

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial



Dissertação

Caracterização de genótipos de mamona:

marcadores RAPD, teor de óleo nas sementes por Soxhlet e RMN e rendimento da extração do óleo usando etanol

Denilson Gouvêa Anthonisen

Pelotas, 2007

Denilson Gouvêa Anthonisen

Caracterização de genótipos de mamona:

marcadores RAPD, teor de óleo nas sementes por Soxhlet e RMN e rendimento da extração do óleo usando etanol

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências. Área do conhecimento: Ciência e tecnologia de grãos.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Artigas Schirmer

Co-orientadores: Dr. Sérgio Delmar dos Anjos e Silva

Dr. João Guilherme Casagrande Jr.

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB -10/744)

A628c Anthonisen, Denilson Gouvêa

Caracterização de genótipos de mamona : marcadores RAPD, teor de óleo nas sementes por Soxhlet e RMN e rendimento da extração do óleo usando etanol / Denilson Gouvêa Anthonisen - Pelotas, 2007.

73f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial.Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas. – Pelotas, 2007, Manoel Artigas Schirmer, Orientador; co-orientador João Guilherme Casagrande JR e Sérgio Delmar dos Anjos e Silva.

1. Ricinus communis 2. Melhoramento genético 3. PCR
4. Soxhlet 5. RMN I. Schirmer, Manoel Artigas (orientador)
II. Título

CDD: 633.85

Banca examinadora:

Beatriz Helena Gomes Rocha

Manoel Artigas Schirmer

Ricardo Peraça Toralles

À minha esposa Eliane e à minha família.

Agradecimentos

Ao PPGCTA pela oportunidade de aperfeiçoamento.

Ao Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA) pelo apoio financeiro.

À coordenação do Curso de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas (CEFET/RS) por ceder a estrutura do LAPPA.

À Embrapa Clima Temperado por ceder a estrutura do Laboratório de Biologia Molecular.

À Embrapa Algodão pelo auxílio nas análises de óleo por RMN.

Ao DCTA por ceder a estrutura do Laboratório de Grãos.

À minha esposa Eliane pelo apoio na execução de experimentos e pela compreensão e companheirismo durante a execução desta pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular pelo apoio e companheirismo, em especial da amiga Ema Gládis Corrêa.

Aos professores e colegas do PPGCTA pelo convívio enriquecedor.

Ao orientador Manoel Artigas Schirmer e aos co-orientadores Sérgio Delmar dos Anjos e Silva e João Guilherme Casagrande Jr. pelo incentivo, críticas e sugestões.

Aos pesquisadores e técnicos da Embrapa Clima Temperado que se dispuseram a revisar o trabalho e fazer críticas e sugestões.

Ao SRH da Embrapa Clima Temperado por viabilizar a participação no PPGCTA;

A todos que torceram pelo meu sucesso neste desafio.

Resumo

ANTHONISEN, Denilson Gouvêa. **Caracterização de genótipos de mamona: marcadores RAPD, teor de óleo nas sementes por Soxhlet e RMN e rendimento da extração do óleo usando etanol**. 2007. 73f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A Embrapa Clima Temperado implantou um programa de melhoramento de mamona (*Ricinus communis* L.) para desenvolver cultivares produtivas com elevado teor de óleo. Foram caracterizadas 15 destas cultivares procedentes de 5 locais, cultivadas em Pelotas/RS, quanto ao perfil eletroforético de marcadores RAPD e o teor de óleo das sementes para auxiliar na identificação de materiais promissores. Os genótipos foram classificados em 7 grupos, usando o coeficiente Jaccard médio de 0,86, de acordo com a procedência. A produção em escala industrial de óleos vegetais adota a extração por solventes, dos quais o hexano é o mais utilizado, porém a reduzida capacidade de solubilizar frações ricas no ácido ricinoléico orientou o estudo de solventes mais polares, como o etanol, já que tais frações são solúveis em álcool. Verificou-se que os teores de óleo extraído por etanol, em média de 53,8%p/p, são superiores aos resultados médios obtidos com hexano, 45,5%p/p, quando o método Soxhlet foi utilizado. Em escala laboratorial, a extração por solventes foi comparada à técnica de ressonância magnética nuclear, que além de apresentar vantagens como rapidez e preservação da matriz, produziu resultados equivalentes à extração Soxhlet com hexano, método oficial de determinação do teor de óleo em sementes.

Palavras-chave: *Ricinus communis* L., melhoramento genético, PCR, Soxhlet, RMN

Abstract

The Embrapa Clima Temperado created a breeding program, aiming to develop more productive and high oilseed content cultivars. Fifteen castor bean cultivars of 5 locations were grown in Pelotas/RS and characterized using RAPD markers and the oilseed content that were used to identify promising materials. Seven groups of genotypes were established according to its origin, using Jaccard coefficient of 0,86. The oilseeds industrial production uses solvent extraction with hexane, but its low capability to solubilize fractions with ricinoleic acid orient the use of more polar solvent like ethanol, considering these fractions are soluble in alcohol. The oilseed content extracted using ethanol, is 53,8%w/w, it is higher than the official method, which uses hexane as solvent, with 45,5%w/w. In laboratory scale, the solvent extraction was compared for NMR spectroscopy. This technique has advantages. It is faster than solvent extraction, it is non-destructive method and its results are equivalent to the Soxhlet data.

Keywords: *Ricinus communis* L., genetic breeding, PCR, Soxhlet, NMR

Lista de figuras

- Figura 1. Técnica de amostragem do cone e da quarta parte (MENDHAM, et al., 2002)27
- Figura 2. Sistema de extração Soxhlet montado no LAPPA (CEFET/RS)29
- Figura 3. Géis de agarose 1,5% p/v em TBE 1X apresentando os produtos de RAPD de cultivares de mamona utilizando os primers UBC-132 (a), UBC-133 (b) e OPY-13 (c), onde: DNA ladder 1 kb Plus (M): AL Guarany 2002 (1, 9 e 17); Nordeste (2, 10, 18); AL Preta (3, 11 e 19); Cafelista (4, 12 e 20); CSRN 393 (5, 13 e 21); IAC 226 (6, 14 e 22); CSRN 193 (7, 15 e 23) . Embrapa Clima Temperado, 2007.....31
- Figura 4. Agrupamento das cultivares de mamona produzido pela avaliação dos produtos da amplificação tipo RAPD, usando o coeficiente de similaridade Jaccard e a média aritmética não ponderada (UPGMA). Embrapa Clima Temperado, 2007.32
- Figura 5. Teor de óleo (% p/p base seca) em sementes de cultivares comerciais de mamona cultivadas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, na safra 2005-2006, determinado pelo método Soxhlet usando hexano e etanol e pela extração à temperatura ambiente com o álcool. Embrapa Clima Temperado, 2007.....64
- Figura 6. Teor de óleo (kg/t) obtido na extração Soxhlet com etanol, produção de semente (kg/ha) e a estimativa do rendimento de óleo (kg/ha) das cultivares cultivadas pela Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS, na safra 2005-200667

Lista de tabelas

Tabela 1. Área colhida, produção e rendimento médio da cultura da mamona no Brasil desde 1977.....	15
Tabela 2. Estrutura química e propriedades de solventes orgânicos	19
Tabela 3. Procedência das cultivares comerciais de mamona (<i>Ricinus communis</i> L.) cultivadas na Estação Experimental Cascata (EEC), da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS, na safra 2005/2006. Embrapa Clima Temperado, 2007.....	26
Tabela 4. Produtos resultantes das reações de amplificação de DNA de genótipos de mamona com base nos marcadores RAPD. Embrapa Clima Temperado, 2007.	30
Tabela 5. Teor de óleo (% p/p base seca) em sementes de cultivares comerciais de mamona cultivadas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, na safra 2005-2006, determinado pelo método Soxhlet usando hexano. Embrapa Clima Temperado, 2007.....	34
Tabela 6. Detalhes técnicos de métodos de extração de óleo	42
Tabela 7. Procedência das cultivares comerciais de mamona cultivadas em Pelotas/RS, na safra 2005-2006. Embrapa Clima Temperado, 2007.....	44
Tabela 8. Teor médio de óleo (% p/p base seca) em sementes de cultivares comerciais de mamona cultivadas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, na safra 2005-2006, determinado pelo método de extração Soxhlet usando hexano e pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Embrapa Clima Temperado, 2007.....	46
Tabela 9. Dados da avaliação estatística da precisão e da exatidão da técnica de espectroscopia de RMN para a determinação do teor de óleo (% p/p b.s.) em sementes de cultivares comerciais de mamona, usando como referência o método Soxhlet. Embrapa Clima Temperado, 2007.....	47
Tabela 10. Procedência das cultivares comerciais de mamona (<i>Ricinus communis</i> L.) cultivadas na Estação Experimental Cascata (EEC), da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS, na safra 2005/2006	54
Tabela 11. Teor de óleo (% p/p b. s.) em sementes de cultivares de mamona cultivadas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, na safra 2005-2006, extraído com etanol à temperatura ambiente e usando método de extração Soxhlet. Embrapa Clima Temperado, 2007.....	58
Tabela 12. Resumo do agrupamento das cultivares de mamona produzido pela avaliação dos produtos da amplificação tipo RAPD usando o coeficiente de similaridade Jaccard e a média aritmética não ponderada (UPGMA). Embrapa Clima Temperado, 2007.....	63

Tabela 13. Estimativa do rendimento de óleo a partir da produção de sementes (kg/ha) das cultivares cultivadas pela Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS	66
--	----

Sumário

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract	VI
1 Introdução geral	12
2 Revisão bibliográfica	14
2.1 Mamona	14
2.2 Melhoramento genético da mamona	15
2.2.1 Coleção de germoplasma de mamona	16
2.2.2 Caracterização de genótipos	16
2.3 Óleo de mamona	18
2.3.1 Extração de óleo	18
2.3.2 Determinação de óleo	19
Capítulo I – Marcadores RAPD e teor de óleo na caracterização de cultivares de mamona	21
Marcadores RAPD e teor de óleo na caracterização de cultivares de mamona	22
RAPD markers and oilseed content in the characterization of castor bean cultivars	23
1 Introdução	24
2 Material e métodos	26
2.1 Material Vegetal	26
2.2 PCR	28
2.3 Teor de óleo	29
3 Resultados e discussão	29
3.1 RAPD	29
3.2 Teor de óleo	33
4 Conclusões	34
5 Agradecimentos	34
6 Referências	35
Capítulo II – Validação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na determinação do teor de óleo em sementes de mamona	38
Validação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na determinação do teor de óleo em sementes de mamona	39
Validation of the NMR spectroscopy of oilseed content determination in castor bean	40
1 Introdução	41
2 Material e métodos	44
2.1 Sementes de mamona	44
2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	45
2.3 Método de Extração Soxhlet	45
2.4 Avaliação estatística dos dados	45
3 Resultados e Discussão	45

4	Conclusões	47
5	Agradecimentos	47
6	Referências	48
	Capítulo III – Extração de óleo de sementes de mamona usando etanol	49
	Extração de óleo de sementes de mamona usando etanol.....	50
	Oilseed extraction of castorbean by ethanol.....	51
1	Introdução	52
2	Material e métodos	54
2.1	Material vegetal.....	54
2.2	Determinação do teor de óleo	55
2.2.1	Extração soxhlet.....	55
2.2.2	Extração a frio	55
2.3	Avaliação estatística dos dados	55
3	Resultados e discussão	56
4	Conclusões	59
5	Agradecimentos	59
6	Referências	60
3	Discussão geral	62
4	Conclusões gerais	68
5	Considerações gerais	69
6	Referências Bibliográficas	70
	APÊNDICE A.....	72

1 Introdução geral

A escassa utilização de sementes selecionadas no cultivo tradicional da mamona é a principal causa da baixa produtividade e da suscetibilidade às doenças, entre outros problemas agrônômicos associados à cultura da oleaginosa. Embora cultivares de mamona introduzidas no Rio Grande do Sul tenham demonstrado adaptação, é fundamental desenvolver um programa de melhoramento genético para a cultura, a fim de oferecer cultivares mais produtivas, precoces, resistentes às doenças e com elevado teor de óleo. Entendendo esta necessidade, a Embrapa Clima Temperado está estruturando um banco ativo de germoplasma (BAG) constituído de cultivares introduzidas e acessos locais de ocorrência espontânea (SILVA et al., 2004). Visando a auxiliar na identificação de materiais promissores ao programa, um dos objetivos deste trabalho foi caracterizar 15 cultivares de mamona cultivadas em Pelotas/RS, usando marcadores RAPD e o teor de óleo das sementes.

A viabilidade técnico-econômica da produção de óleos vegetais em escala industrial exige sistemas de alta eficiência como a extração por solventes. O hexano é o mais utilizado (MORETTO; FETT, 1998), porém, além de inflamável e tóxico, apresenta reduzida capacidade de solubilizar frações ricas em ácido ricinoléico (MERCK, 2006b), o que justifica o estudo de solventes mais polares como o etanol, nos quais tais frações são solúveis (BELTRÃO et al., 2004). Além disso, o álcool oferece menores riscos operacionais, pois é menos inflamável e tóxico do que o hexano. Por isso, o segundo estudo deste trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar a eficiência do etanol na extração de óleo de sementes de mamona, relativa ao hexano.

Os laboratórios que executam de forma rotineira a determinação do teor de óleo usam a extração por solvente, entretanto este método é demorado e destrutivo, o que o torna inviável quando o volume de trabalho é elevado (COLNAGO, 1996). A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é um método alternativo para a determinação do teor de óleo, pois apresenta características como tempo reduzido de execução do ensaio, alta produtividade, além da capacidade de preservar a integridade da amostra, requisitos fundamentais na escolha de uma técnica analítica (MENDHAM et al., 2002).

Reconhecendo a viabilidade de implementar a técnica instrumental, mas entendendo ser imprescindível garantir a confiabilidade dos resultados gerados nas avaliações laboratoriais, este estudo também objetivou a validação da técnica de determinação do teor de óleo de sementes de mamona, usando a espectroscopia de RMN.

O conjunto destes estudos visa a estabelecer parâmetros iniciais comparativos entre as cultivares de mamona com potencial para a extração de óleo no Rio Grande do Sul, bem como expressar este potencial com parâmetros de extração mais eficientes do ponto de vista industrial, como a extração com álcool e, por fim, validar uma técnica analítica mais rápida, não-destrutiva, de utilização viável em um programa de melhoramento e no controle da qualidade de matéria-prima em uma unidade industrial.

2 Revisão bibliográfica

2.1 Mamona

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma euforbiácea rústica, heliófila, resistente à seca, disseminada por diversas regiões do mundo. O interesse pelo cultivo desta oleaginosa se deve às diversas possibilidades de uso do óleo extraído das sementes e à sua capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais (SILVA et al., 2004).

O porte das plantas pode variar desde 80 cm até 8 m de altura. O hábito de crescimento, cor de folhagem e caule, tamanho de semente e conteúdo de óleo também variam bastante nesta espécie. Suas características mais marcantes são a facilidade de adaptação e a velocidade de propagação sob diferentes condições climáticas (STI/MIC, 1985). De acordo com Moshkin (1986), a existência de inúmeras variedades de mamona pode ser justificada pelo fato de a espécie ser politípica, ou seja, subespécies são geradas em função de diferenças de origens morfológica, genética e ecológica.

Azevedo e Lima (2001) destacam a adaptação da mamona a quase todas as regiões do país e ressaltam que as regiões nordeste, sudeste e sul, representadas respectivamente pelos estados da Bahia, São Paulo e Paraná, são os principais produtores da oleaginosa. Entretanto, a Comissão de Educação, Cultura, Desporto, Ciência e Tecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, resalta que além de possuir todo território propício ao cultivo de mamona, a produtividade gaúcha em 1999, 2,7 t/ha, foi superior aos índices das demais regiões do país (CECDCT/RS, 2000).

Kouri et al. (2004) descrevem a evolução da cultura da mamona no Brasil, desde a safra 1977-78, usando dados fornecidos pelo IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Tabela 1). Os autores relatam que, embora as taxas de crescimento da área colhida, produção e rendimento médio da cultura no Brasil tenham sido negativas em diversas safras e os anos 90 tenham representado um período de decadência, o cenário que se estabeleceu com a criação do Probiodiesel, em 2002, é de crescimento da cultura. Além disso, é possível perceber que, naquele ano, embora a área colhida tenha sofrido redução de 172 para 122 mil hectares, que representa cerca de 29%, o rendimento médio da cultura apresentou um incremento de aproximadamente 7%, passando de 582 para 621kg/ha. A área plantada em

2007 foi ampliada em mais de 50% nos últimos cinco anos, superando 190 mil hectares, com rendimento próximo a 900kg/ha e, apesar da oscilação dos preços de mercado, as elevadas cotações da baba da mamona se mantêm ao redor de R\$ 70,00/saca de 60 kg (MACEDO, 2004).

Tabela 1. Área colhida, produção e rendimento médio da cultura da mamona no Brasil desde 1977

Ano agrícola	Área colhida 1.000 ha	Produção 1.000 t	Rendimento médio kg.ha ⁻¹
1977/1978	350	317	905
1981/1982	462	192	416
1985/1986	457	263	576
1989/1990	287	148	516
1993/1994	106	54	508
1997/1998	63	17	264
2000/2001	172	100	582
2001/2002*	122	76	621
2007**	190	169	889

Fonte: IBGE - Anuários estatísticos do Brasil (1978-2000) e Produção Agrícola Municipal – PAM (ano 1990 a 2002); *para o ano de 2002 foram desconsiderados os dados referentes ao Estado do Maranhão; ** IBGE (2007)

2.2 Melhoramento genético da mamona

No cultivo tradicional da mamona, a baixa produtividade e a suscetibilidade às doenças, entre outros problemas agrônômicos são conseqüências da escassa utilização de sementes selecionadas. Existe, por isso, a necessidade de desenvolver programas de melhoramento genético capazes de oferecer cultivares de mamona mais produtivas, precoces, semi-deiscentes, resistentes às doenças e, principalmente, com elevado conteúdo de óleo (MOREIRA et al., 1996).

Murphy (1999) afirma que a maioria das atividades de pesquisa e desenvolvimento (P&D) tem sido focada na evolução de culturas tradicionais. Mais recentemente, o interesse no uso da tecnologia do DNA recombinante para transferir genes entre espécies produtoras de óleo com a finalidade de aumentar a quantidade e variedade de ácidos graxos produzidos por elas tem-se destacado. Meneses et al. (2004, apud BELTRÃO et al. 2001), afirmam que existem centenas de cultivares de mamona e que são comuns diferenças relativas ao conteúdo do óleo e a outras características agrônômicas.

Segundo Moreira et al. (1996) a organização da coleção de germoplasma é fundamental para o programa de melhoramento, especialmente para a mamona, uma espécie de ampla variabilidade incorporada em materiais espontâneos ou cultivados, da qual se conhece pouco sobre o desempenho no Rio Grande do Sul e características genéticas de cultivares locais.

2.2.1 Coleção de germoplasma de mamona

Segundo Barbieri (2005), a coleção de mamona da Embrapa Clima Temperado contém 133 genótipos, com 17 cultivares comerciais e 116 acessos espontâneos da região de Clima Temperado, principalmente na metade sul do Rio Grande do Sul, conservados em câmara fria e cujas sementes são renovadas através de autofecundação das linhagens, recombinação manual e plantio isolado das populações. O objetivo da coleção é evitar a perda de recursos genéticos e conservar fontes de genes para uso em programas de melhoramento (MOREIRA et al., 1996). A expansão da cultura de mamona no Estado, transforma esta coleção numa importante fonte de variabilidade para o programa de melhoramento estruturado pela Embrapa Clima Temperado, cujos objetos de estudo e evolução são a produtividade, o teor de óleo e adaptação às condições edafoclimáticas da região (BARBIERI, 2005).

2.2.2 Caracterização de genótipos

Na caracterização das cultivares e/ou acessos da coleção registram-se características que não sofram influência do ambiente, como as baseadas em marcadores moleculares, associadas a caracteres fenológicos, influenciados pelas condições ambientais. Neste caso, o objetivo é avaliar o aproveitamento do genótipo diretamente ou, de forma indireta, via hibridização, onde novas características são incorporadas em genótipos submetidos à seleção (MOREIRA et al., 1996).

Segundo Moreira et al. (1996), uma ferramenta importante para os programas de melhoramento genético é a análise da variabilidade genética, que consiste na diferenciação do DNA dos componentes de uma população, obtida em estudos de germoplasma. Ainda acerca de melhoramento genético, Murphy (1999) destaca que tem sido fundamental ao sucesso dos programas, o uso de técnicas como o desenvolvimento de mapas moleculares. Para tanto, marcadores baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase), podem produzir detalhadas descrições genéticas das mais variadas espécies de forma mais rápida e com menor investimento.

Ferreira e Grattapaglia (1996) relatam que, até os anos 60, os estudos genéticos e programas de melhoramento eram baseados em caracteres morfológicos, geralmente fenótipos identificados visualmente, até que foram desenvolvidos marcadores genéticos para se somarem às descrições fenotípicas. Segundo Alfenas (1998), estes marcadores podem ser bioquímicos, produzidos pela expressão de genes, como as proteínas, e moleculares identificados pela análise direta do DNA. Uma técnica utilizada para tal fim é a amplificação ao acaso de fragmentos de DNA (RAPD, *Random Amplified Polymorphism DNA*) que utiliza *primers* (ou iniciadores) de sequência curta e arbitrária. Além de facilitar e tornar mais ágeis os estudos de espécies vegetais tradicionais, a técnica ampliou tal possibilidade para outras, até então não avaliadas (MILACH et al., 1998). A difusão desta tecnologia na análise genética e no melhoramento de plantas foi rápida e, atualmente, é aplicada na avaliação da diversidade genética de populações, em estudos filogenéticos entre espécies, no mapeamento genético e na seleção assistida de indivíduos e/ou populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

2.3 Óleo de mamona

Durante os anos 80, o Proalcool direcionou o interesse dos pesquisadores à cana-de-açúcar, entretanto, desde 2002, com a criação do Probiodiesel, Programa Brasileiro de Desenvolvimento Tecnológico do Biodiesel, a atenção sobre a biomassa como fonte alternativa de energia voltou a ser ampliada para diferentes espécies (PARENTE, 2003).

A mamoneira ou carrapateira (*Ricinus communis* L.) tem no seu óleo o principal apelo comercial, afinal trata-se de um bem renovável e de baixo custo de produção (MACÊDO, 2003). De acordo com Guerreiro et al. (2002), além de alternativa na geração de energia, o óleo de mamona e seus derivados têm importância em diversos setores produtivos, como têxtil, celulose e papel, tintas e vernizes, lubrificantes, plásticos, farmacêutico e de cosméticos.

Segundo Macêdo (2004), a amêndoa representa 75% em peso da baga e contém entre 43% e 49% de óleo. Na extração do óleo pelo processo industrial utiliza-se a prensagem das sementes a frio ou a quente, para obter óleo tipo padrão límpido, com, no máximo, 1% de acidez e 0,5% de impurezas e umidade, depois de refinado (BALIZA et al., 2004).

2.3.1 Extração de óleo

Segundo Moretto e Fett (1998), a produção de óleos vegetais em escala industrial não pode prescindir da extração por solvente, pois no processo mecânico de prensagem, mesmo sob alta pressão, resta na torta residual uma fração de cerca de 5% do óleo contido no material extraído, percentual que se reduz à aproximadamente 0,5% quando solventes orgânicos são utilizados. O hexano é usado no processo porque é o mais seletivo dentre os solventes, possui estreita faixa de ebulição e é imiscível com a água, evitando a formação de misturas azeotrópicas. Contudo, os riscos operacionais, à saúde humana e ao meio ambiente, associados à origem não-renovável e à reduzida capacidade de solubilizar o principal ácido graxo da mamona, justificam a pesquisa de alternativas ao hexano para extrair este óleo.

O etanol constitui uma alternativa, pois o óleo de mamona é rico em ácido ricinoléico e este é o único ácido graxo solúvel em álcool, mesmo em baixas

temperaturas (BELTRÃO et al., 2004). Além disso, o álcool é produzido a partir de fontes renováveis e, quando comparado ao alcano, apresenta propriedades químicas vantajosas (Tabela 2) como maiores temperaturas de inflamação (12 contra -22°C) e de auto-ignição (363 contra 225°C) e toxicidade mais baixa (LD_{50} oral para ratos de 6.200 contra 2.500mg/kg), que lhe conferem menores riscos operacionais do que o hexano (MERCK, 2006a; 2006b).

Tabela 2. Estrutura química e propriedades de solventes orgânicos

Característica	Hexano	Etanol
Função orgânica	alcano	álcool
Matéria-prima	petróleo	cana de açúcar (vegetais)
Natureza da matéria-prima	não-renovável	renovável
Fórmula molecular	$\text{H}_3\text{C}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
Peso molecular ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	86,18	46,07
Ponto de ebulição ($^{\circ}\text{C}$)	69,0	78,3
Ponto de inflamação ($^{\circ}\text{C}$)	-22	12
Pressão de vapor a 20°C (hPa)	160	59
Limites de explosão (% v)	1,0 a 8,1	3,5 a 15,0
Auto-ignição ($^{\circ}\text{C}$)	225	363
Riscos	Facilmente inflamável; Tóxico para organismos aquáticos.	Facilmente inflamável;
Toxicidade aguda		
LC_{50} (inalação, rato) mg/L/4h	171,6	95,6
LD_{50} (cutânea, coelho) mg/kg	> 2.000	-
LD_{50} (oral, rato) mg/kg	2.500	6.200

Fonte: Merck (2006a; 2006b)

2.3.2 Determinação de óleo

Mendham et al. (2002), afirmam que para escolher a técnica analítica adequada à escala laboratorial é necessário considerar o tempo de execução do ensaio, o volume de testes que serão realizados, a natureza da amostra e o tamanho da alíquota para o teste. Segundo os autores, métodos destrutivos envolvem a dissolução e/ou fragmentação da matriz e implicam na sua transformação com a finalidade de aumentar a capacidade de detecção do analito. O preparo da amostra, portanto, consome tempo, exige investimento e gera fontes de erros como a diluição. Os autores afirmam, ainda, que para preservar as características das amostras e gerar resultados com maior rapidez do que os

métodos clássicos, de natureza destrutiva, foram desenvolvidas técnicas instrumentais, cuja medida do analito baseia-se em propriedades físicas, como absorção ou emissão de energia, condutividade elétrica, rotação óptica, entre outras.

A determinação do teor de óleo em amostras de sementes pelo processo de extração deve ser evitada por se tratar de um processo demorado e destrutivo, especialmente no caso da avaliação de um banco ou coleção de genótipos, cujo número de amostras é elevado e, freqüentemente, a quantidade disponível é pequena. A ressonância magnética nuclear (RMN) é um método alternativo para a determinação do teor de óleo e apresenta vantagens como rapidez, preservação da matriz, simplicidade no preparo da amostra e possibilidade de uso de sistemas *in vivo* para a determinação (COLNAGO, 1996).

Reunir informações relativas à variabilidade genética de cultivares da coleção de germoplasma da Embrapa Clima Temperado e estabelecer parâmetros comparativos entre as cultivares de mamona a partir de seu potencial para a produção de óleo são úteis ao programa de melhoramento genético da cultura, na medida em que permitem selecionar materiais promissores ao desenvolvimento de cultivares com elevado teor de óleo. Do ponto de vista industrial, o estudo do etanol como alternativa ao hexano, solvente tradicionalmente utilizado no beneficiamento de oleaginosas, constitui uma possibilidade de redução no consumo de energia, nos riscos operacionais e ambientais do processo produtivo. Já no cenário laboratorial, validar uma técnica analítica rápida, não destrutiva e que dispensa processos elaborados de preparo de amostras pode ser o instrumento necessário para viabilizar a avaliação de sementes em larga escala, como é o caso da avaliação de coleções de germoplasma e o controle da qualidade de matéria-prima em uma unidade industrial. Este conjunto de estudos compõe, portanto, uma compilação de informações bastante úteis ao processo de implementação da cultura de mamona no Rio Grande do Sul para a produção em larga escala e aproveitamento industrial.

Capítulo I – Marcadores RAPD e teor de óleo na caracterização de cultivares de mamona *

* Aprovado pelo comitê de publicações da Embrapa Clima Temperado em março de 2007 como Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento n. 41.

Marcadores RAPD e teor de óleo na caracterização de cultivares de mamona

ANTHONISEN, Denilson Gouvêa¹; SCHIRMER, Manoel Artigas²; ANTHONISEN, Eliane Freire³; SILVA, Sérgio Delmar dos Anjos⁴; CASAGRANDE Jr, João Guilherme⁵

¹ Bacharel em química, analista da Embrapa Clima Temperado, CPACT, mestrando do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, DCTA, da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, denilson@cpact.embrapa.br

² Químico, Dr, professor da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, schirmer@ufpel.edu.br

³ Graduanda do curso de bacharelado em química da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, eliane.f.a@ibest.com.br

⁴ Eng. agrôn., Dr., pesquisador da Embrapa Clima Temperado, CPACT, sergio@cpact.embrapa.br

⁵ Eng. agrôn., Dr, bolsista de pós-doutorado da Fundação de Apoio à Pesquisa Edmundo Gastal, FAPEG, jgcasa@uol.com.br

Resumo

O óleo da mamona é uma matéria-prima estratégica, utilizado na manufatura de diversos insumos e produtos, inclusive biodiesel, e a cultura demonstra adaptação às condições edafoclimáticas do Rio Grande do Sul, então a Embrapa Clima Temperado implantou um programa de melhoramento da espécie que tem por objetivo desenvolver cultivares mais produtivas, precoces, resistentes às doenças e com elevado teor de óleo. Neste trabalho, foram caracterizadas 15 cultivares comerciais de mamona cultivadas em Pelotas/RS, usando os marcadores baseados em RAPD e teor de óleo das sementes, a fim de auxiliar na identificação de materiais promissores ao programa de melhoramento da cultura. Foram testados 40 oligonucleotídeos. O uso da técnica de PCR revelou um coeficiente médio de similaridade de 0,86 entre 7 grupos, segregando os genótipos de acordo com a procedência. O teor de óleo nas sementes variou desde 40,6 até 49,0% p/p. Os dois parâmetros usados foram considerados eficientes para caracterizar cultivares de mamona.

Termos para indexação: *Ricinus communis* L., melhoramento genético, eletroforese, PCR

RAPD markers and oilseed content in the characterization of castor bean cultivars

Abstract

The castor bean oilseed is a strategic raw material, used to manufacturing several products, including biodiesel, and this crop shows adaptation to the Rio Grande do Sul soil and climate conditions, then the Embrapa Clima Temperado created a breeding program, aiming to develop more productive, short-season, disease-resistant and high oilseed content cultivars. In this work, 15 commercial cultivars of castor bean grown in Pelotas/RS were characterized, using molecular markers based in RAPD and oilseed content, with the objective to identify promising materials in the castor bean breeding program. There were tested 40 oligonucleotides. The PCR technique showed a Jaccard's coefficient of similarity of 0,86, among seven groups, divided according to its origin. The oilseed content ranged from 40,6 to 49,0% p/p. The two parameters used were considered efficient to characterize castor bean cultivars.

Index terms: *Ricinus communis* L., genetic breeding, electrophoresis, PCR

1 Introdução

O uso de óleos vegetais como matéria-prima para a produção de combustíveis tornou-se assunto importante no Brasil com o lançamento, em 2002, do Probiodiesel, programa do Ministério da Ciência e Tecnologia, que estabeleceu aspectos econômicos e sócio-ambientais como fundamentais ao desenvolvimento tecnológico de biocombustíveis. Este cenário passou a exigir a redução de custos da matéria-prima e de processos de produção do biodiesel (MACEDO, 2003).

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma das principais oleaginosas do mundo, neste contexto. Seu principal produto, o óleo extraído das sementes, que responde por cerca de 48% de sua composição, não é comestível e é o único solúvel em álcool (BELTRÃO et al., 2003). Conforme Myczkowski (2003), para as indústrias processadoras de mamona, as características que definem a qualidade das sementes são alto teor de óleo e uniformidade. Porém, Meneses et al. (2004) afirmam que entre acessos são comuns diferenças relativas ao conteúdo do óleo e a outras características agronômicas. Isto porque a mamona apresenta sistema reprodutivo misto, ou seja, tanto ocorre autofecundação como cruzamento natural e as taxas de alogamia variam de acordo com o porte da planta (MYCZKOWSKI, 2003).

Contudo, os avanços da biotecnologia, tornaram concreta a possibilidade de domesticação e manipulação de genes para produzir gerações com alto teor de óleo, resistentes à pragas e doenças e altamente produtivas (MURPHY, 1999). Estas características podem ser identificadas e transferidas em programas de melhoramento via hibridação, ou heterose, decorrente do cruzamento entre genótipos com capacidade combinatória e acentuada divergência genética (COSTA, 2006). Segundo Moreira et al. (1994), a análise da variabilidade genética, que consiste na diferenciação do DNA dos componentes de uma população, pode ser obtida em estudos de germoplasma. Ferreira e Grattapaglia (1996) relatam que, até os anos 60, estes estudos eram baseados em caracteres morfológicos. Entretanto, quando comparados às características fenotípicas, os marcadores genéticos ampliaram o número de caracteres e sua abrangência sobre as espécies vegetais.

Murphy (1999) destaca que tem sido fundamental ao sucesso dos programas de melhoramento genético, o uso de técnicas como o desenvolvimento

de mapas moleculares. Para tanto, marcadores baseados em PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação da Polimerase em Cadeia), podem produzir detalhadas descrições genéticas das mais variadas espécies de forma mais rápida e com menor investimento. De acordo com Milach et al. (1998), uma importante derivação desta técnica é a amplificação ao acaso de fragmentos de DNA (RAPD, *Random Amplified Polymorphism DNA*) que utiliza *primers* de sequência curta e arbitrária. A difusão desta tecnologia na análise genética e no melhoramento de plantas foi rápida auxiliando na avaliação da diversidade genética, no mapeamento genético e na seleção assistida de indivíduos e/ou populações (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Embora a grande maioria das cultivares de mamona introduzidas e testadas no Rio Grande do Sul tenham apresentado excelente adaptação, é imprescindível o desenvolvimento de um programa de melhoramento genético para a cultura, a fim de oferecer genótipos mais produtivos, precoces, resistentes às doenças e com elevado teor de óleo. Entendendo esta necessidade, a Embrapa Clima Temperado vem estruturando um banco ativo de germoplasma constituído de cultivares introduzidas e acessos locais de ocorrência espontânea (SILVA et al., 2004).

O objetivo deste trabalho foi caracterizar cultivares de mamona utilizando marcadores baseados em RAPD e teor de óleo nas sementes, a fim de auxiliar na identificação de materiais promissores ao programa de melhoramento da cultura conduzido pela Embrapa Clima Temperado.

2 Material e métodos

2.1 Material Vegetal

Foram avaliadas plantas de 15 cultivares comerciais de mamona (*Ricinus communis* L.) de diversas procedências (Tabela 3) cultivadas na Estação Experimental Cascata (EEC), da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS.

Tabela 3. Procedência das cultivares comerciais de mamona (Ricinus communis L.) cultivadas na Estação Experimental Cascata (EEC), da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS, na safra 2005/2006. Embrapa Clima Temperado, 2007.

Cultivar	Procedência
AL Guarany 2002	São Paulo/SP: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)
AL Preta	São Paulo/SP: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)
Cafelista	São Paulo/SP: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)
Nordestina	Campina Grande/PB: Embrapa Algodão (CNPQ)
Paraguaçu	Campina Grande/PB: Embrapa Algodão (CNPQ)
CSRN 393	Costa Rica: introduzida no Brasil pela Embrapa Algodão (CNPQ)
CSRN 193	Costa Rica: introduzida no Brasil pela Embrapa Algodão (CNPQ)
IAC 226	Campinas/SP: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)
IAC 80	Campinas/SP: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)
IAC Guarani	Campinas/SP: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)
VINEMA-T1	Camaquã/RS: Vilson Neumann Machado (VINEMA)
Íris	Janaúba/MG: Sementes Armani (Híbrido)
Lyra	Janaúba/MG: Sementes Armani (Híbrido)
Mirante	Janaúba/MG: Sementes Armani
Savana	Janaúba/MG: Sementes Armani (Híbrido)

Os experimentos no campo foram conduzidos em delineamento experimental de blocos casualizados, com as 15 cultivares de mamona. Foram 15 tratamentos com três repetições, na safra 2005-06.

Para as análises de PCR foram usadas duas amostras de 300mg de folhas, em fase inicial de desenvolvimento, de dez plantas em cada uma das parcelas. As análises de similaridade e de agrupamento dos genótipos foram feitas a partir dos perfis (bandas) revelados pelos géis, representados por matrizes binárias (ausência=0 e presença=1), empregando o coeficiente de Jaccard (1908) e o método da média aritmética não ponderada (UPGMA) com o auxílio do software

Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for Personal Computers, NTSYS 2.1 (ROHLF, 2000).

A fidelidade entre o dendrograma gerado e a matriz de similaridade que lhe deu origem foi avaliada pelo teste de Mantel (1967), cujo coeficiente define a correlação entre os dados. O dendrograma gerado foi seccionado sobre o valor médio de similaridade, para avaliar os grupos formados.

Foram colhidas 100g de sementes para a extração de óleo, utilizando a técnica do cone e da quarta parte (MENDHAM et al., 2002), a partir da quantidade total produzida pelas cultivares em cada bloco (Fig. 1). Foram 45 amostras de sementes geradas pelas três repetições no campo de cada uma das cultivares. Os ensaios laboratoriais foram repetidos três vezes, totalizando 9 testes para cada cultivar em cada um dos métodos de extração.

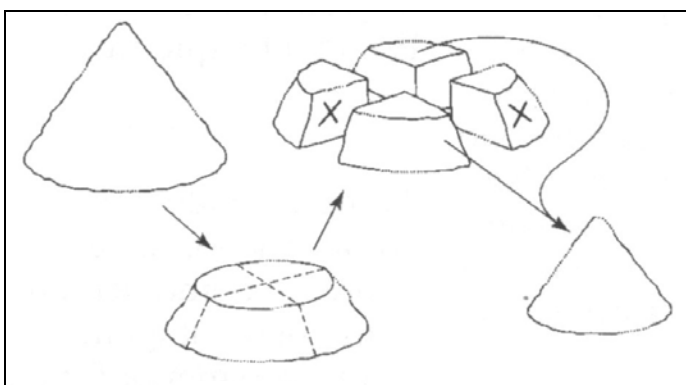


Figura 1. Técnica de amostragem do cone e da quarta parte (MENDHAM, et al., 2002)

2.2 PCR

O DNA genômico foi extraído de folhas, em fase inicial de desenvolvimento, pelo método CTAB, segundo protocolo descrito por Ferreira e Grattapaglia (1996). O DNA foi ressuspenso em tampão TE (Tris-EDTA), e armazenado em freezer. A quantificação foi realizada pela comparação da banda produzida pelas amostras com fragmentos de DNA λ cortado com enzima Hind III revelados depois da corrida eletroforética em gel de agarose a 0,8% p/v, em TBE 1X. As soluções de trabalho foram produzidas pela diluição em água padrão milliQ (5 μ g/ μ L).

As reações de amplificação do DNA foram processadas no Laboratório de Biologia Molecular da Embrapa Clima Temperado. Foram usados 2 μ L de DNA (10 μ g) somados a 11 μ L de mix de amplificação, uma solução aquosa (água MilliQ) contendo tampão PCR 1X (Tris-HCl 20mM com pH 8,4 e KCl 50mM); MgCl₂ (2,5mM), dNTPs (10mM), BSA (10 μ g), *primer* (0,38 μ M) e taq DNA polimerase (1U). Foram testados 20 oligonucleotídeos (*primers*) com 10 pares de bases, da Operon Technologies e 20 da UBC (University of British Columbia), dos quais foram selecionados 13 (Tabela 4). A reação foi processada em 40 ciclos de 94°C (1 minuto), 35°C (1 minuto) e 72°C (2 minutos), seguidos de um intervalo de 5 minutos a 72°C.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% p/v, em TBE 1X, com brometo de etídio (25 μ g/100mL). As amostras foram acompanhadas pelo marcador 1kb Plus DNA Ladder da Invitrogen. O ensaio foi conduzido em cuba submarina, sob diferença de potencial (ddp) de 110V e os fragmentos amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta. Seus pesos foram calculados pela comparação com o padrão de corrida, estabelecido pelo marcador.

2.3 Teor de óleo

A determinação do teor de óleo em sementes de mamona utilizando-se o método Soxhlet (Fig. 2) com hexano foi realizada com base nos procedimentos definidos pela *International Union of Pure and Applied Chemistry*, IUPAC (PAQUOT, 1979), no Laboratório de Pesquisa e Prestação de Serviços em Alimentos, LAPPA, do CEFET/RS. A fim de obter a maior fração de extrato possível (produto de peso constante), foram adotados 40 refluxos do solvente sobre a amostra, cerca de três horas e trinta minutos desde o primeiro refluxo. Ao final da extração, o solvente foi recuperado e o teor de lipídeos foi determinado pela relação gravimétrica percentual entre o óleo obtido e as sementes submetidas à extração.



Figura 2. Sistema de extração Soxhlet montado no

LAPPA (CEFET/RS)

Os resultados obtidos para o teor de óleo nas sementes foram submetidos à análise estatística com o auxílio do software Statistical Analysis System, SAS (2001). A análise da variância para comparação das cultivares (Teste de Duncan) em função do teor de óleo foi aplicada em um nível de significância de 5% ($\alpha=0,05$).

3 Resultados e discussão

3.1 RAPD

Embora tenham sido realizadas reações de amplificação com 40 *primers* diferentes, diversos oligonucleotídeos não produziram fragmentos e/ou os produtos de reação não permitiram uma avaliação consistente acerca da similaridade das cultivares testadas. Por isso, foram desprezados 27 *primers*, restando 13 (5 da UBC e 8 da Operon), que serviram à avaliação dos genótipos (Tabela 4).

Tabela 4. Produtos resultantes das reações de amplificação de DNA de genótipos de mamona com base nos marcadores RAPD. Embrapa Clima Temperado, 2007.

Primer	Seqüência (5'-3')	N.º bandas		Polimorfismo (%)
		Total	Polimórficas	
UBC-132	AGG GAT CTC C	11	4	36
UBC-133	GGA AAC CTC T	4	0	0
UBC-135	AAG CTG CGA G	16	7	44
UBC-153	GAG TCA CGA G	14	10	71
UBC-155	CTG GCG GCT G	12	5	42
OPA-12	TCG GCG ATA G	4	0	0
OPAB-9	GGG CGA CTA C	5	2	40
OPC-4	CCG CAT CTA C	4	0	0
OPI-11	ACA TGC CGT G	8	0	0
OPN-7	CAG CCC AGA G	6	3	50
OPX-7	GAG CGA GGC T	10	4	40
OPY-13	GGG TCT CGG T	21	14	67
OPY-16	GGG CCA ATG T	5	0	0
Totais		120	49	
Médias		9,2	3,8	41

Dentre os primers estudados, UBC-133, OPA-12, OPC-4, OPI-11 e OPY-16 geraram produtos monomórficos, e, os fragmentos produzidos por UBC-132, 135, 153 e 155, e por OPAB-9, OPN-7, OPX-7 e OPY-13, apresentaram polimorfismo (Fig. 3). Foram gerados 120 fragmentos, dos quais 49 polimórficos (41%). Em média, cada iniciador produziu 9,2 fragmentos, dos quais 3,8 apresentaram polimorfismo. Este índice é superior aos resultados obtidos por Vidal et al. (2005) ao avaliar cinco cultivares de mamona, procedentes do IAC, da Embrapa Algodão e da Costa Rica. Os autores registraram 105 bandas polimórficas, aproximadamente 23%, de um total de 454 fragmentos produzidos em amplificações RAPD com 47 oligonucleotídeos dos kits A, E, M, N e P da Operon. Já Cunha et al. (2006), empregando marcadores do tipo RAPD, para estudar 10 cultivares de mamona no município de Igaci, em Alagoas, obtiveram 60 bandas polimórficas, utilizando 7 iniciadores produzidos pela IDT (*Integrated DNA Technologies, Inc*), ou seja, cada primer produziu 8,6 bandas, em média.

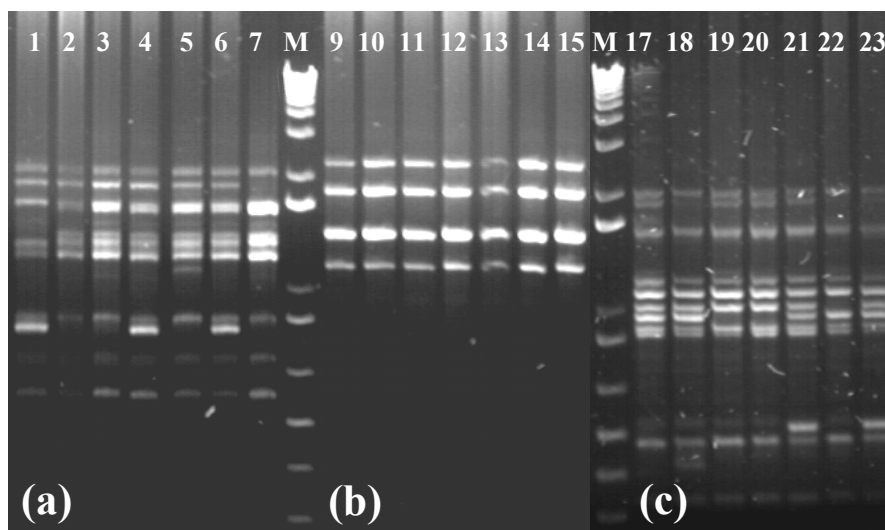


Figura 3. Géis de agarose 1,5% p/v em TBE 1X apresentando os produtos de RAPD de cultivares de mamona utilizando os primers UBC-132 (a), UBC-133 (b) e OPY-13 (c), onde: DNA ladder 1 kb Plus (M): AL Guarany 2002 (1, 9 e 17); Nordeste (2, 10, 18); AL Preta (3, 11 e 19); Cafelista (4, 12 e 20); CSRN 393 (5, 13 e 21); IAC 226 (6, 14 e 22); CSRN 193 (7, 15 e 23). Embrapa Clima Temperado, 2007.

O dendrograma (Fig. 4) obtido a partir da similaridade dos fragmentos gerados nas reações de amplificação, cujo coeficiente Jaccard foi de 0,86, possibilitou a separação dos genótipos em 7 grupos, segregando-os de acordo com a procedência, independente da instituição que desenvolveu a cultivar. Analisando populações de *Piper cernnum*, com marcadores RAPD, também observou-se diferenciação genética com forte estruturação espacial (ZUCCHI, 2002, apud MARIOT, 2000), fato que se repetiu em experimentos com pimenta longa no Acre (WADT; KAGEYAMA, 2004), onde o agrupamento genético das populações coincidiu com suas localizações geográficas em um nível de correlação de 77%. Estudando cagaiteira (*Eugenia dysenterica*), frutífera alógama característica do Cerrado, as matrizes de distâncias geográficas e genéticas apresentaram alta correlação, atribuindo à variabilidade genética um padrão espacial (ZUCCHI, 2002).

O coeficiente de correlação de Mantel foi de 0,81, indicando concordância satisfatória entre a matriz de dados e o agrupamento. O primeiro e maior dos grupos, com cerca de 87% de similaridade, composto por 6 cultivares, abriga todas os genótipos procedentes do Estado de São Paulo. No segundo grupo, separados em um nível de 88% de similaridade, estão dois híbridos de Minas Gerais, Lyra e Savana, seguidos de outros dois híbridos mineiros, compondo os grupos 3 (Íris) e 4 (Mirante). Quatro cultivares fornecidas pela Embrapa Algodão, da Paraíba,

constituem o quinto e o sétimo grupos, com dois genótipos cada um. No quinto, aparecem CSRN 393 e 193, e, no sétimo, Nordestina e Paraguaçu, ambos os agrupamentos num nível de 89% de similaridade. Convém salientar, neste caso, que as cultivares CSRN são materiais da Costa Rica (CR), introduzidos pela Embrapa Algodão no Brasil. Entre estes materiais, isolou-se o genótipo VINEMA-T1, oriundo de Camaquã, no Rio Grande do Sul. A capacidade de segregar os materiais testados pode ser explicada pelo fato de, embora não ser claro em que região do genoma os fragmentos de RAPD são amplificados, eles estão distribuídos aleatoriamente no genoma, o que sugere de moderada a alta resolução dos marcadores em mapas genéticos (HWANG et al., 2001; ZUCCHI, 2002).

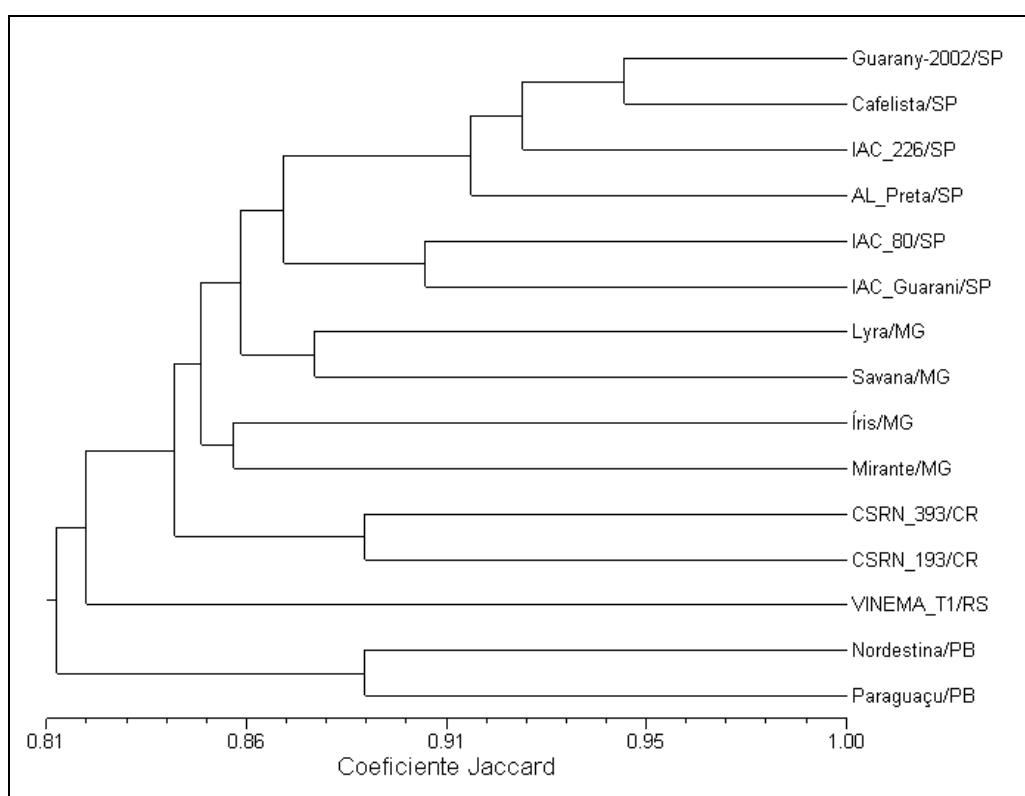


Figura 4. Agrupamento das cultivares de mamona produzido pela avaliação dos produtos da amplificação tipo RAPD, usando o coeficiente de similaridade Jaccard e a média aritmética não ponderada (UPGMA). Embrapa Clima Temperado, 2007.

3.2 Teor de óleo

A análise da variância para comparação das cultivares em função do teor de óleo foi significativa. Foram gerados 8 agrupamentos com os 15 genótipos testados (Tabela 5). Os grupos gerados pela avaliação do teor de óleo não corresponderam aos produzidos pelos marcadores moleculares, entretanto, não há dentre estes descritores genéticos qualquer especificidade com relação à quantidade de óleo das sementes. Além disso, de acordo com Hwang et al. (2001), a variação detectada por marcadores RAPD pode não ter consequências fenotípicas. Estudos em *Brassica oleracea*, por exemplo, conduzidos por Rao (2004), baseados em marcadores RAPD, revelaram que 14 acessos definidos fenotipicamente foram reduzidos a 4 grupos distintos.

O genótipo AL Guarany 2002 apresentou teor de óleo de 49,0%p/p, significativamente superior, seguido por dois híbridos mineiros, Lyra e Íris, e pela cultivar paulista IAC 80, cujos resultados oscilaram ao redor de 48%p/p. Em seguida, seis cultivares, cujos resultados variaram desde 45,7, da Mirante, até 46,5%p/p, dos genótipos IAC 226 (SP) e Paraguaçu (PB), acompanhados das demais cultivares paraibanas, Nordestina, CSRN 393 e 193, agruparam-se com mínima diferença no teor de óleo. Os genótipos AL Preta e Savana apresentaram teor de óleo de aproximadamente 44%p/p, superando a cultivar gaúcha VINEMA-T1, com 42,7%p/p. Os dois materiais restantes de São Paulo, Cafelista e IAC Guarani respectivamente com 40,7 e 40,6%p/p de óleo apresentaram os menores teores, entre os genótipos avaliados. Os resultados obtidos são semelhantes à faixa de valores, entre 43 e 49%, relatada por Pires et al. (2004) em experimentos da Embrapa no Nordeste do Brasil e, também, com resultados obtidos por Lima et al. (2004) na determinação do teor de óleo de sementes de mamona nativa de dez municípios, abrangendo Agreste, Brejo e Litoral do Estado da Paraíba, que oscilaram entre 44,14 e 47,47%. Dados de Melo et al. (2006), que avaliaram o teor de óleo de sementes das cultivares Nordestina e CSRN-393, mantidas pela Embrapa Algodão, em Missão Velha (CE), revelaram, respectivamente, 50,92 e 43,75%p/p, enquanto experimentos conduzidos por Lucena et al. (2006) alcançaram, respectivamente, 48,9% e 47,98% para a Nordestina e a Paraguaçu.

Tabela 5. Teor de óleo (% p/p base seca) em sementes de cultivares comerciais de mamona cultivadas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, na safra 2005-2006, determinado pelo método Soxhlet usando hexano. Embrapa Clima Temperado, 2007.

Cultivar	Origem	Óleo (% p/p)	CV (%)
AL-Guarany-2002	São Paulo	49,0 a	1,07
Lyra	Minas Gerais	48,2 b	1,00
Iris	Minas Gerais	47,9 b	1,08
IAC-80	São Paulo	47,7 b	1,15
IAC-226	São Paulo	46,5 c	1,34
Paraguaçu	Paraíba	46,5 c	1,39
Nordestina	Paraíba	46,3 cd	0,68
CSRN-393	Costa Rica	46,0 cd	1,50
CSRN-193	Costa Rica	45,8 d	1,32
Mirante	Minas Gerais	45,7 d	0,54
AL-Preta	São Paulo	44,6 e	0,82
Savana	Minas Gerais	44,2 e	0,74
VINEMA-T1	Rio Grande do Sul	42,7 f	0,90
Cafelista	São Paulo	40,7 g	0,92
IAC-Guarani	São Paulo	40,6 g	0,84

* médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Duncan a 5%.

4 Conclusões

Os marcadores moleculares baseados em RAPD são eficientes para revelar a variabilidade genética de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.).

A variabilidade genética revelada pelos marcadores baseados em RAPD apresenta alta correlação com a procedência dos genótipos estudados, independente da instituição que desenvolveu a cultivar.

Existe diferença significativa no teor de óleo extraído das sementes de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.) pelo método Soxhlet com hexano.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA) e ao Curso de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas (CEFET/RS) pelo apoio na realização deste trabalho.

6 Referências

- BELTRÃO, N. E. De M.; SOUZA, J. G. de; SANTOS, J. W. dos; COSTA, F. X.; LUCENA, A. M. A. de; QUEIROZ, U. C. de. Modificações na bioquímica da planta da mamoneira, cultivar BRS 188 Paraguaçu, submetida ao estresse hídrico (deficiência e excesso). **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 7, n. 1, p. 653-658, 2003.
- COSTA, M. N. da. **Análise dialélica das capacidades geral e específica de combinação utilizando técnicas uni e pi multivariadas e divergência genética em mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. 2006. 155 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Paraíba, 2006.
- CUNHA, M. A. da S. SALES, J. S.; MORAIS, T. de A.; RAMALHO NETO, C. E. Variabilidade genética de *Ricinus communis* L. revelada por marcadores RAPD. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Anais....** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 1 CD-ROM.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa CENARGEN, 1996. 220 p.
- HWANG, S.; LIN, H.; KUO, Y.; LIN, T. S. RAPD variation in relation to population differentiation of *Chamaecyparis formosensis* and *Chamaecyparis taiwanensis*. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, Taiwan, v. 42, p. 173-179, 2001.
- JACCARD, P. Nouvelles recherches sur la distribution florale. **Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles**, Lausanne, v. 44, p. 223-270, 1908.
- LIMA, R. L. S. Caracterização de sementes de mamoneiras asselvajadas coletadas em dez municípios da Paraíba. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.
- LUCENA, A. M. A. de; SEVERINO, L. S.; FREIRE, M. A. de O.; BELTRÃO, N. E. de M.; BORTOLUZI, C. D. Caracterização física e teor de óleo de sementes das cultivares: BRS Nordestina e BRS Paraguaçu separadas em classes pela cor do tegumento. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Anais....** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 1 CD-ROM.
- MACEDO, I. C. de. **Estado da arte e tendências tecnológicas para energia**. Brasília: Secretaria Técnica do Fundo Setorial de Energia, Centro de Gestão e Estudos Estratégicos, 2003. 76 p.
- MANTEL, N. A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Resouces**, Bethesda, v. 27, p. 209-220, 1967.
- MELO, C. L. R. de; GONDIM, T. M. de S.; SAMPAIO, D. D.; ARAÚJO, D. R. de; SOUSA, J. dos S.. Análises físico-químicas de sementes de três genótipos de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2006, Aracaju. **Anais....** Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2006. 1 CD-ROM.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. **Vogel: análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p. 109-113.

MENESES, C. H. S. G.; BEZERRA, C. S.; TAVARES, A. C.; COUTINHO, T. C.; SILVA, S. C.; MILANI, M.; VIDAL, M. S. Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética *Ricinus communis* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2004, Campina Grande. **Anais....** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 140 p.

MOREIRA, J. A. N.; SANTOS, J. W. dos; OLIVEIRA, S. R. M. **Abordagens e metodologias para avaliação de germoplasma**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1994. 115 p.

MURPHY, D. J. The future of new and genetically modified oil crops. In: JANICK, J. **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 1999. p. 216-219.

MYCZKOWSKI, M. L. **Variabilidade genética para o teor de óleo entre progênies autofecundadas de mamona (*Ricinus communis* L.) da cultivar Guarani**. 2003. 33 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, 2003.

PAQUOT, C. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6.ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 170 p.

PIRES, M. M.; ALVES, J. M.; ALMEIDA NETO J. A. de A.; ALMEIDA, C. M.; SOUSA, G. S. de; CRUZ, R. S. da; MONTEIRO, R.; LOPES, B. S.; ROBRA, S. Biodiesel de mamona: uma avaliação econômica. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais....** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

RAO, N. K. Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. **African Journal of Biotechnology**, Quênia, v. 3, n. 2, p. 136-145, 2004.

ROHLF, J. **NTSYSpc 2.1**. Nova Iorque: Applied Biostatistics, 2000. 1 CD-ROM.

SAS Institute. **Statistical analysis system 8.02**. Cary, 2001. 1 CD-ROM.

SILVA, S. D. A.; GOMES, C. B.; UENO, B.; ANTHONISEN, D. G.; GALHARÇA, S. P.; BAMMANN, I.; ZANATTA Z. G. C. N. Avaliação de cultivares de mamona em Pelotas - RS, Safra 2003/04. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais....** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

VIDAL, M. S.; MILANI, M.; MENESES, C. H. S. G.; BEZERRA, C. de S. **Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética *Ricinus communis* L.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 5 p.

WADT, L. H. de O.; KAGEYAMA, P. Y. Estrutura genética e sistema de acasalamento de *Piper hispidinervum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p.151-157, 2004.

ZUCCHI, M. I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR.** 2002. 148 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

Capítulo II – Validação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na determinação do teor de óleo em sementes de mamona[□]

[□] Aprovado pelo comitê de publicações da Embrapa Clima Temperado em fevereiro de 2007 para publicação como Comunicado Técnico 153.

Validação da espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) na determinação do teor de óleo em sementes de mamona

ANTHONISEN, Denilson Gouvêa¹; SCHIRMER, Manoel²; ANTHONISEN, Eliane Freire³; SILVA, Sérgio Delmar dos Anjos⁴; MILANI, Máira⁵; CASAGRANDE Jr, João Guilherme⁶

¹ Bacharel em química, analista da Embrapa Clima Temperado, CPACT, mestrando do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, DCTA, da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, denilson@cpact.embrapa.br

² Engenheiro químico, Drº, professor da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, schirmer@ufpel.edu.br

³ Graduanda do curso de bacharelado em química da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, eliane.f.a@ibest.com.br

⁴ Eng. agrôn., Drº, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, CPACT, sergio@cpact.embrapa.br

⁵ Eng. agrôn., Msc, pesquisadora da Embrapa Algodão, CNPA, maira@cnpa.embrapa.br

⁶ Eng. agrôn., Drº, bolsista de pós-doutorado da Fundação de Apoio à Pesquisa Edmundo Gastal, FAPEG, jgcasa@uol.com.br

Resumo

A extração com solvente é o processo mais utilizado na obtenção de óleos vegetais em escala industrial, onde o hexano é o solvente mais usado. Contudo, a necessidade de dispor de técnicas não destrutivas, rápidas e de fácil execução, tem tornado inviável o uso deste processo na rotina laboratorial. A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é um método alternativo para a determinação do teor de óleo e apresenta vantagens como a rapidez, a preservação da matriz, simplicidade no preparo da amostra e a possibilidade de uso de sistemas *in vivo* nos ensaios. Neste trabalho, o objetivo foi validar a técnica de RMN para a determinação do teor de óleo de sementes de mamona comparando-a ao método oficial de extração Soxhlet com hexano. A precisão da técnica instrumental foi avaliada usando a variância dos resultados e a exatidão foi medida através da comparação de médias dos ensaios. Concluiu-se que o uso da espectroscopia de RMN determina, com precisão, o teor de óleo em sementes de mamona e produz resultados equivalentes ao método oficial.

Termos para indexação: *Ricinus communis* L., análise instrumental, comparação de métodos

Validation of the NMR spectroscopy of oilseed content determination in castor bean

Abstract

The solvent extraction is the most used method to obtain vegetable oils at industrial scale, and hexane is the most used as solvent. However, non destructive, fast and easy techniques are necessary in laboratory routines and solvent extraction application is improper. The Nuclear Magnetic Resonance (NMR) is an alternative method for oilseed content determination, with advantages like speedness, matrix preservation, sample preparing simplicity and the possibility to use for *in vivo* systems assays. The objective of this work was to validate the NMR technique for the castor bean oilseed content determination comparing to the Soxhlet method of extraction. The precision was evaluated using the variance of the results and the accuracy by the means comparison. It was concluded that the use of NMR spectroscopy determines, precisely, the castor bean oilseed content, producing equal results to the official method.

Termos para indexação: *Ricinus communis* L., instrumental analysis, methods comparison

1 Introdução

Devido ao elevado valor comercial dos óleos vegetais, a produção em escala industrial não pode prescindir da extração por solvente, pois na prensagem mecânica, mesmo sob alta pressão, em torno de 5% do óleo contido no material extraído ficam retidos na torta, teores que podem ser reduzidos a 0,5%, quando solventes orgânicos são utilizados (MORETTO; FETT, 1998). Segundo Christie (1993), vários solventes ou combinações deles são usuais extratores de óleo (Tabela 6). Hoseney (1991) atribui tal propriedade à variedade e à complexidade das substâncias que a denominação óleo abrange, desde ácidos graxos livres até lipoproteínas. O autor destaca, por exemplo, que lipídeos não polares, como ácidos graxos livres e triglicerídeos, compõem a fração solúvel em clorofórmio, enquanto os polares, como fosfolipídeos e glicolipídeos, dissolvem-se em metanol. O hexano é o solvente orgânico preferido no processo de extração, por ser o mais seletivo, possuir estreita faixa de ebulição e ser imiscível com a água (Tabela 6), o que evita misturas azeotrópicas (MORETTO; FETT, 1998). No entanto, sua inflamabilidade, custo e potencial poluidor, justificam o estudo de alternativas ao seu uso.

Tabela 6. Detalhes técnicos de métodos de extração de óleo

Método	Aplicação	Vantagem	Limitação
Prensagem mecânica ¹	Industrial	Baixo consumo de energia; Baixo custo	Elevado teor de óleo na torta
Extração com hexano ^{1,2}	Laboratorial	Seletividade do solvente; Estreita faixa de ebulição;	Alto consumo de energia (aquecimento); Inflamabilidade do solvente;
	Industrial	Imiscibilidade com água; Recuperação do solvente.	Alto custo do solvente; Impacto ambiental.
Extração com éter (Soxhlet) ³	Laboratorial	Baixo ponto de ebulição do solvente; Recuperação do solvente.	Alto consumo de energia (aquecimento); Solvente inflamável e explosivo; Alto custo do solvente; Impacto ambiental.
Extração com clorofórmio/metanol (Bligh-Dyer) ⁴	Laboratorial	Baixo consumo de energia (sem aquecimento); Extração de todas as classes de lipídeos.	Solventes tóxicos; Impacto ambiental.

¹ Citado por Moretto e Fett (1998); ² Citado por Paquot (1979); ³ Citado por Pregnotatto e Pregnotatto (1985); ⁴ Citado por Vicenzi (2004)

Para trabalhos em escala laboratorial, Mendham et al. (2002) afirmam que a escolha da técnica analítica, além de segurança e custo, deve considerar outros critérios, como o tempo de execução do ensaio, o volume de testes, a natureza e a quantidade de amostra. Segundo os autores, métodos destrutivos, cujo processo de preparo de amostras ou a própria determinação envolvem a dissolução e/ou fragmentação do material em estudo, implicam, portanto, em transformação da matriz para melhorar a detecção do analito. Isto consome tempo, exige investimento e gera fonte de erros, como a diluição. Os autores afirmam, ainda, que métodos instrumentais, baseados em propriedades físicas, como absorção ou emissão de energia, condutividade elétrica, rotação óptica, são capazes de fornecer informações quantitativas de um analito, preservando as características das amostras e gerando resultados com maior rapidez do que métodos clássicos, como os gravimétricos e os volumétricos, estes caracterizados pela natureza destrutiva.

Para Colnago (1996), laboratórios podem dispensar a extração por solvente para a determinação rotineira do teor de óleo, especialmente quando grandes quantidades de amostras precisam ser avaliadas, por se tratar de um processo demorado e destrutivo. De acordo com o autor, a ressonância magnética nuclear (RMN) é um método alternativo para a determinação do teor de óleo e apresenta vantagens como a rapidez, a preservação da matriz, simplicidade no preparo da amostra e a possibilidade de uso de sistemas *in vivo* para a determinação.

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) mede a absorção de radiação eletromagnética de até 750MHz pelos núcleos dos átomos, presentes na amostra. O uso da técnica no estado sólido é um campo especializado que abrange desde o estudo de polímeros até a produção de imagens (MENDHAM et al., 2002).

Analisar uma mesma amostra usando diferentes técnicas pode servir para verificar a ordem de grandeza de um resultado ou para confirmar a existência de um analito, obtido pela técnica original. Comparar resultados é uma prática comum à química analítica para verificar a precisão de técnicas distintas e determinar se conjuntos diferentes de dados são coerentes e, portanto, confiáveis (LEITE, 1998). Além disso, Ellison et al. (2002) destacam que a atual preferência pelos métodos analíticos oficiais, para a determinação dos mais variados analitos, tem origem na necessidade de apresentar dados com rastreabilidade e precisão. Contudo, a exigência formal de confiabilidade consiste na rastreabilidade do resultado a uma referência que pode ser representada por método reconhecido ou empírico (ELLISON et al., 2002). O uso da espectroscopia de RMN pressupõe, portanto, a necessidade de estabelecer previamente uma referência para os resultados, como forma de validá-los.

Validar um ensaio laboratorial é comprovar, através de evidência objetiva, que os requisitos para sua aplicação foram atendidos (INMETRO, 2005). Embora a validação não tenha sido formalmente definida, o foco incide sobre a confiabilidade analítica do método, sem desprezar o critério pessoal, quando o interessado promove adaptações e ajusta as recomendações técnicas às suas necessidades (LEITE, 1998).

Leite (1998) destaca que a validação deve ser um processo abrangente que avalie desde a estrutura suporte e o ambiente laboratorial até a capacitação do analista. Neste contexto, deve-se ter especial interesse em parâmetros básicos, como exatidão, precisão, segurança, calibração, respostas analíticas e avaliação estatística.

Entendendo a necessidade de agilidade na geração de resultados, preservação de amostras, redução de riscos operacionais e minimização do impacto ambiental, mas, sobretudo, reconhecendo ser imprescindível a confiabilidade dos resultados gerados em análises laboratoriais, este trabalho objetiva a validação da técnica de determinação do teor de óleo de sementes de mamona, usando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear.

2 Material e métodos

O processo de validação da técnica de espectroscopia de RMN passa pelas etapas de definição da precisão e da exatidão dos resultados, neste caso pela comparação com o método de extração do tipo Soxhlet, usando hexano como solvente, por ser o método oficial de determinação do teor de óleo, de acordo com a IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry*.

2.1 Sementes de mamona

As sementes utilizadas na validação da técnica de espectroscopia de RMN foram obtidas de cinco cultivares comerciais de mamona cultivadas na Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS, na safra 2005-2006 (Tabela 7).

Tabela 7. Procedência das cultivares comerciais de mamona cultivadas em Pelotas/RS, na safra 2005-2006. Embrapa Clima Temperado, 2007.

Cultivar	Tipo	Procedência	Descrição
Íris	Híbrido	Janaúba/MG	Sementes Armani
IAC 226	Variedade	Campinas/SP	IAC (Instituto Agronômico de Campinas)
Savana	Híbrido	Janaúba/MG	Sementes Armani
VINEMA T1	Variedade	Camaquã/RS	VINEMA (Vilson Neumann Machado)
Cafelista	Variedade	São Paulo/SP	CATI (Coordenadoria de Assistência Técnica Integral)

2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A determinação do teor de óleo em sementes de mamona, utilizando-se a técnica de RMN, foi conduzida a partir de procedimentos descritos por Colnago (1996), na Embrapa Algodão, em três repetições. A primeira etapa desta técnica foi a calibração do espectrômetro de onda contínua de 2,7MHz, usando-se farinha e óleo de mamona, como os pontos zero e 100%, respectivamente. Uma vez realizada a calibração, procedeu-se à determinação do teor de óleo das amostras. Ao final da leitura, o peso de amostra usado no teste foi inserido no sistema e o teor de óleo fornecido automaticamente.

2.3 Método de Extração Soxhlet

A determinação do teor de óleo em sementes de mamona utilizando-se o método Soxhlet com hexano foi realizada, em três repetições, com base nos procedimentos definidos pela IUPAC (PAQUOT, 1979). A fim de se obter a maior fração de extrato possível (produto de peso constante), foram adotados 40 refluxos, totalizando cerca de três horas e trinta minutos de extração, desde o primeiro refluxo. Ao final da extração, o solvente foi recuperado e o teor de lipídeos foi determinado pela relação gravimétrica percentual entre o óleo obtido e as sementes submetidas à extração.

2.4 Avaliação estatística dos dados

A medida da precisão da técnica instrumental baseou-se na avaliação da variância dos resultados obtidos para cada cultivar testada. Para fazê-lo, foram comparados os dois conjuntos de dados pelo teste F. A exatidão foi medida através da comparação de médias (teste t) dos dados, obtidas pela espectroscopia de RMN e pelo método clássico de extração (Soxhlet) de óleo das sementes (LEITE, 1998).

3 Resultados e Discussão

A determinação do teor de óleo em sementes de mamona pelo método Soxhlet de extração por solvente orgânico, usando hexano, forneceu os resultados reunidos na Tabela 8, considerados referência na validação da técnica instrumental (RMN). Os valores de desvio padrão entre 0,34 e 0,51, além de coeficientes de variação que oscilaram entre 0,77 e 1,17% indicam precisão elevada, requisito intrínseco a um método analítico oficial.

Tabela 8. Teor médio de óleo (% p/p base seca) em sementes de cultivares comerciais de mamona cultivadas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, na safra 2005-2006, determinado pelo método de extração Soxhlet usando hexano e pela técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Embrapa Clima Temperado, 2007.

Cultivar	Método Soxhlet			RMN		
	Teor de óleo	Desvio padrão	CV (%)	Teor de óleo	Desvio padrão	CV (%)
Íris	47,9	0,51	1,06	49,1	2,04	4,15
IAC 226	45,0	0,40	0,88	45,4	1,46	3,21
Savana	44,1	0,34	0,77	46,5	1,48	3,18
VINEMA T1	42,6	0,42	0,98	44,0	1,81	4,12
Cafelista	40,6	0,48	1,17	42,8	1,39	3,25

A técnica instrumental de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) gerou valores de desvio padrão que oscilaram entre 1,39 e 2,04, e coeficientes de variação, entre 3,21 e 4,24% (Tabela 8), que indicam menor precisão, quando comparada ao método clássico (Soxhlet). Entretanto, a avaliação dos resultados da análise de variância através do teste F permite verificar que não existe diferença significativa em um nível de confiança de 5%, ou seja, a precisão da espectroscopia de RMN equivale à do método clássico.

Ao avaliar a exatidão da técnica proposta, usando-se o teste t para comparação das médias, percebe-se que também não há diferença significativa entre os valores em nível de confiança de 1%, conforme dados expostos na Tabela 9.

Embora seja possível observar que os valores absolutos obtidos com o uso da técnica de espectroscopia de RMN foram ligeiramente superiores, os coeficientes de correlação, ao redor de 1, indicam que os teores de óleo de cada cultivar, em ambas as técnicas analíticas, são equivalentes, ratificando a informação gerada pelo teste t.

A classificação das cultivares, segundo o teor de óleo, obtida a partir dos resultados de ambas as técnicas analíticas, foi equivalente. O híbrido Íris foi o material de maior teor, 47,9 e 49,1%, no método Soxhlet e na espectroscopia de RMN, respectivamente. As cultivares VINEMA-T1 e Cafelista, apresentaram os menores teores entre os materiais avaliados e, embora os valores absolutos de teor de óleo para os genótipos IAC-226 e Savana indiquem alternância de posição como

segunda e terceira cultivar com maior teor de óleo, tais resultados não diferem estatisticamente em um nível de significância de 5%.

Tabela 9. Dados da avaliação estatística da precisão e da exatidão da técnica de espectroscopia de RMN para a determinação do teor de óleo (% p/p b.s.) em sementes de cultivares comerciais de mamona, usando como referência o método Soxhlet. Embrapa Clima Temperado, 2007.

Cultivar	Soxhlet		RMN		F (F _{5%} =19,00)	t (t _{1%} =3,75)	Correlação
	Média	s ²	Média	s ²			
Íris	47,9	0,258	49,1	4,157	16,12	1,35	1,0000
IAC 226	45,0	0,157	45,4	2,121	13,53	0,65	1,0000
Savana	44,1	0,115	46,5	2,186	18,96	3,50	0,9973
VINEMA T1	42,6	0,174	44,0	3,287	18,86	1,69	0,9999
Cafelista	40,6	0,226	42,8	1,929	8,55	3,35	1,0000

Onde:

s² é a variância; F é o valor de F, obtido pela razão entre as variâncias de cada técnica de determinação; F_{5%} = 19,00 é valor tabelado para $\alpha = 0,05$; t é valor t obtido da comparação das médias; t_{1%} = 3,75 é valor tabelado para $\alpha = 0,01$.

4 Conclusões

O uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) permite determinar, com precisão, o teor de óleo em sementes de mamona.

A espectroscopia de RMN e o método oficial, de extração tipo Soxhlet com hexano, produzem resultados equivalentes na determinação do teor de óleo em sementes de mamona.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA), ao Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas (CEFET/RS) e à Embrapa Algodão (CNPQ), pelo apoio na realização deste trabalho.

6 Referências

- CHRISTIE, W.W. **Advances in Lipid Methodology**. Dundee: Oil Press, 1993. p. 195-213.
- COLNAGO, L. A. **Análise do teor de óleo em sementes por RMN**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1996. 13 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Circular técnica, 3).
- ELLISON, S. L. R.; ROSSLEIN, M.; WILLIAMS, A. **Guia EURACHEM/CITAC: determinando a incerteza na medição analítica**. 2 ed. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Metrologia, 2002. 166 p.
- HOSENEY, R. C. **Principios de ciencia y tecnología de los cereales**. Zaragoza: Acribia, 1991. 317 p.
- INMETRO. **Orientações para seleção e uso de materiais de referência: DQO-CGCRE-016**. Revisão 00. Rio de Janeiro: INMETRO-DICLA, 2005. 15 p.
- LEITE, F. **Validação em análise química**. 3 ed. Campinas: Átomo, 1998. 224 p.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. **Vogel: análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 462 p.
- MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 151 p.
- PAQUOT, C. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6.ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 170 p.
- PREGNOLATTO, W; PREGNOLATTO, N. P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Secretaria Estadual da Saúde, 1985. v. 1. 533 p.
- VICENZI, R. **Apostila de bromatologia**. Ijuí: Ed. Da UNIJUI - Departamento de Ciências da Saúde, 2004. 79 p.

Capítulo III – Extração de óleo de sementes de mamona usando etanol

Extração de óleo de sementes de mamona usando etanol

ANTHONISEN, Denilson Gouvêa¹; SCHIRMER, Manoel Artigas²; ANTHONISEN, Eliane Freire³; SILVA, Sérgio Delmar dos Anjos⁴; CASAGRANDE Jr, João Guilherme⁵

¹ Bacharel em química, analista da Embrapa Clima Temperado, CPACT, mestrando do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, DCTA, da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, denilson@cpact.embrapa.br

² Químico, Dr, professor da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, schirmer@ufpel.edu.br

³ Graduanda do curso de bacharelado em química da Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, eliane.f.a@ibest.com.br

⁴ Eng. agrôn., Dr, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, CPACT, sergio@cpact.embrapa.br

⁵ Eng. agrôn., Dr, bolsista de pós-doutorado da Fundação de Apoio à Pesquisa Edmundo Gastal, FAPEG, jgcasa@uol.com.br

Resumo

O óleo da mamona é uma matéria prima estratégica de elevado valor comercial, cujas propriedades químicas permitem utilizá-lo na manufatura de diversos insumos e produtos, inclusive biodiesel. O uso de solventes na extração é fundamental para viabilizar sua produção em escala industrial. O hexano é o solvente usualmente utilizado, mas os riscos operacionais, à saúde humana e ao meio ambiente. Além disso, a reduzida capacidade de solubilizar frações ricas em ácido ricinoléico, principal ácido graxo da mamona, justificam o estudo do etanol como uma alternativa para o processo, pois estas frações são solúveis em álcool. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência deste solvente na extração de óleo de sementes de mamona comparando-a com o processo que usa hexano. Os teores de óleo extraído por etanol são, no método Soxhlet, 53,8%p/p, e, à temperatura ambiente, 48,0%p/p, ambos superiores aos resultados obtidos pelo método oficial, que usa hexano na extração por Soxhlet, em média 45,5%p/p.

Termos para indexação: *Ricinus communis* L., Soxhlet, ácido ricinoléico

Oilseed extraction of castorbean by ethanol

Abstract

The castor bean oilseed is a strategic raw material of great value in the market, which chemical properties are suitable for manufacturing several products, including biodiesel. The use of solvents in extraction is essential to add value to the industrial process. Hexane is the solvent usually used, but the operational risks, to human health and to the environment, besides its low capability to solubilize lipidic fraction with high ricinoleic acid content, main castor bean fat acid, justifies the study of ethanol as an alternative for the extraction process, considering that ricinoleic acid is the only one fat acid soluble in alcohol. The aim of this study was to evaluate the efficiency of ethanol as solvent in castor bean oilseed extraction using the hexane extraction as reference. The oilseed content extracted using ethanol as solvent in the Soxhlet Method is 53.8%w/w, and at room temperature is 48.0%w/w, both are higher than the official method, which uses hexane in the Soxhlet extraction, 45.5%w/w.

Index terms: *Ricinus communis* L., soxhlet, ricinoleic acid

1 Introdução

O óleo da mamona é uma matéria prima estratégica, pois apresenta grande potencial químico e energético. Suas propriedades químicas permitem utilizá-lo na manufatura de diversos insumos e produtos, dentre eles o biodiesel, que se constitui numa fonte renovável de energia capaz de substituir o óleo diesel (SANTOS et al., 2004). Macêdo (2004) afirma que os preços dos óleos vegetais aumentaram desde meados de 2003 com a redução da safra americana de soja e o incremento das importações de oleaginosas pela China. O óleo de mamona estava entre os mais valorizados e acompanhou esta alta chegando a 900 dólares por tonelada. Atualmente, este óleo mantém sua cotação ao redor de 1.000 dólares (SEAOFINDIA, 2007).

A obtenção do óleo de mamona, como dos demais óleos vegetais, exige tecnologia específica, porque os lipídeos estão distribuídos em diversas partes anatômicas das sementes e ligados a vários tipos de constituintes, como proteínas e carboidratos que podem exibir diferenças de solubilidade. Por isso, para obtê-lo, as sementes são submetidas à extração, física e/ou química, da qual produz-se óleo bruto, cuja composição abriga ácidos graxos livres, fosfolipídeos, esteróis e outras impurezas (PREGNOLATO; PREGNOLATO, 1985; HOSENEY, 1994). Os ácidos graxos constituintes de óleos vegetais diferem quanto ao comprimento da cadeia carbônica e ao número de ligações insaturadas (MA; HANNA, 1999). Entretanto, a composição do óleo de mamona é bastante peculiar, afinal é o único constituído por um ácido graxo hidroxilado de 18 átomos de carbono com insaturação, o ácido ricinoléico, que responde por cerca de 90% p/p do óleo (MENEGETTI et al. 2004). Contudo, Rojas-Barros et al. (2004) afirmam que esta fração pode variar desde 58,5 até 92,3% p/p.

A produção de óleos vegetais não pode prescindir da extração por solvente, pois na prensagem mecânica resta na torta uma fração de, pelo menos, 5% do óleo contido nas sementes, percentual que se reduz a 0,5%, quando solventes orgânicos são utilizados (MORETTO; FETT, 1998). Segundo Christie (1993), vários solventes são eficientes na extração de óleo, entretanto, o mais utilizado é o hexano, pois, apesar da inflamabilidade e toxicidade, é o mais seletivo, possui estreita faixa de ebulição e é imiscível com a água, o que evita misturas azeotrópicas.

Contudo, os riscos operacionais, à saúde humana e ao meio ambiente, associados à origem não-renovável e à reduzida capacidade de solubilizar o ácido ricinoléico, principal ácido graxo da mamona, justificam a pesquisa de substitutos para o hexano na extração deste óleo. De acordo com Beltrão et al. (2004), o etanol constitui uma alternativa, pois o ácido ricinoléico é o único solúvel em álcool, mesmo em baixas temperaturas, viabilizando a extração da fração rica neste ácido, predominante nas sementes de mamona. Além disso, o álcool é produzido a partir de fontes renováveis, ao contrário do alcano, e a comparação de propriedades químicas permite verificar que o etanol oferece menores riscos operacionais do que o hexano, pois apresenta maiores temperaturas de inflamação (12 contra -22°C) e de auto-ignição (363 contra 225°C) e toxicidade mais baixa (LD_{50} oral para ratos de 6.200 contra 2.500mg/kg) (MERCK, 2006a; 2006b).

Também na produção de biocombustíveis, o álcool apresenta vantagens. A análise da viabilidade econômica e ambiental dos processos destinados a este fim passa pela avaliação da relação entre a energia investida na sua produção e a gerada por ele. Na extração do óleo, por exemplo, trocar hexano por etanol significa economizar 3,79 MJ/kg de solvente, já que na produção de etanol e de hexano são consumidos, respectivamente, 2,91 e 6,70 MJ/kg (ALMEIDA NETO et al., 2004).

Outra indicação do potencial de utilização do etanol na extração é a facilidade da separação do solvente ao final do processo e a economia de energia para fazê-lo. Por se tratar de uma substância orgânica solúvel em água, o etanol pode ser separado do óleo por decantação depois da mistura com este solvente, concentrando-se na fase aquosa (WISER, 2006).

A análise destes fatores e a ausência de informações a respeito do desempenho do etanol na extração de óleo, tornaram oportuno o estudo deste álcool como solvente, por isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do etanol na extração de óleo de sementes de mamona.

2 Material e métodos

2.1 Material vegetal

Os experimentos no campo foram conduzidos em delineamento experimental de blocos ao acaso, com 15 cultivares de mamona (Tabela 10). Foram 15 tratamentos com três repetições, na safra 2005-06.

Tabela 10. Procedência das cultivares comerciais de mamona (Ricinus communis L.) cultivadas na Estação Experimental Cascata (EEC), da Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS, na safra 2005/2006

Cultivar	Procedência
AL Guarany 2002	São Paulo/SP: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)
AL Preta	São Paulo/SP: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)
Cafelista	São Paulo/SP: Coordenadoria de Assistência Técnica Integral (CATI)
Nordestina	Campina Grande/PB: Embrapa Algodão (CNPA)
Paraguaçu	Campina Grande/PB: Embrapa Algodão (CNPA)
CSRN 393	Costa Rica: introduzida no Brasil pela Embrapa Algodão (CNPA)
CSRN 193	Costa Rica: introduzida no Brasil pela Embrapa Algodão (CNPA)
IAC 226	Campinas/SP: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)
IAC 80	Campinas/SP: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)
IAC Guarani	Campinas/SP: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC)
VINEMA-T1	Camaquã/RS: Vilson Neumann Machado (VINEMA)
Íris	Janaúba/MG: Sementes Armani (Híbrido)
Lyra	Janaúba/MG: Sementes Armani (Híbrido)
Mirante	Janaúba/MG: Sementes Armani
Savana	Janaúba/MG: Sementes Armani (Híbrido)

Para a extração de óleo foram colhidas, em fevereiro de 2006, as bagas das plantas e delas removidas manualmente as cascas. As amostras com 100g de sementes foram obtidas utilizando a técnica do cone e da quarta parte (MENDHAM et al., 2002), a partir da quantidade total produzida pelas cultivares em cada bloco, conservadas em câmara fria. Os ensaios laboratoriais foram repetidos três vezes para as cultivares em cada um dos métodos de extração propostos neste trabalho.

2.2 Determinação do teor de óleo

2.2.1 Extração soxhlet

A determinação do teor de óleo em sementes de mamona utilizando o método Soxhlet, extração com solvente aquecido até sua temperatura de ebulição, com hexano e etanol, foi realizada com base nos procedimentos definidos pela IUPAC, *International Union of Pure and Applied Chemistry* (PAQUOT, 1979), no Laboratório de Pesquisa e Prestação de Serviços em Alimentos, LAPPA, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas, CEFET/RS. A fim de obter um extrato de peso constante com hexano e etanol, foram adotados quarenta e vinte refluxos, respectivamente. Ao final da extração, o solvente foi recuperado e o teor de lipídeos foi determinado pela relação gravimétrica percentual entre o óleo obtido e as sementes submetidas à extração.

2.2.2 Extração a frio

Este processo considera o fato que o etanol é capaz de solubilizar frações ricas em ácido ricinoléico, mesmo em baixas temperaturas (BELTRÃO et al., 2004). Foram pesados 5g de sementes e transferiu-se o material para um béquer de 250mL contendo 50mL de etanol absoluto. A mistura foi triturada durante 60 segundos com o auxílio de um mixer portátil e, em seguida, submetida à filtração à vácuo, cujo papel filtro foi previamente tarado. A quantidade de material retido pelo filtro (torta) foi determinada por gravimetria depois de secagem em estufa ($103\pm 2^{\circ}\text{C}$), até peso constante, enquanto a massa de óleo foi obtida pela diferença entre as massas de torta e de sementes submetidas à extração. O teor de óleo foi determinado pela relação gravimétrica percentual entre o óleo obtido e as sementes utilizadas no ensaio.

2.3 Avaliação estatística dos dados

Os resultados obtidos para o teor de óleo nas sementes foram submetidos à análise estatística com o auxílio do software Statistical Analysis System, SAS. O método oficial de determinação de óleo, Soxhlet usando hexano, foi tomado como referência na avaliação do desempenho do etanol no processo de extração, tanto pelo método Soxhlet, quanto à temperatura ambiente.

A comparação dos tratamentos, em função do teor de óleo, foi realizada utilizando o Teste de Duncan ao nível de 5%.

3 Resultados e discussão

As técnicas de extração de óleo apresentaram elevada precisão, indicada pelos baixos valores obtidos para os coeficientes de variação (CV), 1,07 e 0,99%, respectivamente, para hexano e etanol no método Soxhlet e de 1,75%, quando o etanol à temperatura ambiente foi aplicado (Tabela 11).

Existe diferença significativa entre os resultados gerados pelas três técnicas de extração. O teor de óleo mais elevado na extração Soxhlet com hexano, 49,0%p/p, foi obtido com a cultivar AL Guarany 2002, enquanto com o etanol foi de 58,1%p/p na cultivar Paraguaçu. Já, na extração com o álcool à temperatura ambiente, o maior resultado foi alcançado com o híbrido Lyra, 52,2%p/p (Tabela 11).

A amplitude dos resultados obtidos nos experimentos pelo método Soxhlet, foi de 8,8 pontos percentuais, variando desde 58,1 até 49,3%p/p, para o etanol, e de 8,4 pontos, quando o hexano foi o solvente, com resultados entre 49,0 e 40,6%p/p. Já na extração à temperatura ambiente, a variação foi de 9,7 pontos percentuais, entre 52,2 e 42,5%p/p. Os resultados das cultivares Paraguaçu, Lyra e Íris foram significativamente superiores em todos os experimentos, enquanto Cafelista e IAC Guarani, dentre os materiais testados, apresentaram os menores teores de óleo (Tabela 11). A ordenação das cultivares pelo teor de óleo difere conforme a técnica de extração, devido à diferença na composição química das sementes de mamona conforme a cultivar (FREIRE, 2001).

A análise de variância para o teor de óleo extraído por etanol e hexano no método Soxhlet foi significativa (Apêndice A). Os teores de óleo obtidos quando o etanol foi usado como solvente são superiores aos dados resultantes da extração com hexano, em média, 53,8 e 45,5%p/p, respectivamente (Tabela 11), uma diferença de rendimento de 8,3 pontos percentuais. A maior diferença gerada pelo uso de diferentes solventes no método Soxhlet foi de 11,7 pontos percentuais, verificada na cultivar VINEMA-T1, onde com etanol obteve-se 54,4% e, com hexano, 42,7%p/p de óleo. Resultados superiores ao hexano, também foram obtidos por Baliza et al. (2004), usando etanol para extrair óleo da torta de mamona do genótipo AL Guarany 2002. Isto pode ser explicado pelo fato que o grupo hidroxila do ácido

ricinoléico, principal constituinte do óleo de mamona, contribui para propriedades peculiares como a solubilidade, elevada em álcool e limitada em solventes alifáticos derivados do petróleo (G.R.O'SHEA, 2002). Cabe, também, ressaltar que os solventes polares têm a capacidade de extrair lipídeos ligados a outros constituintes, ao contrário dos apolares que removem apenas os livres, e, por isso, podem carrear materiais não lipídicos (HOSENEY, 1994).

Existem diferenças significativas do teor de óleo entre a extração à temperatura ambiente com etanol e o método Soxhlet com hexano (Apêndice A), embora, para quatro cultivares, CSRN 193, CSRN 393, IAC 80 e Mirante, isto não tenha ocorrido. Os resultados obtidos com álcool são superiores àqueles em que o alcano foi usado, em média, 48,0 e 45,5%p/p, respectivamente (Tabela 11). O que ratifica os resultados obtidos por Baliza et al. (2004) na extração de óleo de torta de mamona, onde concluíram que se obtém maior rendimento usando solventes polares. Contudo, a diferença em relação ao método oficial, neste caso de 2,5 pontos percentuais, foi inferior àquela observada quando o álcool foi aquecido durante a extração, igual a 8,3 pontos. A maior diferença, relativa ao hexano, em favor da extração com etanol sem aquecimento, de 5,8 pontos percentuais, foi obtida com a cultivar AL-Preta, da qual extraiu-se uma fração de 50,4% contra 44,6%p/p. O híbrido Lyra apresentou maior teor de óleo, embora o resultado de 52,2%p/p tenha sido inferior 5,5 pontos percentuais ao obtido na extração Soxhlet com o mesmo solvente, 57,7%p/p.

As médias dos resultados obtidos na extração com etanol foram de 53,8 e 48,0%p/p, respectivamente, para o método Soxhlet e à temperatura ambiente (Tabela 11), o que representa um incremento de 5,8 pontos percentuais, no teor de óleo quando o aquecimento é aplicado ao solvente. Embora os genótipos Lyra e Paraguaçu tenham mantido resultados superiores aos demais materiais, a ordenação das cultivares segundo o teor de óleo determinado pelas técnicas de extração usando álcool difere, devido à diferença na composição química das sementes de mamona conforme a cultivar (FREIRE, 2001).

Tabela 11. Teor de óleo (% p/p b. s.) em sementes de cultivares de mamona cultivadas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, na safra 2005-2006, extraído com etanol à temperatura ambiente e usando método de extração Soxhlet. Embrapa Clima Temperado, 2007.

Cultivar	Etanol/Soxhlet			Etanol/Ambiente			Hexano/Soxhlet			Média	CV
	Óleo	Duncan*		Óleo	Duncan*		Óleo	Duncan*		% p/p	%
Paraguaçu	58,1	a	A	50,4	b	B	46,5	c	C	51,6	11,45
Lyra	57,7	a	A	52,2	a	B	48,2	b	C	52,7	9,10
Íris	56,5	b	A	48,8	cd	B	47,9	b	C	51,1	9,26
Nordestina	54,9	c	A	47,5	def	B	46,3	cd	C	49,5	9,38
AL-Preta	54,7	c	A	50,4	b	B	44,6	e	C	49,8	10,12
Savana	54,7	c	A	48,8	cd	B	44,2	e	C	49,2	10,66
VINEMA-T1	54,4	cd	A	46,7	ef	B	42,7	f	C	47,9	12,38
Mirante	53,9	d	A	46,3	fg	B	45,7	d	B	48,7	9,36
AL-Guarany-2002	53,7	de	A	51,3	ab	B	49,0	a	C	51,3	4,62
IAC-226	53,7	de	A	49,8	bc	B	46,5	c	C	50,0	7,21
IAC-80	53,2	e	A	47,9	de	B	47,7	b	B	49,6	6,30
CSRN-393	51,2	f	A	46,8	ef	B	46,0	cd	B	48,0	5,79
CSRN-193	50,6	f	A	46,2	fg	B	45,8	d	B	47,6	5,57
Cafelista	49,8	g	A	45,0	g	B	40,7	g	C	45,2	10,03
IAC-Guarani	49,3	g	A	42,5	h	B	40,6	g	C	44,2	10,37
Média (% p/p)	53,8			48,0			45,5				
CV (%)	0,99			1,75			1,07				

* médias seguidas de letras iguais, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo Teste Duncan a 5%.

4 Conclusões

A extração de óleo de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) pelo método Soxhlet com etanol apresenta resultados superiores ao método oficial com hexano.

A extração de óleo de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) com etanol à temperatura ambiente apresenta resultados superiores ao método Soxhlet com hexano.

Os teores de óleo obtido de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) usando etanol como solvente no método Soxhlet são superiores aos da extração à temperatura ambiente.

Os genótipos Lyra e Paraguaçu apresentaram resultados superiores aos demais quando o etanol foi usado como solvente no método Soxhlet.

5 Agradecimentos

Os autores agradecem ao Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA) e ao Curso de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica de Pelotas (CEFET/RS) pelo apoio na realização deste trabalho.

6 Referências

- ALMEIDA NETO, J. A. de. Balanço energético de ésteres metílicos e etílicos de óleo de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais..** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.
- BALIZA, D. P.; CARDOSO, M. das G.; VILELA, F. J.; GUIMARÃES L. G. de L.; SILVA, V. de F.; PEREIRA, A. de A.; CASTRO NETO, P.; FRAGA, A. C. Extração do óleo fixo da torta oriunda da prensagem industrial de sementes de *Ricinus communis* (mamona). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais..** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.
- BELTRÃO, N. E. de M.; ARAÚJO, A. E. de; GONÇALVES, N. P.; AMARAL, J. A. B. do; SEVERINO, L. S.; CARDOSO, G. D. **Ordenamento ambiental e época de plantio da mamoneira (*Ricinus communis* L.) para a região norte de Minas Gerais.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 6 p. (Embrapa Algodão, Comunicado Técnico, 207).
- CHRISTIE, W.W. **Advances in lipid methodology.** Dundee: Oil Press, 1993. p. 195-213.
- FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil.** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p. 295-333.
- G.R.O'SHEA. **Castor oil and its chemistry.** Illinois: CASCHEM, Cambrex, 2002. 2 p.
- HOSENEY, R. C. **Principles of cereal science and technology.** 2. ed. St. Paul: AACC, 1994. 378 p.
- MACÊDO, M. H. G. **Mamona.** Brasília, DF: CONAB, 2004. 9 p.
- MA, F.;HANNA, M. A. Biodiesel production: a review. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 70, p. 1-15, 1999.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. **Vogel: análise química quantitativa.** 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p. 109-113.
- MERCK. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos:** Etanol absoluto. São Paulo: Merck, 2006a. 6 p.
- MERCK. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos:** n-Hexano. São Paulo: Merck, 2006b. 7 p.
- MENEGHETTI, S.; MENEGHETTI, M. R.; CARVALHO, S. H. V. de; SOLETTI, J. I.; LIMA, G. E. S.; SILVA, E. C. da; MENDONÇA, D. R. de; COSTA, A. M.; MACEDO, C. C. S.; ABREU, F. R. e. Obtenção de biodiesel a partir do óleo de mamona: estudo comparativo, entre diferentes catalisadores, na reação de transesterificação empregando-se metanol e etanol. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais..** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.
- MORETTO, E. ; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos.** São Paulo: Varela, 1998. 151 p.

PAQUOT, C. **Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives**. 6.ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 170 p.

PREGNOLATO, W; PREGNOLATO, N. P. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Secretaria Estadual da Saúde, 1985. v. 1. 533 p.

ROJAS-BARROS, P.; HARO, A. de; MUÑOZ, J.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J. M. Isolation of a Natural Mutant in Castor with High Oleic/Low Ricinoleic Acid Content in the Oil. **Crop Science**, Madison, v. 44, p. 76–80, 2004.

SANTOS, T. da S.; SANTOS, J. W. dos; CABRAL, R. B. Análise da trajetória sob multicolinearidade: uma aplicação a dados dos componentes de produção de mamoneira. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais..** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.

SEAOFINDIA (The Solvent Extrator's Association of Índia). Disponível no site <<http://www.seaofindia.com/>>. Acesso em: 9 fev. 2007.

WISER, M. F. **Lecture Notes for Methods in Cell Biology**. New Orleans: Tulane University, 2006. 218 p.

3 Discussão geral

A evidência da variabilidade genética entre as cultivares de mamona cultivadas em Pelotas/RS foi estudada utilizando marcadores baseados em RAPD. A similaridade dos fragmentos gerados nas reações de amplificação, cujo coeficiente Jaccard foi de 0,86, possibilitou a separação dos genótipos em 7 grupos, classificando-os de acordo com a procedência, independente da instituição que desenvolveu a cultivar, fato associado à origem genética dos materiais (Tabela 12), atestando a eficiência desta ferramenta na caracterização dos genótipos. De acordo com Ferreira e Grattapaglia (1996) as principais aplicações de marcadores moleculares como os baseados em RAPD são a identificação e a discriminação de genótipos em curto prazo. Cabe destacar que esta caracterização do gemoplasma pode servir ao programa de melhoramento para a seleção de progenitores, que são materiais superiores submetidos a cruzamento com o objetivo de recombinar genes ou complexos gênicos em novas combinações gênicas favoráveis (RANGEL et al., 1990). Contudo, apesar da caracterização molecular ser fundamental para o contínuo investimento no melhoramento de plantas em grandes empresas produtoras de sementes híbridas, as características morfo-fisiológicas também devem ser utilizadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996). Segundo Freire (2001), existem variações inclusive na composição físico-química das sementes de mamona em diferentes cultivares.

Tabela 12. Resumo do agrupamento das cultivares de mamona produzido pela avaliação dos produtos da amplificação tipo RAPD usando o coeficiente de similaridade Jaccard e a média aritmética não ponderada (UPGMA). Embrapa Clima Temperado, 2007.

Grupo	Similaridade	Cultivar	Procedência
1	0,89	AL Guarany 2002	Variedade de São Paulo/SP
		Cafelista	Variedade de São Paulo/SP
		IAC 226	Variedade de Campinas/SP
		AL Preta	Variedade de São Paulo/SP
		IAC 80	Variedade de Campinas/SP
		IAC Guarani	Variedade de Campinas/SP
2	0,87	Lyra	Híbrido de Janaúba/MG
		Savana	Híbrido de Janaúba/MG
3	0,85	Íris	Híbrido de Janaúba/MG
4	0,85	Mirante	Variedade de Janaúba/MG
5	0,89	CSRN 393	Variedade da Costa Rica
		CSRN 193	Variedade da Costa Rica
6	0,82	VINEMA-T1	Variedade de Camaquã/RS
7	0,89	Nordestina	Variedade de Campina Grande/PB
		Paraguaçu	Variedade de Campina Grande/PB

A figura 5 apresenta os resultados obtidos na extração de óleo com hexano e etanol. O teor de óleo mais elevado na extração Soxhlet com hexano, de 49,0%p/p, foi obtido com a cultivar AL Guarany 2002, enquanto com o etanol foi de 58,1%p/p para a Paraguaçu. Já, na extração com o álcool à temperatura ambiente, o maior resultado foi alcançado com o híbrido Lyra, 52,2%p/p. Além disso, a avaliação dos métodos com diferentes solventes permite constatar que os resultados obtidos com etanol no método Soxhlet, em média de 53,8%p/p, são superiores aos alcançados pelo mesmo solvente à temperatura ambiente, 48,0%p/p. Ambas as técnicas superaram o teor médio de óleo obtido na extração Soxhlet com hexano, que foi de 45,5%p/p. O que pode ser explicado pelo fato de o grupo hidroxila do ácido ricinoléico, principal constituinte do óleo de mamona, contribuir para a solubilidade elevada em álcool e limitada em hexano (G.R.O'SHEA, 2002). Além disso, os solventes polares podem carrear materiais não lipídicos da semente, pois são capazes de extrair lipídeos ligados a outros constituintes (HOSENEY, 1994).

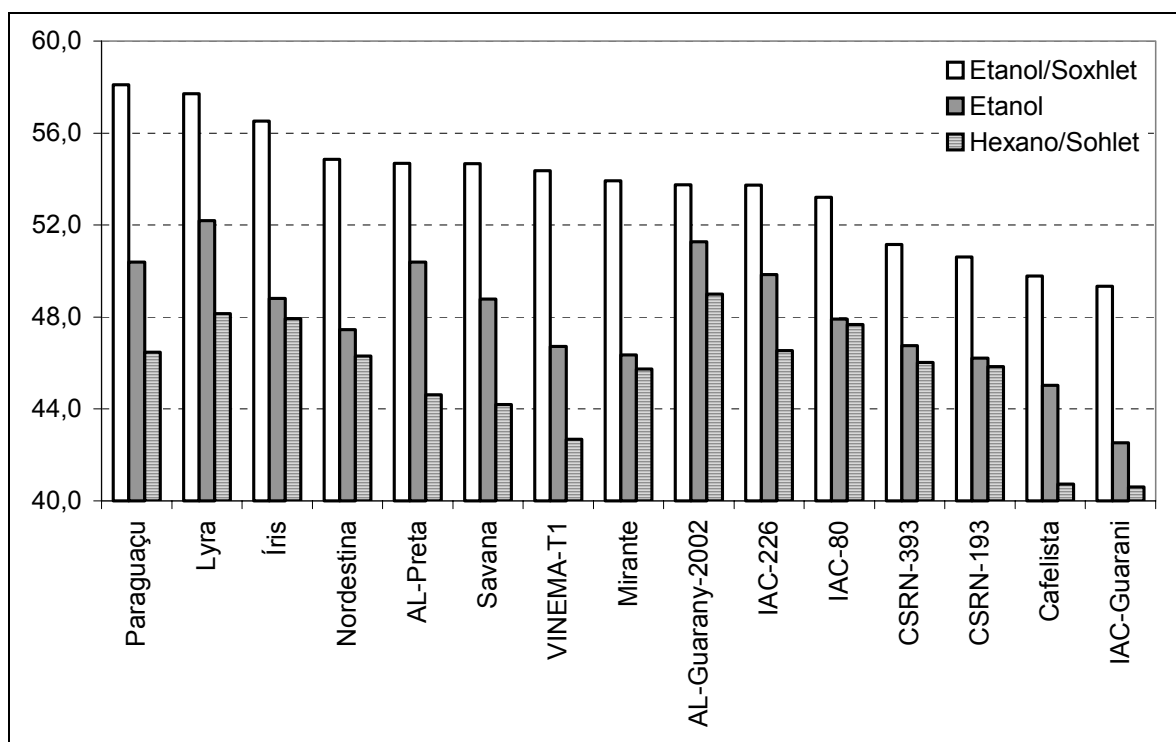


Figura 5. Teor de óleo (% p/p base seca) em sementes de cultivares comerciais de mamona cultivadas pela Embrapa Clima Temperado em Pelotas/RS, na safra 2005-2006, determinado pelo método Soxhlet usando hexano e etanol e pela extração à temperatura ambiente com o álcool. Embrapa Clima Temperado, 2007.

Considerando o exposto, a associação dos descritores utilizados (marcadores RAPD e o teor de óleo) com o desempenho agrônomo foi aplicada neste estudo com a finalidade de atender a necessidade de identificar materiais com potencial para produção de óleo entre as cultivares da coleção de germoplasma de mamona da Embrapa Clima Temperado avaliadas.

A estimativa da produção de óleo por hectare foi calculada utilizando o rendimento agrônomo obtido por Silva (2005), com plantas cultivadas em Pelotas/RS, em campos experimentais da Embrapa Clima Temperado (Tabela 13). O autor relata que a produtividade média de 816kg/ha, inferior aos dados estatísticos fornecidos pelo IBGE (2007) de 890kg/ha, pode ser atribuída à estiagem e, destaca que, mesmo nestas condições, a produção da oleaginosa superou os resultados experimentais de outras culturas como o milho e a soja, no mesmo período, mesmo assim permitem avaliar o desempenho relativo das cultivares.

O uso da estimativa do rendimento de óleo permite uma ordenação das cultivares diferenciada, se comparada àquela produzida utilizando, exclusivamente,

a determinação do teor de óleo. O desempenho agronômico destacado de algumas cultivares como Nordestina e IAC-226, cujos rendimentos de grãos, respectivamente, de 1.069 e 1.012kg/ha, foram bastante superiores aos demais materiais, levou-as à condição de destaque na classificação segundo o rendimento de óleo por hectare, embora tenham apresentado teores de óleo intermediários nas extrações. As cultivares CSRN 393 e Mirante apresentaram as menores produções de sementes, com 591 e 464 kg/ha, respectivamente. Os genótipos Lyra e Paraguaçu, destacados entre os materiais com maior teor de óleo entre as cultivares testadas, apresentaram rendimentos de óleo por hectare baixos por consequência do modesto desempenho agronômico. Enquanto as cultivares paulistas Cafelista e IAC Guarani, cujo teor de óleo foi inferior às demais em todas as técnicas de extração, passaram a compor o grupo intermediário segundo o rendimento de óleo por hectare, devido ao bom desempenho agronômico nos campos experimentais da Embrapa Clima Temperado.

Tabela 13. Estimativa do rendimento de óleo a partir da produção de sementes (kg/ha) das cultivares cultivadas pela Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS

Cultivar	Produção de sementes ¹ (kg/ha)	Rendimento de óleo (kg/ha)		
		Etanol (Soxhlet) ²	Etanol (ambiente) ²	Hexano (Soxhlet) ²
Nordestina	1.069a	586 a	507 a	495 a
IAC-226	1.012ab	544 b	504 a	471 c
AL-Guarany-2002	984abc	529 c	504 a	482 b
Íris	851abc	481 d	415 b	408 e
IAC-80	890abc	473 e	426 b	424 d
VINEMA-T1	815abc	443 f	381 d	348 g
Cafelista	887abc	442 f	399 c	361 f
Lyra	755abc	436 g	394 c	364 f
Savana	775abc	424 h	378 d	343 h
IAC-Guarani	840abc	414 i	357 e	341 h
AL-Preta	706abc	386 j	356 e	315 j
Paraguaçu	639 bc	371 k	322 f	297 k
CSRN-193	721abc	365 l	333 f	331 i
CSRN-393	591 c	302 m	276 g	272 l
Mirante	464 d	250 n	215 h	212 m

¹ Silva (2005); ² médias seguidas de letras iguais não diferem entre si pelo Teste Duncan a 5%

Avaliando o conjunto de resultados obtidos a partir da extração do óleo usando o método Soxhlet com etanol como solvente (Fig. 6) é possível destacar as estimativas do rendimento de óleo por hectare obtidas para as cultivares Nordestina, de 586kg/ha, IAC 226, com 544kg/ha, e AL Guarany 2002, com 529kg/ha, como os melhores resultados dentre os materiais testados. Em contrapartida, os genótipos da Costa Rica, CSRN 193 e CSRN 393, apresentando rendimentos de 365 e 302kg/ha, respectivamente, além da cultivar Mirante, com apenas 250kg/ha, demonstraram ser os materiais de pior desempenho entre os genótipos avaliados.

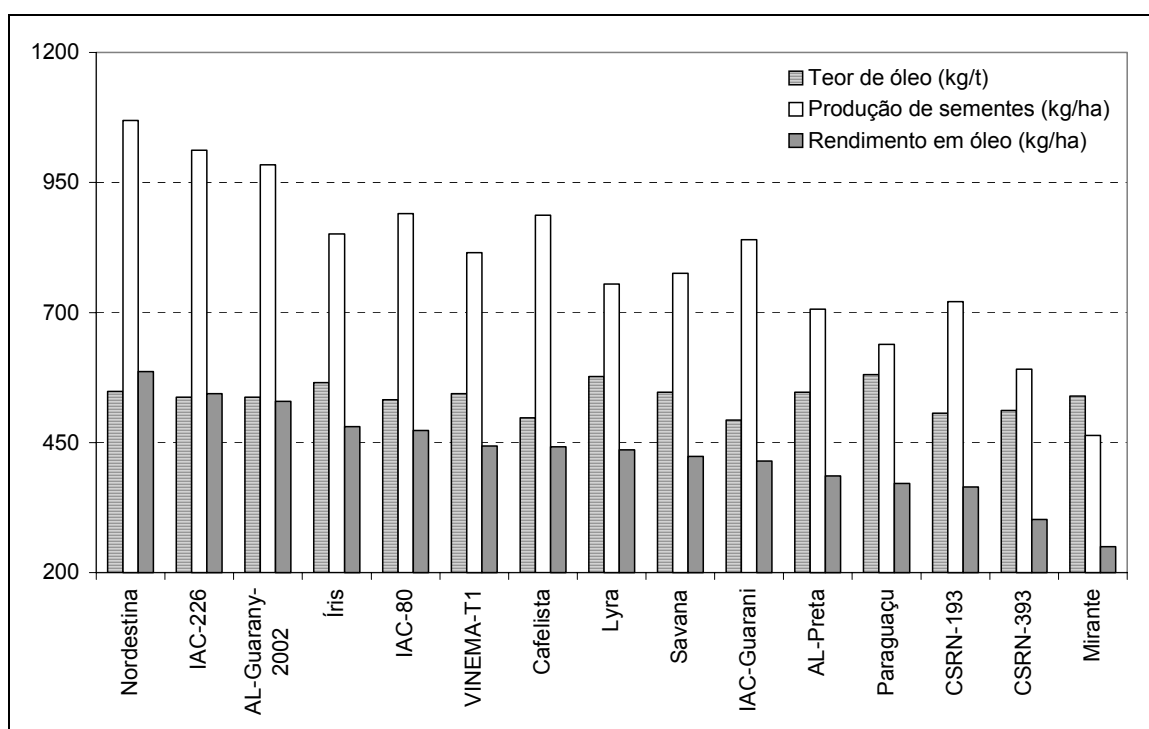


Figura 6. Teor de óleo (kg/t) obtido na extração Soxhlet com etanol, produção de semente (kg/ha) e a estimativa do rendimento de óleo (kg/ha) das cultivares cultivadas pela Embrapa Clima Temperado, em Pelotas/RS, na safra 2005-2006

4 Conclusões gerais

Os marcadores moleculares baseados em RAPD são eficientes para revelar a variabilidade genética de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.), que apresenta alta correlação com a procedência dos genótipos estudados.

Existe diferença significativa no teor de óleo extraído das sementes de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.) pelo método Soxhlet com hexano e com etanol, que mesmo à temperatura ambiente, apresenta resultados superiores aos alcançados pela extração com o alcano.

O uso da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) determina, com precisão, o teor de óleo em sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) e seus resultados são equivalentes à extração Soxhlet com hexano, com a vantagem de ser uma técnica rápida, de alta produtividade e não-destrutiva.

A estimativa do rendimento de óleo por hectare de cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.) pode auxiliar na recomendação de cultivares no que se refere à avaliação de genótipos para fins de melhoramento genético da cultura.

5 Considerações gerais

Os estudos relatados neste documento subsidiam o banco de dados da coleção de germoplasma de mamona (*Ricinus communis* L.) da Embrapa Clima Temperado e deverão servir de fonte de informação a produtores, melhoristas e técnicos que trabalham ou desejem trabalhar com a cultura da oleaginosa. Entretanto, a necessidade de informações a respeito desta nova alternativa para a agricultura do Rio Grande do Sul não se encerra com a aquisição destes resultados. Ao invés disso, eles servem de ponto de partida para futuros estudos, os quais deverão servir para ampliar as hipóteses testadas, entre eles:

- Avaliar as diferenças na composição de ácidos graxos do óleo de mamona em cultivares com diferenças desproporcionais do teor de óleo extraído por diferentes solventes e/ou métodos;
- Avaliar alterações na composição físico-química do extrato de sementes de mamona provocadas pela extração com etanol;
- Avaliar alterações na toxicidade da ricina da torta de mamona provocadas pela extração com etanol;
- Desenvolver marcadores genéticos para o teor de óleo em sementes de mamona;
- Desenvolver marcadores genéticos para o teor de ricina em sementes de mamona;
- Avaliar o cultivo da mamona em áreas de várzea e sua influência no teor de óleo nas sementes;
- Desenvolver processos de transformação da ricina a fim de remover seu efeito tóxico;
- Avaliar a utilização da torta de mamona detoxificada como fonte nutricional para animais.

6 Referências Bibliográficas

- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins**: fundamentos e aplicações em plantas e microrganismos. Viçosa: UFV, 1998. 574p.
- AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 350p.
- BALIZA, D. P.; CARDOSO, M. das G.; VILELA, F. J.; GUIMARÃES L. G. de L.; SILVA, V. de F.; PEREIRA, A. de A.; CASTRO NETO, P.; FRAGA, A. C. Extração do óleo fixo da torta oriunda da prensagem industrial de sementes de *Ricinus communis* (mamona). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais..** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.
- BARBIERI, R. L. **Conservação 'ex situ' de recursos genéticos vegetais na Embrapa Clima Temperado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. p. 26. (Embrapa Clima Temperado, Documentos 143).
- BELTRÃO, N. E. de M.; ARAÚJO, A. E. de; GONÇALVES, N. P.; AMARAL, J. A. B. do; SEVERINO, L. S.; CARDOSO, G. D. **Ordenamento Ambiental e Época de Plantio da Mamoneira (*Ricinus Communis* L.) para a Região Norte de Minas Gerais**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 6 p. (Embrapa Algodão, Comunicado Técnico, 207).
- CECDCT/RS. **Mamona Petróleo Verde**: Uma alternativa para o Rio Grande. Porto Alegre: Assembléia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul, 2000. 24 p.
- COLNAGO, L. A. **Análise do teor de óleo em sementes por RMN**. São Carlos: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 1996. 13 p. (Embrapa Instrumentação Agropecuária. Circular técnica, 3).
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa CENARGEN, 1996, 220 p.
- FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2001. p. 295-333.
- G.R.O'SHEA. **Castor oil and its chemistry**. Illinois: CASCHEM, Cambrex, 2002. 2 p.
- GUERREIRO, L. F.; MATTA, J. P. R.; MACÊDO, W. **Agroindústria na Bahia: Diagnóstico e Perspectivas da Cadeia Produtiva**. In: Estudo Setorial 03/02, Agência de Fomento do Estado da Bahia – Desenbahia, ago. 2002. 33p.
- HOSENEY, R. C. **Principles of cereal science and technology**. 2. ed. St. Paul: AACC, 1994. 378 p.
- IBGE. Estatística da produção agrícola. **Indicadores IBGE**, Brasília, fevereiro de 2007.
- KOURI, J.; SANTOS, R. F. dos; SANTOS, J. W. dos. Evolução da cultura da mamona no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais....** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.
- MACÊDO, M. H. G. **Mamona**. Brasília: CONAB, 2003, 7p.

- MACÊDO, M. H. G. **Mamona**. Brasília: CONAB, 2004, 9p.
- MENESES, C. H. S. G.; BEZERRA, C. S.; TAVARES, A. C.; COUTINHO, T. C.; SILVA, S. C.; MILANI, M.; VIDAL, M. S. Seleção de marcadores do tipo RAPD para caracterização genética *Ricinus communis* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 2., 2004, Campina Grande. **Anais....** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.
- MENDHAM, J.; DENNEY, R. C.; BARNES, J. D.; THOMAS, M. **Vogel: análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. p. 109-113.
- MERCK. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos: Etanol absoluto**. São Paulo: Merck S. A. 2006a. 6 p.
- MERCK. **Ficha de informações de segurança de produtos químicos: n-Hexano**. São Paulo: Merck S. A. 2006b. 7 p.
- MILACH, S. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: UFRGS, 1998. 140 p.
- MOREIRA, J. A. N.; LIMA, E. F.; FARIAS, F. J. C.; AZEVÊDO, D. M. P. **Melhoramento da mamona (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 1996. 29 p. (Embrapa Algodão. Documentos 44).
- MORETTO, E. ; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1998. 151 p.
- MOSHKIN, V.A. (ed.). **Castor**. NewDelhi: Amerind, 1986. 315 p.
- MURPHY, D. J. The Future of New and Genetically Modified Oil Crops. In: JANICK, J. **Perspectives on new crops and new uses**. Alexandria: ASHS, 1999. p. 216-219.
- PARENTE, E; et al. **Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado**. Fortaleza: Tecbio , 2003. 68p.
- RANGEL, P. H. N.; CRUZ, C. D.; VENCOVSKY, R.; FERREIRA, R. P. Selection of local lowland rice cultivars based on multivariate genetic divergence. **J. Genetics**, Brasil, v. 14, p. 437-453, 1990.
- SILVA, S. D. dos A. **A cultura da mamona na região de clima temperado: informações preliminares**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2005. 56 p. (Embrapa Clima Temperado, Documentos 149).
- SILVA, S. D. A.; GOMES, C. B.; UENO, B.; ANTHONISEN, D. G.; GALHARÇA, S. P.; BAMMANN, I.; ZANATTA Z. G. C. N. Avaliação de cultivares de mamona em Pelotas - RS, Safra 2003/04. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Anais....** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004. 1 CD-ROM.
- STI/MIC. **Produção de Combustíveis Líquidos a Partir de Óleos Vegetais**. Brasília: Secretaria de Tecnologia Industrial do Ministério da Indústria e Comércio, 1985. p. 195-222.

APÊNDICE A

Análise de variância para os métodos de extração de óleo

Classes	Níveis	Valores
Metodo	3	Etanol-Soxhlet; Etanol-frio; Hexano-Soxhlet.
Cultivar	15	AL-Guarany-2002; AL-Preta; CSRN-193; CSRN-393; Cafelista; IAC-226; IAC-80; IAC-Guarani; Lyra; Mirante; Nordeste; Paraguaçu; Savana; VINEMA-T1; Iris.

Variável dependente: Teor de óleo

Fonte	GL	Soma de quadrados	Média	F	P>F
Modelo	44	4563,877498	103,724489	311,01	<0,0001
Erro	180	60,031748	0,333510		
Corrigido total	224	4623,909246			

R ²	CV (%)	Raiz	Média (Teor de_óleo)
0,987017	1,171117	0,577503	49,31215

Fonte	GL	Soma de quadrados	Média	F	P>F
Metodo	2	3159,727700	1579,863850	4737,09	<0,0001
Cultivar	14	1016,207735	72,586267	217,64	<0,0001
Metodo*Cultivar	28	288,203583	10,292985	30,86	<0,0001