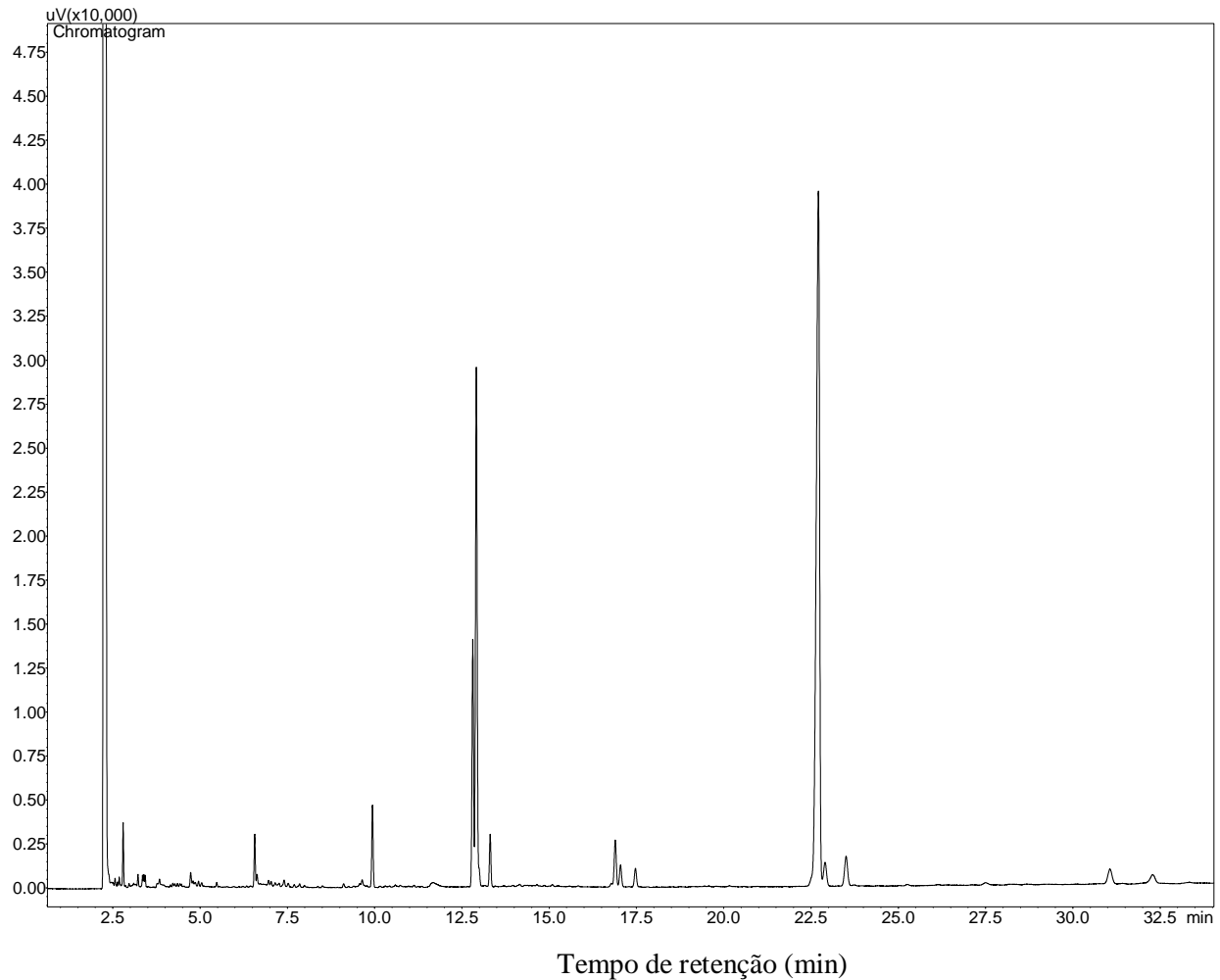


Figura 38. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 2B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 3A)

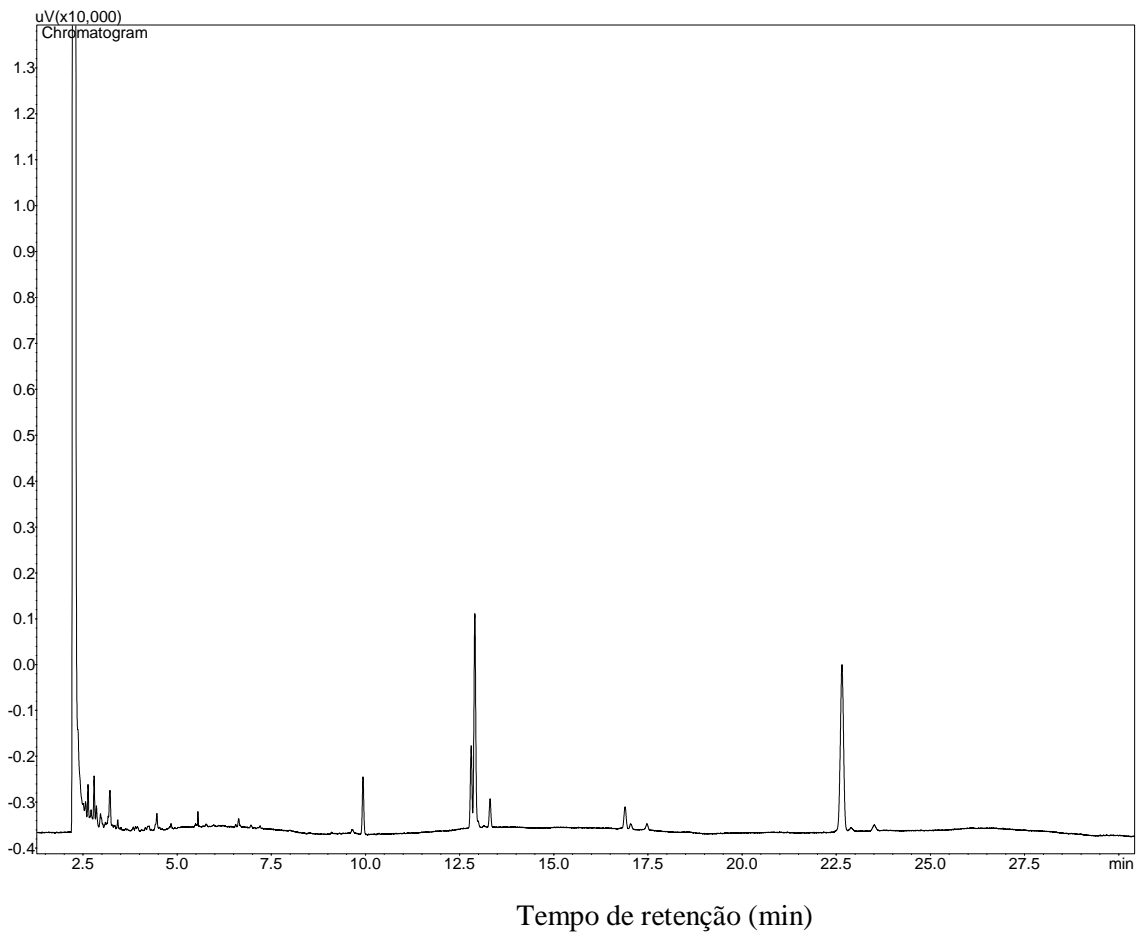


Figura 39. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 3A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 3B)

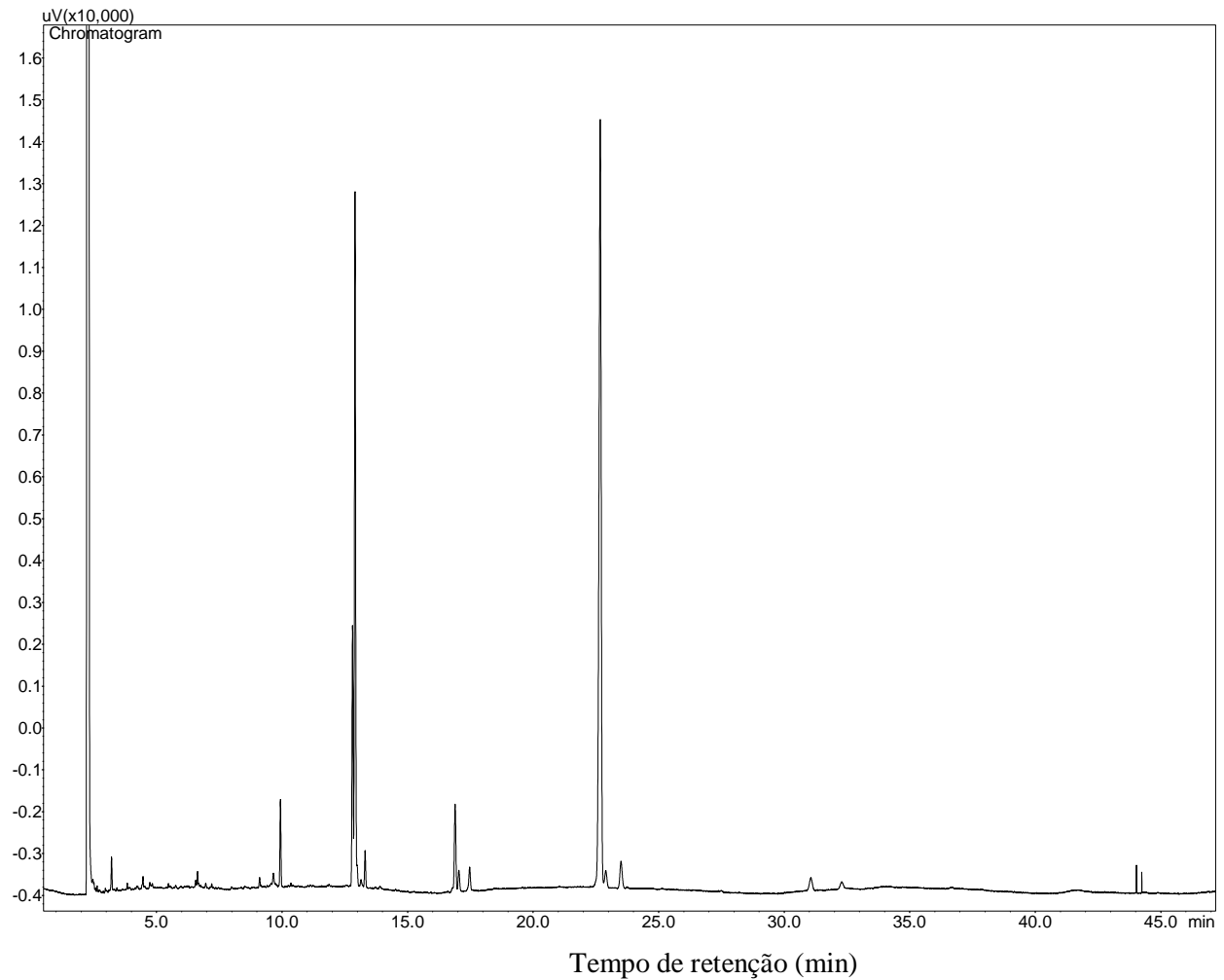


Figura 40. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 3B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 4A)

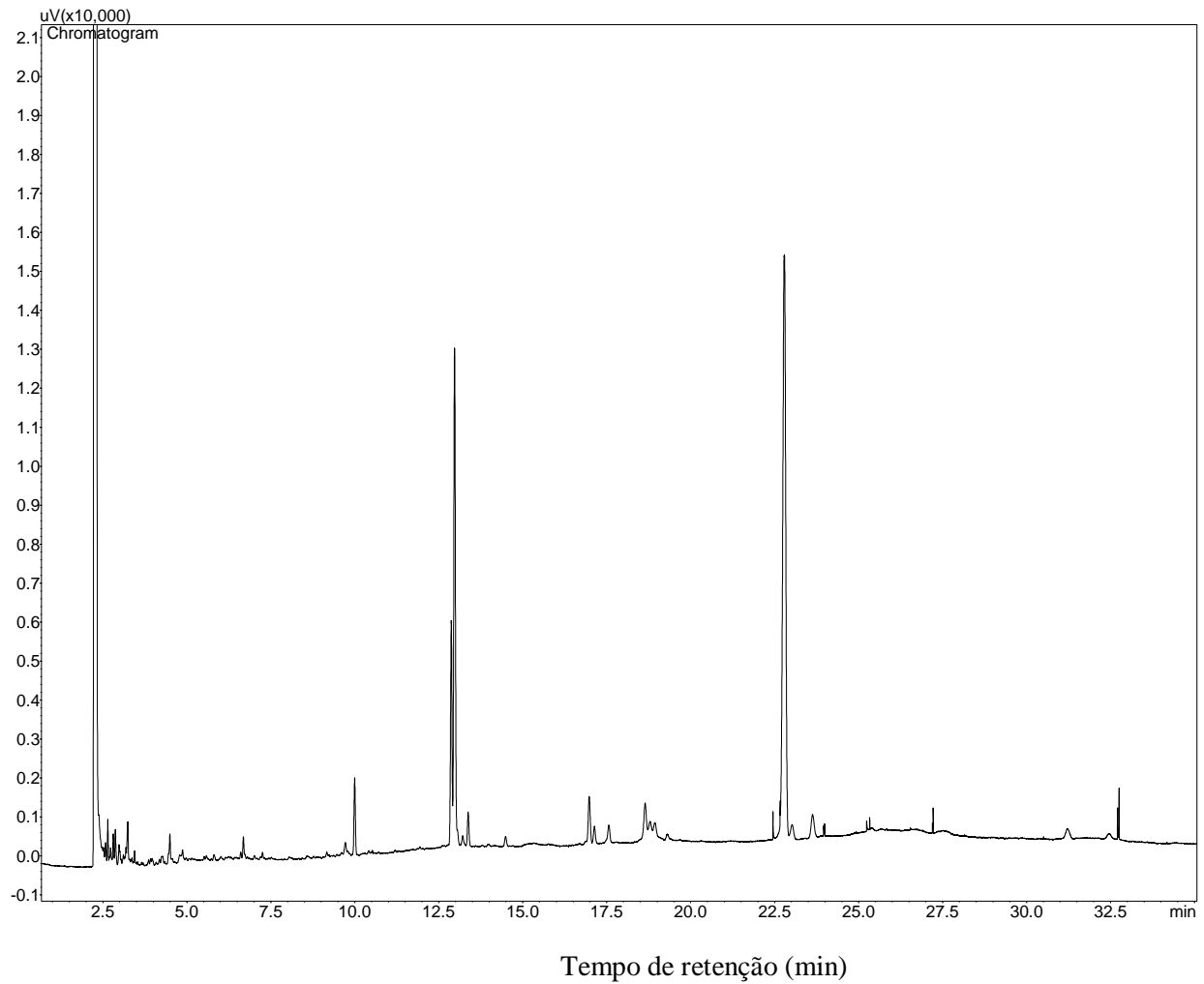


Figura 41. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 4A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 4B)

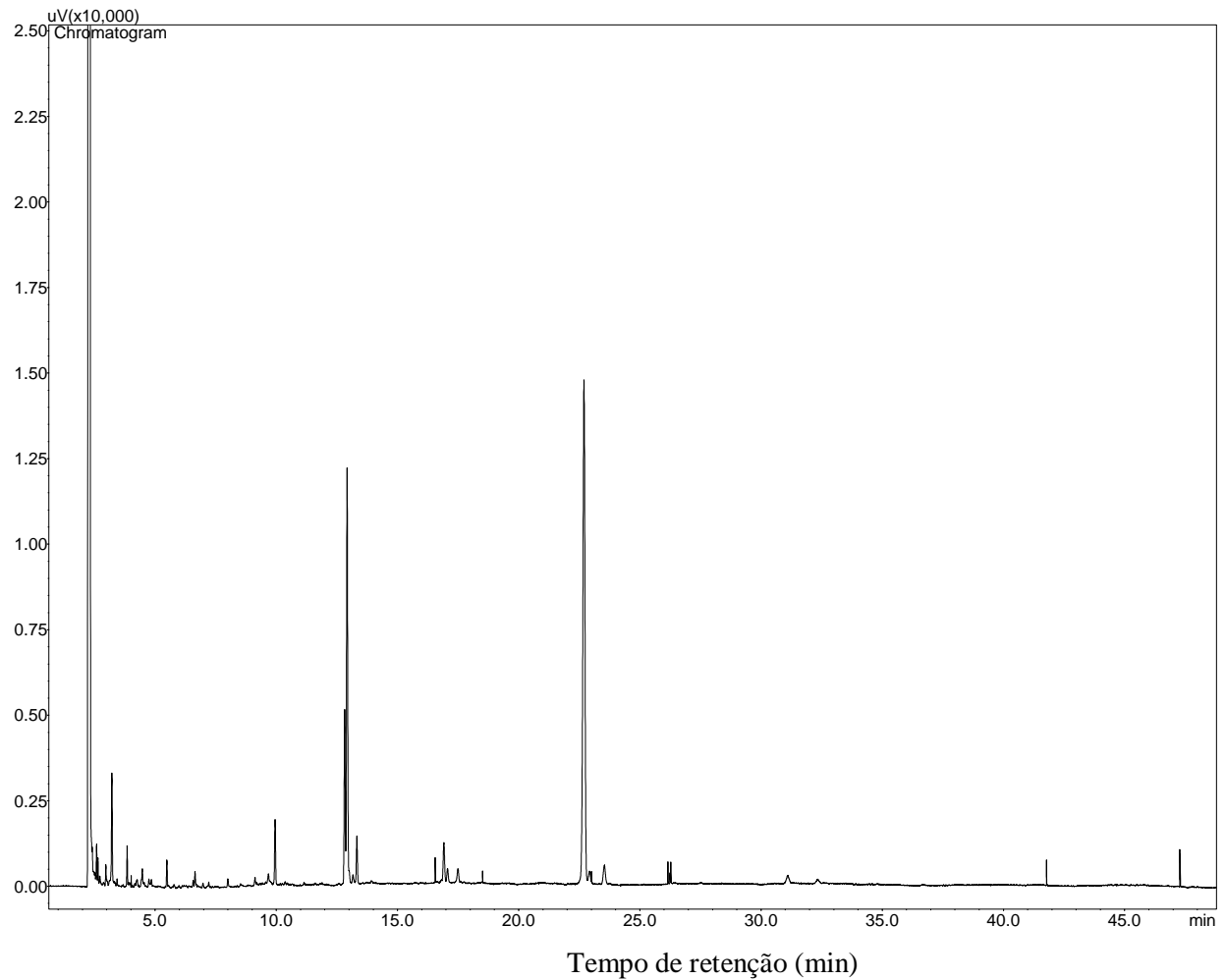


Figura 42. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 0,8 mM de N-nitrato (Repetição 4B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 1A)

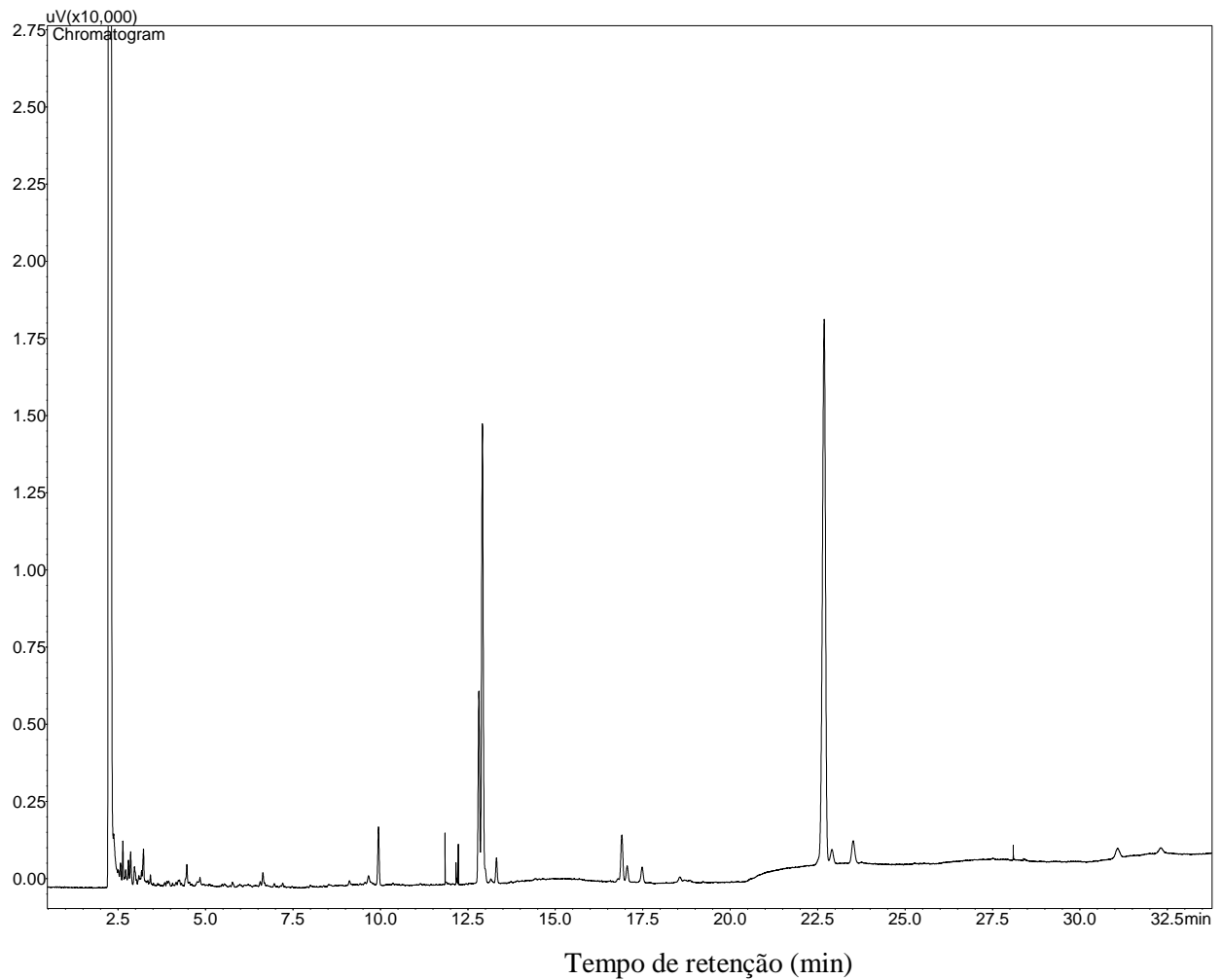


Figura 43. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 1A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 1B)

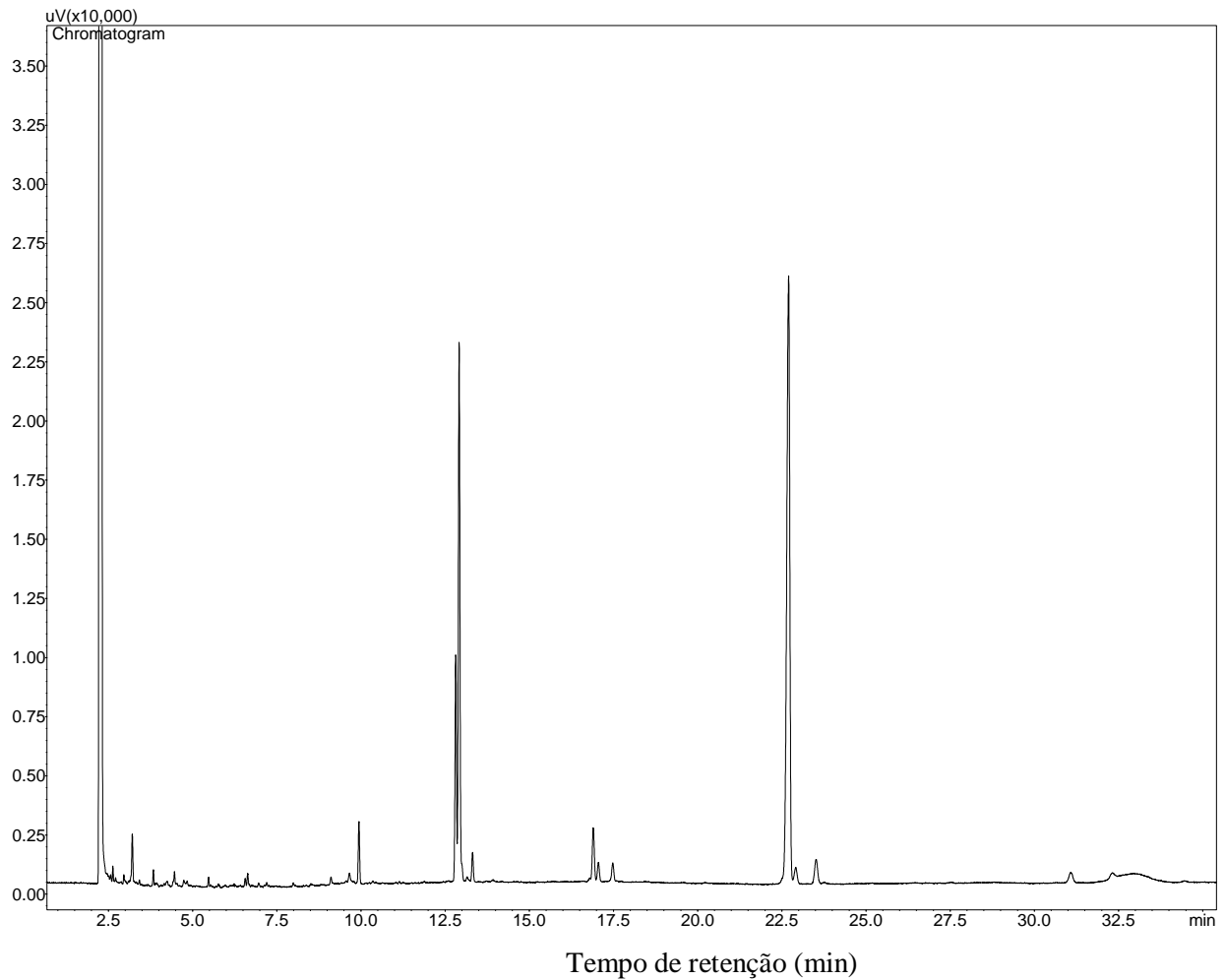


Figura 44. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 1B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 2A)

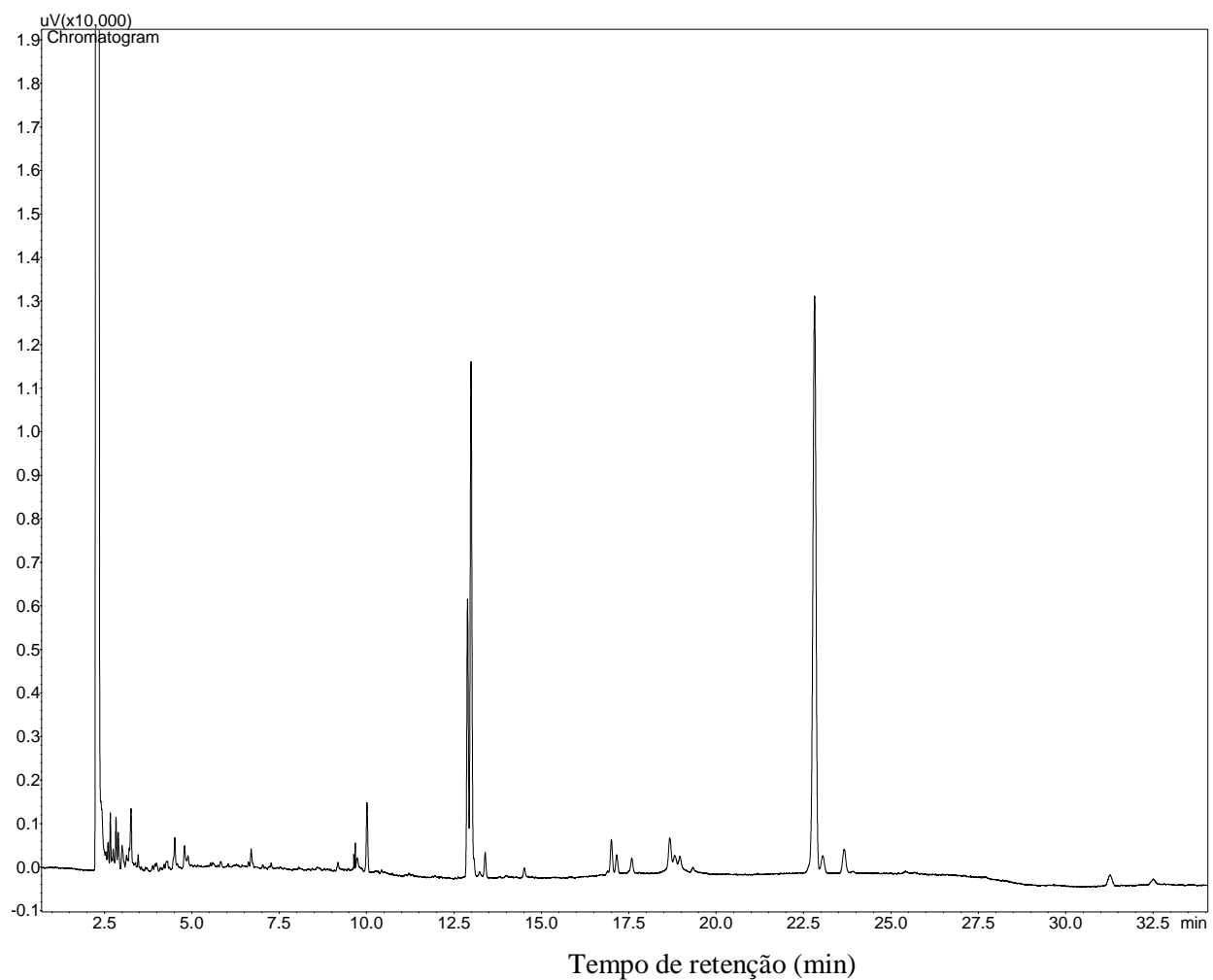


Figura 45. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 2A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 2B)

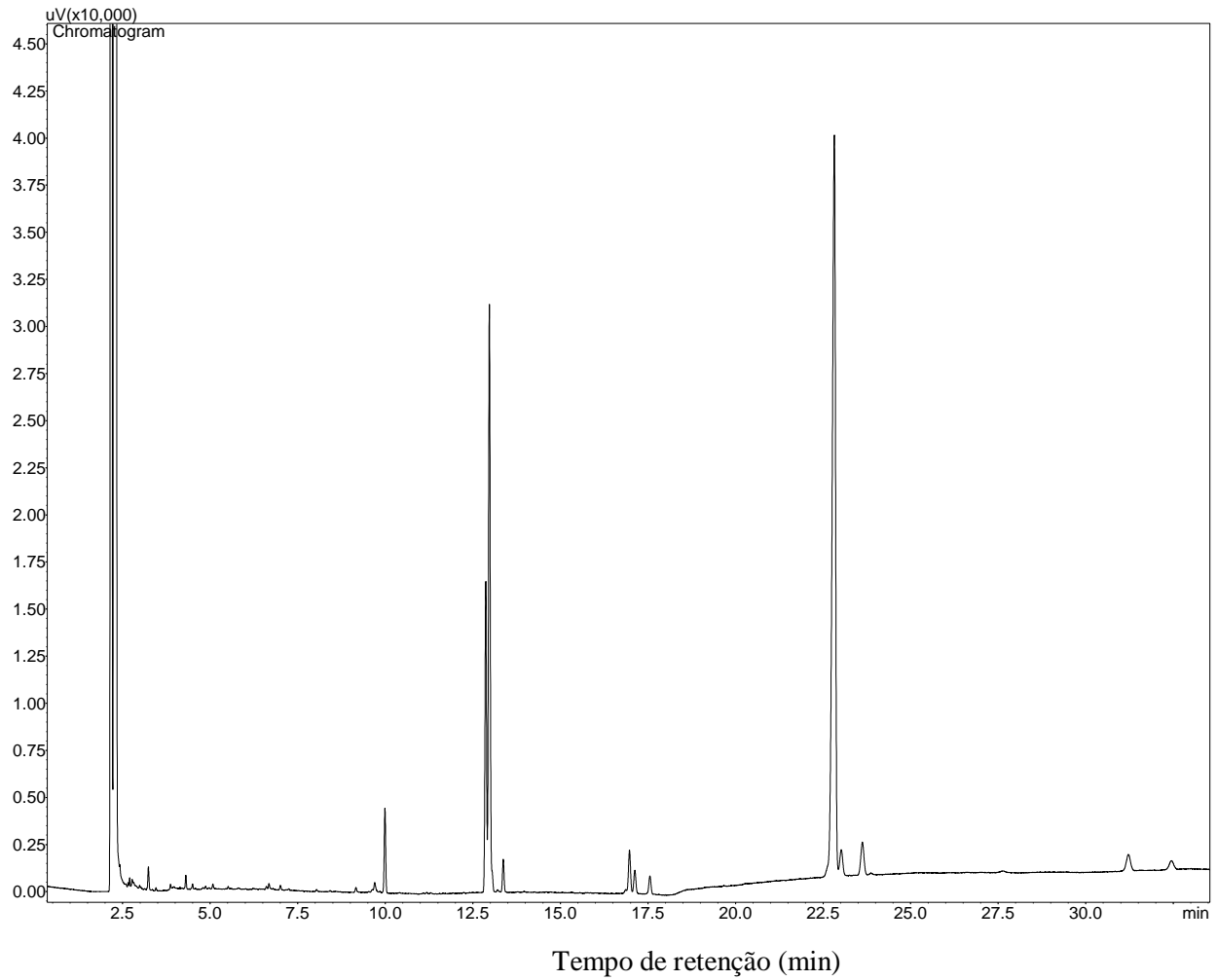


Figura 46. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 2B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 3A)

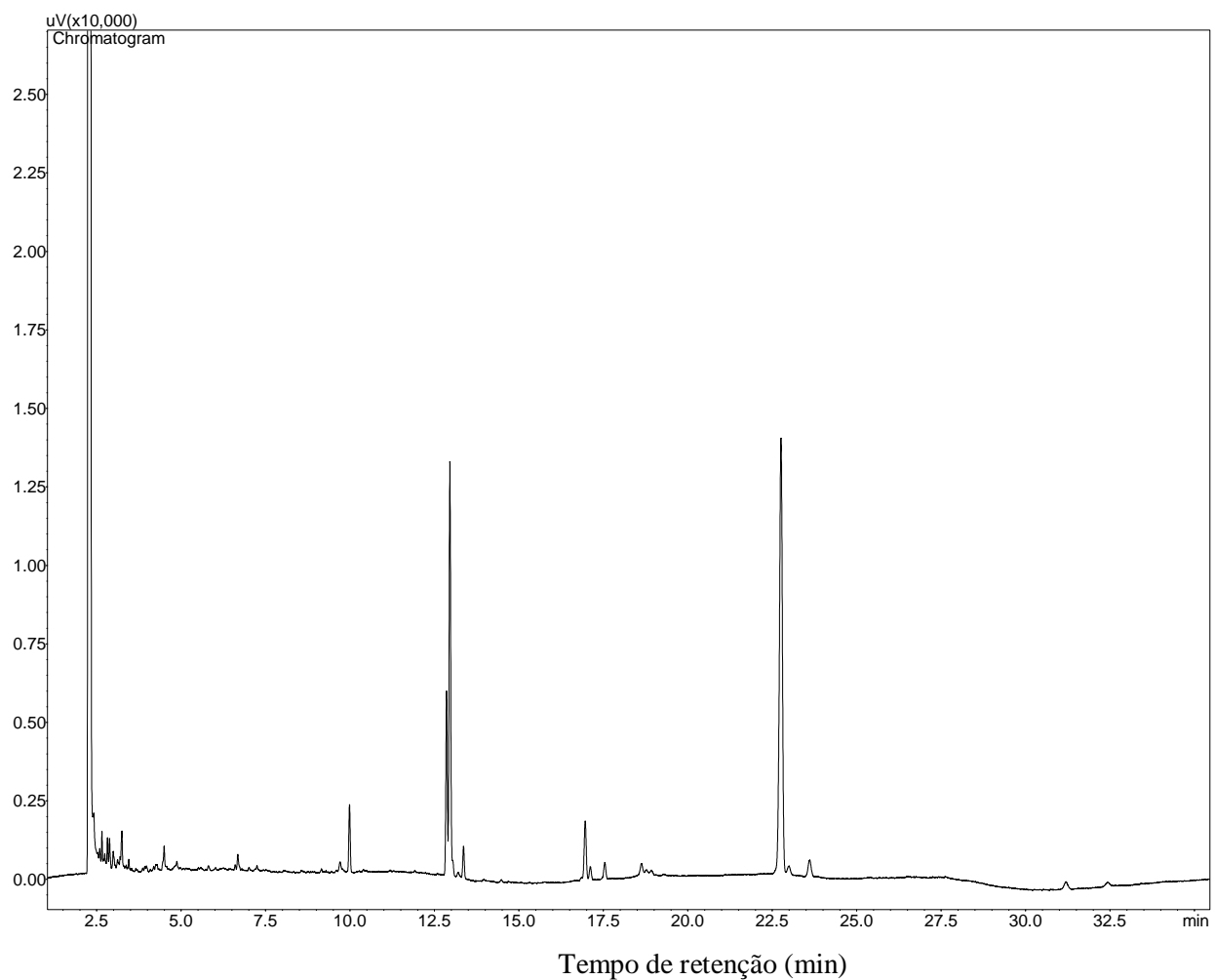


Figura 47. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 3A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 3B)

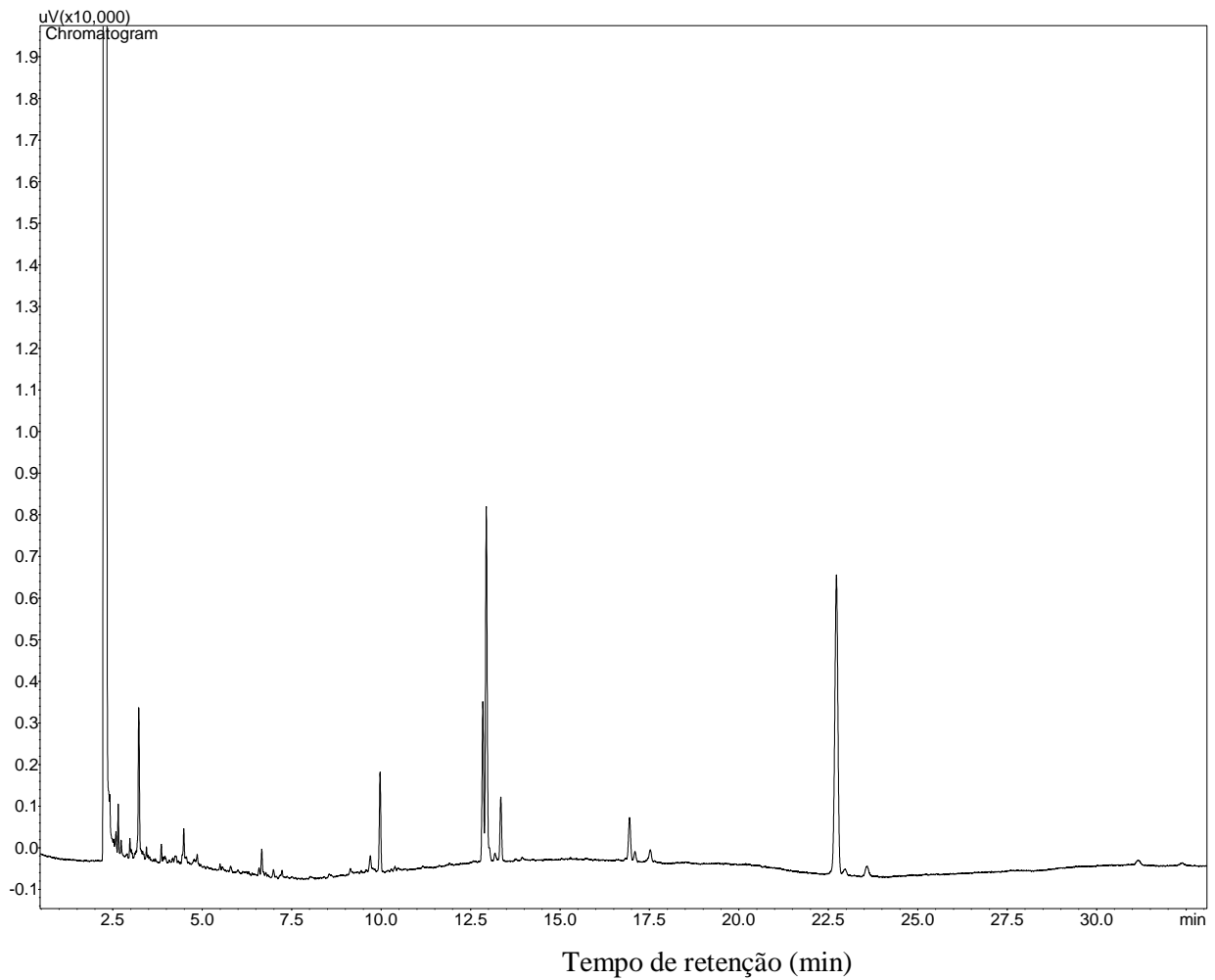


Figura 48. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 3B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 4A)

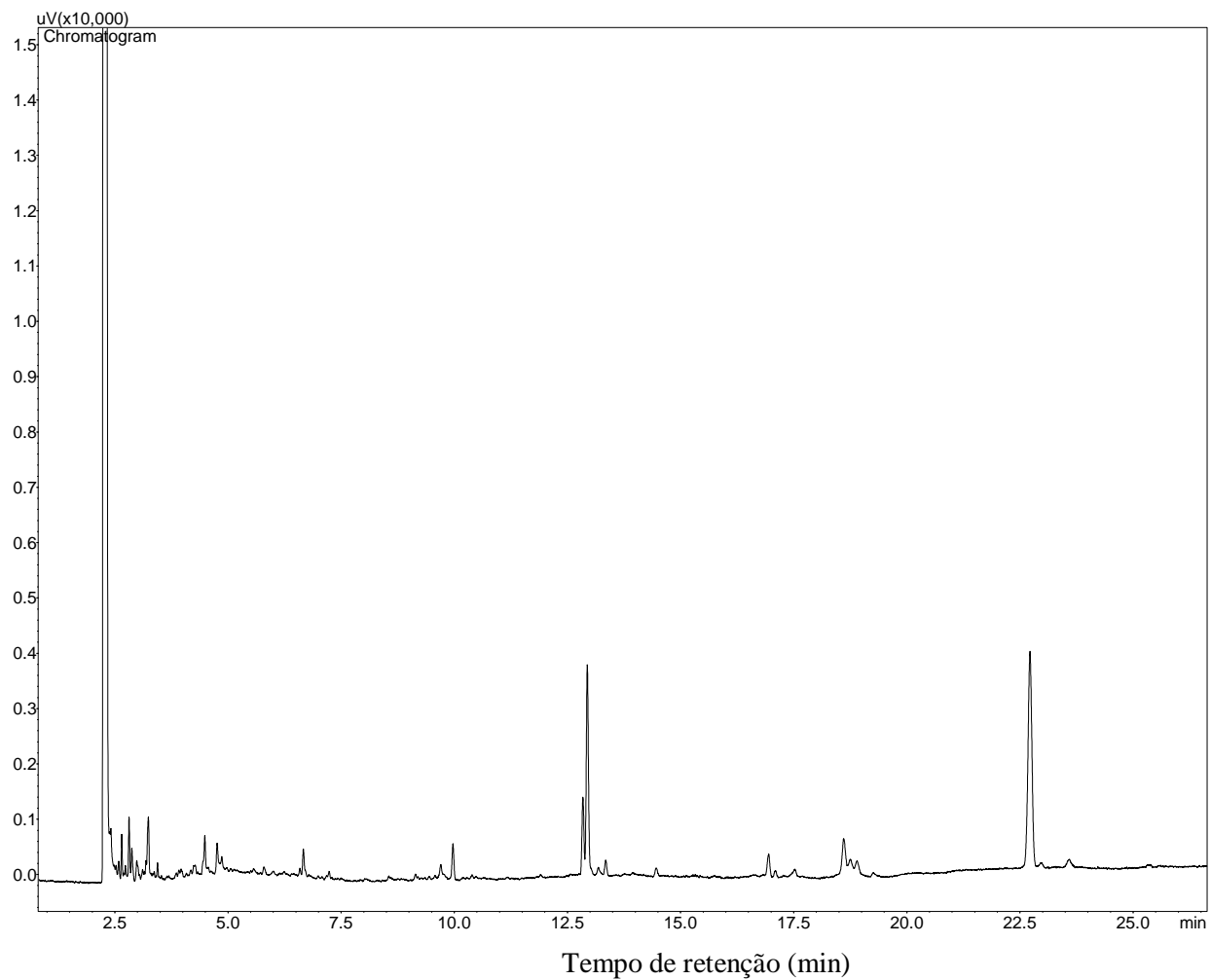


Figura 49. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 4A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 4B)

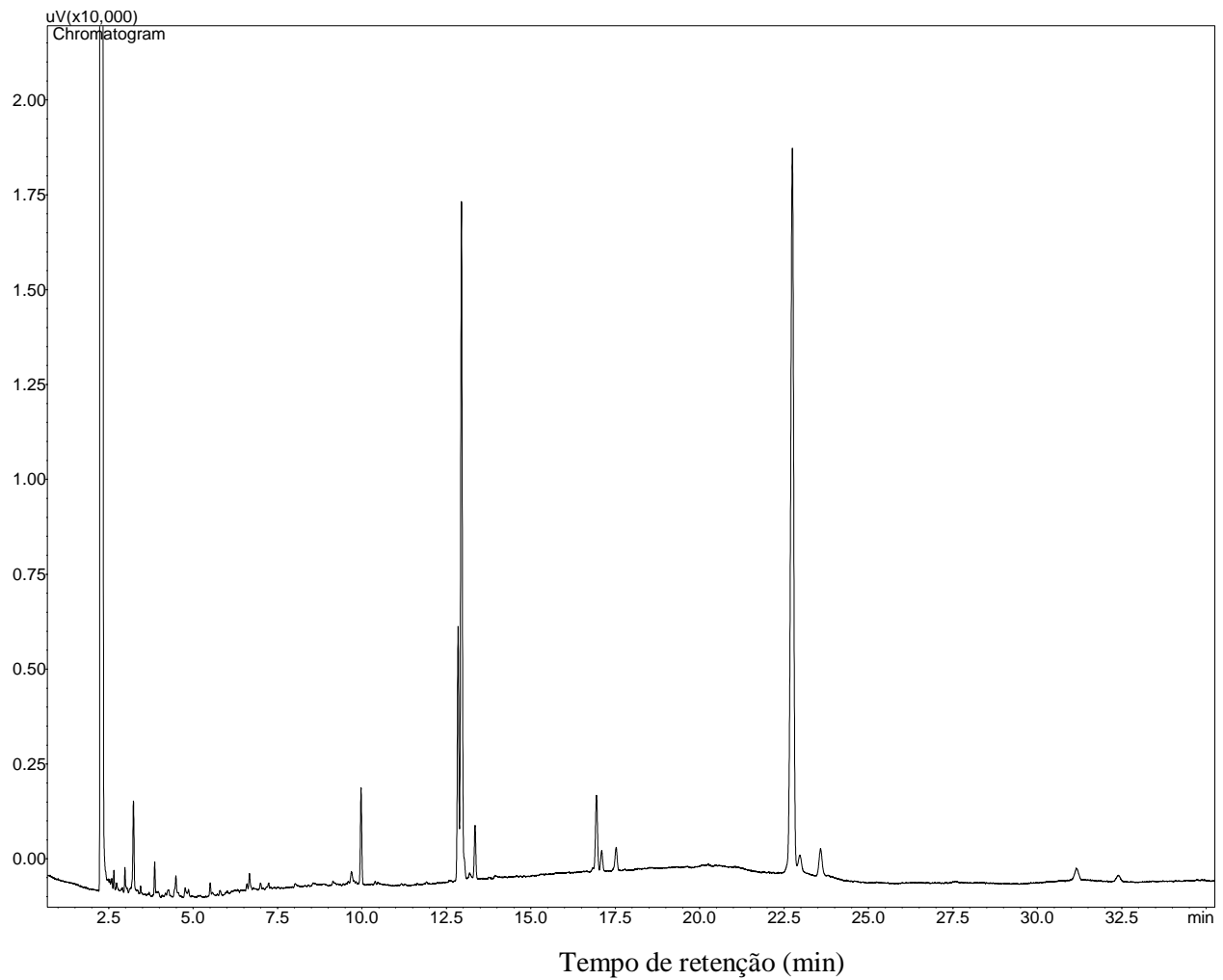


Figura 50. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 1,6 mM de N-nitrato (Repetição 4B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 1A)

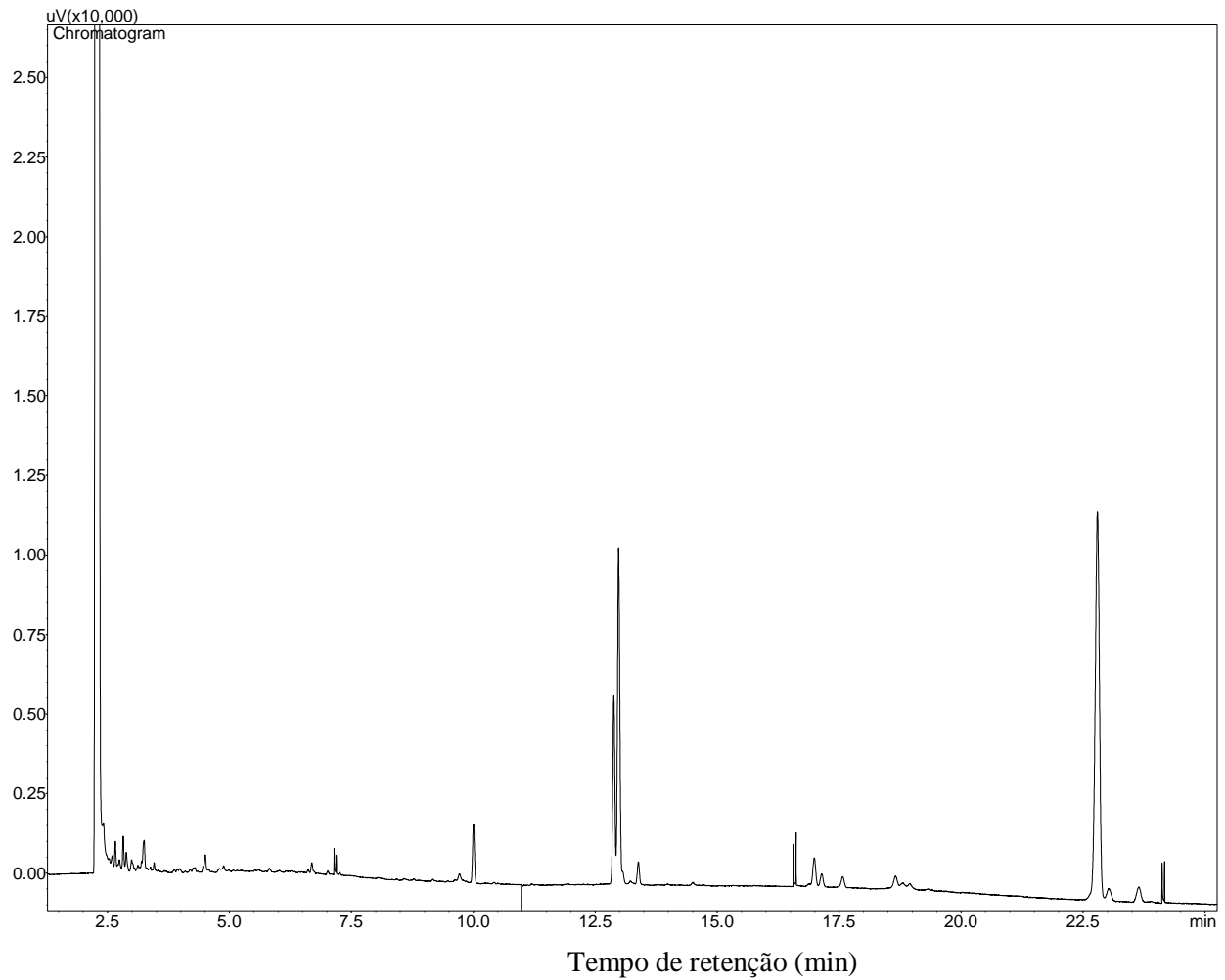


Figura 51. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 1A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 1B)

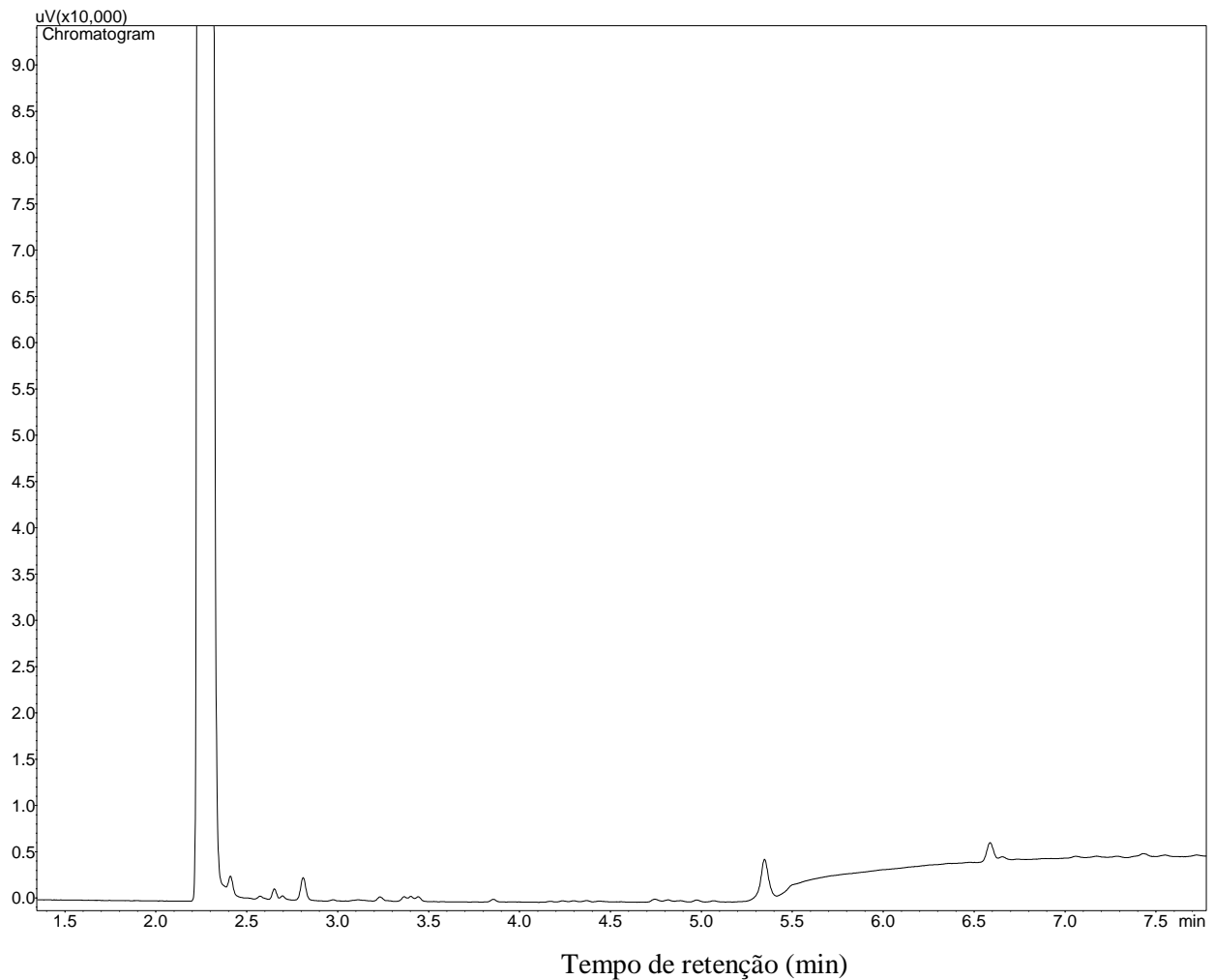


Figura 52. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 1B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 2A)

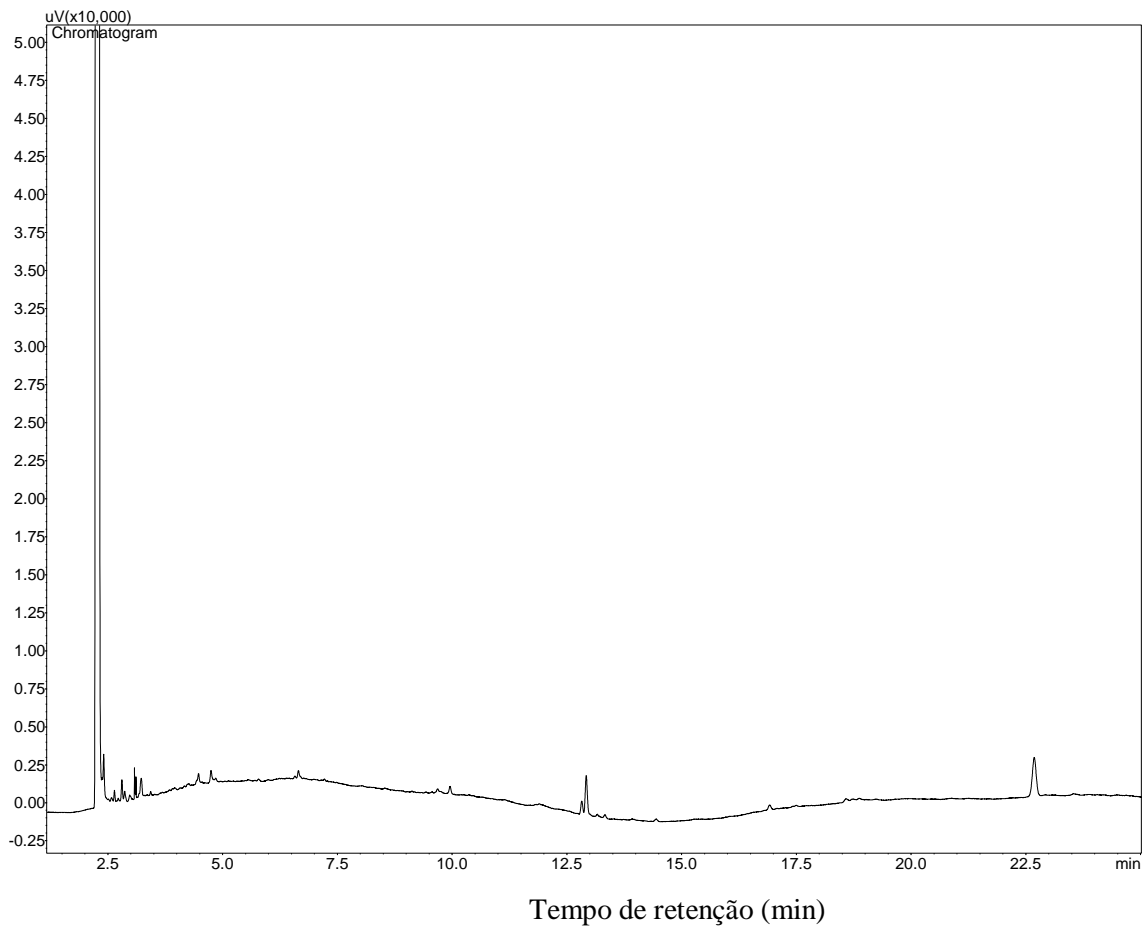


Figura 53. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 2A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 2B)

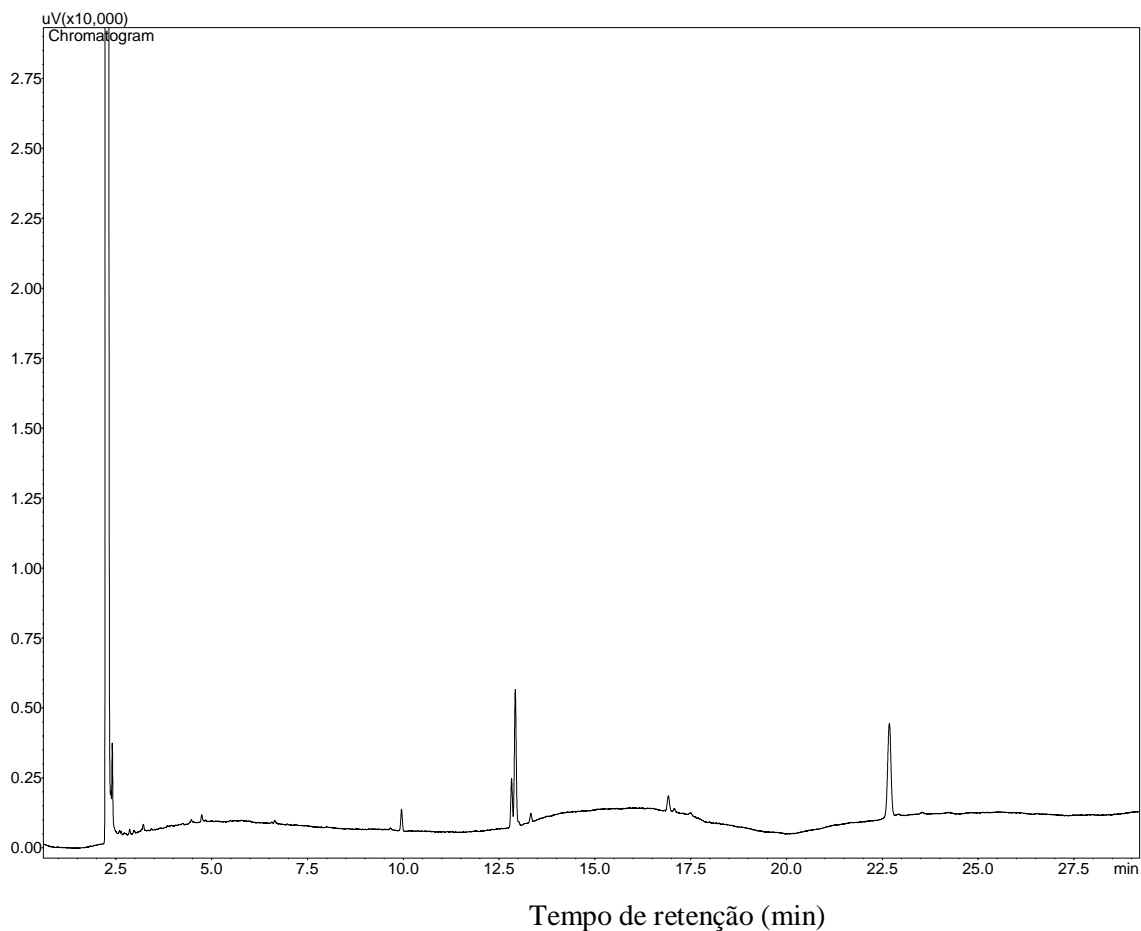


Figura 54. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 2B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 3A)

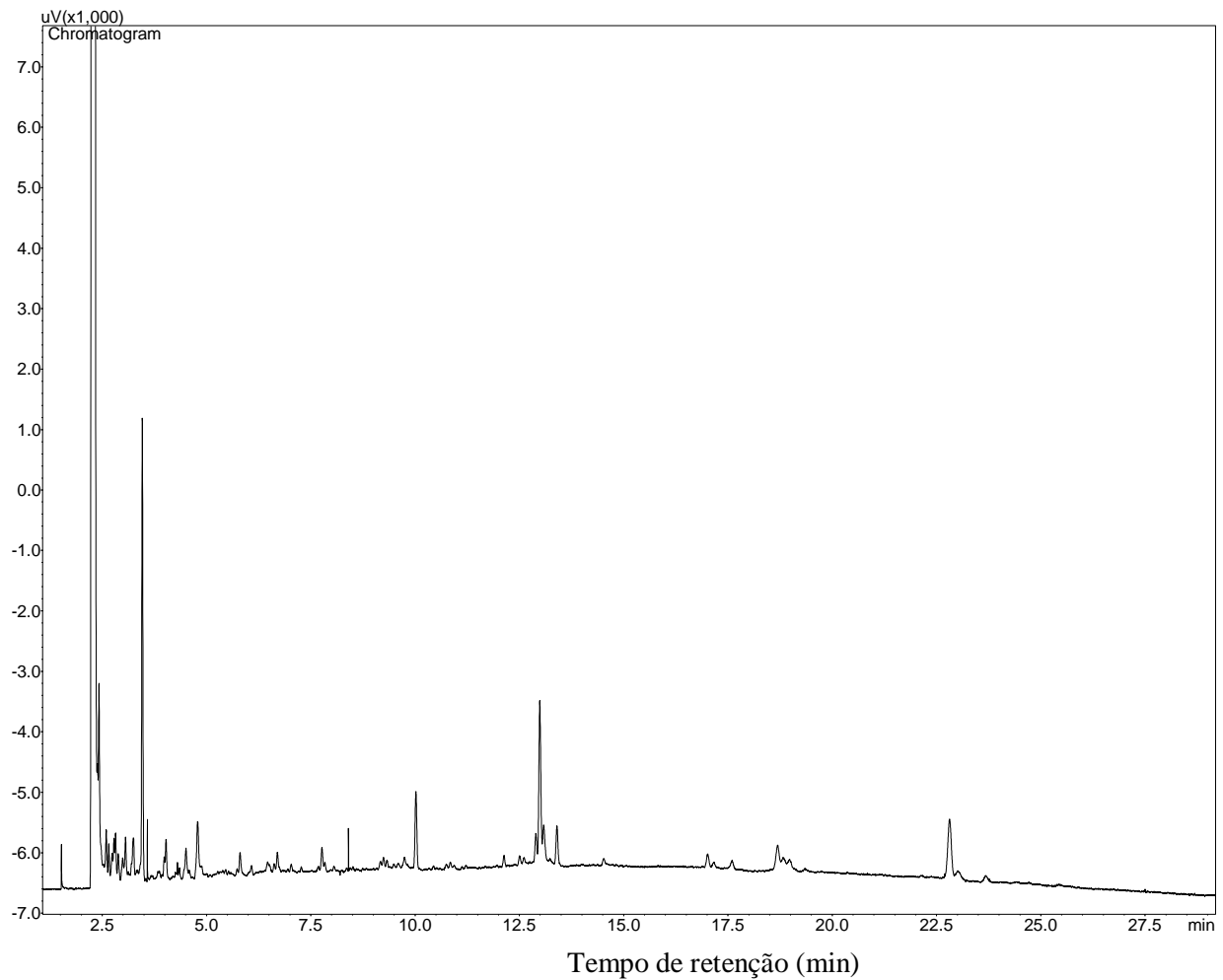


Figura 55. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 3A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 3B)

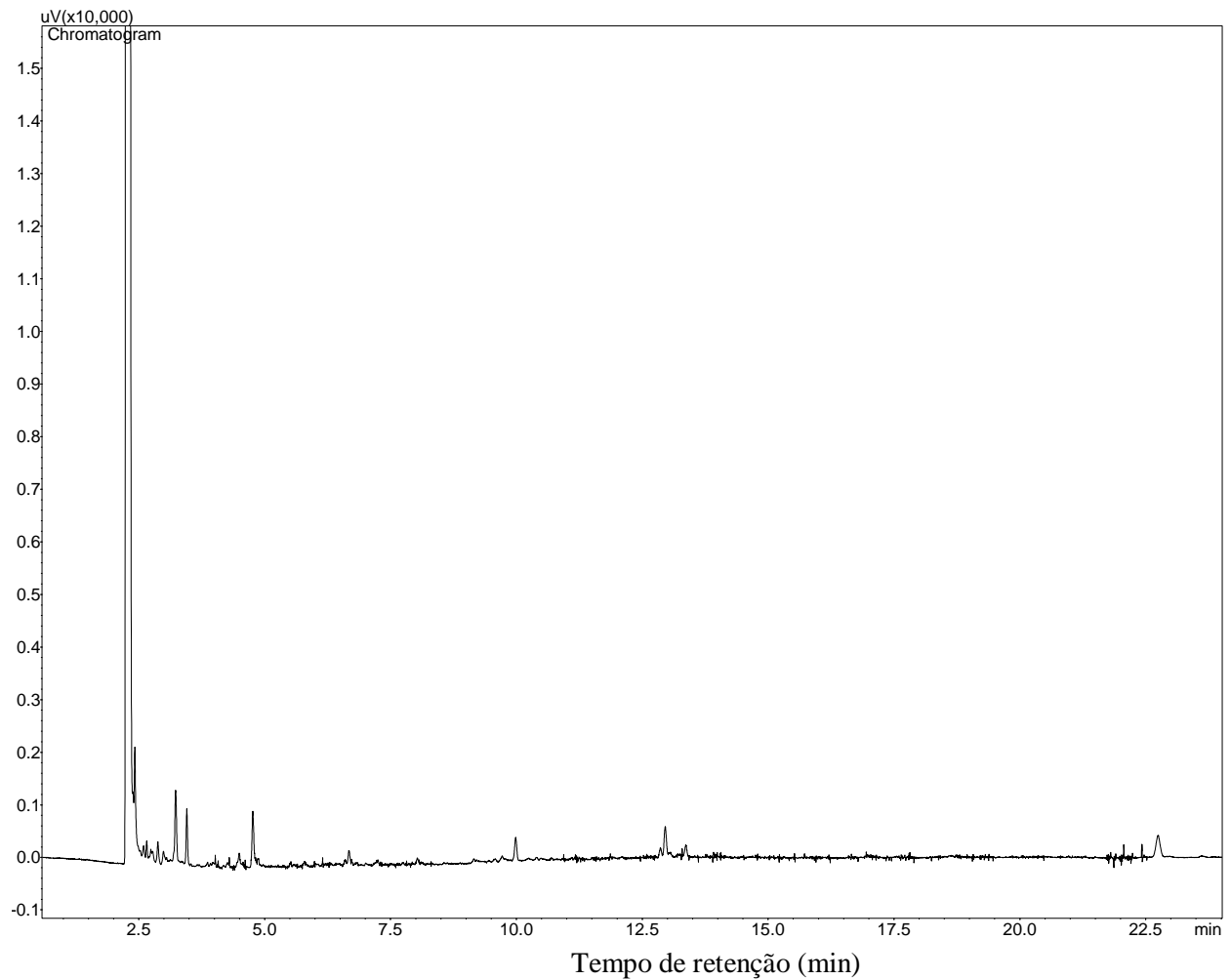


Figura 56. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 3B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 4A)

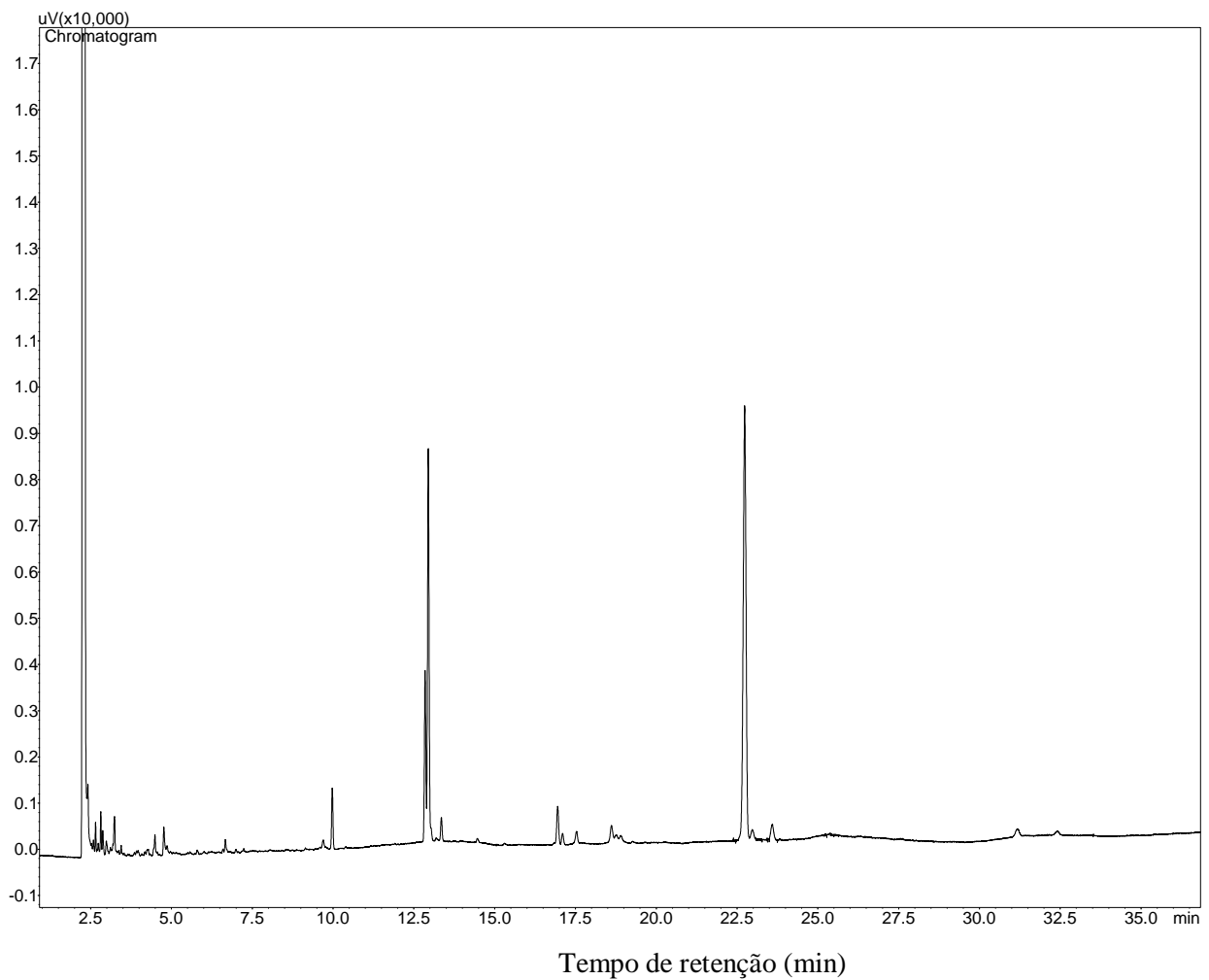


Figura 57. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 4A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 4B)

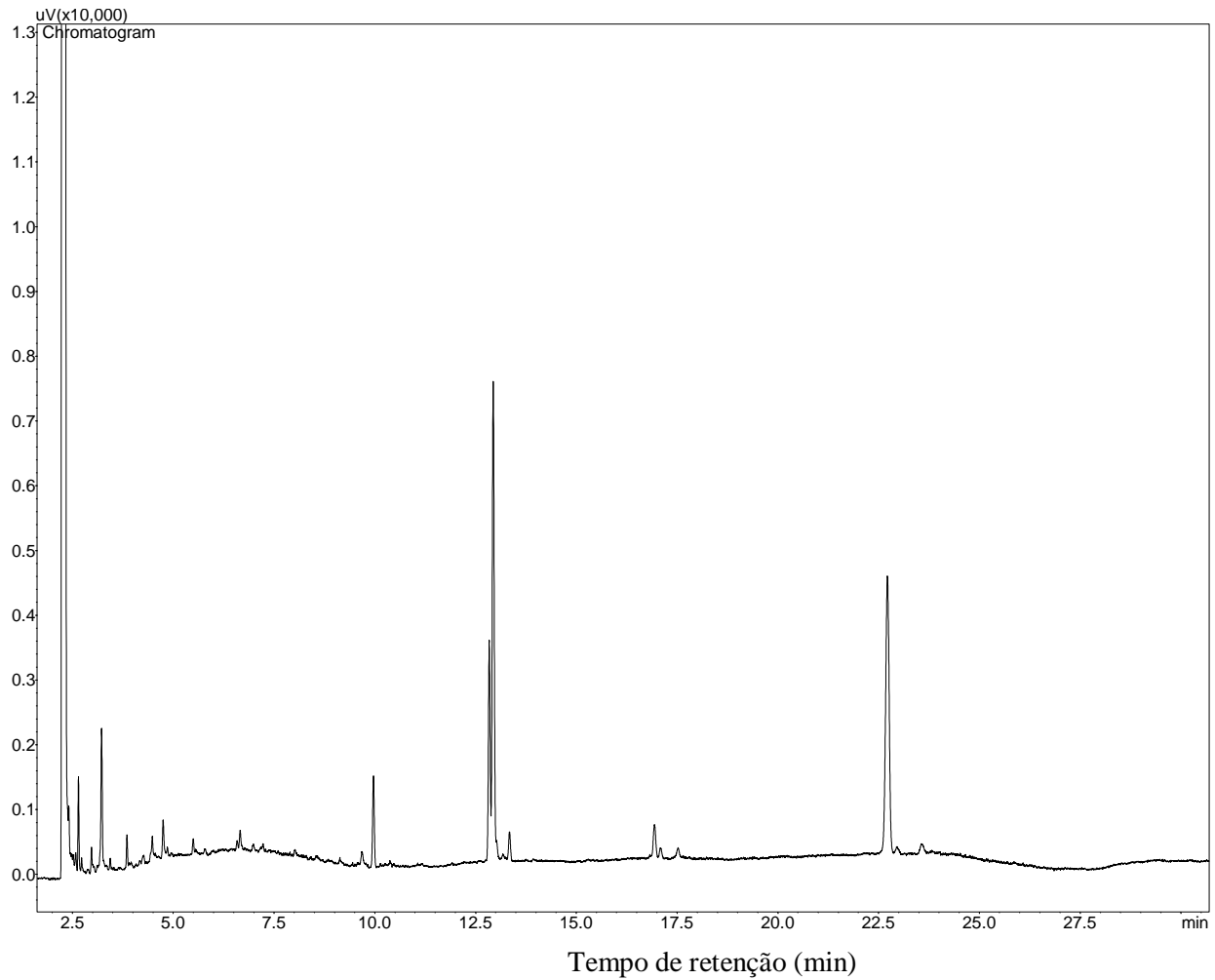


Figura 58. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 2,4 mM de N-nitrato (Repetição 4B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 1A)

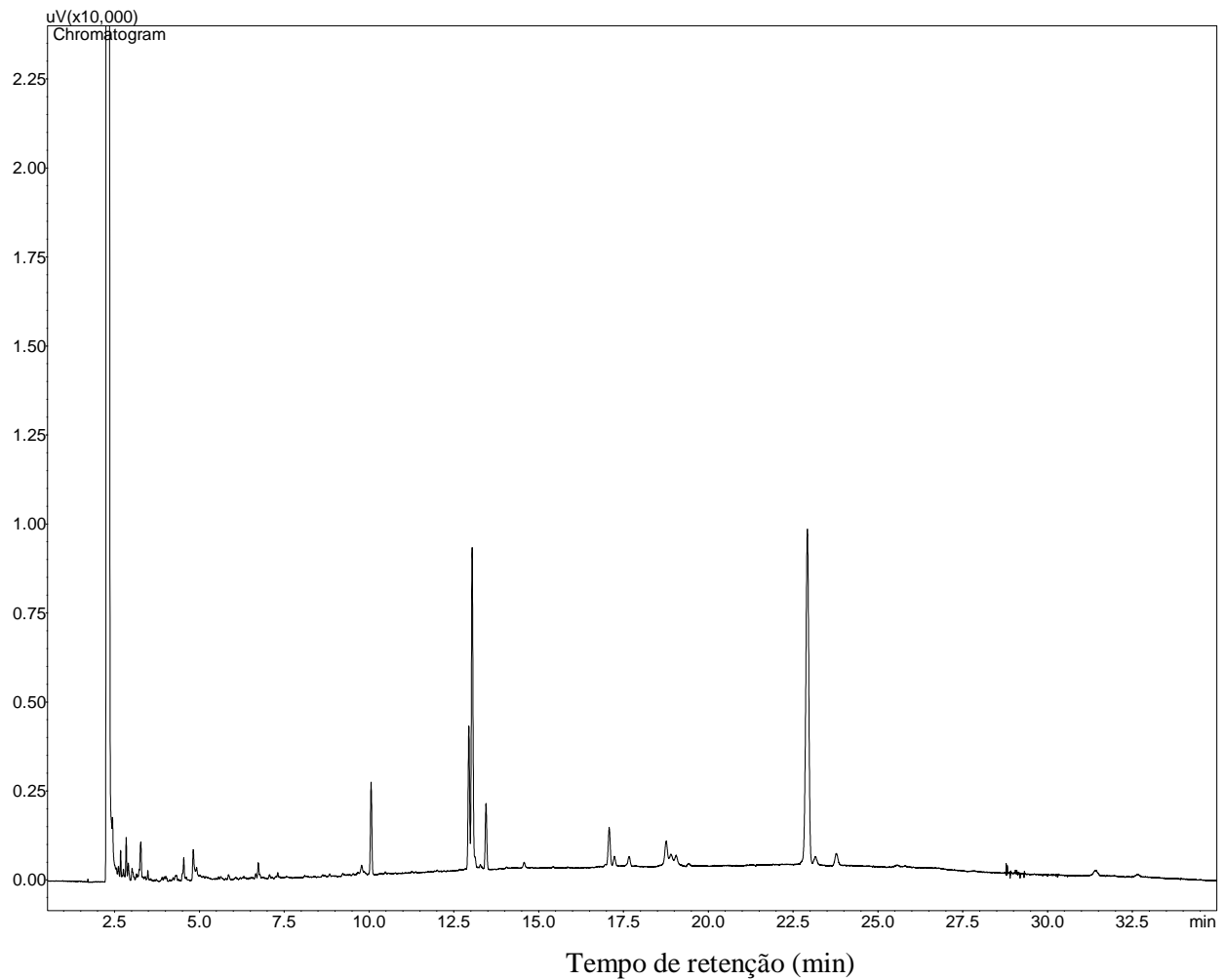


Figura 59. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 1A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 1B)

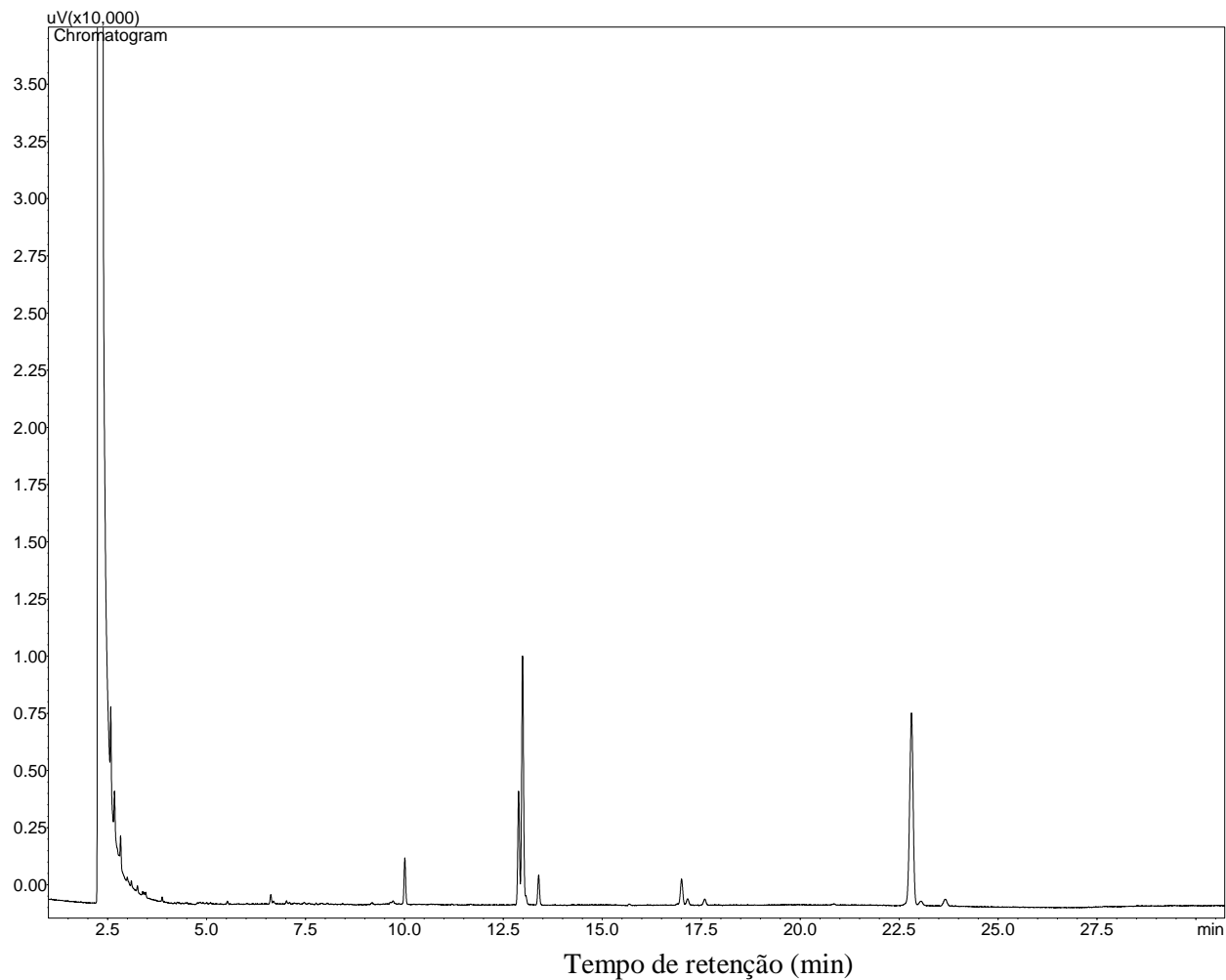


Figura 60. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 1B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 2A)

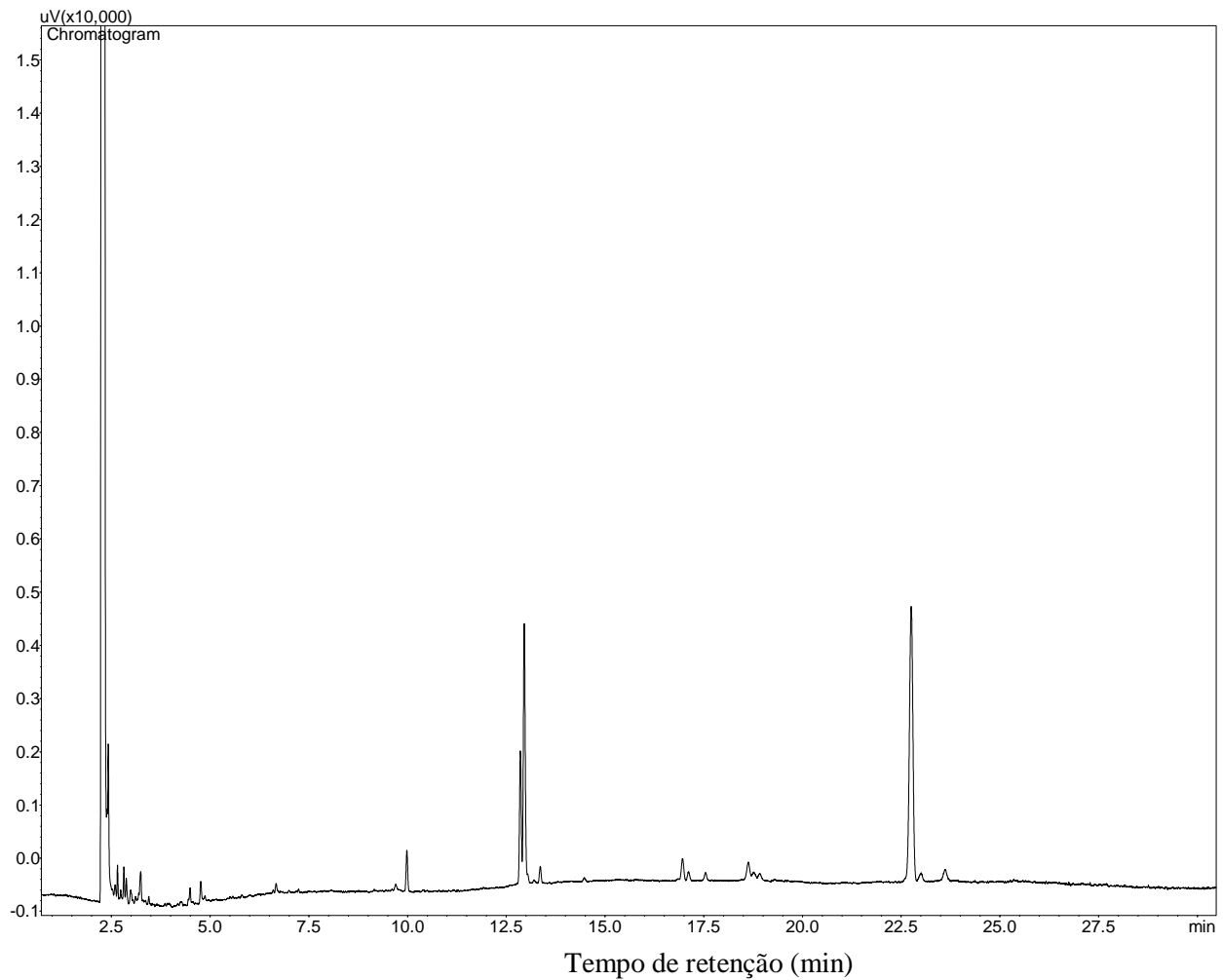


Figura 61. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 2A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 2B)

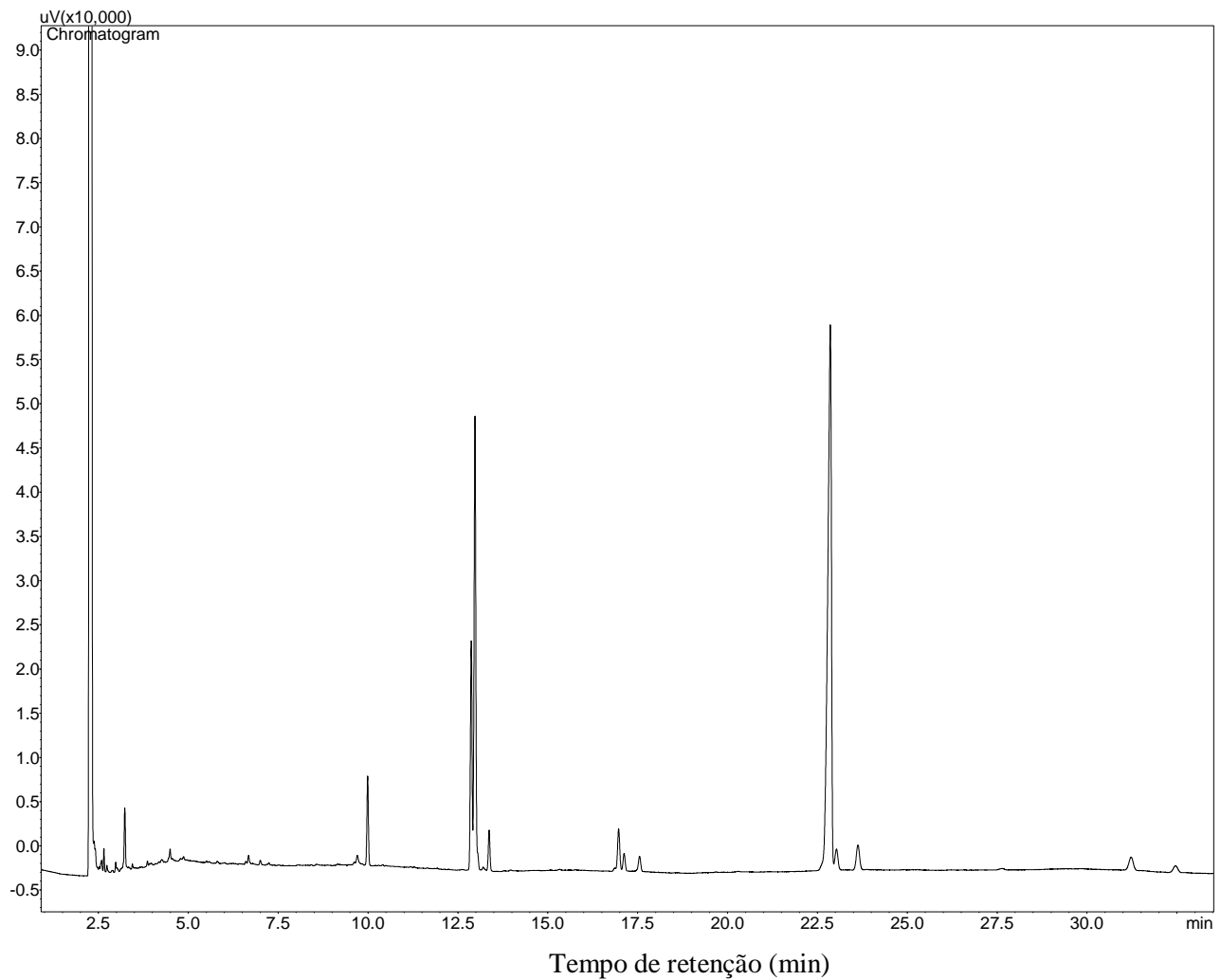


Figura 62. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 2B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 3A)

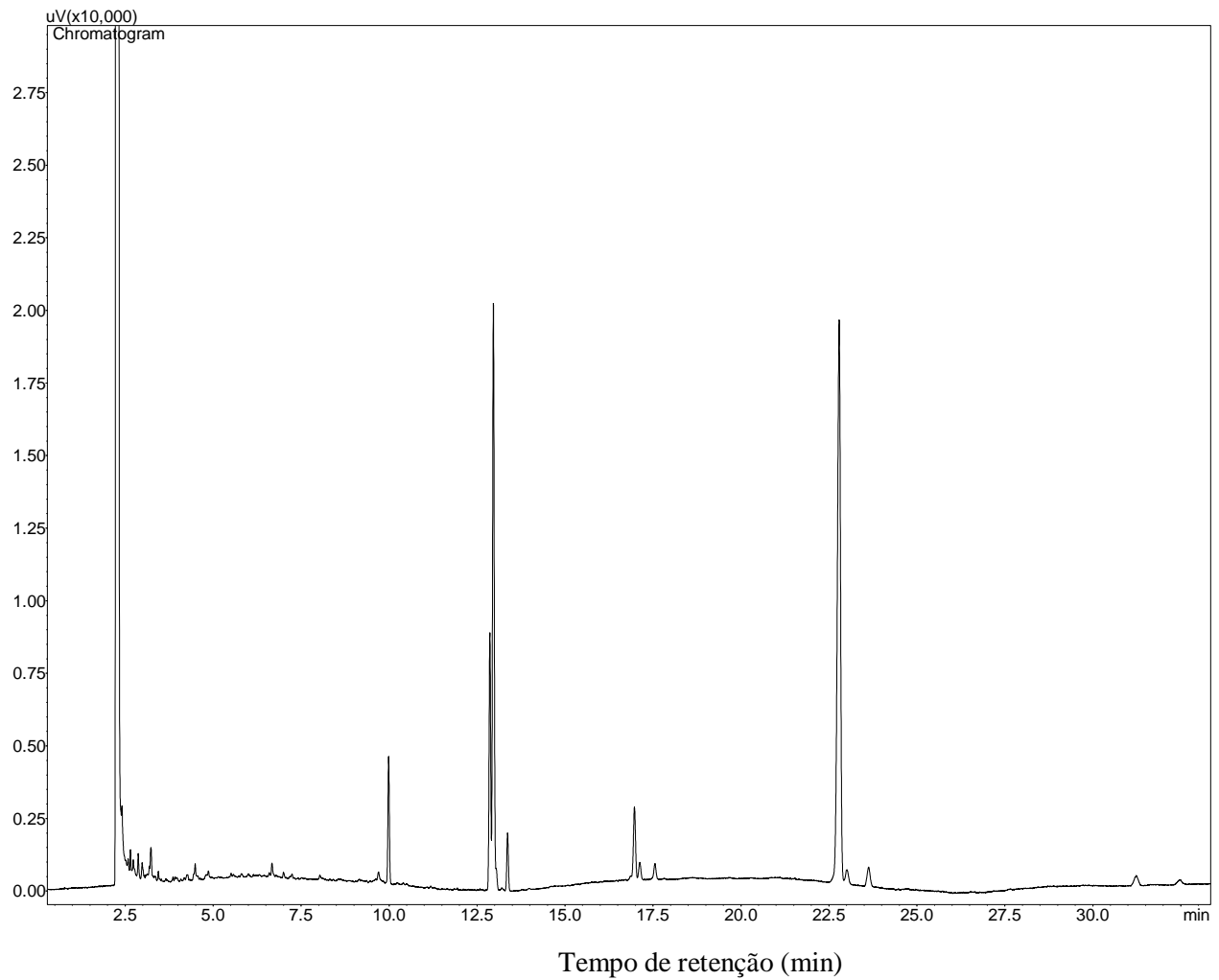


Figura 63. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 3A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 3B)

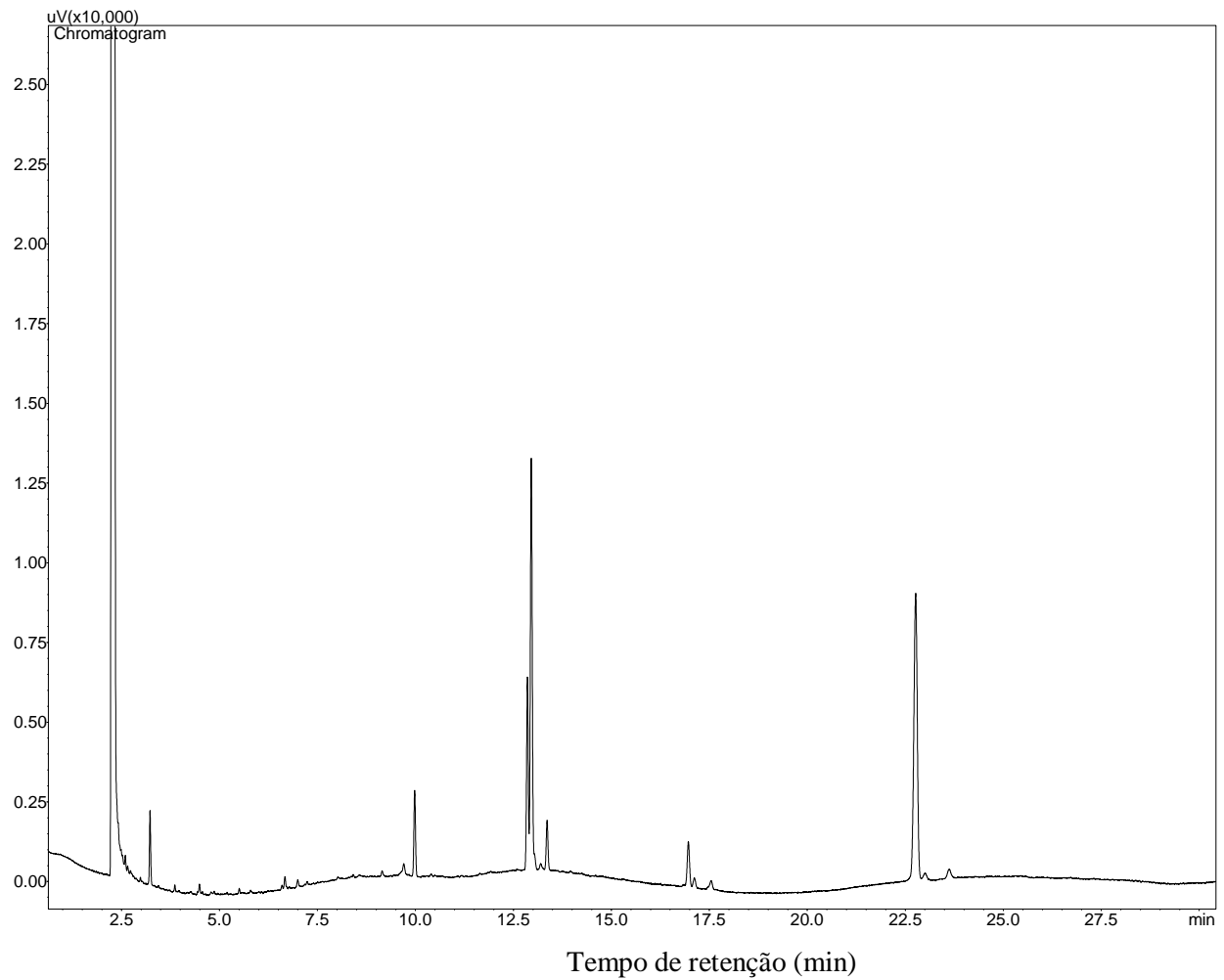


Figura 64. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 3B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 4A)

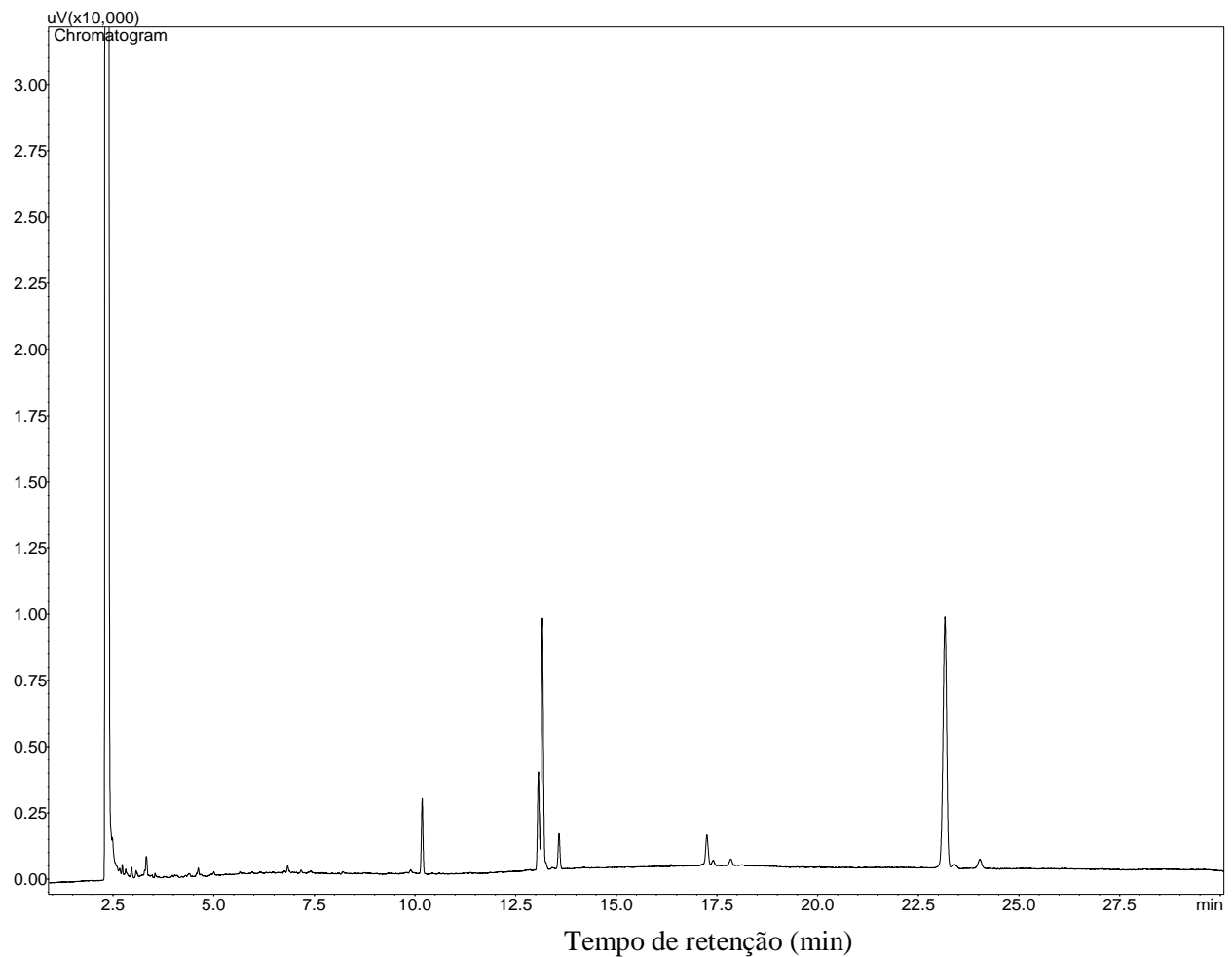


Figura 65. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 4A) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Amostra: 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 4B)

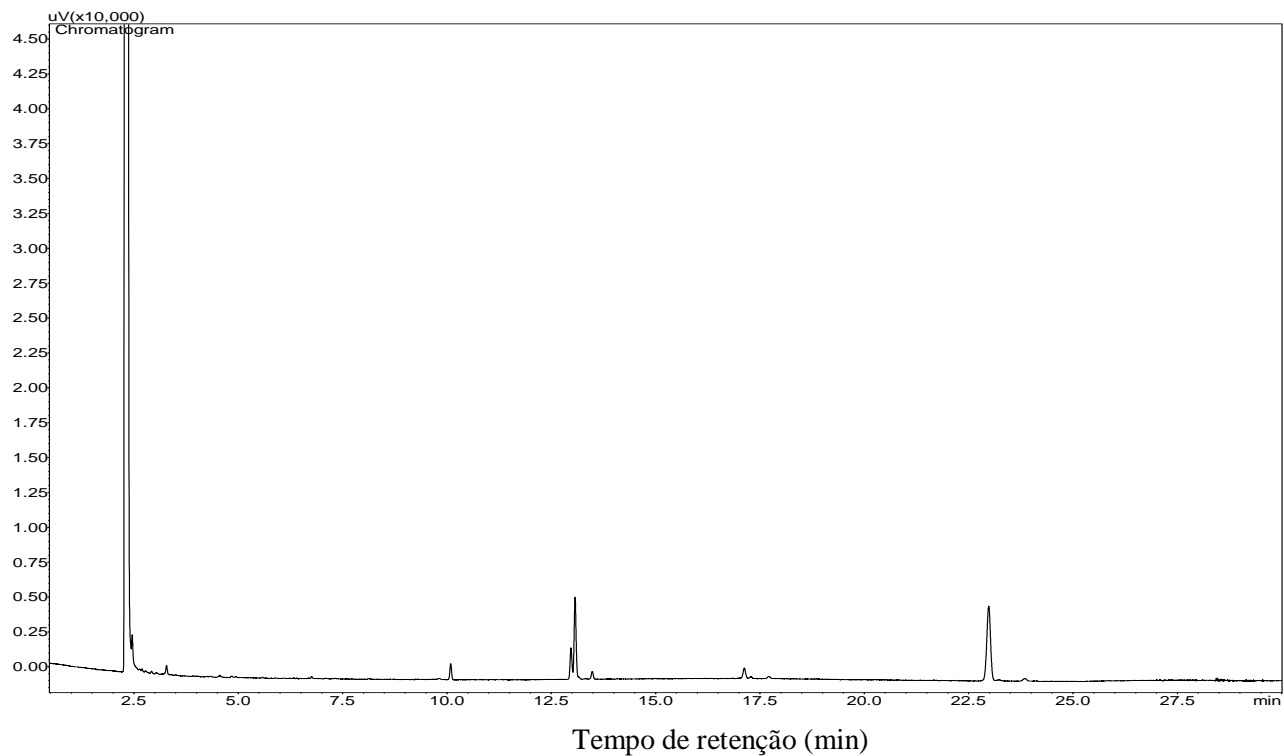


Figura 66. Cromatograma obtido por CG-DIC da amostra de óleo obtida a partir de sementes de plantas de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst. ex. R.E. Fries), submetidas a 3,2 mM de N-nitrato (Repetição 4B) em solo, coletadas ao fim da maturação de sementes (90 DAG).

Anexo C – Aceite e artigo a ser publicado em periódico

Decision Letter (LPLA-2010-0247.R1)

From: jplantnutrition@gmail.com

To: diegobioquimica@hotmail.com, diegobioquimica@hotmail.com

CC:

Subject: Journal of Plant Nutrition - Decision on Manuscript ID LPLA-2010-0247.R1

Body: @@date to be populated upon sending@@

Dear Mr Brito:

Ref: Effects of nitrate supply on plant growth, N, P, and K accumulation, and nitrate reductase activity in Crambe

Our referees have now considered your paper and have recommended publication in Journal of Plant Nutrition. We are pleased to accept your paper in its current form. We will begin the final editing of your manuscript shortly, at that time, we will contact you if we have any further questions.

After the final editing your manuscript will be forwarded to the publisher for copy editing and typesetting.

If you have not already filled out a copyright form and uploaded it then please do so at your earliest convenience. The copyright form is attached to this email. Please email the copyright to us and we will upload it with your manuscript.

You will receive proofs for checking.

The publisher also requests that proofs are checked and returned within 48 hours of receipt.

Thank you for your contribution to Journal of Plant Nutrition and we look forward to receiving further submissions from you.

Sincerely,
Dr Mills
Editor in Chief, Journal of Plant Nutrition
jplantnutrition@gmail.com

Reviewer(s)' Comments to Author:

Date Sent: 13-Sep-2011

File 1: * [LPLA-CF-TF.pdf](#)

Effects of nitrate supply on plant growth, N, P, and K accumulation, and nitrate reductase activity in Crambe

Diego de Mello Conde de Brito,¹ Carlos Diego dos Santos,¹ Fabíola Vieira Gonçalves,¹
Rosane Nora Castro,¹ and Sonia Regina de Souza¹

¹Plant Biochemistry Laboratory, Department of Chemistry, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effects of variation in nitrate (NO_3^- -N) supply on nitrogen (N), phosphorus (P), and potassium (K) values and several aspects of N metabolism in crambe (*Crambe abyssinica*). Crambe plants were submitted to crescent NO_3^- -N doses (1.0; 2.5; 5.0 and 7.5 mM) under hydroponic culture in greenhouse and, at the end of vegetative stage (68 days after germination) harvest was performed. Increase in NO_3^- -N supply caused a significant growth of it levels in stem, suggesting that this organ acts as a preferential storage site of this anion in crambe. Low P and high K values were observed in plants under 1.0 mM NO_3^- -N. Whereas, with 7.5 mM was verified a decrease in NO_3^- -N reductase activity and low N levels. At this dose, plants also exhibit other evidences of suppression in NO_3^- -N reduction such as high amino-N levels.

Keywords: *Crambe abyssinica*, Brassicaceae, nitrogen metabolism, hydroponic system.

Address correspondence to Diego de Mello Conde de Brito, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, Km 7, CEP: 23851-970, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: diegobioquimica@hotmail.com

INTRODUCTION

Crambe (*Crambe abyssinica*) is an oleaginous plant, probably originated from the Mediterranean, that belongs to the Brassicaceae family. It is characterized as an annual and erect herb with approximately 1 m high and a cycle that lasts about 100 days (Springdale Group, 2005).

In agronomical context, it is important to emphasize the potential of crambe oil for use in biodiesel industry or for isolation of erucic acid that is largely employed as lubricant, corrosion inhibitor or as raw material for synthetic rubber and plastic production (Leonard, 1992). Furthermore, 30-32% of crude protein is found in its cake and therefore, it is used in ruminants feed (Pitol, 2008). However, despite the fact that crambe has a promising potential and is well adapted to Brazilian agricultural conditions, there is not much information available at the metabolic level.

One of the main aspects that must be established in crambe production is the nutritional demand, because there is no specific fertilizer recommendation for this culture. Thus, investigations are necessary to evaluate the correct doses of nutrients required for crambe metabolism in order to avoid deficiency or waste situations and, consequently, serious impacts on productivity and on the environment.

N is one of the most important nutritional factors in culture development. This is justified due to its requirement to vegetal metabolism, to represent high costs in productive process, and to have the potential to cause serious impacts on environment, mainly by water table contamination (Abrol et al., 2007).

Therefore, information on the metabolic behavior of crambe plants under variation of N supply is needed to optimize the production and the sustainability of the process. This information is a basic for commercial production, independently which will be the final fate.

Hydropony is a high utility tool for vegetal nutrition studies. It allows exclusion of the soil influence on ionic transfer process which occurs on the root surface, thus making the nutrient supply provided at a constant rate. Furthermore, an important aspect of hydroponic system is the easier manipulation of nutrients compared with the conventional method (Baligar, 1986). Another point to be considered concerning the use of nutrient solutions is the absence of influences on metabolism, such as soil-associated diseases and weeds (Sheikh, 2006). Accordingly, the use of hydroponic system allows a more precise evaluation about interactions between nutrients and metabolic process in plants.

Thus, the purpose of this work was to evaluate the effects of crescent NO_3^- -N doses in nutrient solution on N, P, and K values and N metabolism in crambe plants to gather information to contribute for a rational production of this culture with minimal use of inputs.

MATERIALS AND METHODS

The experiment was conducted in a hydroponic system in a greenhouse at the Chemistry Department, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, from October 2008 to January 2009. For this work, commercial crambe seeds (*Crambe abyssinica*) were used which were previously treated under stirring with distilled water (15 min), 70% ethanol (1 min), and 2% sodium hypochlorite (15 min). After seed washing, the sowing was made in a sterilized substrate mixture composed of soil (40%), humus (30%), and clay (30%) in a growth chamber. When the height of seedlings reached 10 cm they were moved to the greenhouse for a 5 days acclimation with 50%

reduction of the light intensity. After this stage, light reduction was abolished and seedlings were transferred to 1.7 L pots of the hydroponic system. The system was composed of 12 pots connected to a pumping air machine and in each pot was placed one plant. During one week, plants were cultivated in a modified ½-strength Hoagland and Arnon (1950) nutrient solution with 2 mM NO₃⁻-N. Hereafter, the treatments (1.0; 2.5; 5.0; and 7.5 mM NO₃⁻-N) were applied and a ½ strength Hoagland and Arnon (1950) nutrient solution was used for availability of other nutrients. Each treatment was composed of three replicates (plants) arranged in a completely randomized experimental design.

Nutrient solution was replaced weekly and, every two days, pH was measured and adjusted to 6.3 and the solution volume was maintained by addition of distilled water. At the end of the vegetative stage (ca. 68 days after germination) the harvest was performed.

After the harvest, roots, stems and leaves were separated and the fresh weight was determined. NO₃⁻-N reductase activity was evaluated (Jaworski, 1971) for each plant part, and 0.5 g samples of fresh tissue were kept in ethanol 80%. After partition with chloroform, extracts were used for amino-N (Yemm and Cocking, 1955), NO₃⁻-N (Cataldo et al., 1975), and soluble sugars (Yemm and Willis, 1954) analyses. Other 0.2 g samples of plant parts were dried for dry weight determination and submitted to digestion for total N, P, and K analyses (Tedesco, 1982). ANOVA was carried out and treatments means obtained were compared using Tukey's test at p= 0.05 level.

RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1a shows that higher NO_3^- -N levels in plant parts were obtained with treatments at higher N amounts in nutrient solution. At NO_3^- -N doses of 5.0 and 7.5 mM no significant difference was detected in levels of this anion in roots and leaves. However, for stem, NO_3^- -N doses of 5.0 and 7.5 mM afforded a significant increase of the amount of the anion.

The significant increase in NO_3^- -N levels for stem with increased N supply in the nutrient solution and the fact that it is not the preferential site for reduction reactions in most plant species may indicate an important role for stem in the storage of this anion. In this context, Chen et al. (2004) observed in rape (*Brassica campestris* L.) and in Chinese cabbage (*Brassica chinensis* var. *Oleifera Makino et Nenoto*), members of Brassicaceae family like crambe, that stem is the main site for NO_3^- -N storage. Such mechanism occurs in many vegetal species and is defined as a result of an adaptive process developed in order to maintain sufficient N supply for metabolic activities in low availability periods (Hirel et al., 2007; Fageria et al., 2008).

NO_3^- -N reductase activity was found to be generally higher in leaves which also emphasize a role for stem as the preferential site for NO_3^- -N storage (Figure 1b). However, the enzyme activity did not increase significantly with NO_3^- -N amounts available in the nutrient solution. Moreover, in leaves of plants submitted to 7.5 mM NO_3^- -N the lowest enzymatic activity was observed when compared with doses of 2.5 and 5.0 mM.

In this case, it must be considered that, after uptake, NO_3^- -N can flow to different places in the cell. NO_3^- -N which remains in cytosol is part of the metabolic pool (inducing pool) and intrinsically related to NO_3^- -N reductase regulation but the one which is found in vacuole composes the storage pool (substrate pool) (Lillo et al., 2004; Souza and Fernandes, 2006). Thus, the NO_3^- -N distribution in these sites has an important effect on NO_3^- -N reductase activity.

A possible explanation for a decrease in NO_3^- -N reductase activity, observed in leaves of plants which received 7.5 mM NO_3^- -N, is that at this dose a significant influence in storage mechanisms takes place and this causes the increase of storage/reduction ratio. Consequently, this dose could contribute to the reduction of the relative amounts of NO_3^- -N in the metabolic pool (cytosol) of leaves due to an increase of this anion in the storage pool (vacuole) of leaves and stem. This could explain the high NO_3^- -N levels detected in stem and leaves of plants supplied with 7.5 mM NO_3^- -N and the low activity of NO_3^- -N reductase observed in leaves since a relative reduction on metabolic pool would cause a decrease in enzymatic activity. The main point of this effect can be related to amino-N levels.

As shown in Figure 2a, NO_3^- -N doses in nutrient solution affected significantly amino-N levels in leaves with higher values occurring in plants at 7.5 mM NO_3^- -N. In this context, it must be emphasized that amino acids can modify NO_3^- -N balance in cell sites leading to inhibition of NO_3^- -N reductase activity (Lea et al., 2006; Miller et al., 2007). Thus, the low enzymatic activity observed in leaves of crambe plants submitted to the highest N dose can be related to the increase in their amino-N levels.

Figure 2b shows that soluble sugars levels in roots have not been affected by NO_3^- -N supplies, but in stem and leaves the higher NO_3^- -N doses in the nutrient solution tended to cause a reduction in soluble sugars levels. This behavior can be explained by the increase in the use of carbon skeletons, from sugar catabolism, in the N assimilation process for amino acids synthesis (Souza et al., 2002). Therefore, a lower NO_3^- -N supply caused a reduction in the use of these carbon skeletons, and consequently in amino acids synthesis in leaves. This difference probably affected fresh weight production in leaves where, at a dose of 7.5 mM NO_3^- -N, a significant increase was observed when compared with a dose of 1.0 mM (Table 1). This is justified because

the increase in amino acids availability can promote an increment in protein synthesis and, thus, in biomass production (Souza and Fernandes, 2006).

As can be seen in Table 2, high levels of total N were detected in roots and leaves. In these parts, data show that the lower NO_3^- -N dose provided is among those that caused low total N levels. However, at 7.5 mM NO_3^- -N, plants exhibited total N levels similar to those obtained with 1.0 mM. The low levels of total N observed with 7.5 mM NO_3^- -N can be associated to low NO_3^- -N reductase activity and the high levels of amino-N of these plants (Figure 1b and 2a). These features indicate a lower NO_3^- -N reduction.

Another important point concerning total N levels is the major tendency to acidification in nutrient solution of plants which were grown under 1.0 mM NO_3^- -N (Figure 3). This result can be direct linked to the amount of NO_3^- -N available in this treatment, because an environmental acidification mechanism which acts via proton extrusion is commonly used by plants for NO_3^- -N uptake, since this process is executed via 2H^+ symport (Souza and Fernandes, 2006). This stimulus for NO_3^- -N uptake in plants submitted to 1.0 mM NO_3^- -N together with the decrease in activity of NO_3^- -N reduction system in plants treated with 7.5 mM may be the reason for the similarity of total N levels observed between these treatments. However, when the total N content is considered (Table 2), the increase produced in leaves with 7.5 mM NO_3^- -N is evident and may be due to the high fresh weight production at that dose (Table 1).

A significant reduction in P levels was observed in the leaves of plants treated with 1.0 mM NO_3^- -N nutrient solution (Table 2). P is a nutrient related to energy transfer processes in cells, mainly because it is required for ATP synthesis (Araújo and Machado, 2006). Thus, with a high ATP requirement for amino acids synthesis, the low P levels in leaves of plants under 1.0 mM NO_3^- -N treatment can be linked to the lowest amino-N level detected in this tissue. This is

justified by a decrease in energy demand by routes of amino acids synthesis due to the low NO_3^- -N availability in nutrient solution for this process.

High K levels were determined in plants under 1.0 mM NO_3^- -N treatment which can be related to the variation of environmental pH since a higher acidification is linked to an increase in K uptake (Table 2). According to Hoth et al. (2001) channels involved in K uptake hold a histidine residue, highly conserved in plants, which responds to changes in pH. Such residue is found in a site of the pore near to the selective region and with the decrease in pH it responds causing an increase in K influx to the cell. Even though the acidification probably has affected K levels, the K content did not show any variation with the different NO_3^- -N doses available.

Thus, under 1.0 mM NO_3^- -N were detected low P levels in leaves and high K levels in all plant parts. On the other hand, with 7.5 mM NO_3^- -N was obtained a high fresh weight production in leaf and low soluble sugars levels. Also was observed that this NO_3^- -N dose caused suppression in the reduction system of this anion in leaf. Moreover, our results suggest that stem play an important role in NO_3^- -N storage in crambe plants.

ACKNOWLEDGMENT

This work was financially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Programa de Pós-Graduação em Química-Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (PPGQ-UFRRJ). Translation assistance was provided by Dr. Victor Marcos Rumjanek.

REFERENCES

- Abrol, Y. P., N. Raghuram, and M. S. Sachdev. 2007. *Agricultural nitrogen use & its environmental implications*. New Delhi, India: I.K International publishing house Pvt. Ltd.
- Araújo, A. P., and C. T. T. Machado. 2006. Fósforo. In *Nutrição mineral de plantas*, ed. M. S. Fernandes, 253-280. Viçosa, Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.
- Baligar, V. C. 1986. Interrelationships between growth and nutrient uptake in alfafa and corn. *Journal of Plant Nutrition* 9 (11): 1391-1404.
- Cataldo, D. A., M. Haroon, L. W. Schrader, and V. L. Youngs. 1975. Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 6: 853-855.
- Chen, B. M., Z. H. Wang, S. X. Li, G. X. Wang, H. X. Song, and X. N. Wang. 2004. Effects of nitrate supply on plant growth, nitrate accumulation, metabolic nitrate concentration and nitrate reductase activity in three leafy vegetables. *Plant Science* 167: 635-643.
- Fageria, N. K., V. C. Baligar, and Y. C. Li. 2008. The role of nutrient efficient plants in improving crop yields in the twenty first century. *Journal of Plant Nutrition* 31: 1121–1157.

Hirel, B., J. Le Gouis, B. Ney, and A. Gallais. 2007. The challenge of improving nitrogen use efficiency in crop plants: towards a more central role for genetic variability and quantitative genetics within integrated approaches. *Journal of Experimental Botany* special issue paper: 1-19.

Hoth, S., D. Geiger, D. Becker, and R. Hedrich. 2001. The pore of plant K⁺ channels is involved in voltage and pH sensing: Domain-swapping between different K⁺ channel α -subunits. *The plant cell* 13: 943-952.

Hoagland, D. R., and D. I. Arnon. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. *University of California Agricultural of Experimental Station Bulletin* 347: 1-32.

Jaworski, E. G. 1971. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 43: 1274-1279.

Lea, U. S., M. Leydecker, I. Quilleré, C. Meyer, and C. Lillo. 2006. Posttranslational regulation of nitrate reductase strongly affects the levels of free amino acids and nitrate, whereas transcriptional regulation has only minor influence. *Plant Physiology* 140: 1085-1094.

Leonard, E. C. 1992. High-erucic vegetable oils. *Industrial Crops & Products* 1: 119–123.

Lillo, C., C. Meyer, U. S. Lea, F. Provan, and S. Oltedal. 2004. Mechanism and importance of post-translational regulation of nitrate reductase. *Journal of Experimental Botany* 55: 1275-1282.

Miller, A. J., X. Fan, Q. Shen, and S. J. Smith. 2007. Amino acids and nitrate as signals for the regulation of nitrogen acquisition. *Journal of Experimental Botany* 59: 111–119.

Pitol, C. 2008. Cultura do crambe. In *Tecnologia e produção: Milho safrinha e culturas de inverno*, 85-88. Maracaju, Mato Grosso do Sul: Fundação MS.

Sheikh, B. A. 2006. Hydroponics: key to sustain agriculture in water stressed and urban environment. *Pakistan Journal of Agriculture, Agricultural Engineering and Veterinary Sciences* 22: 53–57.

Souza, S. R., and M. S. Fernandes. 2006. Nitrogênio. In *Nutrição Mineral de Plantas*, ed. M. S. Fernandes, 215-252. Viçosa, Minas Gerais: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo.

Souza, S. R., E. M. L. M. Stark, and M.S. Fernandes. 2002. Enzimas de assimilação de nitrogênio em plantas. Artware projetos culturais.

Springdale Group. 2005. *Crambe (Abyssinian mustard)*. < www.ienica.net/crops/crambe.pdf >. (accessed 14 feb 2008).

Tedesco, M. J. 1982. Extração simultânea de N, P, K, Ca e Mg em tecido de plantas por digestão com H₂O₂-H₂SO₄. Porto Alegre, Rio Grande do Sul: UFRGS.

Yemm, E. W., and E. C. Cocking. 1955. The determination of amino acids with ninhydrin. *Analytical Biochemistry* 80: 209-213.

Yemm, E. W., and A. J. Willis. 1954. The estimation of carbohydrate in plants extracts by anthrone. *Biochemical Journal* 57: 508-514.

Table 1.

NO ₃ ⁻ -N dose (mM)	Fresh Weight Production [*] (g plant ⁻¹)		
	Root	Stem	Leaf
1.0	6.48a	5.57a	8.76b
2.5	7.50a	5.21a	14.57ab
5.0	5.33a	3.47a	10.73ab
7.5	8.17a	7.71a	21.62a

Table 2.

NO ₃ ⁻ -N dose (mM)	Level [*] (mg g ⁻¹ DW)								
	Total N			P			K		
	Root	Stem	Leaf	Root	Stem	Leaf	Root	Stem	Leaf
1.0	22.21b	15.89a	32.80b	1.11a	0.91a	1.16b	0.90a	0.94a	1.00a
2.5	30.46a	17.77a	39.74ab	1.15a	0.97a	1.52a	0.40b	0.51bc	0.43b
5.0	27.35ab	13.12a	40.82a	1.05a	1.01a	1.54a	1.04a	0.75ab	0.91a
7.5	27.49ab	12.15a	32.59b	1.16a	1.09a	1.65a	0.32b	0.30c	0.32b
	Content [*] (mg plant ⁻¹)								
1.0	8.19a	10.90a	33.66b	0.45a	0.56a	1.17b	0.36a	0.61a	1.03a
2.5	9.98a	6.80a	60.45ab	0.38a	0.37a	2.33ab	0.10a	0.21a	0.82a
5.0	6.23a	6.60a	47.60ab	0.26a	0.51a	1.69b	0.24a	0.38a	1.02a
7.5	10.10a	7.12a	71.04a	0.40a	0.52a	3.74a	0.10a	0.15a	0.57a

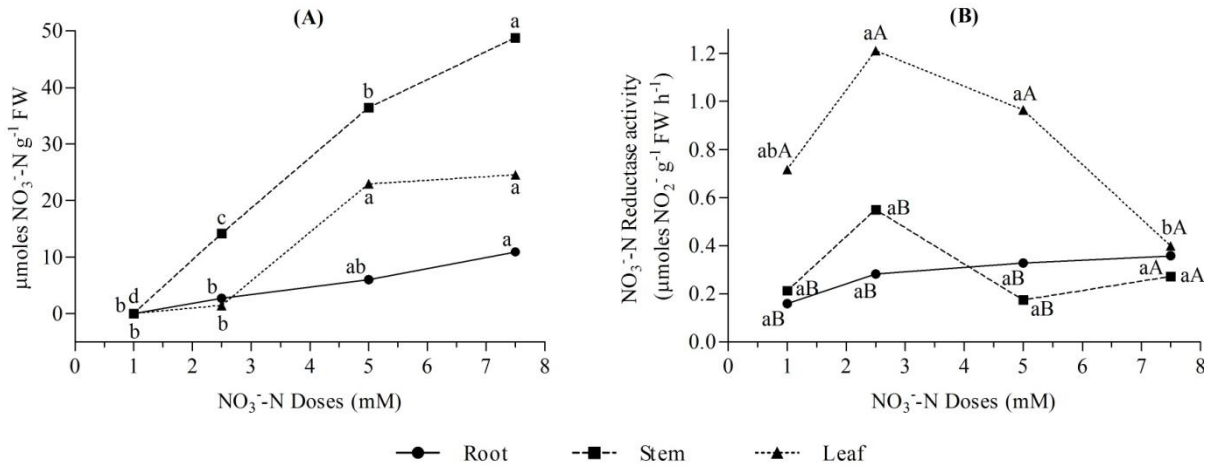


Figure 1.

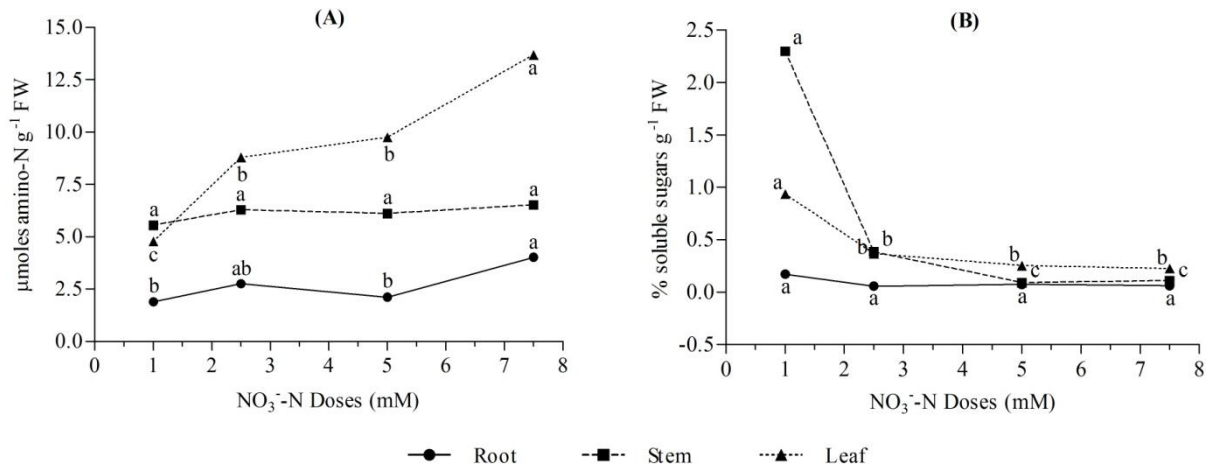


Figure 2.

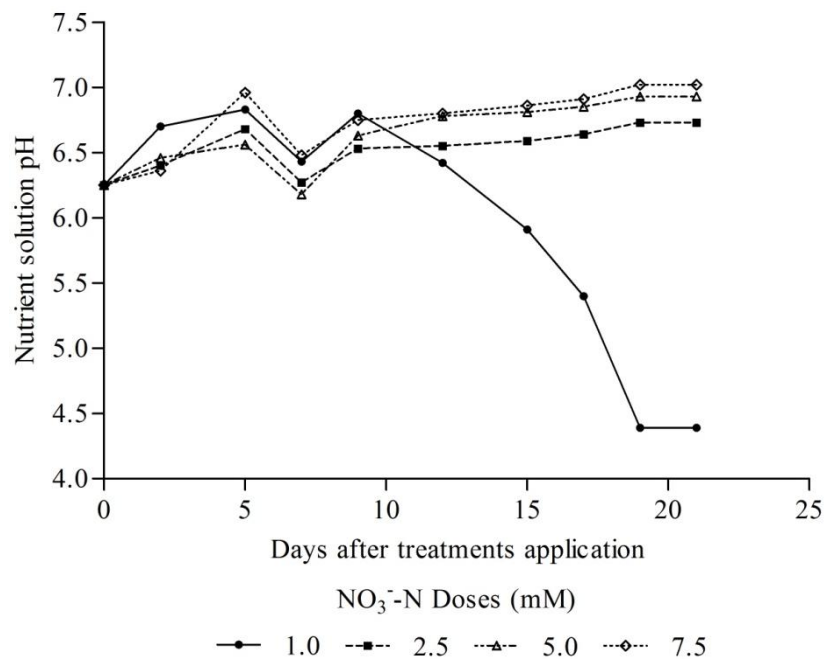


Figure 3.

Table 1. Fresh weight (g plant^{-1}) of roots, stems and leaves of crambe (*Crambe abyssinica*) plants submitted to different NO_3^- -N doses in nutrient solution (1.0; 2.5; 5.0; and 7.5 mM) harvested at the end of vegetative stage (68 days after germination).

*Different letters in the same plant part indicate significant difference (Tukey test, $p= 0.05$).

Table 2. Total N, P, and K levels (mg g^{-1} DW) and contents (mg plant^{-1}) in roots, stems and leaves of crambe (*Crambe abyssinica*) plants submitted to different NO_3^- -N doses in nutrient solution (1.0; 2.5; 5.0; and 7.5 mM) harvested at the end of vegetative stage (68 days after germination).

*Different letters in the same plant part in each division (level or content) indicate significant difference (Tukey test, $p= 0.05$).

Figure 1. NO_3^- -N levels (A) and NO_3^- -N reductase activity (B) in roots, stems and leaves of crambe (*Crambe abyssinica*) plants submitted to different NO_3^- -N doses in nutrient solution (1.0; 2.5; 5.0; and 7.5 mM) harvested at the end of vegetative stage (68 days after germination). Different minuscule letters indicate significant difference in the same plant part and different capital letters indicate significant difference in the same NO_3^- -N dose (Tukey test, $p= 0.05$).

Figure 2. Amino-N (A) and soluble sugars (B) levels in roots, stems and leaves of crambe (*Crambe abyssinica*) plants submitted to different NO_3^- -N doses in nutrient solution (1.0; 2.5; 5.0; and 7.5 mM) harvested at the end of vegetative stage (68 days after germination). Different letters indicate significant difference in the same plant part (Tukey test, $p= 0.05$).

Figure 3. Variation of pH in nutrient solution used for growth of crambe (*Crambe abyssinica*) plants submitted to different NO_3^- -N doses (1.0; 2.5; 5.0; and 7.5 mM), after treatments application until the end of vegetative stage (68 days after germination).