

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

DISSERTAÇÃO

**Aspectos do Metabolismo de Plantas de Crambe
(*Crambe abyssinica*) Submetidas a Diferentes Doses de
Nitrogênio Visando a Produção de Óleo para Biodiesel**

Diego de Mello Conde de Brito

2009



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

**ASPECTOS DO METABOLISMO DE PLANTAS DE CRAMBE
(*Crambe abyssinica*) SUBMETIDAS A DIFERENTES DOSES DE
NITROGÊNIO VISANDO A PRODUÇÃO DE ÓLEO PARA BIODIESEL**

DIEGO DE MELLO CONDE DE BRITO

Sob a orientação da Professora
Sonia Regina de Souza

e Co-orientação da Professora
Rosane Nora Castro

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Agrária

Seropédica, RJ
Maio de 2009

547

B862a

T

Brito, Diego de Mello Conde de, 1982-

Aspectos do metabolismo de plantas de crambe (crambe abyssinica) submetidas a diferentes doses de nitrogênio visando a produção de óleo para biodiesel / Diego de Mello Conde de Brito - 2009.

64 f. : il.

Orientador: Sonia Regina de Souza.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Química.

Bibliografia: f. 50-54

1. Química orgânica - Teses. 2. Hidroponia - Teses. 3. Ácidos graxos - Teses. 4. Biodiesel - Teses. 5. Nitrogênio - Fixação - Teses. 6. Plantas - Metabolismo - Teses. I. Souza, Sonia Regina de, 1965-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa 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

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**,
no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química Agrária.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29/05/2009



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



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



Prof. Dr. José Guilherme Marinho Guerra (CNPAB-EMBRAPA)

RESUMO

BRITO, Diego de Mello Conde. **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.

As crises e as projeções em torno do mercado do petróleo apontam para a necessidade crescente do desenvolvimento de fontes alternativas de energia. Nesse contexto, os biocombustíveis são caracterizados como a principal fonte alternativa de energia e, dentre os países com o maior potencial para sua produção, o Brasil destaca-se devido suas possibilidades na agroenergia. Isso se justifica pela grande disponibilidade de mão de obra e área para cultivo e, além disso, pela alta diversidade vegetal que o país apresenta. Entretanto, o desenvolvimento da agroenergia, pode acarretar o desvio de parte da produção de alimentos, já que as principais culturas utilizadas para esse fim são a soja, o milho, a cana-de-açúcar, o girassol e a canola. Assim, torna-se extremamente importante, o desenvolvimento do potencial de culturas que não tenham emprego na indústria de alimentos. O crambe (*Crambe abyssinica*) apresenta um alto potencial para a indústria de biodiesel devido a sua precocidade (pode ser colhido por volta dos 90 dias), a alta produtividade (1000 e 1500 kg/ha), o baixo custo de produção, e um percentual de óleo total na semente que fica entre 26 e 38%. Além disso, deve-se ressaltar que o crambe é tóxico para a alimentação humana e, portanto, não compete diretamente com a produção de alimentos. Por outro lado, embora a cultura apresente um grande potencial, ainda estão disponíveis poucas informações sobre sua produção, já que não existe um manual de cultivo estabelecido. Dessa forma, tornam-se viáveis pesquisas que tenham o objetivo de otimizar sua produção com o mínimo de custos e impactos ao ambiente. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes doses de nitrogênio sobre o metabolismo vegetal, por causa da reconhecida influência desse nutriente na produtividade das culturas e por representar uma parcela significativa dos gastos envolvidos na produção agrícola. Assim, plantas de crambe foram cultivadas em solução nutritiva com diferentes doses de nitrogênio (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) em casa de vegetação. Cada tratamento foi composto por 3 repetições e, ao longo do experimento, foram realizadas 2 coletas, sendo a primeira no início da floração e a segunda no fim da produção de sementes (aos 68 e 103 dias após a germinação, respectivamente). O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 (Trat x Col). Dentre os resultados obtidos, é possível destacar que não houve influência significativa das diferentes doses de nitrogênio na produção de grãos. Além disso, o tratamento com a menor dose de nitrogênio (T1= 1 mM de N-NO₃⁻) se mostrou eficiente, já que possibilitou a obtenção de um alto rendimento de óleo frente aos demais tratamentos. Assim, os resultados obtidos, em hidroponia, apontam para a viabilidade da utilização dessa dose para o cultivo de crambe, já que representa um meio para a otimização da produção juntamente com uma diminuição dos custos e impactos ao ambiente.

Palavras-chave: Biocombustíveis, Cultivo Hidropônico, Ácidos Graxos.

ABSTRACT

BRITO, Diego de Mello Conde. **Aspects of Crambe (*Crambe abyssinica*) Metabolism Under Different Nitrogen Doses Aiming the Oil Production for Biodiesel**. 2009. 58p Dissertation (Master Science in Chemistry, Agronomy Chemistry). Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2009

The crisis and projections around the petroleum business, lead a growing necessity to the development of alternatives energy sources. In this context, biofuel are characterized as a major alternative energy source and, between the countries with great potencial for its production, Brasil plays a role due to its possibilities in agroenergy. This is explained by the big availability of workforce and cultivation area, besides, its high vegetal diversity. However, the agroenergy development can leads some deviation of food production, since the principal cultures used for this, are soybean, corn, sugarcane, sunflower and oilseed rape. In this way, the development of the potential of cultures that are not employed for food industry is very important. Crambe (*Crambe abyssinica*) shows a high potential for the biodiesel industry, due to its precocity (can be harvested around 90 days), elevated productivity (1000 and 1500 kg/ha), low production cost, and a percentage of total oil around 26 and 38%. Moreover, crambe is toxic for human feeding and therefore, do not compete directly with the food industry. On the other hand, though this culture shows a great potential, there is a few informations about its production, whereas do not exist a cultivation guideline established. In this way, researches that aim enhance its production with lower costs and so the environmental impacts, are immensely relevants. The aim of this work, was to evaluate the outcome of distincts nitrogen doses on vegetal metabolism, because of, the already known, influence of this nutrient in cultures productivity and for represent a significative portion in costs involved in agricultural production. Thereby, crambe were cultivated in nutritive solution with differents nitrogen doses (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 and T4= 7,5 mM of N-NO₃⁻) in greenhouse. Each treatment was compound of 3 repetitions and during the experiment were done 2 harvests, the first one in the beginning of the flowering and the other one, in the end of the seed production (68 and 103 days after germination, respectively). The experimental design used was completely randomized desing fatorial arrangement 4 x 2 (Tre x Har). Among the obtained results, is interesting to emphasize, that there was not significative influence of the differents nitrogen doses on the seed production. Further, the treatment with the lower nitrogen dose (T1= 1mM of N-NO₃⁻) was efficient, since it enabled the obtainment of a high oil yield, comparing with the others treatments. Thereby, the results obtained in hydroponic culture indicates availability in the use of this dose for crambe cultivation, since it represents a improvement for its cultivation and decrease the costs and envirommental impacts.

Keywords: Biofuels, Hydroponic Culture, Fatty Acids.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 O Crambe (<i>Crambe abyssinica</i>)	4
2.2 Biocombustíveis	7
2.3 Nitrogênio	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Informações Gerais	13
3.2 Produção e Aclimação de Mudanças	13
3.3 Condução do Experimento	14
3.4 Análises Laboratoriais	14
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1 Plantas de Crambe ao Início do Ciclo Reprodutivo	22
4.2 Plantas de Crambe ao Fim do Ciclo Reprodutivo	35
5 CONCLUSÕES	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
7 ANEXOS	54
A – Concentrações dos Padrões e Modo de Preparo	54

1 INTRODUÇÃO

Com a instabilidade e as perspectivas futuras relacionadas ao mercado do petróleo, torna-se fundamental a busca por fontes alternativas de energia que viabilizem o atendimento da demanda. De acordo com o levantamento realizado em 2006, em relação às reservas estimadas de petróleo no mundo, é possível observar que a Arábia Saudita, o Irã e o Iraque detêm uma parcela significativa desses recursos (Connor, 2008). Essa distribuição desigual, juntamente com as tensões no âmbito político que marcam esses países, ocasiona fortes reflexos no mercado mundial de petróleo acarretando flutuações e, conseqüentemente, grandes impactos econômicos sobre outros países.

No contexto das perspectivas sobre a duração das reservas, o grupo de especialistas no ramo energético caracterizado como “pessimista” indica que até 2050 ocorrerá uma crise na produção de petróleo, entretanto, para os “otimistas” há a possibilidade de que essa crise seja mais tardia. Sobre essas diversas previsões acerca do fim do petróleo, Robert Kaufmann, um renomado economista da Universidade de Boston que atua no ramo energético, declara: “Eu não sei se devemos ser pessimistas demais, mas todos devemos concordar que há uma quantidade finita de petróleo” (Witze, 2007). Assim, o desenvolvimento de novas fontes de energia, visando diminuir a dependência mundial em relação ao mercado do petróleo, torna-se uma necessidade fundamental para o desenvolvimento de uma matriz energética segura, devido, principalmente, as incertezas que marcam esse mercado, e também pelas projeções em torno do aumento da demanda por energia pela população mundial.

Dentre as diversas fontes energéticas alternativas, a que mais tem obtido destaque em todo o mundo são os biocombustíveis. O termo biocombustível abrange os combustíveis líquidos e gasosos, utilizados no setor de transporte e obtidos, predominantemente, a partir de biomassa como, por exemplo, a cana-de-açúcar, plantas oleaginosas, biomassa florestal e outras fontes de matéria orgânica (Reijnders, 2006). Em alguns casos, os biocombustíveis podem ser usados tanto isoladamente, como adicionados aos combustíveis convencionais.

A grande aposta nos biocombustíveis deve-se ao fato de que a biomassa é a maior fonte renovável de energia existente (Jefferson, 2006). Além disso, ainda existem outros motivos que impulsionam os estudos com biocombustíveis, como suas propriedades ambientais excelentes, pois seu uso libera menores quantidades de gases relacionados ao efeito estufa e ainda, ao grande aumento no preço do petróleo, que atingiu valores recordes em 2006 e 2007 (Hill et al., 2006).

No contexto dos biocombustíveis, o Brasil se destaca devido ao seu grande potencial para produzir matéria-prima, pois é o país que possui a maior área verde cultivável do mundo e tem disponível uma mão-de-obra abundante (Bilich & Silva, 2006). O grande passo, no âmbito político, que visa o desenvolvimento desse potencial se deu no ano de 2004, com a criação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPUB). Dentre o conjunto de medidas propostas pelo programa está a introdução dos biocombustíveis na matriz energética com, por exemplo, a adição gradual de biodiesel ao óleo diesel, além do incentivo a pesquisas que visam aumentar a produtividade das espécies de plantas com potencial para fornecer matéria-prima (Rathmann et al., 2005).

As plantas mais utilizadas atualmente são a soja, o milho, a cana-de-açúcar, o girassol e a canola. Entretanto, a grande crítica em relação aos biocombustíveis é o argumento de que a utilização de plantas, que são cultivadas para fins alimentares, provocaria o desvio de parte da produção para a indústria de energia o que, conseqüentemente, poderia inflacionar os preços dos alimentos (Simioni, 2006). Dentro desse quadro, torna-se extremamente interessante a busca de fontes de biomassa que não sejam utilizadas para fins alimentares.

No ano de 2008, ocorreu a divulgação de uma planta, que não é utilizada na alimentação, com grande potencial de fornecer matéria-prima para o biodiesel. A espécie em questão é o crambe (*Crambe abyssinica*), uma planta que pertence a família das crucíferas e que dentre suas diversas vantagens pode-se destacar a precocidade (pode ser colhida por volta dos 90 dias), a alta produtividade de sementes (1000 e 1500 kg/ha), o baixo custo de produção, e um percentual de óleo total na semente que fica entre 26 e 38%. É importante ressaltar que, o óleo de crambe, além de sua utilização na indústria de biodiesel, pode ser viável em outros mercados, já que, devido ao alto percentual de ácido erúico (50 a 60%), pode ser empregado na indústria de plásticos e lubrificantes. Além disso, a torta de crambe pode ser utilizada na alimentação de ruminantes, pois contém cerca de 30 a 32% de proteína bruta (Pitol, 2008).

Entretanto, poucos trabalhos de pesquisa foram realizados com o crambe, tendo em vista seu emprego na agroenergia. Assim, abre-se um vasto campo para investigações que tenham como objetivo desenvolver as potencialidades dessa cultura. Um desses é a bioquímica de plantas que pode possibilitar um melhor entendimento sobre a interação dos fatores bióticos e abióticos com o metabolismo da planta e, conseqüentemente, uma evolução nos tratamentos culturais.

Dentre as ferramentas utilizadas nos estudos que envolvem o metabolismo de plantas, a hidroponia vem conquistando espaço ultimamente. Isso porque a hidroponia apresenta diversas vantagens em relação aos outros sistemas, já que permite determinar com precisão a importância de um dado nutriente, pois possibilita sua manipulação e, conseqüentemente, permite inferir sobre a relevância do mesmo nos processos metabólicos, como por exemplo, a produção de biomassa e o metabolismo das sementes.

Além disso, o cultivo hidropônico possibilita manter o fornecimento dos nutrientes às raízes das plantas a uma taxa constante, excluindo assim a influência exercida pelo solo nos processos de transferência iônica que ocorrem na superfície das raízes (Baligar, 1986).

Um dos principais pontos que devem ser estabelecidos na produção de crambe é sua demanda nutricional, pois não existem recomendações de adubação para esta cultura. Portanto, são necessários estudos que visem avaliar as doses adequadas dos nutrientes requeridos pelo metabolismo vegetal com o objetivo de evitar situações de deficiência ou de desperdício, o que traz sérias conseqüências à produtividade das culturas e ao ambiente.

No que diz respeito aos nutrientes requeridos pelo metabolismo vegetal, o nitrogênio (N) é geralmente um dos mais exigidos e abundantes nas plantas. Isso ocorre porque o N tem papel fundamental na constituição de moléculas que compõem as proteínas e, assim, na formação das enzimas. Além disso, este macronutriente também participa da formação de compostos indispensáveis às plantas, como purinas, pirimidinas, pafininas e coenzimas (Lehninger et al., 1995). Na agricultura, os fertilizantes nitrogenados representam uma parcela significativa dos custos de produção e, por isso, torna-se fundamental determinar as quantidades adequadas deste nutriente para cada cultura. Assim, essas investigações são importantes pois, além de evitar gastos desnecessários com fertilizantes, minimizam-se os efeitos danosos desse elemento no ambiente como, por exemplo, a poluição da água, e também torna-se viável a otimização da quantidade e qualidade da matéria-prima produzida (Abrol et al., 2007; Choudhury et al., 2007).

Deste modo, o objetivo desse trabalho é avaliar a influência de diferentes doses de N sobre aspectos do metabolismo de plantas de crambe visando à produção de biodiesel, pois assim será possível determinar, de maneira mais adequada, a dose que proporcione maior produção de grãos, de óleo nos grãos e também uma melhoria na qualidade do óleo produzido. A partir dessas informações será possível a obtenção de uma matéria-prima de melhor qualidade para a aplicação na indústria de biodiesel, bem como na alimentação de ruminantes, com seus co-produtos, além de evitar prejuízos econômicos e poluição com o uso inadequado desse nutriente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O Crambe

De acordo com dados da literatura, o crambe (*Crambe abyssinica*) pertence à família Cruciferae e é, provavelmente, originário do mediterrâneo. Essa planta é caracterizada como uma erva anual e ereta, com altura que varia de 70 a 90 centímetros (**Figura 1a**). 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 1b**) (Pitol, 2008).

As sementes de crambe encontram-se em pequenas cápsulas de coloração marrom que têm cerca de 5 milímetros de diâmetro (**Figura 1c**). 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).

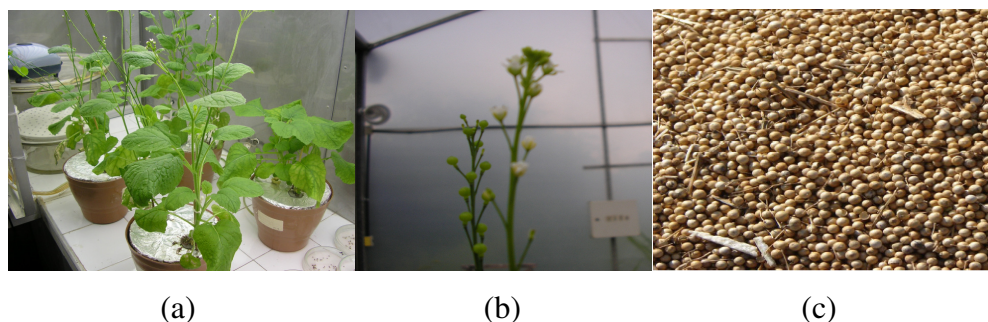


Figura 1: Crambe (*Crambe abyssinica*) em sistema hidropônico (a); A inflorescência (b), e suas sementes após a coleta (c) (Brito, 2009).

Recentemente, o crambe ganhou papel de destaque no âmbito agrônomo, por ser uma cultura altamente adaptável e, assim, possivelmente viável em diversas regiões do Brasil. 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 sub-tropical, onde a cultura apresenta melhor adaptação. Além disso, uma importante característica das plantas de crambe é a baixa ocorrência de pragas, o que diminui os custos de sua produção. A ocorrência de doenças também é baixa, estando geralmente ligadas a um aumento na umidade do solo e do ar.

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. 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, que afetam a tolerância a seca da cultura. 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). Assim, 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 de 38%, sendo também importante destacar que o óleo e o farelo são impróprios para o consumo humano (Pitol, 2008).

A composição do óleo é uma das principais vantagens econômicas do crambe. Isso se justifica devido ao alto percentual de ácido erúico, quando comparado a diversas oleaginosas comerciais (**Tabela 1**). O ácido erúico é um composto empregado na indústria como lubrificante, inibidor da corrosão, matéria-prima para a produção de borracha sintética, plástico, etc (Leonard, 1993).

Tabela 1: 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)

Ácido Graxo	Oleaginosa				
	Crambe	Canola	Dendezeiro	Girassol	Soja
Caprílico (8:0)	0	0	0,1	0	0
Cáprico (10:0)	0	0	0,1	0	0
Láurico (12:0)	0	0	0,9	0	0
Mirístico (14:0)	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
Erúico (22:1)	58 – 66	0,5	0	0	0
Brassicídico (22:1)	0,7	0	0	0	0
Tetracosanóico (24:1)	0,7	0	0	0	0
Nervônico (24:1)	1,6	0	0	0	0
Outros	2,5	0	0	0	0

Além disso, o óleo demonstra viabilidade para o uso pela indústria farmacêutica, de cosmético e, principalmente, de biodiesel (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, relatam que a influência genética foi altamente significativa sobre o metabolismo. Os autores descrevem que ocorreram diferenças marcantes em relação a taxa de emergência, a produção de sementes, a produção de óleo e na composição do óleo dos genótipos pesquisados. Em relação a 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 erúico, em diferentes condições de salinidade.

Assim, é fundamental que sejam realizados estudos sobre a interação do metabolismo do crambe com fatores ambientais e genéticos. Isso se justifica pelo seu potencial agroenergético, recentemente descoberto, e pela carência de informações sobre essa cultura.

2.2 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. O bioetanol e o biodiesel são os biocombustíveis que mais se destacam no mercado atual, entretanto, cabe ressaltar as inúmeras diferenças existentes em suas cadeias de produção.

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 2**). Tal produto pode substituir parcialmente ou totalmente a gasolina (Hahn-Hägerdal et al., 2006).

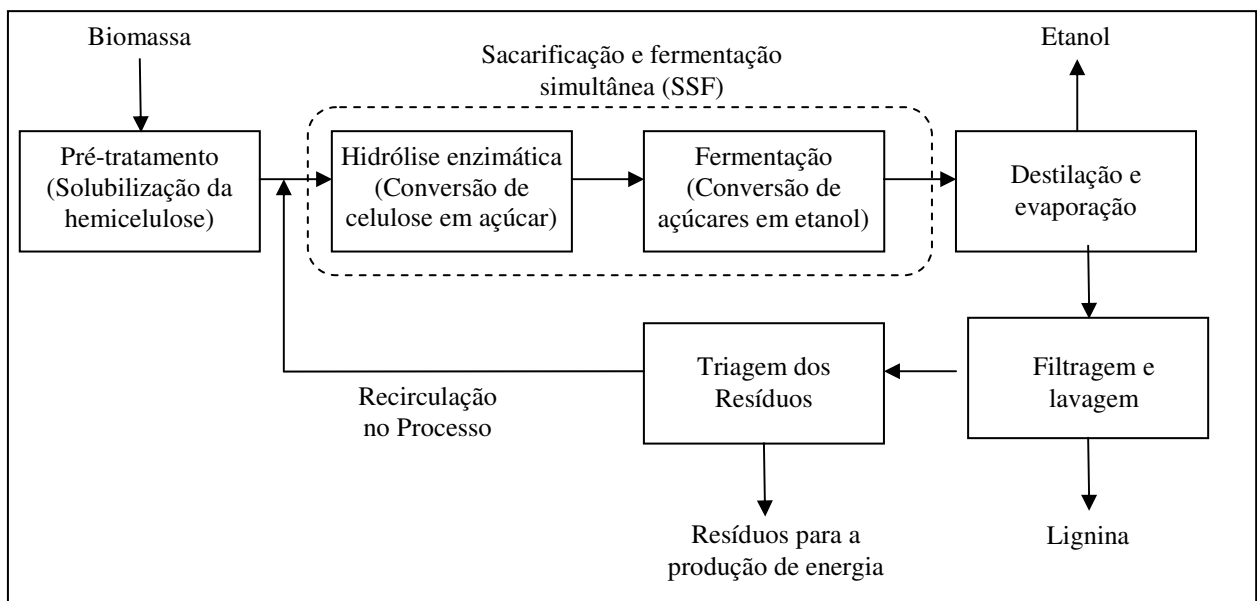


Figura 2: Esquema Representando o Processo de Obtenção do Bioetanol. Adaptado de Hahn-Hägerdal et al. (2006).

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 a glicerina e uma mistura de ésteres, denominada biodiesel (**Figura 3**). Esse biocombustível pode ser misturado ao diesel de petróleo ou utilizado integralmente (Gerpen, 2005).

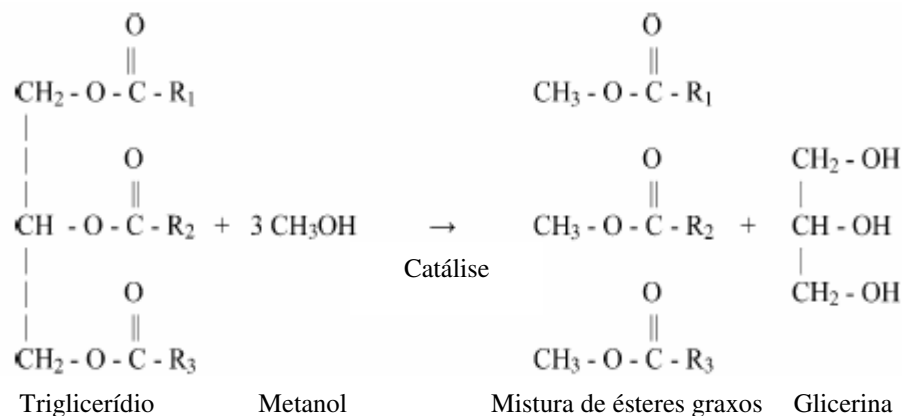


Figura 3: Reação de transesterificação. O agente catalisador pode ser uma base, um ácido ou uma enzima (Gerpen, 2005).

Cabe ressaltar também a existência do 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 pode ser usado 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 (USDA, 2005).

Dentro do cenário mundial, os biocombustíveis têm obtido cada vez mais destaque como uma alternativa para o setor de transportes, tanto do ponto vista econômico quanto social e ambiental. No âmbito econômico, a principal causa é o mercado do petróleo que, cada vez mais, demonstra instabilidade e inviabilidade. Isso é constatado no freqüente aumento no preço do barril de petróleo, que superou a marca recorde dos 100 dólares no ano de 2008 (Guandalini, 2008). A grande instabilidade desse mercado é ocasionada pelo alto protecionismo dos países que detêm as maiores reservas e, também, pela situação política dos mesmos. Um fator que também agrava a instabilidade é o conhecimento de que a quantidade de petróleo disponível diminui a cada ano, com projeções que caracterizam o fim das reservas em 50 anos, somado ao fato de que o número de carros movidos a derivados de petróleo aumenta em todo o mundo (Demirbas, 2000; Sheehan et al., 1998a).

Do ponto de vista social, a grande importância dos biocombustíveis na matriz energética do Brasil, esta na perspectiva de 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 e na Amazônia temos a possibilidade de desenvolver a agroenergia a partir das culturas de mamona e de palma, plantas com grande potencial para esse fim e bem adaptadas a essas regiões. A mamona também apresenta-se como uma opção para as regiões do semi-árido, uma das regiões mais pobres do Brasil (Pousa et al., 2007).

Entretanto, o desenvolvimento social só poderá ocorrer se existirem ações políticas que visam a dar-lhe sustentabilidade. Neste aspecto, o governo decretou 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).

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 implementação 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 a 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 a questão 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 a implementação dos biocombustíveis pode trazer problemas como, a substituição de florestas nativas, inflação nos preços dos alimentos, maior liberação de compostos nitrogenados na atmosfera e desertificação (WWF, 2006).

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.

2.3 Nitrogênio

Na natureza, o nitrogênio ocorre em abundância sob a forma de gás, representando aproximadamente 78% da composição da atmosfera terrestre. Esse elemento também é encontrado em todos os organismos vivos, estando na constituição de aminoácidos, ácidos nucleicos, neurotransmissores, hormônios e outros metabólitos.

O nitrogênio é um dos elementos exigidos em maiores quantidades pelas plantas, sendo um dos nutrientes que limitam o crescimento. Para as plantas, entretanto, o nitrogênio atmosférico não se encontra disponível, devido a baixa reatividade da molécula de N₂. Assim, as formas de nitrogênio que são preferencialmente absorvidas pelas plantas são o nitrato e o amônio, disponibilizados, em sua maior parte, por meio da fixação biológica. No processo de absorção, o nitrato é translocado por um sistema de simporte com dois prótons, enquanto o amônio segue através da membrana por um sistema de transporte caracterizado como uniporte (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 nitrito redutase (NiR). Vale ressaltar, a participação essencial de co-fatores nessas reações, como o NAD⁺ (NR) e a ferredoxina (NiR). O amônio resultante segue pela chamada via GS-GOGAT onde será incorporado a um esqueleto de carbono preexistente, podendo seguir diversas rotas (Oaks & Hirel, 1985).

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.

Assim, são importantes os estudos que visam viabilizar uma aplicação adequada de nitrogênio em uma determinada cultura, pois erros nesse processo podem trazer desvantagens econômicas e ambientais. Isso se justifica devido ao fato de que, o uso inadequado de nitrogênio inorgânico, pode ocasionar sérios problemas ambientais. Camargo & Alonso (2006) analisando essa questão, 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 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Informações Gerais

O experimento foi conduzido em sistema hidropônico localizado na casa de vegetação do Departamento de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Durante o experimento, as plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) foram submetidas a diferentes doses de nitrogênio na solução nutritiva (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻). Os demais nutrientes foram fornecidos nas quantidades propostas por Hoagland & Arnon (1950) para ½ força iônica. Cada tratamento foi composto por 3 repetições e ao longo do experimento foram realizadas 2 coletas, sendo a primeira no início da floração e a segunda no fim da produção de sementes (aos 68 e 103 dias após a germinação, respectivamente). Utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 2 (Trat x Col). Assim, durante o experimento foram utilizadas um total de 24 plantas.

Após as coletas, foram realizadas análises laboratoriais visando determinar aspectos relacionados ao metabolismo da planta. Os dados obtidos foram submetidos a análise estatística de Tukey a 5% de significância e comparados com dados provenientes da literatura.

3.2 Produção e Aclimação de Mudanças

Sementes comerciais de crambe (*Crambe abyssinica*) foram 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, executou-se a semeadura em sementeiras contendo uma mistura de substratos (terra, húmus e argila na proporção 40%, 30% e 30%, respectivamente) devidamente esterilizados, em câmara de crescimento. Em cada célula da sementeira foram acomodadas duas sementes que foram irrigadas com água destilada diariamente e, eventualmente, com solução nutritiva a ¼ da força iônica.

Ao atingirem cerca de 10 cm de altura, as mudas foram transportadas para a casa de vegetação, permanecendo por cinco dias em aclimação, sob sombrite, o que provocou redução de 50% na intensidade luminosa. Após essa etapa, ocorreu a retirada do sombrite e o transplântio das mudas para os vasos, onde permaneceram por uma semana em aclimação com solução nutritiva modificada (Hoagland e Arnon, 1950) com 2 mM de N-NO₃⁻ e os demais nutrientes a ½ de força iônica. Ao final da semana, a solução foi trocada pelas soluções referentes aos tratamentos propostos.

3.3 Condução do Experimento

O experimento foi conduzido em um sistema hidropônico composto por 24 vasos ligados a um sistema de bombeamento de ar, o que possibilitou a oxigenação da solução nutritiva. Em cada vaso foi acondicionada uma planta, assim, cada tratamento esteve representado por um conjunto de seis vasos, sendo três para cada coleta.

Semanalmente, foi realizada a troca da solução nutritiva e, a cada dois dias, a manutenção do pH e do volume de solução. A correção do pH foi realizada para 6 através da deposição de ácido (H_2SO_4) ou base (KOH), ambos na concentração de 0,01 N. A manutenção do volume de solução foi realizada a cada dois dias através da adição de água destilada.

A primeira coleta foi realizada no fim da fase vegetativa, marcada pelo aparecimento das primeiras flores, e a segunda coleta após a maturação fisiológica das sementes.

3.4 Análises Laboratoriais

Após cada coleta, as plantas tiveram suas raízes, caules, folhas (e grãos quando presentes) separados e os pesos frescos determinados. De cada amostra (parte) foi analisada a atividade da nitrato redutase (Javorsky, 1971). Além disso, foram separadas subamostras (0,5 grama) 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 e Cocking, 1955), $N-NH_4^+$ (Felker, 1977), $N-NO_3^-$ (Cataldo et al., 1975) e açúcares solúveis (Yemm e Willis, 1954). O material vegetal restante foi submetido a secagem e, posteriormente, pesagem visando determinar a massa seca de cada parte da planta. Em seguida, o material seco foi submetido a trituração e digestão (Tedesco, 1982). O extrato obtido foi utilizado para as análises de nitrogênio, fósforo e potássio (Tedesco, 1982).

Os grãos coletados foram submetidos a secagem e tiveram o óleo extraído em aparelho extrator de sohxlet durante 4 horas com hexano (Yaniv et al., 1998; Hagemann et al., 1961). 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.

Para o processo de análise do perfil por cromatografia gasosa foi previamente realizada a conversão dos ácidos graxos das amostras em seus respectivos ésteres metílicos (Metcalf et al., 1966). Os ésteres metílicos obtidos foram submetidos à Cromatografia Gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM) que indicaram a composição e o percentual relativo de ácidos graxos de cada amostra. As metodologias são descritas a seguir:

3.4.1 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 KNO_3 (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 graus Celsius. 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, adicionou-se 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 a 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.

3.4.2 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-hidríndeno) (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 (5 mL) 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 a reação colorimétrica e determinou-se sua absorvância, conforme o descrito anteriormente.

3.4.3 Dosagem de N-NH₄⁺

Para a dosagem de N-amônio (Felker, 1977), alíquotas de 0,5 mL das amostras de extrato alcoólico foram submetidas a 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 elevados 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 utilizado 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 o descrito anteriormente.

3.4.4 Dosagem de N-NO₃⁻

Na determinação dos teores de N-nitrato (Cataldo et al., 1975) foram utilizadas alíquotas de 0,05 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, adicionou-se o Hidróxido de Sódio 2N. Após realizar uma nova agitação, a absorvância a 410 nanômetros foi determinada em espectrofotômetro.

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

3.4.5 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 depositada 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 graus Celsius por 10 minutos. Posteriormente, os tubos foram esfriados e de seu conteúdo foi determinada a absorvância a 620 nm que, posteriormente, foi comparada ao padrão de glicose.

3.4.6 Digestão sulfúrica

Para a digestão sulfúrica (Tedesco, 1982), 200 mg de amostra vegetal seca e moída foi transferida para tubo de digestão. Posteriormente, adicionou-se lentamente H_2O_2 30% (1,0 mL), H_2SO_4 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 Na_2SO_4 (100 g), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (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.

3.4.7 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 H_2SO_4 0,05 N padronizado com TRIS. O volume de ácido sulfúrico gasto para a titulação foi anotado visando os cálculos para a determinação do N-total

3.4.8 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 verificada a absorvância a 420 nanômetros em espectrofotômetro.

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

3.4.9 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 a análise por fotometria de chama.

3.4.10 Análise do óleo

O procedimento para a análise do óleo proveniente das sementes de crambe é constituído por três etapas, são elas: preparo para extração, extração e análise quantitativa e pré-tratamento para cromatografia visando viabilizar a análise por cromatografia gasosa acoplada ao espectômetro de massa, conforme descrito a seguir

3.4.10.1 Preparo para extração

Após a coleta, as sementes de crambe foram pesadas e, posteriormente, submetidas a secagem em estufa a 70°C por uma noite. No dia seguinte, as sementes foram submetidas a uma nova pesagem e colocadas na estufa a 70°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 seria repetido. Após atingir o peso constante, as sementes foram colocadas em almofariz devidamente forrado com papel filtro e realizou-se a trituração até que as sementes estivessem fracionadas. O papel filtro contendo as sementes foi aproveitado para a elaboração de um cartucho necessário ao processo de extração do óleo (Yaniv et al., 1998).

3.4.10.2 Extração e análise quantitativa

Em extrator de Soxhlet colocou-se o cartucho contendo as amostras de sementes e foi iniciada a extração durante 4 horas com 200 mL de Hexano. A temperatura da manta foi ajustada para, aproximadamente, 60°C. Após esse processo, o conteúdo do balão foi recolhido e evaporado em rotoavapor por 2 horas a 55°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 foi colocado em banho Maria a 40°C durante 30 minutos 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 houvesse 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 da análise cromatográfica (Hagemann et al., 1961).

3.4.10.3 Análise do Perfil do Óleo - pré-tratamento para cromatografia

Para análise a ser executada foram separadas alíquotas de 150 mg de material lipídico para o processo de metilação. Em tubos de ensaio contendo as amostras adicionou-se 4 mL de hidróxido de sódio em meio metanólico 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 5 mL de BF₃-metanol e foi realizada a fervura em banho-maria por 2 minutos. Após esfriar, as soluções obtidas foram particionadas com 20 mL de éter de petróleo. Após agitar vigorosamente por 1 minuto visando otimizar 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 etílica e foi coletada em balão volumétrico de 10 mL passando-a por papel filtro. 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 cromatográfica (Metcalf et al., 1966).

A análise dos ésteres metílicos foi realizada através de três injeções das amostras e padrões (1 µL) em cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM-Varian-Modelo Saturn 2000). Os padrões foram devidamente pesados (1 mg) e dissolvidos em diclorometano (5 mL). As condições da análise foram as seguintes: coluna capilar de sílica fundida (vf-5MS; 30mx 0,25mmx0,25µm); gás Carreador: hélio; fluxo 1 mL/min; Temperatura (200°C/1' - 5°C/min - 290°C/10'); Injetor: 240°C; EM: Trap: 210°C; Manifold: 60°C; Trxline: 250°C e método de impacto de elétrons (70 eV).

Os ésteres metílicos das amostras foram identificados por comparação entre os tempos de retenção e padrões de fragmentação com os dos seus respectivos padrões isolados. Além disso, foram utilizados também, para auxiliar na identificação, os padrões de fragmentação pertencentes a biblioteca NIST (2004). Os ésteres metílicos dos ácidos erúico e tetracosanóico foram identificados somente por biblioteca.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Plantas de Crambe ao Início do Ciclo Reprodutivo

As diferentes doses de nitrogênio, sob a forma de nitrato, fornecida pelos tratamentos propostos resultaram em reflexos na produção de massa fresca das folhas (**Figura 4**). O tratamento 4 (7,5 mM de N-NO_3^-) acarretou um aumento significativo na produção massa de folha quando comparado ao tratamento 1 (1 mM de N-NO_3^-). Os resultados de peso seco também demonstraram o mesmo comportamento quando comparados aos dados de massa fresca (**Figura 5**). Esse padrão indica que não houve diferença entre as plantas submetidas aos tratamentos no que diz respeito, principalmente, ao percentual de água nos tecidos.

Os resultados demonstram a diferença na produção de massa fresca de folhas, observada entre os tratamentos com a menor e maior dose de nitrato. Provavelmente, esta diferença tenha relação com uma variação nos comportamentos dos diversos aspectos do metabolismo.

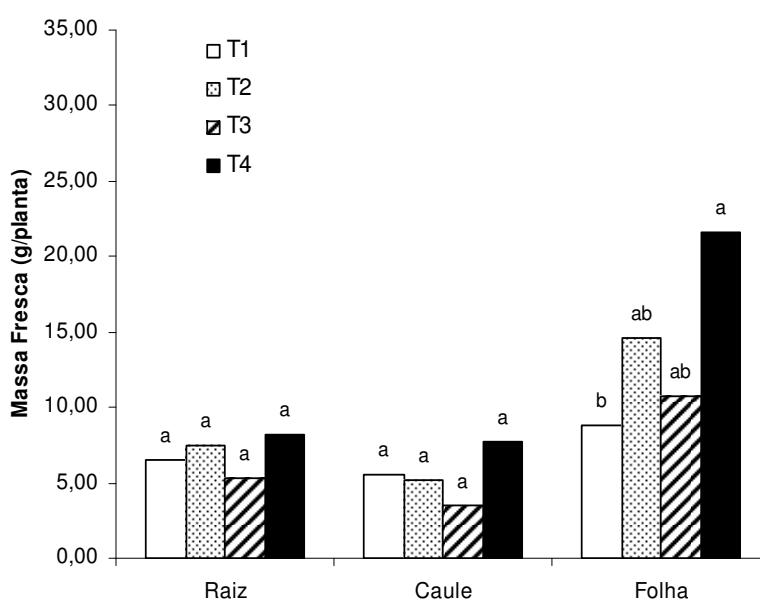


Figura 4: Produção de massa fresca em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) coletadas no início da floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

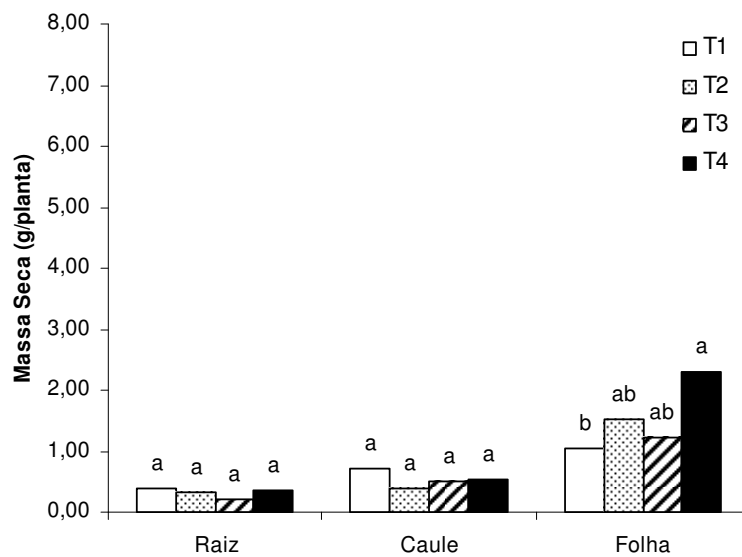


Figura 5: Produção de massa seca em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas no início da floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

De maneira geral, os processos envolvidos no metabolismo do nitrogênio, considerando-se a captação desse nutriente pelas raízes das plantas e sua utilização para a formação de aminoácidos, podem ser divididos em absorção, redução e assimilação. No que diz respeito a absorção, vale destacar que o nitrogênio é principalmente captado pelos sistemas de transporte sob a forma de nitrato (NO₃⁻) ou de amônio (NH₄⁺). É importante ressaltar que o amônio captado não necessita ser reduzido e, portanto, pode ser prontamente assimilado. Esses sistemas de absorção apresentam alta especificidade e, do ponto de vista cinético, demonstram sensibilidade em relação a quantidade exógena desses compostos tendendo a exibir um aumento da atividade com sua maior disponibilidade (Souza & Fernandes, 2006).

Assim, é esperado que com a ampla variação na concentração de nitrogênio, sob a forma de nitrato, disponível na solução nutritiva tendo em vista os diferentes tratamentos, ocorra também uma variação na quantidade de nitrato absorvida.

Na **Figura 6**, são apresentados os teores de nitrato nas diferentes partes da planta. A partir da análise do gráfico, é possível observar que os maiores teores de nitrato foram encontrados nos tratamentos que disponibilizaram as maiores quantidades desse composto na solução nutritiva. Dessa forma, é possível estimar que a relação conhecida entre a maior atividade do sistema de absorção acarretada pelo aumento da disponibilidade desse nutriente esteja estabelecendo-se.

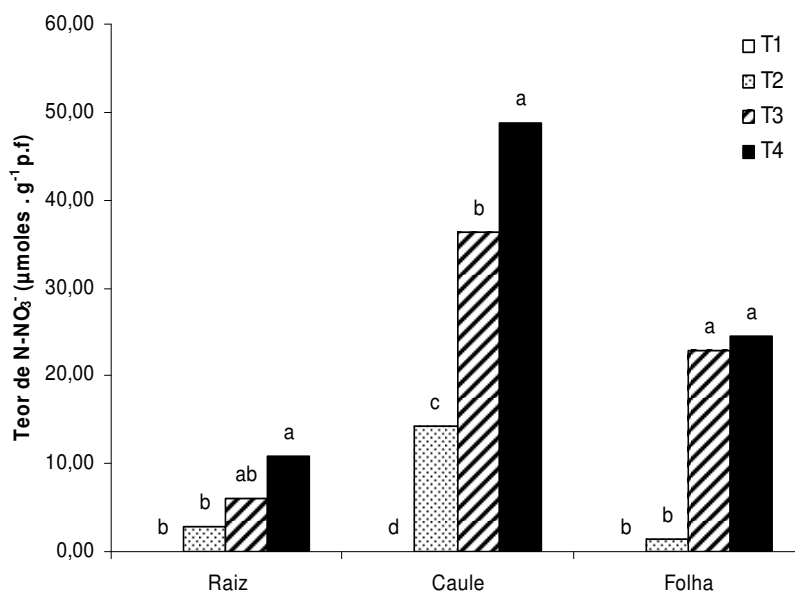


Figura 6: Teores de N-nitrato em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas no início da floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Também é possível observar que, entre as plantas submetidas aos tratamentos 3 e 4, não houve diferença significativa em relação aos teores de nitrato encontrados em raízes e folhas. Entretanto, isso não ocorreu em relação aos teores observados no caule, onde o tratamento 4 proporcionou um aumento desse nutriente em relação aos demais tratamentos. Essa grande diferença nos teores de nitrato pode estar ligada ao fato de que nessa planta, o caule esteja funcionando como um órgão de armazenamento desse nutriente.

Nesse contexto, 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.

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 provável que o caule de plantas de crambe exerça um papel chave no armazenamento de nitrato. 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 (Crawford, 1995).

A análise do conteúdo total de nitrato, em cada parte da planta, frente aos diferentes tratamentos, também evidencia o acúmulo desse nutriente no caule das plantas submetidas ao tratamento 4 (**Tabela 2**). Além disso, é possível observar que na raiz não houve variação significativa nesse conteúdo, diferentemente do que foi observado em relação aos teores de nitrato. Provavelmente, esse resultado está ligado ao fato de que não houve diferença, entre os tratamentos, no que diz respeito à produção de massa fresca e seca na raiz.

Tabela 2: Conteúdo de nitrato em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) ($\mu\text{moles. parte da planta}^{-1}$) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3=5,0 e T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) coletadas ao início do período de floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Tratamentos	Dose de N-NO_3^- (mM)	Conteúdo de Nitrato ($\mu\text{moles. parte da planta}^{-1}$)		
		Raiz	Caule	Folha
T1	1	0,00A	0,00C	0,00C
T2	2,5	15,2A	77,9BC	26,5C
T3	5,0	19,7A	132,1B	221,1B
T4	7,5	67,1A	356,7A	493,5A

Após a absorção do nitrato, além de armazenado, esse nutriente pode ser reduzido e, posteriormente, incorporado aos esqueletos de carbono levando à formação de aminoácidos. Para o processo de redução é primordial que ocorra a catálise realizada pela enzima nitrato redutase (NR) que converte o nitrato em nitrito que, por sua vez, pode ser transformado em amônio pela nitrito redutase (NIR) (Oaks & Hirel, 1985).

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 os maiores valores na folha, o que contribui para a hipótese de que o caule esteja funcionando, preferencialmente, como um órgão de armazenamento de nitrato (**Figura 7**). Entretanto, sua atividade não foi proporcional a quantidade de nitrato disponível na solução nutritiva.

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).

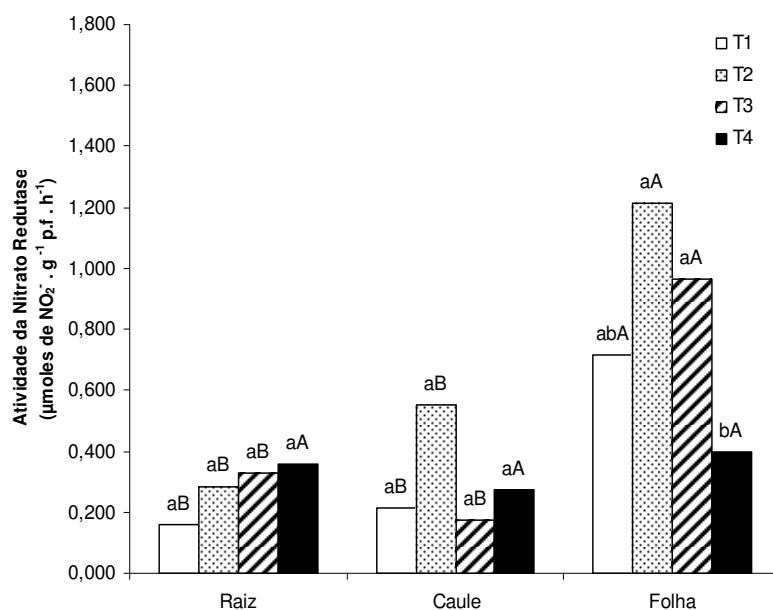


Figura 7: Atividade da nitrato redutase em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas no início da floração. Letras minúsculas iguais em uma mesma parte da planta indicam diferença não significativa. Letras maiúsculas iguais em um mesmo tratamento indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

A partir da análise da atividade da nitrato redutase, é possível observar que as folhas das plantas submetidas ao tratamento onde disponibilizou-se a maior dose de nitrato na solução nutritiva (T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻), exibiu uma menor atividade quando comparada com os valores exibidos nos tratamentos 2 e 3.

Esse resultado pode estar relacionado ao fato de que o nível de nitrato disponibilizado no tratamento 4 esteja influenciando significativamente os mecanismos de armazenamento a ponto de elevar a relação armazenamento/redução. Conseqüentemente, tal processo estaria contribuindo para reduzir a quantidade de nitrato no reservatório metabólico das folhas em detrimento a um aumento do reservatório de reserva desse órgão e do caule. Isso explicaria o maior teor de nitrato encontrado no caule das plantas submetidas ao tratamento 4 juntamente com a menor atividade da nitrato redutase observada na folha, pois uma diminuição relativa no reservatório metabólico acarretaria uma menor atividade da nitrato redutase local.

O ponto central desse efeito pode estar relacionado aos teores de aminoácidos. Nesse sentido foi observado que os tratamentos exerceram forte influência sobre os teores de aminoácidos das folhas, com destaque para o maior teor encontrado nas plantas submetidas ao tratamento 4 (**Figura 8**). De acordo com Oaks et al. (1977) os aminoácidos atuam como reguladores indiretos da atividade da nitrato redutase e isso poderia estar relacionado a sua capacidade de modificar a distribuição de nitrato nos reservatórios da célula, conseqüentemente, interferindo no processo de ativação. Os autores destacam que o aumento nos teores de aminoácidos do meio podem provocar a inibição da atividade da nitrato redutase. Assim, a baixa atividade da enzima observada nas folhas submetidas ao tratamento 4 pode estar ligada aos maiores teores de aminoácidos presentes.

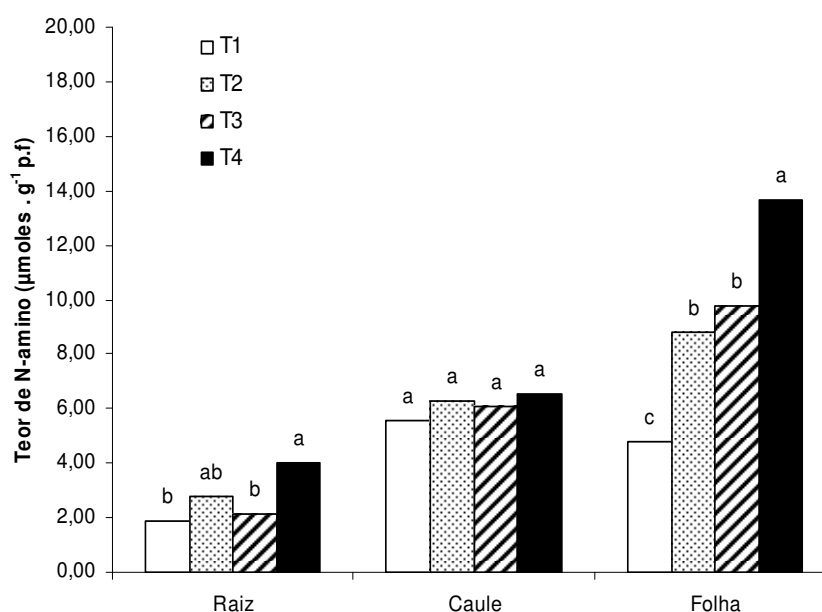


Figura 8: Teores de N-amino em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas no início da floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Além disso, vale ressaltar que esse resultado provavelmente está ligado aos maiores valores de massa fresca exibido pelas plantas submetidas ao tratamento 4, já que os aminoácidos representam um substrato fundamental para a síntese protéica. Assim, a maior disponibilidade de aminoácidos promove incremento nos processos de síntese de proteínas e, conseqüentemente, na produção de biomassa.

Após os processos envolvidos com a absorção do nitrato e sua redução a amônio, a célula pode iniciar as etapas relacionadas a incorporação do nitrogênio em esqueletos de carbono visando a síntese e aminoácidos.

Entretanto, vale destacar que o amônio apresenta alta toxicidade quando comparado com o nitrato e, por isso, seus níveis devem ser estritamente controlados. A **Figura 9** destaca que não houve diferença entre os níveis de amônio nas plantas submetidas aos diferentes tratamentos. É importante ressaltar que nesse experimento não foi fornecido suprimento de amônio na solução nutritiva, pois a família brassicaceae encontra-se situada entre as famílias que englobam espécies mais suscetíveis a intoxicação por amônio (Britto & Kronzucker, 2002).

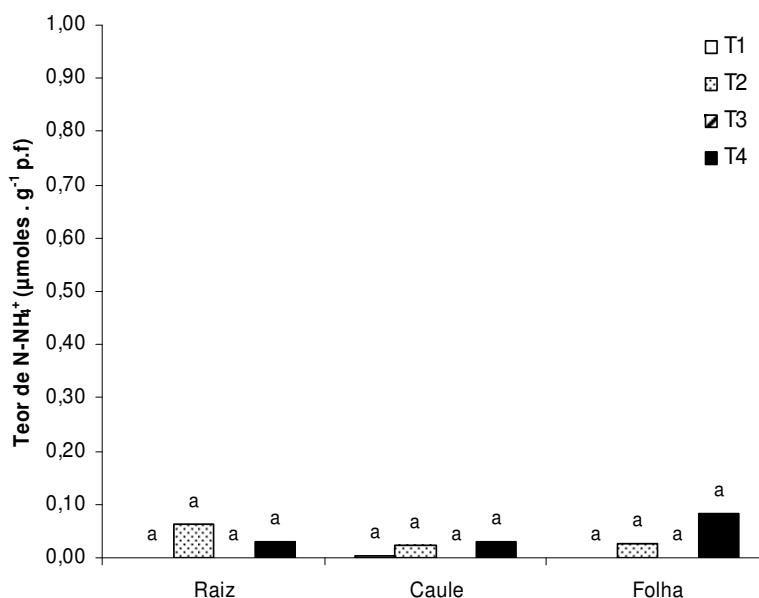


Figura 9: Teores de N-amônio em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas no início da floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Em relação aos teores de açúcares solúveis, é possível destacar que os tratamentos não exerceram efeito significativo na raiz, entretanto, no caule e na folha isto ocorreu (**Figura 10**). No caule, o tratamento com a menor dose de nitrato (T1= 1 mM de N-NO₃⁻) contribuiu para o maior teor desse composto enquanto os tratamentos com as maiores doses (T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) ocasionaram os menores níveis. Em relação a folha os resultados foram semelhantes indicando que em ambos os casos os maiores níveis de nitrato na solução contribuíram para uma redução no teor de açúcares solúveis.

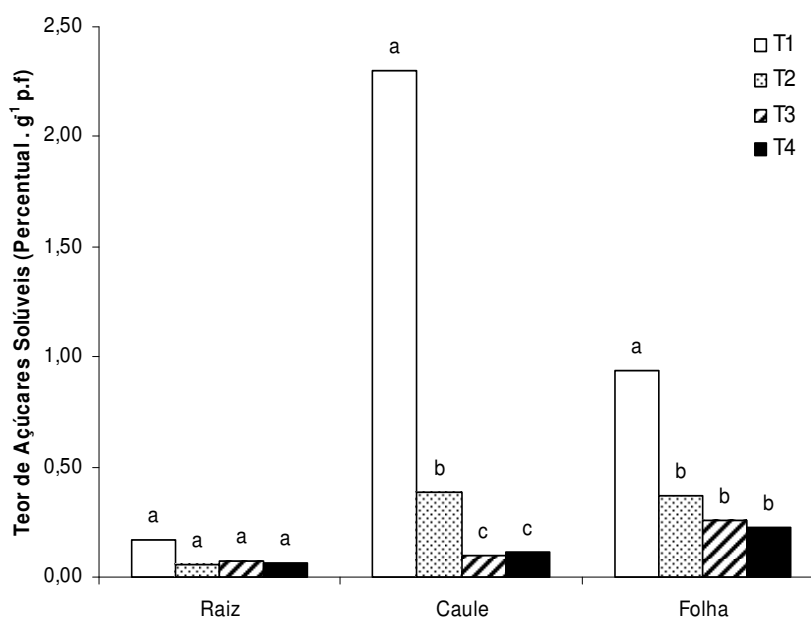


Figura 10: Teores de Açúcares Solúveis em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas no início da floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Esse comportamento pode ser justificado devido a maior utilização de esqueletos de carbono, provenientes da degradação de açúcares, nos processos de assimilação do nitrogênio para a síntese de aminoácidos. Assim, o menor suprimento de nitrato fornecido pelo tratamento 1 acarretou uma redução no uso desses esqueletos de carbono e, conseqüentemente, na síntese de aminoácidos na folha.

É importante observar também que o teor de açúcares solúveis no caule das plantas submetidas ao tratamento 1 foi elevado. Por outro lado, os níveis de N-amino nesse órgão não apresentaram variação entre os tratamentos. Esses indícios apontam para a hipótese de que o caule também exerça um papel importante no armazenamento de açúcares.

A análise do teor de fósforo nas diferentes partes da planta demonstrou que houve pouca variação nesse quesito em relação aos tratamentos executados (**Figura 11**). Na raiz e no caule, os dados demonstram que não houve influência significativa da variação de nitrato na solução nutritiva sobre os teores de fósforo. Na folha, é possível destacar que o tratamento com a menor dose de nitrato (T1= 1 mM de N-NO_3^-) acarretou uma diminuição significativa dos teores de fósforo em relação aos demais tratamentos.

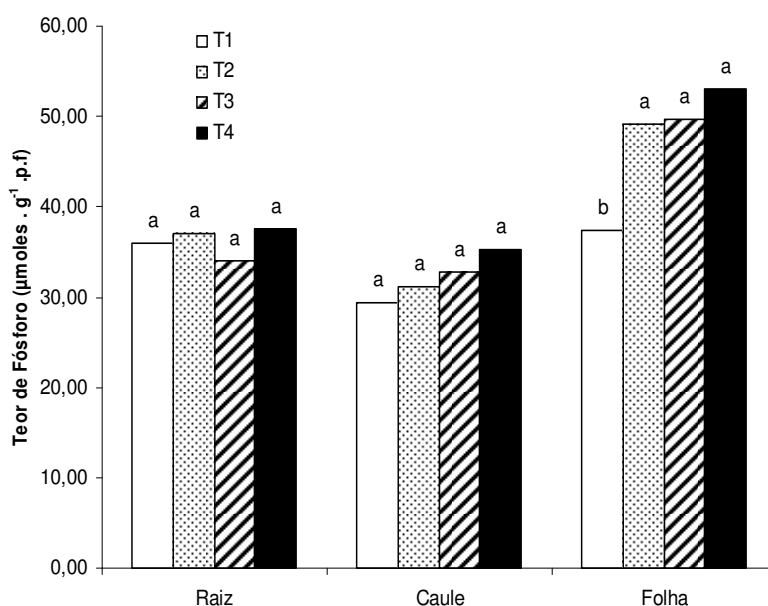


Figura 11: Teor de fósforo em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) coletadas no início da floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

De acordo com Araújo & Machado (2006), o fósforo é um nutriente que encontra-se relacionado com os processos de transferência de energia na célula, principalmente, por estar na constituição do ATP. Assim, como a demanda por ATP nos processos de síntese é significativa, o menor teor de fósforo nas folhas das plantas submetidas ao tratamento 1, pode estar relacionada ao menores teores de N-amino encontrados nessas amostras.

Isso se justifica, devido a uma menor demanda por energia nessas plantas nas vias de síntese de aminoácidos, em função da menor disponibilidade de nitrato na solução em relação aos demais tratamentos.

Nesse contexto, deve-se ressaltar, em especial, os custos energéticos envolvidos no processo de redução e assimilação do nitrato. Durante estas 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, a diferença observada em relação as maiores teores de fósforo nas folhas das plantas submetidas aos tratamentos com as maiores doses de nitrato (T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) esta relacionada, possivelmente, com a maior demanda por energia para os processos de redução do nitrato, assimilação do amônio e, posteriormente, síntese de proteínas.

A análise dos teores de potássio nas diferentes partes das plantas de crambe demonstra um padrão ligeiramente regular de influência entre dos tratamentos (**Figura 12**). Na raiz e na folha, é possível observar que os tratamentos 1 e 3 resultaram nos maiores teores de potássio. No caule, a influência é semelhante em relação ao observado para os outros órgãos. Apesar da semelhança observada no padrão dos teores de potássio nas diferentes partes da planta, é possível que os fenômenos para tal constatação tenham fundamentos diferentes.

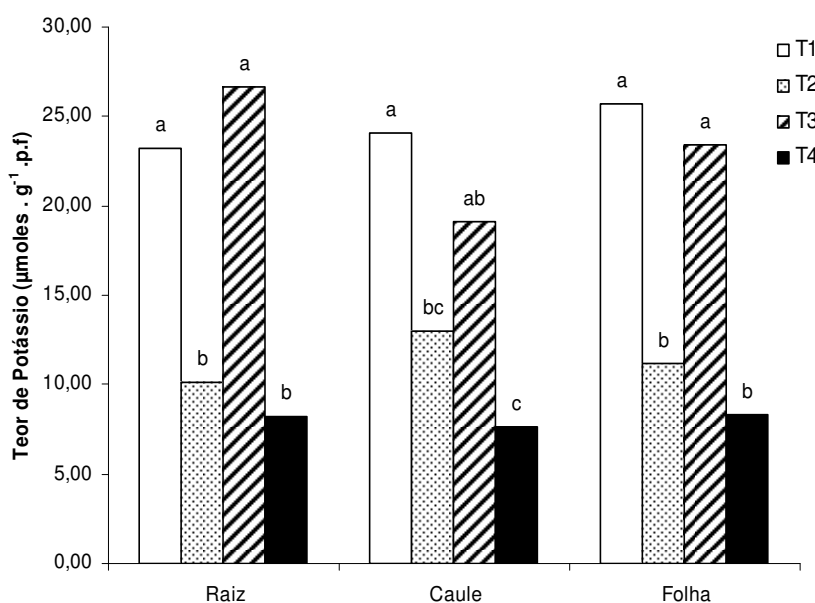


Figura 12: Teor de Potássio em raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas no início da floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Os altos teores de potássio encontrado nas plantas submetidas ao tratamento 1 podem ter ligação com a variação do pH do meio (**Figura 13**). Os dados relacionados a variação do pH na solução nutritiva, ocorrida após o início das aplicação dos tratamentos, demonstram um comportamento similar nas parcelas referentes aos tratamentos 2, 3 e 4. Entretanto, na solução nutritiva referente ao tratamento 1 foi observada uma tendência a acidificação a partir dos 13 dias. Esse comportamento pode ter ligação direta com a dose de nitrato disponibilizada nesse tratamento, pois o mecanismo de acidificação do meio, por meio da extrusão de prótons, pode ser utilizado pelas plantas visando otimizar a absorção de nitrato, uma vez que esse processo é realizado através de simporte com 2 H^+ (Souza & Fernandes, 2006).

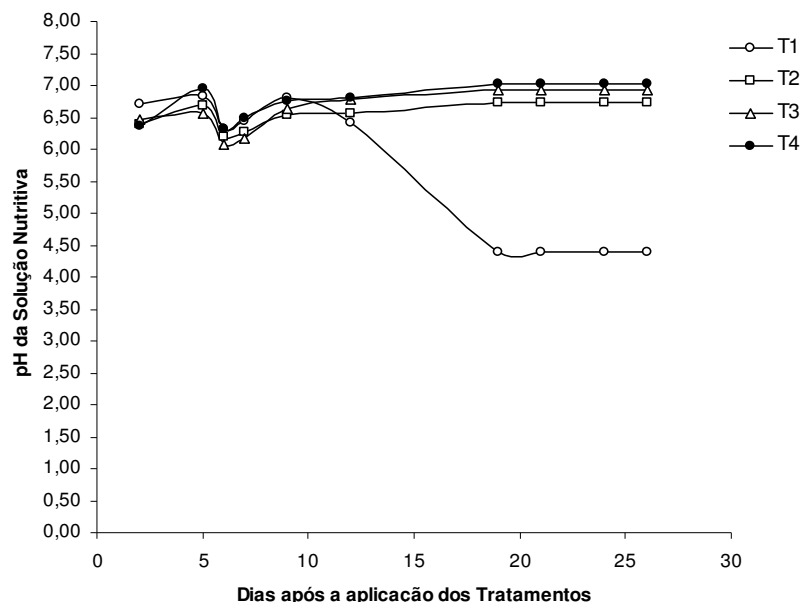


Figura 13: Variação do pH da solução nutritiva usada no cultivo de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) em função dos dias após o início da aplicação dos tratamentos até o período da floração.

Em consequência dessa variação do pH na solução nutritiva das plantas submetidas ao tratamento 1, poderia ter ocorrido um aumento na absorção de potássio. De acordo com Hoth et al. (1997), os canais responsáveis pela absorção de potássio possuem um resíduo de histidina, altamente conservado nas plantas, que encontra-se relacionado a resposta desses canais a alterações no pH. Esse resíduo localiza-se na região do poro próximo ao filtro de seletividade e, com a diminuição do pH, exibe resposta que tem como consequência o aumento do influxo de potássio para a célula. Marten et al. (1999) também relata a relação existente entre a ativação de canais de potássio com a acidificação do meio.

Assim, é plausível que a acidificação do meio, provocada pelas plantas submetidas ao tratamento com a menor dose de nitrato (T1= 1 mM de N-NO_3^-) por meio da maior extrusão de prótons, tenha ocasionado o aumento na atividade dos canais de potássio e, conseqüentemente, a maior absorção desse composto.

Em relação aos teores de nitrogênio total, em função da variação das doses de nitrato na solução nutritiva, é possível observar que ocorreu influência significativa na raiz e na folha (**Figura 14**). Conseqüentemente, o caule não exibiu variação nesses teores em função dos tratamentos. Na raiz e na folha, os dados mostram que o tratamento 1 se destaca entre os que acarretaram os menores teores de nitrogênio.

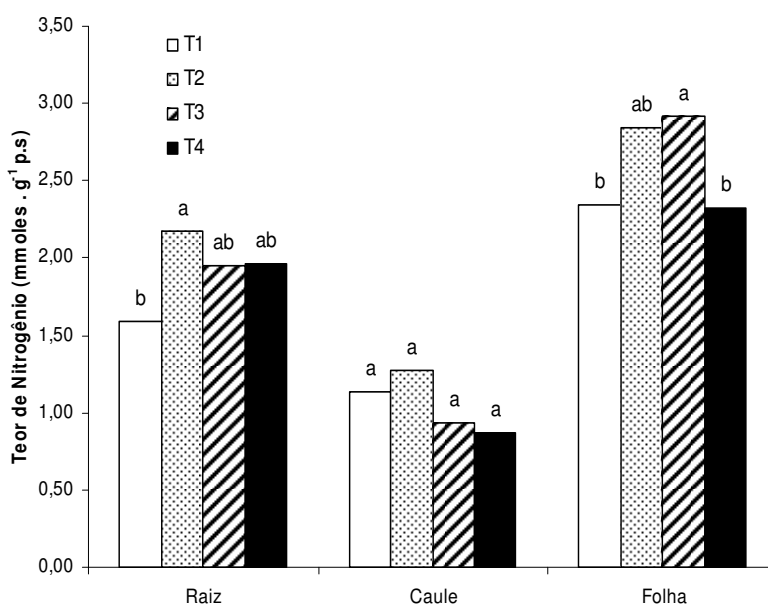


Figura 14: Teor de nitrogênio total nas raízes, caules e folhas de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5, T3= 5 e T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) coletadas no início da floração. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Esses teores exibidos pelas plantas submetidas ao tratamento 1 estão, provavelmente, relacionados com a menor disponibilidade de nitrato na solução nutritiva. Entretanto, vale ressaltar que, embora o tratamento com a maior dose de nitrato (T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) tenha exibido o mesmo comportamento quando comparado ao tratamento com a menor dose (T1= 1 mM de N-NO_3^-), os demais aspectos do metabolismo, apresentados por essas plantas, indicam motivos diferentes para esse resultado.

Nas plantas submetidas ao tratamento 4, observou-se altos valores de N-amino, N-nitrato e uma menor atividade da nitrato redutase. Esses dados sugerem que os maiores teores de nitrogênio nessas plantas não se estabeleceram, quando comparado aos teores apresentados pelas plantas submetidas ao tratamento 1, devido a supressão nos sistemas de captação desse composto. Conforme citado anteriormente, os altos valores de N-amino podem inibir a atividade da nitrato redutase e, juntamente com o acúmulo de nitrato observado nessas plantas, tem-se um quadro favorável a inibição nos sistemas de captação de nitrato.

4.2 Plantas de Crambe ao Fim do Ciclo Reprodutivo

Primeiramente, é importante destacar que as folhas de crambe entram em processo necrótico, com o avanço da fase reprodutiva, e caem próximo ao final do ciclo. Durante essa fase do experimento, foi observado que as folhas nos estágios finais de necrose representavam um foco de doenças, mesmo quando ainda encontravam-se conectadas ao caule. Esse evento, gerou a contaminação das plantas referentes ao tratamento 3 e, conseqüentemente, houve o descarte deste tratamento. Assim, ao fim da produção de sementes foram coletadas as raízes, caules e sementes das plantas de crambe, pois as folhas tiveram que ser removidas, ao atingirem os estágios mais tardios do processo necrótico, visando a preservação do experimento.

A partir da análise da produção de massa fresca observa-se que, na raiz, os diferentes tratamentos não proporcionaram variação significativa (**Figura 15**). Entretanto, no caule, foi observado que o tratamento com a maior dose de nitrato (T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) proporcionou um aumento na produção de massa fresca, quando comparado ao tratamento com a menor dose (T1= 1 mM de N-NO_3^-). Além disso, vale destacar que essa diferença não foi detectada ao início do período de florescimento (**Figura 4**), onde os tratamentos não produziram variação na produção de massa fresca de caule. Os dados de massa seca também seguiram o mesmo padrão de resposta observado para massa fresca (**Figura 16**).

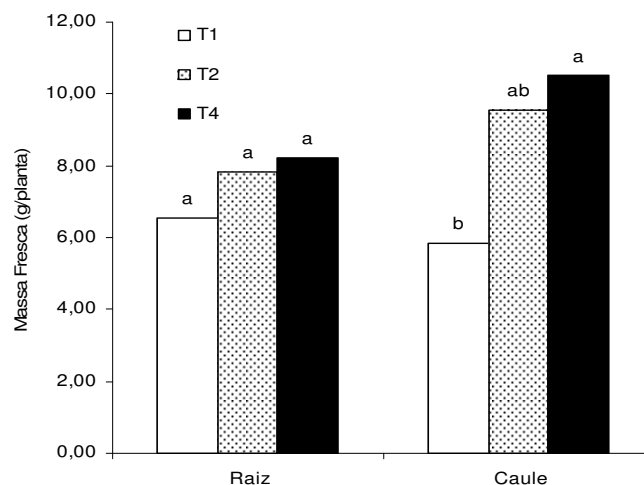


Figura 15: Produção de massa fresca em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

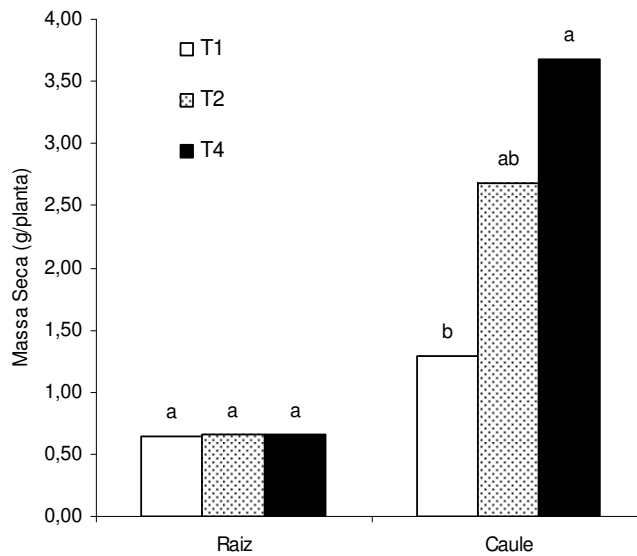


Figura 16: Produção de massa seca em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de $N-NO_3^-$) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

A variação dos valores de massa fresca e seca no caule das plantas, observado nessa etapa do desenvolvimento, está possivelmente correlacionada com as diferentes doses de nitrato disponibilizadas ao longo do experimento. Ao início do período de florescimento, foi observado que, dentre os tratamentos executados, as plantas submetidas ao tratamento 4 apresentaram o maior teor de nitrato no caule. Uma hipótese plausível, é que essa reserva possa estar sendo utilizada para os processos de síntese protéica e, conseqüentemente, refletindo-se sobre a produção de massa do caule. Outro fato importante é, logicamente, a maior dose de nitrato fornecida nesse tratamento, o que possibilitou a manutenção do suprimento tanto para uso quanto para armazenamento. Essa hipótese, pode ser melhor compreendida, a partir da análise dos teores de nitrato nas diferentes partes da planta nesta etapa do desenvolvimento (**Figura 17**).

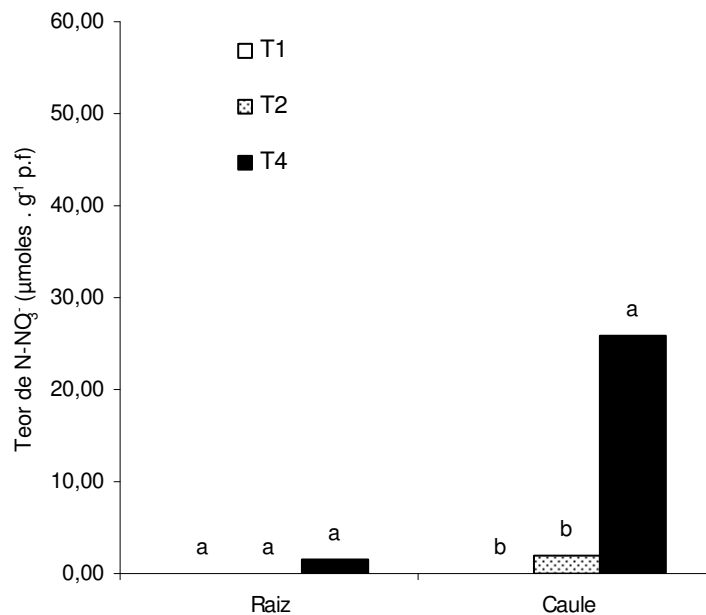


Figura 17: Teores de nitrato ($\mu\text{moles de NO}_3^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{p.f.}$) em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

A partir da análise da **Figura 17**, observa-se que não houve diferença significativa nos teores de nitrato das raízes em função dos tratamentos. Entretanto, no caule pode-se destacar que o tratamento que forneceu a maior dose de nitrato (T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) exibiu os maiores teores desse composto. Esse resultado indica que, provavelmente, o acúmulo de nitrato no caule das plantas submetidas ao tratamento 4, observado ao início da floração, esteja se refletindo sobre os maiores teores desse composto nos estágios mais tardios do desenvolvimento. É importante destacar também que, ao início da floração, esses teores encontravam-se em torno de 50 μmoles por grama de peso fresco, entretanto, ao fim da produção de sementes, é possível observar que esse valor cai aproximadamente 50%, levando-se em consideração o alto teor de nitrato fornecido nesse tratamento (7,5 mM).

Millard (1988), em seu trabalho com couve-flor (*Brassica oleracea*), observaram que o órgão preferencial para o armazenamento de nitrato é o caule e que, além disso, essa tendência pode se estender significativamente ao longo do desenvolvimento vegetal.

Assim, é plausível a hipótese de que a remobilização e o uso do suprimento externo de nitrato, tenha relação direta com o aumento de massa fresca e seca observado no caule das plantas submetidas ao tratamento 4. Isso se justifica pelo fato de que, além da maior disponibilidade de nitrato no meio, houve um consumo considerável das reservas desse composto, tendo em vista os valores observados nas duas fases de desenvolvimento avaliadas.

Outro dado importante para esse contexto é a atividade da nitrato redutase (**Figura 18**). A análise da atividade da nitrato redutase realizada nas plantas, ao fim da produção de sementes, demonstrou comportamento distintos entre os órgãos. De acordo com os dados obtidos, pode-se destacar que no caule, as plantas submetidas ao tratamento 4 evidenciaram maior atividade dessa enzima. Por outro lado, na raiz, o tratamento 1 esteve entre os que acarretaram uma maior atividade da nitrato redutase, enquanto, o tratamento 4 apresentou redução na atividade.

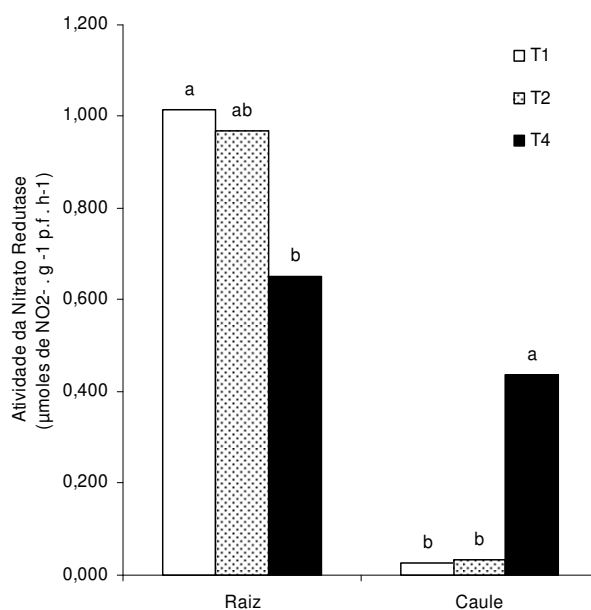


Figura 18: Atividade da nitrato redutase ($\mu\text{moles de NO}_2^- \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{p.f.} \cdot \text{h}^{-1}$) em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO_3^-) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Os dados apresentados em relação ao caule reforçam a hipótese de que as plantas submetidas ao tratamento 4 estejam consumindo o nitrato disponível e, conseqüentemente, obtendo aumento da produção de massa nesse órgão ao longo do desenvolvimento.

Em relação a raiz, os dados obtidos sugerem que, neste estágio do desenvolvimento, esse seja o principal órgão para os processos de redução do nitrato. Além disso, vale ressaltar que, a alta atividade da nitrato redutase observada nas raízes das plantas submetidas ao tratamento 1, pode estar relacionada a maior ativação de mecanismos de indução da atividade enzimática.

De acordo com o relatado por Crawford (1995), a atividade da nitrato redutase pode ser influenciada pelo níveis de açúcares da célula. Em seu experimento com *Arabidopsis thaliana*, o autor observou que a nitrato redutase tinha sua atividade aumentada após a adição de açúcares ao meio. Além disso, foi observado também um aumento na concentração do RNAm relacionado a síntese dessa enzima.

A **Figura 19** exibe os níveis de açúcares observados nas plantas submetidas ao diferentes tratamentos. Dentre as diferenças observadas, é possível destacar que o tratamento 1 (T1= 1 mM de N-NO₃⁻) provocou um maior acúmulo de açúcares na raiz e no caule quando comparado aos demais tratamentos.

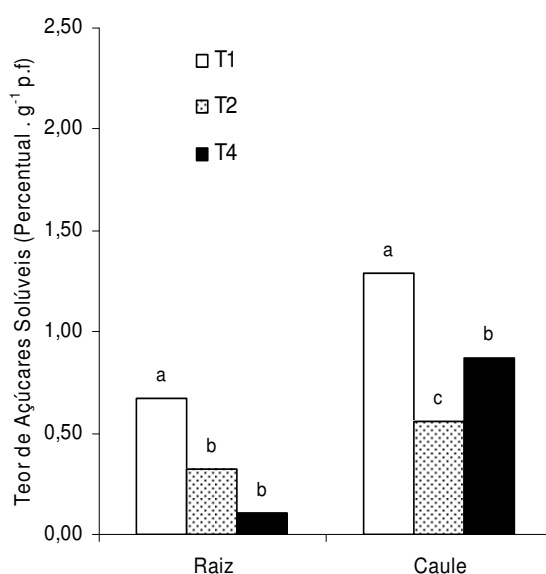


Figura 19: Teor de açúcares solúveis (%) em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Esse acúmulo, pode estar ligado a maior atividade da nitrato redutase observada nas raízes dessas plantas, pois como resultado desse processo estaria ocorrendo uma maior indução dos mecanismos responsáveis pela síntese e atividade dessa enzima. Além disso, esse acúmulo também pode estar relacionado a carência de nitrato disponível para as plantas submetidas ao tratamento 1, pois os esqueletos de carbono necessários a síntese de aminoácidos não estariam sendo utilizados.

A esse ponto, é importante ressaltar as peculiaridades que envolvem o metabolismo vegetal, durante a fase de produção de sementes, com o objetivo de buscar um melhor entendimento dos resultados. No que diz respeito a síntese de ácidos graxos nas sementes, deve-se destacar a alta dependência do processo de acetato que, via malonil-CoA, atua como substrato para a síntese de ácidos graxos. Esse processo envolve dois locais diferentes da célula vegetal, o cloroplasto e o retículo endoplasmático (Lehninger et al., 1995)

Mahon & Stumpf (1965) observaram, em experimento com plantas de cártamo (*Carthamus tinctorius* L.), uma oleaginosa rica em ácido linoléico, que os picos no consumo de acetato, juntamente com a síntese de ácido graxos, ocorrem em um curto espaço de tempo, mais precisamente de 12 a 30 dias após o florescimento, considerando um ciclo de 140 dias. Além disso, os autores destacam que, assim como a síntese de ácidos graxos, o tempo de existência de algumas das enzimas responsáveis é igualmente curto. Assim, deve-se considerar que esses eventos são importantes para uma análise adequada dos aspectos metabólicos das plantas, a essa fase do desenvolvimento, pois modificam significativamente a dinâmica metabólica do vegetal.

Os teores de amônio fornecem um indício importante em relação ao metabolismo das plantas submetidas ao tratamento 1 (**Figura 20**). De acordo com os dados apresentados, observa-se que, na raiz, o tratamento 1 provocou uma elevação nos teores de amônio. No caule, não foram observadas diferenças nesses teores.

Ao longo do ciclo de vida das plantas, deve-se considerar que picos na produção de amônio ocorrem na germinação e também durante a senescência. De acordo com Lam et al. (1996), durante o processo de senescência, as proteínas foliares são degradadas com o objetivo de fornecer, principalmente, glutamina para o desenvolvimento das sementes. Além disso, os autores também destacam que, o processo de deaminação de aminoácidos, aumenta consideravelmente as concentrações de amônio na planta nesse período.

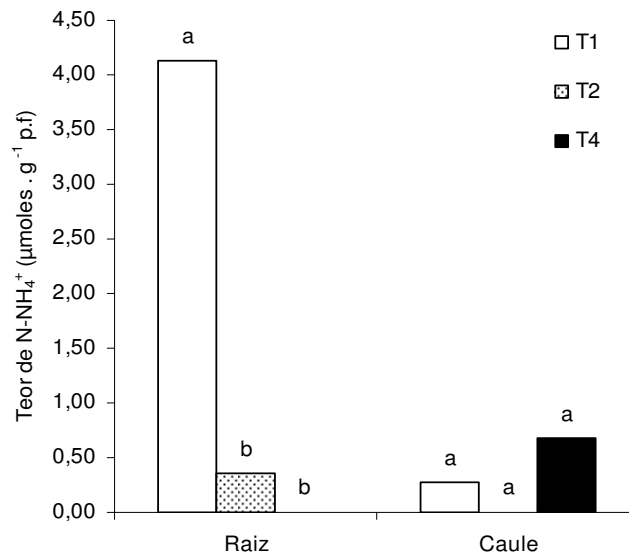


Figura 20: Teor de amônio em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Dessa forma, o aumento nas concentrações de amônio das raízes, nas plantas submetidas ao tratamento 1, pode estar ligado a vários fatores. A primeira hipótese, é que esse aumento seja consequência da alta atividade da nitrato redutase e disponibilidade de açúcares nessa parte da planta, o que teria provocado o consumo de nitrato conforme observado. Por outro lado, esse aumento nos teores de amônio pode estar ligado ao fato de que essas plantas, devido a menor disponibilidade de nitrato no meio, entraram em processo de senescência mais cedo que as demais plantas. Esse processo poderia ser responsável pelo aumento dos teores de amônio produzido pelo catabolismo de proteínas e o incremento na deaminação de aminoácidos. Entretanto, vale ressaltar que, de acordo com Souza & Fernandes (2006), a atividade das enzimas envolvidas com o metabolismo do nitrogênio tende a diminuir com o avanço da senescência. Assim, embora os teores de amônio possam indicar a aceleração da senescência, a atividade da nitrato redutase encontra-se alta, o que enfraquece essa hipótese.

Os teores de N-amino apresentados demonstram a grande influência da variação do nitrato no meio sobre esse aspecto na raiz (**Figura 21**). Os dados demonstram que, nessa parte, o tratamento 1 se destacou pelos maiores teores de N-amino apresentados, por outro lado, é possível observar uma diminuição considerável nos teores desse composto nas plantas submetidas ao tratamento 4. No caule, os tratamentos não exibiram influência significativa.

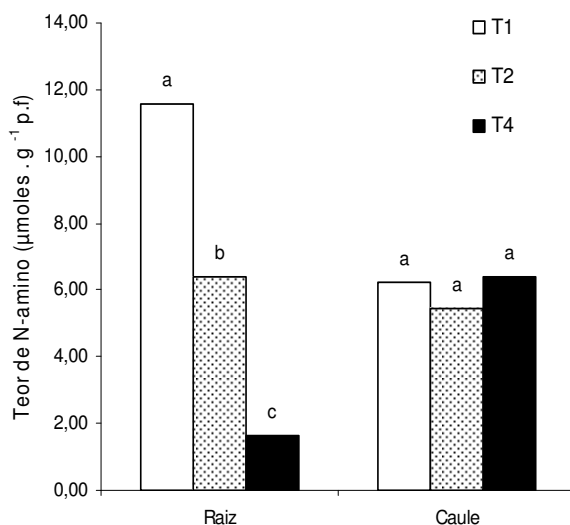


Figura 21: Teor de N-amino em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Esse aumento pode estar relacionado a maior disponibilidade de esqueletos de carbono, provenientes da degradação de açúcares, nas plantas pertencentes ao tratamento 1. Além disso, também é possível que este efeito seja consequência da alta atividade da nitrato redutase observada nas plantas submetidas ao tratamento 1. Assim, como resultado da maior disponibilidade de açúcares e atividade da nitrato redutase e disponibilidade de amônio tem-se um incremento no processo de síntese protéica visando, provavelmente, o desenvolvimento dos grãos. Além disso, conforme apontado anteriormente, esse aumento nos teores de N-amino pode estar ligado aos processos de catabolismo de proteínas e deaminação de aminoácidos que se intensificam com o avanço da senescência.

Os teores de nitrogênio apresentam um comportamento semelhante dos diferentes tratamentos na raiz e no caule (**Figura 22**). Em ambos, é possível destacar que o tratamento 4 promoveu o maiores teores desse nutriente. Essa diferença não foi observada nas plantas durante o início da floração e, assim como a produção de massa fresca e seca, se estabeleceu ao longo do desenvolvimento das plantas. Esses resultados também parecem estar relacionados com o uso das reservas de nitrato, estabelecidas no caule das plantas submetidas ao tratamento 4, e também a manutenção do suprimento.

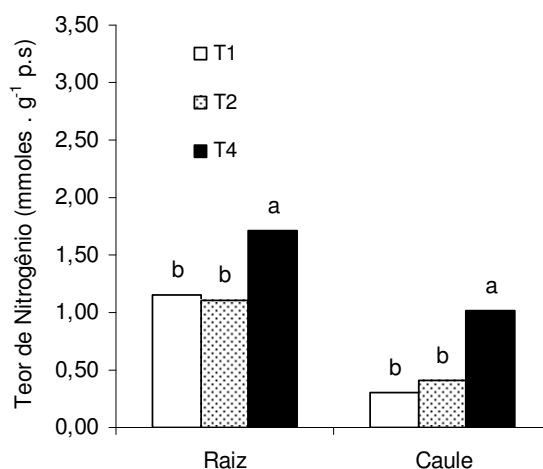


Figura 22: Teor de nitrogênio em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

No que diz respeito aos teores de fósforo encontrados, observa-se um comportamento diferente entre raiz e caule, em função dos tratamentos (**Figura 23**). Na raiz, o tratamento com a menor dose de nitrato (T1= 1 mM de N-NO₃⁻) promoveu um aumento nos teores desse nutriente, entretanto, no caule, o tratamento com a dose mais elevada de nitrato (T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) é que acarretou o maior incremento.

Conforme o observado anteriormente, os processos relacionados ao metabolismo do nitrogênio parecem estar ocorrendo intensamente nas raízes das plantas submetidas ao tratamento 1. Isso se justifica com base na detecção da maior concentração de N-amino, da elevada atividade da nitrato redutase e da alta concentração de açúcares e amônio nesse local. Logicamente, devido a alta dependência de energia para esses processos, é esperado que os teores de fósforo nesse local aumentem de forma considerável.

No caule, o motivo também parece ser a alta atividade da nitrato redutase, pois tal enzima é considerada um ponto chave no metabolismo do nitrogênio que, por sua vez, é altamente dependente de energia.

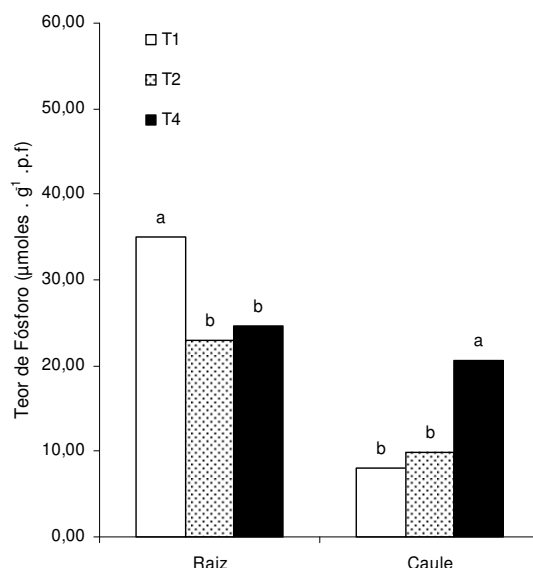


Figura 23: Teor de fósforo em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Os teores de potássio demonstram que, as plantas submetidas ao tratamento 1, obtiveram o maior nível desse nutriente na raiz (**Figura 24**). No caule, o comportamento foi diferente, já que as plantas submetidas ao tratamento 4 exibiram os maiores teores. Em comparação com os dados obtidos ao início da floração, é possível observar que na raiz o padrão de influência dos diferentes tratamentos não se alterou. Dessa forma, a explicação para os maiores teores de potássio, na raiz das plantas submetidas ao tratamento 1, possivelmente ainda esta relacionado com a variação do pH do meio (**Figura 25**).

A partir da observação do pH da solução nutritiva ao longo do experimento verifica-se que os tratamentos com as menores doses de nitrato (T1 e T2) provocaram uma maior tendência a acidificação do meio. Essa tendência esta provavelmente ligada ao processo de extrusão de prótons pelas raízes dessas plantas, com o objetivo de otimizar a captação de nitrato. Essa maior tendência a acidificação do meio observada no tratamento 1 também pode ter relação com a maior absorção de potássio. Obviamente, devido ao suprimento fornecido, as plantas pertencentes ao tratamento 4 não exibiram a tendência de acidificar o meio.

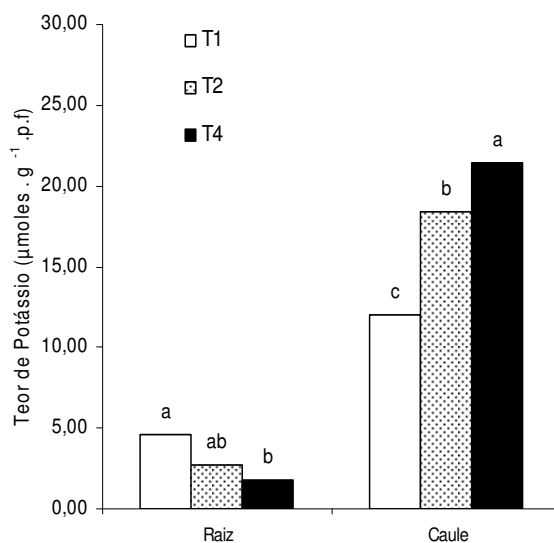


Figura 24: Teor de potássio em raízes e caules de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) coletadas ao fim da produção de sementes. Letras iguais em cada parte da planta indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

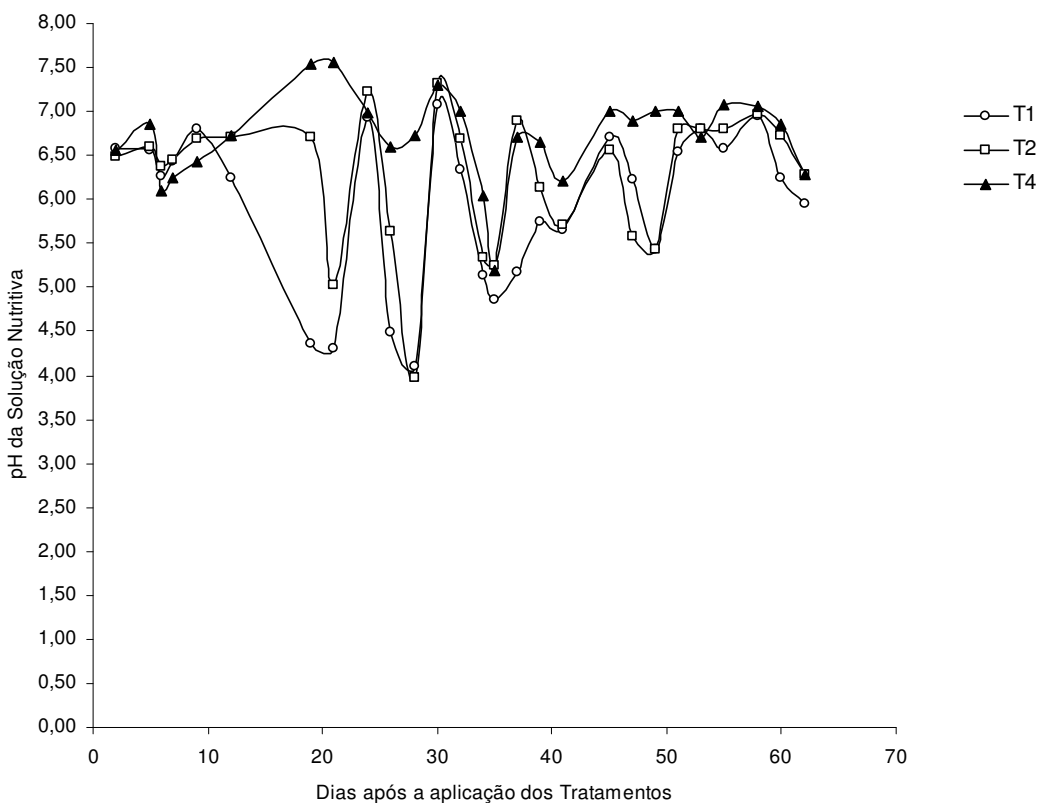


Figura 25: Variação do pH da solução nutritiva de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻) desde a aplicação dos tratamentos até o fim da produção de sementes.

Em relação à produção de grãos, é possível observar que não houve variação significativa entre os diferentes tratamentos (**Figura 26**). Entretanto, no que diz respeito ao conteúdo de óleo no grão, o comportamento foi diferente (**Figura 27**). De acordo com esses dados, pode-se destacar que o tratamento 1 apresentou conteúdo de óleo significativamente maior que o tratamento 2. O tratamento 4, por sua vez, não exibiu diferença significativa nesse aspecto em relação aos demais tratamentos.

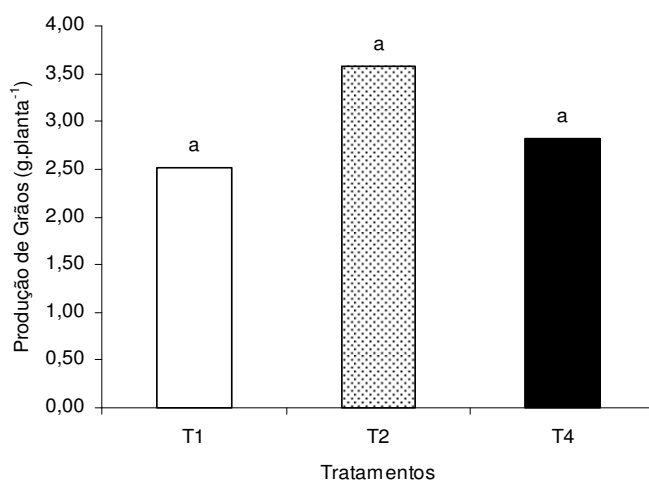


Figura 26: Produção de grão (g.planta⁻¹) de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻). Letras iguais indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

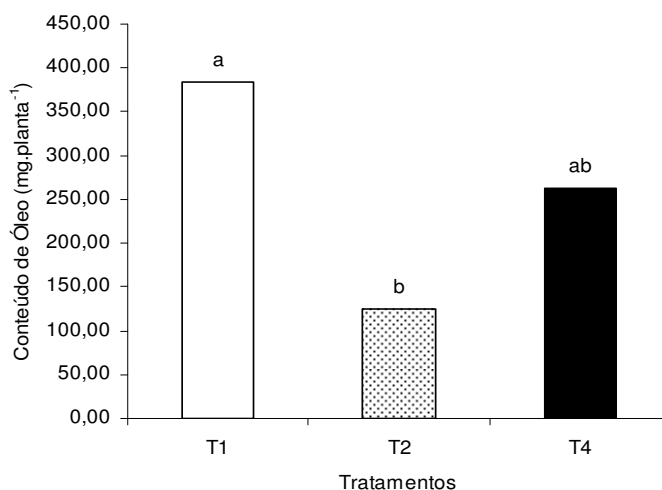


Figura 27: Conteúdo de óleo (mg.planta⁻¹) de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻). Letras iguais indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Assim como o observado em relação ao conteúdo de óleo, o rendimento de óleo na semente exibiu maior concentração nas plantas submetidas ao tratamento 1, quando comparado ao tratamento 2 (**Figura 28**).

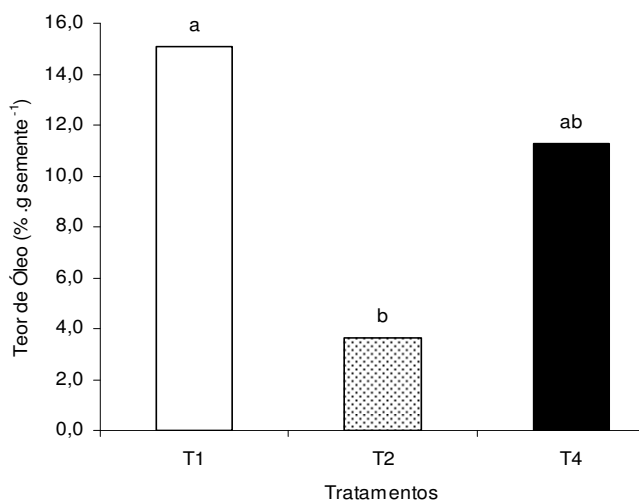


Figura 28: Rendimento de óleo (%) de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻). Letras iguais indicam diferença não significativa (teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade).

Rathke et al. (2006), aponta que diversas espécies da família Brassicaceae exibem correlação inversa entre o rendimento de óleo e a quantidade de proteína no grão. Nesse âmbito, Taylor et al. (1991) também observaram, em experimento com canola (*Brassica napus* L.), que o rendimento de óleo apresentou aumento com as menores doses de nitrogênio fornecidas. Além disso, diferentemente dos dados obtidos nesse experimento, os autores destacam que houve um aumento na produção de grãos com a maior disponibilidade de nitrogênio. Por outro lado, outros autores observaram, também em plantas de canola, uma estagnação ou até mesmo uma redução na produção de grãos com o aumento nas doses de nitrogênio (Gammelvind et al., 1996; Sieling & Christen., 1997).

Em relação aos resultados obtidos, bem como os dados fornecidos pela literatura, 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.

Nesse experimento, os resultados obtidos indicam que a menor dose de nitrato na solução nutritiva (T1= 1 mM), o valor limite entre os sistemas de absorção de nitrato de alta e baixa afinidade, é suficiente para garantir a produção de grãos de crambe com elevado conteúdo de óleo, sem que seja necessário empregar doses elevadas de N, como a do tratamento 4 (**Figuras 26, 27 e 28**).

No que diz respeito à composição do óleo das plantas de crambe submetidas ao diferentes tratamentos, é possível observar que alguns componentes exibiram variação significativa, quando comparados composição apresentada por sementes comerciais e aos dados da literatura (Springdale Group, 2005) (**Tabela 3**). De acordo com esses dados, observa-se que entre os tratamentos, ocorreu aumento nos teores de ácido oléico com as maiores doses de nitrogênio no meio. Com o tratamento 4, em particular, foram observados também os maiores teores de ácido tetracosanóico e eicosanóico. Por outro lado, com o tratamento 2 foram obtidos os maiores percentuais de ácido esteárico.

Behrens (2001) também destaca que o aumento no suprimento de nitrogênio acarretou diminuição nos percentuais de ácido oléico e, em contrapartida, uma elevação nos teores de ácido erúcido no óleo de canola (*Brassica napus* L.). Entretanto, o autor também relata uma correlação positiva entre o suprimento de nitrogênio e o teor de ácido linoléico, diferentemente do que ocorreu nesse experimento.

Tabela 3: Teores de ácidos graxos no óleo (%) de plantas de crambe (*Crambe abyssinica*) submetidas a diferentes doses de nitrato (T1= 1, T2= 2,5 e T4= 7,5 mM de N-NO₃⁻). A determinação foi realizada com base na análise dos respectivos ésteres metílicos. Além disso, são relatados os percentuais de ácidos graxos obtidos para sementes comerciais de crambe e pela literatura (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	Sementes Comerciais	T1	T2	T4	Springdale Group (2005)
Mirístico (14:0)	0,1	0,1A	0,8A	0B	0
Palmítico (16:0)	2,4	1,7B	3,6A	2B	1,8
Esteárico (18:0)	1,1	1,1B	1,8A	1,4B	0,7
Oléico (18:1)	22,5	20,4B	21,3B	22,2A	17,2
Linoléico (18:2)	8,3	5,4C	7A	6,6B	8,7
Linolênico (18:3)	---	---	---	---	5,2
Eicosanóico (20:0)	1,3	1,4A	1,3A	1,5A	3,4
Erúcido (22:1)	55	58,5A	41,2B	54,6A	62
Brassídico (22:1)	---	---	---	---	0,7
Tetracosanóico (24:1)	0,68	0,9A	0,2B	1,1A	0,7
Nervonico (24:1)	---	---	---	---	1,6
Outros	8,7	11,2B	23,6A	11,1B	2,5

5 CONCLUSÕES

Nas condições do experimento, a menor dose de nitrato (1 mM) utilizada para o cultivo do crambe foi a responsável pela maior produção de óleo pela cultura, sem afetar a produção de grãos. Esses resultados indicam que o crambe pode ser cultivado, visando a produção de biodiesel, com um baixo aporte de nitrato, o que pode contribuir para a otimização da produção dessa cultura, diminuição dos custos de produção e impactos ambientais.

6 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
- 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.
- BEHRENS, T.; HORST, W.J.; WIESLER, F. Effect of rate, timing and form of nitrogen application on yield formation and nitrogen balance in oilseed rape production. In: Horst, W.J., et al. (Eds.), *Plant Nutrition: Food Security and Sustainability of Agro-Ecosystems through Basic and Applied Research*. Kluwer Academic Publishers, p. 800–801, 2001.
- 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&nrm=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.

CONNOR, S. Oil shortage a myth, says industry insider. *The Independent*, 2008. Disponível em (<http://www.independent.co.uk/environment/climate-change/oil-shortage-a-myth-says-industry-insider-842778.html>). Acesso em 13/02/2008

Crambe (*Abyssinian mustard*). In: Springdale Group, 2005. Disponível em (www.ienica.net/crops/crambe.pdf). Acesso em 14/02/2008.

Crambe: Alternativa para produção de óleo. In: Rural Sementes, 2006. Disponível em (<http://www.ruralsementes.com.br/site/default.asp?tipo=1&secao=crambe.asp>). Acesso em 14/02/2008

Crambe: Opção lucrativa para o crescente mercado de biodiesel. In: AgroPrecisa, 2008. Disponível em (<http://www.agroprecisa.com.br/site/noticias/?iIdNoticia=152>). Acesso em 23/03/2008.

Crambe: Uma nova opção para produção de biodiesel. In: Fundação MS, 2007. Disponível em (<http://www.fundacaoms.com.br/news.php?item.2.1>). Acesso em 11/02/2008.

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.

DEMIRBAS, A. Biomass resources for energy and chemical industry. *Energy Edu Sci Technol*, v. 5, p. 21–45, 2000.

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.

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.

GARBA, M.U.; ALHASSAN, M.; KOVO, A.S. A Review of Advances and Quality Assessment of Biofuels. *Leonardo Journal of Sciences*, 9.ed, p. 167-178, 2006. ISSN 1583-0233, (<http://ljs.academicdirect.org>).

- GERPEN, J.V. Biodiesel processing and production. *Fuel Processing Technology*, n. 86, p. 1097-1107, 2005
- GUANDALINI, G. O barril a 100 dólares. *Revista Veja*, 2042.ed, 2008. Disponível em (http://veja.abril.com.br/090108/p_044.shtml). Acesso em 12/02/2008.
- HAGEMANN, J.W. MICOLAJKZAC, K.L. WOLFF, I.A. Purification of erucic-acid by low-temperature crystallization
- 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.
- HILL, J. NELSON, E. TILMAN, D. POLASKY, S. TIFFANY, D. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v. 103, n. 30, 2006.
- 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.
- HOTH, S. DREYER, I. DIETRICH, P. BECKER, D. ROBERT, B.M, HEDRICH, R. Molecular basis of plant-specific acid activation of K⁺ uptake channels. *PNAS*, v. 94, n. 9, p. 4806-4810, 1997.
- HUPPE, H.C. TURPIN, D.H. Integration of carbon and nitrogen metabolism in plant and algal cells. *Plant Physiol. Plant Mol. Bio*, v.45, p. 577-507, 1994.
- JAVORSKY, E. G. Nitrate reductase assay in intact plant tissues. *Biochemical Biophysical Research. Communication*, v.43, n.6, p.1274-1279, 1971.
- JEFFERSON, M. Sustainable energy development: performance and prospects. *Renew Energy*, v. 31, p. 571–82, 2006.
- LAM, H.M. COSCHIGANO, K.T. OLIVEIRA, L.C, MELO-OLIVEIRA, R. CORUZZI, G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Plant Physiol*, v.471, p. 569-593, 1996.
- 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.

MAHON, V.M. STUMPF, P.K. Fat Metabolism in Higher Plants XXVI. Biosynthesis of Fatty Acids in Tissues of Developing Seeds and Germinating Seedlings of Safflower (*Carthamus tinctorius*). *Plant Physiol*, v.11, p. 148-150, 1966.

MARTEN, I. HOTH, S. DEEKEN, R. ACHE, P. KETCHUM, K.A HOSHI, T. HEDRICH, R. AKT3, a phloem-localized K⁺ channel, is blocked by protons. P. *The National Academy of Sciences*. v. 96, n. 13, p. 7581-7586, 1999.

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.

MILLARD, P. The accumulation and storage of nitrogen by herbaceous plants. *Plant cell and environment*, v. 11, p. 1-8, 1988.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2004. Disponível em (<http://www.mme.gov.br/site/news/detail.do;jsessionid=DB0DB3E849E8111342FBFDE36BECA5F9?newsId=542¤tArea=>). Acesso em 13/02/2008.

OAKS, A. ASLAM, M, BOESEL, I. Ammonium and Amino Acids as Regulators of Nitrate Reductase in Corn Roots. *Plant Physiology*, v. 59, p. 391-394, 1977.

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

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 13/02/2008.

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.

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.

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

SHEEHAN, J.; CAMOBRECO, V.; DUFFIELD, J.; GRABOSKI, M.; SHAPOURI, H. An Overview of Biodiesel and Petroleum Diesel Life Cycles. *National Renewable Energy Laboratory*, Colorado, 1998a. Disponível em (<http://www.nrel.gov/docs/legosti/fy98/24772.pdf>). Acesso em 12 /02/2008.

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.

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.; FERNANDES, M.S. Nitrogênio. In: Manlio Silvestre Fernandes. (Org.). *Nutrição Mineral de Plantas*. 1 ed. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1, p. 215-252, 2006.

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

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.

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

WITZE, A. Energy: That's oil, folks... *Nature*, v. 445, p. 14-17 (4 January 2007), doi:10.1038/445014a; Published online 3 January 2007.

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

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.

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.

7 ANEXOS

Anexo A – Concentrações dos Padrões e Modo de Preparo

A.1 Atividade da nitrato redutase

Tabela 2: 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	Completar o volume até 50 mL com água destilada
40	20,0	
25	12,5	
20	10,0	
10	5,0	
5	2,5	
0	0,0	

A.2 Dosagem de N-amino livre

Tabela 3: 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	0 (somente tampão citrato)	Completar o volume até 25 mL com Tampão Citrato
0,04	0,5	
0,08	1,0	
0,16	2,0	
0,20	2,5	
0,24	3,0	
0,32	4,0	
0,40	5,0	

A.3 Dosagem de N-NH₄⁺

Tabela 4: 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
0,1	Completar com água deionizada até o volume final de 25 ml	10
0,25		25
0,5		50
1		100
2		200
3		300
4		400

A.4 Dosagem de N-NO₃⁻

Tabela 5: 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	Completar em balão volumétrico até 50 ml com água destilada
0,1	1,0	
0,25	2,5	
0,5	5,0	
1	10,0	
1,5	15,0	
2	20,0	
2,5	25,0	

A.5 Dosagem de açúcares solúveis

Tabela 6: 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	Completar em balão volumétrico até 25 ml com Etanol 80%
0,5	20	
1	40	
1,25	50	
2	80	
2,5	100	

A.6 Digestão sulfúrica

Quadro 3: Descrição das temperaturas e seus respectivos períodos utilizados para a digestão sulfúrica.

Temperaturas ($^{\circ}\text{C}$)	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 7: 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 8: 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	