

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE CRAMBE [*Crambe*
hyspanica subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] PARA USO NA
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

MAGNUN ANTONIO PENARIOL DA SILVA

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Energia na
Agricultura).

BOTUCATU – SP

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS
CÂMPUS DE BOTUCATU

**SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE CRAMBE [*Crambe*
hyspanica subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] PARA USO NA
PRODUÇÃO DE BIODIESEL**

MAGNUN ANTONIO PENARIOL DA SILVA

Engenheiro Agrícola

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Martin Biaggioni

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Gisela Ferreira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agronômicas da UNESP – Câmpus de
Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Energia na
Agricultura).

BOTUCATU – SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO - DIRETORIA TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - UNESP - FCA - LAGEADO - BOTUCATU (SP)

S586s Silva, Magnun Antonio Penariol da, 1988-
Secagem e armazenamento de grãos de crambe [*Crambe*
hyspanica subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]
para uso na produção de biodiesel / Magnun Antonio Penariol da Silva. - Botucatu : [s.n.], 2016
xiii, 61 f. : grafs. color., tabs.

Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2016
Orientador: Marco Antonio Martin Biaggioni
Coorientador: Gisela Ferreira
Inclui bibliografia

1. Sementes oleaginosas. 2. Lipídios. 3. Açúcar. 4. Proteínas. 5. Biodiesel. I. Biaggioni, Marco Antonio Martin. II. Ferreira, Gisela. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (Câmpus de Botucatu). Faculdade de Ciências Agrônômicas. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: "SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE CRAMBE (*Crambe*
hyspanica subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA) PARA USO NA PRODUÇÃO DE
BIODIESEL"

AUTOR: MAGNUN ANTONIO PENARIOL DA SILVA

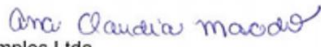
ORIENTADOR: MARCO ANTONIO MARTIN BIAGGIONI

COORIENTADORA: GISELA FERREIRA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em AGRONOMIA
(ENERGIA NA AGRICULTURA), pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. GISELA FERREIRA
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu

Dra. ANA CLAUDIA MACEDO 
/ JM Bio Análises Sociedade Simples Ltda



Profa. Dra. CARMEN SILVIA FERNANDES BOARO
Deptº de Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu



Profa. Dra. CAMILA KISSMANN
Departamento de Botânica / Instituto de Biociências de Botucatu



Profa. Dra. GIUSEPPINA PACE PEREIRA LIMA
Departamento de Química e Bioquímica / Instituto de Biociências de Botucatu da UNESP

Botucatu, 06 de outubro de 2016.

DEDICATÓRIA

A minha mãe Aparecida Sueli Penariol da Silva

Ao meu Pai Elias Antonio da Silva

Ao meu irmão Jean Carlos Penariol da Silva

A minha sobrinha Isadorah Araújo Penariol

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus.

Ao meu orientador Professor Marco Biaggioni por aceitar me orientar durante todos os anos de Mestrado e Doutorado.

A minha co-orientadora Professora Gisela Ferreira com quem tenho a honra de trabalhar, que me orientou em diversos momentos, na condução desse trabalho, me ajudou de forma indescritível enquanto eu estava no meu período de Doutorado Sanduíche, sempre com palavras de ânimo e encorajamento.

Ao meu orientador no exterior Professor Dennis Wiesenborn pela forma solícita que me acolheu na North Dakota State University (NDSU - EUA).

A minha primeira orientadora Professora Analy Polizel, que me iniciou nessa jornada.

A professora Maria Aparecida Peres Oliveira, por toda ajuda e incentivo a ingressar na Pós-Graduação.

A professora e amiga Jaqueline Malagutti Corsato por todo ensinamento em técnicas laboratoriais, pela paciência, amizade e tempo.

A professora Carmen Boaro por toda contribuição na minha formação e ensinamentos durante o estágio docência em Fisiologia Vegetal – Metabolismo e pelas palavras de entusiasmo.

As professoras Giuseppina Pace Pereira Lima e Camila Kissman, por aceitarem contribuir com este trabalho.

Aos professores Ivan de La Cruz Chacón e Alma Rosa Gonzalez–Esquinca pelos ensinamentos teóricos e práticos em química e bioquímica vegetal.

A Ana Cláudia Macedo por toda ajuda nas análises bioquímicas deste trabalho, por sua amizade e companheirismo.

A Juliana e Samantha por todo tempo de trabalho no Laboratório de Germinação, e pela amizade construída.

A equipe da Pilot Plant em NDSU: Nattapong, Juan, Guo Sun, Monono.

Aos amigos do Laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas: Felipe e Fernando.

Aos funcionários do Departamento de Botânica: Inara, Maria Helena, José Eduardo e Kléber.

Aos funcionários da Fazenda Lageado, do Departamento de Engenharia Rural e da Seção de Pós – Graduação.

Ao meu amigo Igor Fabriccio.

Aos amigos Caio, Ulisses e Rodolfo por sempre me ajudarem, animarem, estenderem a mão em momentos difíceis, e me manterem seguindo sempre em frente.

Aos amigos (as) que fizeram parte desta jornada em Botucatu: Ana Karollyna, Letusa, Sueko, Lia, Jéssica, Raissa, Angélica, Luciene, Ana Paula, Letícia, Patrícia, Samanta, Jenifer, Angélica Lino, Taissa, Juliana Joice, Débora, Natália, Taís, Anderson, Saulo, Fernando, Luiz Eduardo, Luiz Ricardo, André, Felipe Giroto, Fábio Gregory, Renato Guedes, Vinícius e Nilton.

Aos amigos de Fargo, Dakota do Norte (EUA): Bruna, Lucilene, Bruno, Flávia, Ricardo e Jasem.

A República Centro Sul: Caio, Alisson, Marco, Jefferson e Felipe.

Aos meus familiares que sempre torceram pelo meu sucesso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Energia na Agricultura) nas pessoas do Coordenador: Professor Adriano Wagner Ballarin e da Secretária: Débora Blanco.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela concessão da minha bolsa de estudos, e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE).

A Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA) e ao Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
1 RESUMO	1
2 SUMMARY	3
3 INTRODUÇÃO.....	5
Capítulo I: DESENVOLVIMENTO, SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE CRAMBE [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA].....	8
1. INTRODUÇÃO	9
2. REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 DESENVOLVIMENTO	10
2.2 SECAGEM	10
2.3 ARMAZENAMENTO.....	11
3. CONCLUSÕES.....	11
4. REFERÊNCIAS	11
Capítulo II “PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM SEMENTES DE CRAMBE [<i>Crambe</i> <i>hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] DURANTE O DESENVOLVIMENTO”	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
2.1. Instalação, condução do experimento e, delineamento experimental.....	16
2.2. Tratamentos e delineamento experimental	17
2.3. Análises laboratoriais.....	17
2.3.1. Teor de água	18
2.3.2. Teor de lipídeos	18
2.3.3. Perfil de ácidos graxos.....	18
2.3.4. Atividade da Peroxidase (PODs, EC 1.11.1.7).....	19
2.3.5. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1).....	19
2.3.6. Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	19
2.3.7. Quantificação dos teores de lipoperóxidos.....	20
2.3.8. Índice de peróxidos dos lipídeos	20
2.3.9. Índice de acidez dos lipídeos	21
2.3.10. Ácidos graxos livres em lipídeos.....	21

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4. CONCLUSÃO	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
Capítulo III: “ACÚMULO DE RESERVAS EM SEMENTES DE CRAMBE [<i>Crambe</i> <i>hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] DURANTE O DESENVOLVIMENTO E DANOS OXIDATIVOS OCASIONADOS PELA SECAGEM”	30
RESUMO	31
INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
Instalação do experimento	33
Tratamentos e delineamento experimental	33
Análises bioquímicas	34
Determinação das proteínas	34
Teor de lipídeos.....	34
Atividade da Peroxidase (PODs, EC 1.11.1.7)	34
Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6).....	35
Quantificação dos teores de lipoperóxidos.....	35
Açúcares solúveis totais	35
Análises estatísticas	36
RESULTADOS	36
DISCUSSÃO.....	37
CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
Capítulo IV: ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE CRAMBE [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]: SISTEMAS ANTIOXIDANTES, PIGMENTAÇÃO E METABOLISMO DE RESERVAS.....	44
RESUMO	45
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	46
Instalação do experimento	46
Análises bioquímicas	47
Pigmentos.....	47
Atividade da Peroxidase (PODs, EC 1.11.1.7)	48

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)	48
Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)	49
Quantificação dos teores de lipoperóxidos.....	49
Teor de lipídeos	49
Açúcares solúveis totais	50
Delineamento experimental e análises estatísticas	50
RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
CONCLUSÃO.....	53
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
5. CONCLUSÃO.....	58
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59

LISTA DE TABELAS

Capítulo I: **DESENVOLVIMENTO, SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE GRÃOS E SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]**

Capítulo II: **PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

Tabela 1. Datas das coletas e valores de temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C), temperatura média (°C), umidade relativa do ar – UR (%) e precipitação (mm) durante o período de desenvolvimento de sementes de crambe. Departamento de Engenharia Rural, Fazenda Lageado. FCA/UNESP -Botucatu /SP.....17

Tabela 2. Variação do teor de água ao longo do desenvolvimento de sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]. Botucatu/SP (2014).....22

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos livres dos lipídeos extraídos das sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento. Botucatu/SP (2014).....25

Tabela 4. Índice de peróxidos, índice de acidez, índice de estabilidade oxidativa e ácidos graxos livres (%), em lipídeo extraído de sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] colhidos aos 42 e 49 dias após a floração. Botucatu/SP (2014).....26

Capítulo III: **“ACÚMULO DE RESERVAS EM SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] DURANTE O DESENVOLVIMENTO E DANOS OXIDATIVOS OCASIONADOS PELA SECAGEM**

Tabela 1. Conteúdo de albumina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes de crambe [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.....	41
Tabela 2. Conteúdo de globulina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes de crambe [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.....	41
Tabela 3. Conteúdo de promalina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes de crambe [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.....	41
Tabela 4. Conteúdo de glutelina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes de crambe [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e submetidos a diferentes métodos de secagem.. Botucatu - SP. 2014.....	42
Tabela 5. Conteúdo de açúcares solúveis totais ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) em sementes de crambe [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.....	42
Tabela 6. Conteúdo de lipídeos totais ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) em sementes de crambe [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.....	42
Tabela 7. Atividade específica da enzima peroxidase – POD ($\text{umol/min/ mg proteína}$) em sementes de crambe [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e submetidos a diferentes métodos de secagem Botucatu - SP. 2014.....	43
Tabela 8. Atividade específica da enzima catalase – CAT ($\text{mKat } \mu\text{g proteína}$) em sementes de crambe [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.....	43
Tabela 9. Quantificação dos teores de lipoperóxidos ($\text{nmol/g massa fresca}$) em sementes de crambe [<i>Crambe hyspanica</i> subesp. <i>abyssinica</i> (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.....	43

Capítulo IV: **ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]: SISTEMAS ANTIOXIDANTES, PIGMENTAÇÃO E METABOLISMO DE RESERVAS**

- Tabela 1. Atividade específica das enzimas superóxido dismutase – SOD (U mg prot), peroxidase – POD (umol/min/ mg proteína), catalase – CAT (mKat µg proteína) e quantificação dos teores de lipoperóxidos (nmol/g massa fresca) em grãos de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] armazenados ao longo de 0, 4, 8 e 12 meses.....52
- Tabela 2. Valores médios de clorofila *a* (µg g⁻¹), clorofila *b* (µg g⁻¹) antocianinas (µg g⁻¹) e carotenoides (µg g⁻¹) em grãos de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] armazenados ao longo de 0, 4, 8 e 12 meses.....53
- Tabela 3. Conteúdo de açúcares solúveis totais (mg g massa seca⁻¹) e lipídeos (mg g massa seca⁻¹) em grãos de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] armazenados ao longo de 0, 4, 8 e 12 meses.....53

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I: **DESENVOLVIMENTO, SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]**

Capítulo II: **PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS EM SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] DURANTE O DESENVOLVIMENTO**

Figura 1. Comparativo entre a formação de lipídeos e a (A) quantificação dos teores de lipoperóxidos (nmol/g massa fresca) e as atividades específicas das enzimas (B) peroxidase (umol/min/ mg proteína), e (C) superóxido dismutase - SOD (U mg prot) em grãos de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento. Botucatu/SP (2014).....23

Capítulo III: **“ACÚMULO DE RESERVAS EM SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] DURANTE O DESENVOLVIMENTO E DANOS OXIDATIVOS OCASIONADOS PELA SECAGEM**

Capítulo IV: **ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]: SISTEMAS ANTIOXIDANTES, PIGMENTAÇÃO E METABOLISMO DE RESERVAS**

1 RESUMO

A cultura do crambe começou a ser estudada no Brasil por apresentar elevado teor de óleo nos grãos. A produção é totalmente mecanizada e de baixo custo por utilizar as ferramentas disponíveis para outras espécies. O crambe é uma cultura de inverno, então se torna também uma excelente opção para o cultivo em safrinha. No entanto a cultivar desenvolvida para a comercialização no país apresenta maturação irregular dos grãos, o que se torna um problema tanto para a colheita quanto para os processos pós-colheita, por não se haver uma época ideal para colheita mecanizada sem que ocorram perdas durante esta etapa, ou ainda durante a secagem e armazenamento. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi acompanhar o processo de secagem dos grãos de crambe, e ainda o período de 12 meses de armazenamento, relacionando esses processos com a dinâmica de formação de lipídeos dos grãos, os sistemas antioxidantes, o acúmulo de açúcares, lipídeos e proteínas ao longo do desenvolvimento, os estresses ocasionados pela secagem e a pigmentação durante o armazenamento. Para isso, um experimento foi instalado na área de produção da Fazenda Experimental Lageado, onde utilizou-se para semeadura sementes de crambe da cultivar FMS Brilhante (Fundação Mato Grosso do Sul), na qual

o processo foi acompanhado semanalmente verificando os teores de água dos grãos (82, 74, 60, 40, 30, 20 e 10%) que foram submetidos à diferentes métodos de secagem (testemunha, natural, secagem em estufa à 30°C e secagem em estufa à 40°C). Para melhor entendimento dos dados obtidos este trabalho foi dividido em quatro capítulos. O primeiro capítulo trata-se de uma revisão de literatura a respeito dos processos de desenvolvimento, secagem e armazenamento de grãos de crambe. O segundo capítulo estudou a dinâmica de formação de lipídeos nestes grãos. No terceiro capítulo avaliou-se o acúmulo das principais reservas (proteínas, açúcares e lipídeos) e os danos oxidativos ocasionados pela secagem dos grãos. E no quarto o foco foi verificar se o tempo de armazenamento afeta as reservas, pigmentação e a atividade enzimática dos grãos. Conclui-se que a maior reserva encontrada em grãos de crambe são os lipídeos, seguido por açúcares e proteínas, os grãos de crambe apresentam maior acúmulo de lipídeos aos 49 dias após a floração, a secagem à 80 °C provoca danos aos grãos e que os grãos de crambe começam aumentar o conteúdo de pigmentos à partir dos 6 meses de armazenamento.

Palavras-chave: lipídeos, açúcares, proteínas, pigmentação, enzimas antioxidantes.

DRYING AND STORAGE OF CRAMBE GRAINS [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] FOR USING IN THE BIODIESEL PRODUCTION. Botucatu, 2016. 89 p. Tese (Doutorado em Agronomia – Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista.

Author: Magnun Antonio Penariol da Silva

Adviser: Marco Antonio Martin Biaggioni

Co-adviser: Gisela Ferreira

2 SUMMARY

The culture of crambe began to be studied in Brazil by a high oil content in grain. The production is fully mechanized and low cost to use the tools available for other species. It is a winter crop, then it also makes an excellent choice for growing in off-season. However cultivating developed for sale in the country is irregular grain maturity, which becomes a problem for both the harvest time to post-harvest processes, not be an ideal time for mechanized harvesting without incurring losses during this step or during drying and storage. Given the above, the objective of this study was to follow up the development process of crambe grain, and also the steps of drying and storage, linking these processes with the dynamics of grain lipid formation, antioxidant systems, the accumulation of sugars, lipids and proteins throughout the development of the stresses caused by drying and pigmentation during storage. For this, an experiment was conducted in the area of Fazenda Experimental Lageado. We used to cultivate the crambe sowing seeds FMS Brilhante (Fundação Mato Grosso do Sul), in which the process was monitored weekly by checking the water content of grains (82, 74, 60, 40, 30, 20 and 10%) which were subjected to different drying methods (control, natural drying oven at 30 ° C and dried at 40 ° C). For better understanding of the data from this study was divided into four chapters. The first chapter it is a literature review about the development processes, drying and crambe grain storage. The second chapter studied the dynamics of the formation of lipids in these grains. In the third chapter, we evaluated the accumulation of the main reserves (proteins, sugars and lipids) and the oxidative damage caused by the drying of the beans. And in the room the focus was to determine whether the storage time affects the reserves, pigmentation and the enzymatic activity of the grains. It follows that the

largest reserve found in crambe grains are lipids, followed by sugars and proteins, crambe grains have higher accumulation of lipids at 49 days after flowering, drying at 80 ° C causes damage to the beans and that crambe grains begin to increase the content of pigments from 6 months of storage.

Keywords: lipids, sugars, proteins, pigmentation, antioxidant enzymes.

3 INTRODUÇÃO

A matriz energética brasileira é caracterizada pela elevada participação de fontes de energias renováveis em sua composição, com 44,1% (BRASIL, 2012) oriundas de fontes como a energia hidrelétrica e a biomassa. A participação de biocombustíveis como o biodiesel pode contribuir para o aumento da energia renovável na composição dessa matriz e diminuir a dependência de fontes não renováveis como o diesel e a gasolina.

De acordo com Jasper (2009) os biocombustíveis são fontes de energias renováveis que são derivados de produtos agrícolas como plantas oleaginosas, cana-de-açúcar, biomassa florestal e outras fontes de matéria orgânica. Entre os biocombustíveis está o biodiesel, que segundo Brasil (2005) é definido como um combustível derivado da biomassa renovável para ser usado em motores de combustão com ignição por compressão, ou para outra maneira de geração de energia que possa substituir os combustíveis de origem não renovável. O uso do biodiesel como fonte de energia ajuda diminuir a emissão de CO₂ na atmosfera, resultando em mitigação dos impactos ambientais gerados pelo uso de fontes de energia de origem fóssil.

O crambe surgiu como uma ótima opção para produção de biodiesel, por ser uma planta com alto teor de óleo, de cultivo totalmente mecanizado, podendo ser utilizados os maquinários existentes para o cultivo de grãos miúdos em sua produção, é uma planta resistente à seca e a geadas, e ainda é uma boa opção para a safrinha por se tratar de uma cultura de ciclo outono/ inverno. É uma cultura de ciclo

relativamente curto, em média de 90 dias, e com uma produtividade entre 1000 e 1500 quilos por hectare (FUNDAÇÃO MS, 2011).

Para a produção de biodiesel, o Brasil ainda carece de culturas de ciclo outono/inverno, ficando dependente de culturas de ciclo primavera/verão, e que ainda concorrem para a produção de alimentos, cosméticos, entre outros. Dessa maneira, o cultivo do crambe se torna uma excelente opção para a produção de biodiesel, e ainda uma nova cultura para os produtores agrícolas nacionais investirem na entressafra (SOUZA et al., 2009).

A estrutura do crambe utilizada para a extração de óleo para biodiesel é a semente, que é composta por aproximadamente 30% de óleos (SILVA et al., 2016). Por definição biológica semente é uma estrutura de perpetuação das espécies formada por embrião, tecido de reserva e envoltório protetor. De acordo com sua utilização, as sementes muitas vezes são denominadas de grãos, principalmente quando se refere a usos agrícolas como a extração de biodiesel (OLIVA et al, 2012; MARCOS-FILHO, 2005).

A maturação irregular dos grãos é um fato que além de dificultar a colheita mecanizada, também estabelece limites quanto à secagem, e alguns métodos tem sido estudados visando verificar qual se adapta melhor aos grãos colhidos nessas condições. Silva (2013) estudaram o efeito da secagem de crambe na qualidade do óleo bruto extraído encontrou variação no teor de óleo, e também diferentes colorações nos grãos, o que resultou em óleo com variação na cor, sendo que maior teor de óleo foi obtido quando os grãos foram secos na própria planta. Outros autores estudaram o efeito da secagem visando a produção de sementes, como Donadon et al. (2013) que avaliaram o efeito de altas temperaturas de secagem na ultraestrutura de sementes de crambe, Silva et al. (2016) que estudaram o efeito de métodos de secagem no teor de óleo e na qualidade fisiológica de sementes, e Oliva et al. (2012) que avaliaram o efeito imediato de sistemas de secagem na qualidade fisiológica de sementes.

O armazenamento dos grãos também tem sido objeto de estudo de outros autores, como Bessa et al. (2015) que avaliaram o efeito de diferentes embalagens, ambientes e tempos de armazenamento na qualidade de sementes de crambe. Ou ainda Bezerra et al. (2015) que avaliaram diferentes condições de armazenamento na qualidade dos grãos de crambe e no óleo extraído.

Diante dos temas relatados pela literatura, e a necessidade de informações que possam estabelecer a cultura do crambe como cultura agrícola de alto interesse comercial e que incentive a produção de novas formas de combustíveis sustentáveis na matriz energética brasileira, os objetivos do presente trabalho foram:

1. Determinar em qual estágio de desenvolvimento das sementes os lipídeos apresentam características adequadas para a produção de biodiesel.
2. Verificar o acúmulo de substâncias de reservas durante o desenvolvimento e os danos oxidativos que são ocasionados pelo processo de secagem em sementes de crambe.
3. Avaliar se o período de armazenamento de sementes de crambe altera o conteúdo de reservas, a pigmentação e a atividade enzimáticas.

Para atingir esses objetivos a tese foi dividida em três capítulos, apresentados após o capítulo de revisão de literatura. Assim a tese está composta por quatro capítulos, sendo o primeiro intitulado “Desenvolvimento, secagem e armazenamento de sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]” redigido conforme as normas da revista Energia na Agricultura. O segundo capítulo intitulado “Perfil de ácidos graxos em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento” foi redigido em português de acordo com as normas da revista Biomass and Bioenergy. O terceiro capítulo intitulado “Acúmulo de reservas em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento e danos oxidativos ocasionados pela secagem” foi redigido em português de acordo com as normas da revista Drying Technology. O quarto capítulo intitulado “Armazenamento de grãos de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]: sistemas antioxidantes, pigmentação e metabolismo de reservas” foi redigido conforme as normas da Revista Brasileira de Engenharia Agrícola.

Capítulo I: **REVISÃO: DESENVOLVIMENTO, SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE
SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr)
PRINA]**¹

¹ Artigo redigido conforme normas do periódico “Energia na Agricultura”

REVISÃO: DESENVOLVIMENTO, SECAGEM E ARMAZENAMENTO DE SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]

Magnun Antonio Penariol da Silva^{1*}, Marco Antonio Martin Biaggioni¹ e Gisela Ferreira²

¹Departamento de Engenharia Rural. Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu – SP. Rua Dr. José Barbosa de Barros, 1780 - Portaria 1, Botucatu - SP, 18610-307.

²Departamento de Botânica. Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu – SP. Distrito de Rubião Junior, s/n, Botucatu - SP, 18618-970.

*Autor para correspondência: penariol@gmail.com

RESUMO: O crambe têm-se revelado uma espécie promissora para produção de biodiesel por apresentar elevado teor de óleo em seus grãos. Por ser cultura rústica e ainda carecer de informações sobre o seu desenvolvimento em campo e pós-colheita, fez-se necessário o estudo destes processos. O presente trabalho teve como objetivo reunir informações relativas ao período de desenvolvimento e os métodos de secagem e condições de armazenamento de grãos de crambe. A literatura demonstra que, em relação à qualidade fisiológica de sementes, as melhores condições de germinação e vigor ocorrem aos 14 e 26 dias após a floração. Em relação à secagem, temperaturas entre 40 e 60°C favorecem a germinação das sementes. Secagem em alta temperatura não altera a qualidade do óleo bruto e ocorre mais rapidamente. Embalagens herméticas favorecem a manutenção da qualidade fisiológica da semente e a qualidade do óleo para produção de biodiesel. Na cultura do crambe, a escolha do método de secagem e das condições de armazenamento dependerá da finalidade de uso da matéria-prima.

PALAVRAS-CHAVE: sementes oleaginosas, germinação, biodiesel, vigor de sementes, pressão estática

ABSTRACT: The crambe culture has emerged as a promising species for biodiesel production by a high oil content in its grain. It is a rustic culture, and lack of information on their development in the field, in the post-harvest process, numerous researchers conducted investigations into these processes. Thus, this study aimed to gather information on the development period and the methods of drying and storage conditions of grain and crambe seed. According to the survey conducted in relation to physiological seed quality, the best germination and vigor conditions occur at 14 and 26 days after flowering, however it is not known if all the reserves were accumulated so early, and will be degraded during germination. Regarding the drying, temperatures between 40 and 60 ° C favor the germination of seeds. Drying at high temperature does not change the quality of crude oil and drying occurs faster. Hermetic packaging keeps seed quality and quality of oil for biodiesel production. In crambe culture, the choice of method of drying and storage conditions will depend on the purpose of the feedstock, and must adopt different conditions for grains and seeds.

KEY WORDS: oilseeds, germination, biodiesel, seed vigor, static pressure

1. INTRODUÇÃO

O crambe é uma planta de ciclo anual, pertencente à família Brassicaceae, nativa do Mediterrâneo, caracteriza-se por ser um vegetal arbustivo e pode ser cultivada em algumas regiões tropicais e subtropicais, desde o Sul até o Centro-Oeste do Brasil. O interesse pelo seu cultivo devido a quantidade de óleo extraído destas sementes, e mais recentemente, na produção de óleo para biodiesel, com teor de óleo variando entre 35-60% (CARNEIRO et al., 2009; SOUZA et al., 2009).

A produção de crambe tem como vantagens o cultivo totalmente mecanizado, utilizando os mesmos equipamentos existentes em outras culturas, e a

possibilidade de cultivo no inverno. Por ser uma cultura pouco conhecida comercialmente, praticamente não se dispõe, ainda, de informações técnicas que viabilize seu cultivo intensivo (OLIVA et al., 2012). A planta é tolerante à geada e após seu estabelecimento é altamente resistente à seca. A rotação de cultura evita as monoculturas que são responsáveis pela queda dos rendimentos agrícolas; o crambe apresenta boa produtividade na estação seca, por ser uma cultura de inverno mostrando-se como alternativa para a safrinha (MEAKIN, 2001).

As pesquisas iniciais sobre a cultura visavam à utilização da planta como forrageira, sendo uma alternativa na

rotação de culturas e cobertura de solos para o plantio direto no período de inverno. Contudo, recentemente foi descoberto o alto potencial das sementes para a produção de óleo vegetal e então foi verificada a sua utilização como matéria-prima para o biodiesel (FARIA, 2010).

Em diversos estudos realizados, observou-se um potencial de produtividade do crambe em torno de 1000 a 1500 kg.ha⁻¹ (FUNDAÇÃO MS, 2011). Jasper (2009), em experimento de crambe produzido em plantio direto em Botucatu-SP encontrou produtividade média de 1507,05 kg.ha⁻¹, o que demonstra boa aptidão da cultura à região. Segundo Ferreira e Berchol Silva (2011), no Brasil em 2009, o plantio de crambe alcançou mais de 10.000 ha, destacando-se o Sudeste de Goiás e o Sul do Mato Grosso do Sul.

De acordo com Pitol et al. (2010), quando o crambe é semeado na safrinha, constitui-se uma excelente opção para a rotação de culturas, por ser uma cultura de ciclo curto, de aproximadamente 90 dias, ainda tem rusticidade, precocidade, grande tolerância ao déficit hídrico e cultivo mecanizável, que utiliza os mesmos implementos de culturas tradicionais produtoras de grãos, maximizando o uso de máquinas e equipamentos agrícolas.

O Brasil ainda carece de culturas de ciclo outono/inverno que sejam apropriadas para produção de biodiesel, ficando dependente de culturas de ciclo primavera/verão, e que ainda concorrem para a produção de alimentos, cosméticos, entre outros. Sendo assim, o cultivo do crambe se torna uma excelente opção para a produção de biodiesel, e ainda uma nova cultura para os produtores agrícolas nacionais investirem na entressafra (SOUZA et al., 2009).

Segundo Silva et al. (2013), o Brasil é o país com o maior potencial agrícola do mundo, e apresenta o setor do agronegócio extremamente desenvolvido. Todavia, esse desenvolvimento é perceptível apenas dentro do limite das propriedades, pois carece ainda de tecnologias mais apropriadas para o armazenamento e escoamento da produção, apresentando extremas dificuldades principalmente no setor de transporte, das propriedades até os portos.

O processo de pós-colheita, ainda não é bem elucidado na cultura do crambe, e diversos pesquisadores têm trabalhado aspectos relacionados, desde o processo de desenvolvimento até a secagem e o armazenamento, com diferentes finalidades. Alguns pesquisadores realizaram investigações com o objetivo de compreender aspectos da qualidade fisiológica das sementes, outros, no entanto concentraram suas pesquisas na qualidade do óleo bruto para produção de biodiesel.

Considerando esse contexto, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma revisão de literatura sobre o desenvolvimento das sementes de crambe, dos métodos ideais para secagem, e das condições adequadas para o armazenamento de grãos ou sementes de crambe.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 DESENVOLVIMENTO

No final do desenvolvimento, sementes de crambe apresentam elevado teor de óleo, em torno de 30% (Silva et al. 2013; Silva et al, 2016).

Esse óleo é uma reserva lipídica da semente, utilizada por ela na propagação durante o processo germinativo. Estudando o processo de germinação de sementes de crambe, Oliveira et al. (2016) determinaram o conteúdo de açúcares solúveis totais, amido e lipídeos e porcentagem de sementes germinadas. Os autores observaram que sementes de crambe têm suas reservas degradadas desde o início da ativação do processo metabólico e, com o aumento da germinação, as reservas de amido, açúcares solúveis totais e lipídeos são degradadas.

As sementes de crambe apresentam dificuldades para germinar quando recém-colhidas (OLIVA et al, 2012), o que pode estar relacionado com um tipo de dormência adquirida durante o desenvolvimento.

Oliveira et al. (2014) estudando diferentes épocas de colheita (14, 20, 26, 32 e 38 dias após a floração) associada a qualidade de sementes de crambe, recomendam que a melhor época para realizar a colheita de sementes de crambe com maior qualidade fisiológica (germinação e vigor) ocorre no período de 14 a 26 dias após a floração.

Pode-se ressaltar que algumas sementes apresentam potencial germinativo no início no desenvolvimento, contudo elas não estão totalmente formadas, o que pode não resultar em plântulas normais (MARCOS-FILHO, 2005).

2.2 SECAGEM

Antes de iniciar o processo de secagem dos grãos, um fator importante que deve ser observado é a sua resistência quanto ao fluxo de ar em uma coluna de grãos. Nesse contexto, Brandão et al. (2016) estudaram a variação da pressão estática em uma coluna de grãos de crambe, e propuseram um modelo a ser utilizado para simulação da queda de pressão estática nessa coluna de grãos. Realizando o experimento em um protótipo, os autores utilizaram 5 diferentes densidades de fluxos de ar: 4,76; 6,41; 8,51; 9,90 e 10,47 m³ min⁻¹ m⁻² e testaram a adequação de 2 modelos matemáticos nesse experimento, o primeiro proposto por Sheed (1953) e o segundo por Hunter (1983). Os autores concluíram que a pressão estática aumenta linearmente com o aumento da densidade de fluxo de ar e que ambos os modelos propostos podem ser utilizados para simulação da variação da pressão estática em uma coluna de grãos de crambe.

Outros autores testaram diferentes condições de secagem, envolvendo métodos ou variação da temperatura de secagem.

Furquin et al. (2010) avaliando o efeito da temperatura de secagem de sementes de crambe na qualidade do óleo com temperaturas de 20, 40, 50, 60 e 70°C, concluíram que as temperaturas de secagem empregadas nas sementes não

afetam a qualidade do óleo e que a secagem do material a temperaturas elevadas mantém as propriedades naturais do óleo, além de diminuir o teor de ácidos graxos livres, contudo diminui o teor de óleos das sementes.

Silva et al. (2013) estudando o efeito de 5 métodos de secagem (ar aquecido, ar natural, terreiro, sombra e campo) encontraram maior porcentagem de sementes verdes e com maior teor de clorofila na secagem com ar aquecido, no entanto neste estudo, a presença do pigmento verde não afetou a qualidade fisiológica das sementes.

Analisando o efeito de métodos de secagem (ar aquecido, ar natural, terreiro, sombra e campo), sobre o teor de grãos verdes e rendimento do óleo, Silva et al. (2013) concluíram que, a secagem realizada mais lentamente (campo) proporcionou maior teor de óleo nos grãos de crambe, e que neste tratamento houve maior degradação da clorofila, enquanto na secagem com ar aquecido foi verificado maior porcentagem de grãos verdes, com diminuição do teor de óleo, e uma coloração mais escura no óleo bruto extraído.

Com o objetivo de avaliar o efeito de métodos de secagem na qualidade fisiológica de sementes de crambe, Silva et al. (2016) testaram cinco métodos de secagem (alta temperatura – 55,6°C, ar natural, secagem em terreiro, secagem à sombra e secagem em campo), os autores concluíram que, a secagem em alta temperatura favorece a obtenção de sementes com alto percentual de germinação e vigor em relação aos demais métodos de secagem, com um tempo reduzido de remoção de água nos grãos, ainda assim, a secagem à sombra é viável para sementes de crambe, porém é um método que demanda mais tempo para sua execução.

Resultados semelhantes encontraram Furquin et al. (2014) ao testar a qualidade fisiológica de sementes de crambe em diferentes métodos de secagem.

Donadon et al. (2013) estudaram o efeito de altas temperaturas de secagem na ultraestrutura de sementes de crambe. As temperaturas de secagem utilizadas foram 35, 45, 60, 75 e 90°C. Os autores observaram que as temperaturas de secagem utilizadas neste trabalho não afetaram a estrutura celular dos tecidos, no entanto as sementes tiveram sua qualidade fisiológica alterada, quando foram submetidas à secagem às temperaturas superiores à 60°C.

2.3 ARMAZENAMENTO

As condições de armazenamento de grãos e sementes podem afetar suas características químicas, bioquímicas e fisiológicas. Com o crambe, muitos pesquisadores têm trabalhado testando embalagens em diferentes ambientes, simulando diversas condições de armazenamento.

Bezerra et al. (2015) avaliaram diferentes condições de armazenamento na qualidade dos grãos de crambe e no óleo extraído. Os autores acondicionaram os grãos em dois tipos de embalagens: mini-bolsas herméticas e sacaria de rafia e mantiveram-nas em três ambientes, um ambiente reproduzia uma condição de estresse por alta temperatura e elevada umidade relativa, o segundo “armazenagem a céu aberto” e o terceiro um armazém convencional, durante 12 meses. Os autores concluíram

que a embalagem hermética na qualidade dos grãos armazenados, independente do ambiente.

Avaliando a qualidade fisiológica de sementes de crambe em diferentes condições de armazenamento: embalagens e ambientes, Bessa et al. (2015) concluíram que o ambiente natural e a embalagem politereftalato de etileno mantêm a qualidade fisiológica das sementes de crambe, durante seis meses de armazenamento, o ambiente natural preserva o vigor das sementes e promove superação da dormência primária a partir do terceiro mês de armazenamento e que o ambiente refrigerado a 10 °C não é recomendado para o armazenamento das sementes de crambe.

3. CONCLUSÕES

Com base na revisão realizada, conclui-se que sementes de crambe devem ser tratados de maneira diferente durante o processo de pós-colheita, prevalecendo altas temperaturas de secagem em grãos e temperaturas intermediárias para sementes.

Durante o armazenamento embalagens que impedem a entrada de ar favorecem a manutenção da qualidade dos grãos e sementes de crambe.

4. REFERÊNCIAS

BERALDO, et al. Determinação da época de semeadura do Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) na região nordeste do Estado de São Paulo-SP. 4º Congresso da Rede Brasileira de Biodiesel, 7º Congresso Brasileiro de plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel. In: (Anais...) Belo Horizonte-MG. 2010.

BESSA, Jaqueline F. V. et al. Armazenamento do crambe em diferentes embalagens e ambientes: Parte I - Qualidade fisiológica. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, Campina Grande, v. 19, n. 3, p. 224-230, Mar. 2015.

BESSA, Jaqueline F. V. et al. Armazenamento do crambe em diferentes embalagens e ambientes: Parte II - Qualidade química. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, Campina Grande, v. 19, n. 3, p. 224-230, Mar. 2015.

BEZERRA, P. H. S. et al. Efeito do armazenamento na qualidade dos grãos e do óleo de crambe para produção de biodiesel. **Energ. Agric.**, Botucatu, vol. 30, n.3, p.310-318, julho-setembro, 2015.

BRANDÃO, F. J. B. Et al. Variation of static pressure in a crambe (*Crambe abyssinica*) grains column. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 11(1), pp. 16-22, 7 January, 2016.

CARNEIRO, S. M. T. P. .G.et al. Ocorrência de *Alternaria brassicicola* em crambe (*Crambe abyssinica*) no estado do Paraná. Comunicações. **Summa Phytopathol**. Botucatu, v. 35, n. 2, p. 154, 2009.

DONADON, J. R. et al. Effect of hot air drying on ultrastructure of crambe seeds. **Drying Technology**, v. 31, p. 269-276, 2013.

FARIA, R. Q. Cinética de secagem e qualidade fisiológica das sementes de crambe. 2010. 84 f. **Dissertação**. Mestrado em Engenharia Agrícola.

FARIA, R. Q. et al. Qualidade fisiológica de sementes de crambe submetidas à secagem. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 3, p. 453-460, jul-set, 2014 Universidade Estadual de Goiás. Anápolis, 2010.

FERREIRA, F. M.; BERCHOL SILVA, A. R. Produtividade de grãos e teor de óleo da cultura do Crambe sob diferentes sistemas de manejo de solo em Rondonópolis – MT. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia, vol. 7, n. 12. 2011.

FURQUIN, et. al. Avaliação da qualidade do óleo durante a secagem de sementes de crambe (*Crambe abyssinica*). 33ª Reunião da Sociedade Brasileira de Química. (Anais...). Águas de Lindoia – SP, 2010.

FUNDAÇÃO MATO GROSSO DO SUL. **Crambe FMS Brilhante**. Maracajú, 2009. Disponível em: <<http://www.fundacaoms.org.br/page.php?34>>. Acesso em: 11 de outubro de 2011.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. FEALQ, Piracicaba, 2005, 495p.

MEAKIN, S. et al., Crambe abyssinica, a comprehensive programme, **Springdale Crop Synergues** Ltda, Rudston, 2001.

OLIVA, A. C. E.; BIAGGIONI, M. A. M.; CAVARIANI, C. Efeito imediato do método de secagem na qualidade de sementes de crambe. **Energia na Agricultura**, Botucatu, vol. 27, n.3, julho-setembro, 2012, p.16-30.

OLIVEIRA, M. B. et al. Épocas de colheita e qualidade fisiológica de sementes de crambe. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 1785-1792, jul./ago. 2014.

OLIVEIRA, E. F. ET AL. Degradation of reserves of crambe seed (*Crambe abyssinica*) during germination. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 11(11), pp. 920-924, 17 March, 2016.

PITOL, C.; BROCH, D. L.; ROSCOE, R. **Tecnologia e Produção: Crambe 2010**. Maracaju: Fundação MS, 2010. 60p.

SILVA, M. A. P., BIAGGIONI, M. A. M., SPEROTTO, F. C. S., BEZERRA, P. H. S., BRANDÃO, F. J. B. Qualidade do óleo bruto de grãos de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) sob diferentes métodos de secagem.

Energ.Agric., Botucatu, vol. 28, n.3, p.193-199, julho-setembro, 2013.

SILVA, M. A. P. et al. Influência do pericarpo no teste de condutividade elétrica em sementes de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) submetidas a métodos de secagem. **Energ. Agric.**, Botucatu, vol. 29, n.4, p.301-305, outubro-dezembro, 2014.

SILVA, M. A. P. et al. Seed quality of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) submitted to different drying methods. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza, v. 47, n. 2, p. 358-365, Junho 2016.

SOUZA, A. D. V. et al. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansão, nabo-forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

Capítulo II “**PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO
DE SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex
R.E.Fr) PRINA]”⁴**

**PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO
DE SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex
R.E.Fr) PRINA]**

Magnun Antonio Penariol da Silva^{1*}, Marco Antonio Martin Biaggioni¹, Ewumbua Monono² e Gisela Ferreira³

¹Departamento de Engenharia Rural. Faculdade de Ciências Agrônomicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu – SP. Rua Dr. José Barbosa de Barros, 1780 - Portaria 1, Botucatu - SP, 18610-307.

²Agricultural and Biosystems Engineering. North Dakota State University. 1221 Albrecht BLVD. Fargo, ND. 58102

³Departamento de Botânica. Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu – SP. Distrito de Rubião Junior, s/n, Botucatu - SP, 18618-970.

*Autor para correspondência: penariol@gmail.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar o perfil de ácidos graxos ao longo do desenvolvimento de sementes de crambe. Os tratamentos consistiram em coletar sementes de crambe em sete épocas distintas durante o desenvolvimento (7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias após a floração – DAF). Foram realizadas análises de teor de água, teor de lipídeos, perfil de ácidos graxos, atividade das enzimas peroxidase, superóxido dismutase, teores de lipoperóxidos nas sementes e índice de peróxidos, acidez, ácidos graxos livres e estabilidade oxidativa no lipídeo extraído das sementes. Após obtenção dos resultados, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas por análise de variância ou pelo teste t. Conclui-se que aos 49 DAF, as sementes apresentam a maior quantidade de lipídeos, destacando-se a maior proporção de ácido erúico em relação aos demais ácidos graxos.

Palavras-chave: ácido erúico, peroxidação lipídica, sementes oleaginosas

1. INTRODUÇÃO

A cultura do crambe tem ganhado maior importância nos últimos anos, no entanto, ainda carece de informações para o seu cultivo, especialmente aquelas relacionadas às etapas de processamento e armazenamento (Brandão et al., 2016). Segundo Oliva et al. (2012) a substância de reserva encontrada em maiores proporções em sementes de crambe são os lipídeos, seguidos por carboidratos e proteínas em menores proporções.

Os lipídeos são substâncias de origem animal ou vegetal, insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Essas substâncias são ésteres de ácidos graxos e glicerol (triglicerídeos), apresentando em sua constituição apenas átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio (Marcos-Filho, 2005; Graham, 2008). Assim, os lipídeos são acumulados para posteriormente serem utilizados pelas sementes para a germinação, por se tratarem de uma forma de energia rápida e eficiente (Silva et al., 2016).

Oliveira et al. (2016) estudando o processo de degradação de reservas durante a germinação de sementes de crambe, encontraram um declínio linear dos lipídeos, presentes em maior quantidade que açúcares e amido.

Apesar da planta realizar o acúmulo dos lipídeos para fim de propagação, essas substâncias são largamente utilizadas em diversos segmentos como farmacêutico, estético, alimentação humana e animal, uso industrial e também na produção de biocombustíveis, como é o caso da cultura do crambe (Oliveira et al., 2016).

No entanto, esse lipídeo pode ser deteriorado após extraído do grão, prejudicando a comercialização do produto manufaturado, ou ocasionando perdas financeiras significativas, ou ainda oferecendo riscos de contaminação, colocando em risco a segurança alimentar no caso de óleos destinados à alimentação humana, ou deterioração do motor, no caso dos biocombustíveis (Silva et al., 2016; Donadon et al., 2015).

Os lipídeos juntamente com as proteínas e o DNA são os principais alvos biológicos dos radicais livres e das espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo que nos lipídeos a oxidação altera as propriedades físicas das membranas celulares e consequentemente a sua função no vegetal. Para evitar o acúmulo das EROs, as plantas possuem sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos que eliminam essas espécies ativas e fazem a proteção contra danos oxidativos (Sorg, 2004; Hernández et al., 2001). O sistema oxidativo enzimático envolve entre outras, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) (Scandalios, 2005).

Para se ter um biocombustível de boa qualidade, que não cause danos aos motores de ciclo diesel, e que se torne uma alternativa ambiental e economicamente viável, faz-se necessário um estudo detalhado do processo de formação dos lipídeos, desde o momento em que essa substância começa a ser acumulada nas sementes, até quando o grão chega no ponto ideal de colheita, e ainda poder determinar o ponto ideal para a colheita, agrupando os aspectos quantitativos e qualitativos do óleo extraído (Silva et al., 2013; Oliveira et al., 2014).

Dessa maneira o objetivo desse trabalho foi verificar o perfil de ácidos graxos em sementes de crambe durante desenvolvimento dos lipídeos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Instalação, condução do experimento e, delineamento experimental

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências Agronômicas – FCA, Câmpus de Botucatu/SP. O experimento foi instalado na Fazenda Experimental Lageado.

O município de Botucatu encontra-se em um local com coordenadas geográficas Latitude - 22° 52' 20" S Longitude - 48° 26' 37" W Greenwich, altitude média de 770 metros, declividade média de 4,5% e clima subtropical, com verões quentes e úmidos e invernos frios e secos.

Foram utilizadas para a semeadura, sementes de crambe da cultivar FMS Brilhante, na proporção de 1 g m⁻¹. A semeadura foi realizada no dia 16 de maio de 2014, a emergência em campo ocorreu no dia 26 de maio de a floração no dia 15 de julho. A adubação foi realizada com 300 Kg ha⁻¹ de NPK (08-28-16). As sementes foram tratadas com o fungicida Carboxin (200 g L⁻¹) + Tiram (200 g L⁻¹), o espaçamento entre linhas utilizado foi de 0,45 cm, e a semeadura realizada com uma semeadora-adubadora de fluxo contínuo (Semeato SHM).

A primeira coleta de sementes foi realizada no dia 28/07/2014, e as demais a cada sete dias, até o dia 08/09/2014 (totalizando 7 coletas) (Tabela 1).

A partir das coletas foram instalados os tratamentos no Laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agronômicas e no Laboratório de Germinação do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu.

A atividade das enzimas peroxidase, catalase e superóxido simutase e a quantificação dos teores de lipoperóxidos foram determinadas no Laboratório de Fisiologia Vegetal II do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu.

As análises de índice de peróxido, índice de acidez, ácidos graxos livres e perfil lipídico foram realizadas no Laboratório Planta Piloto pertencente ao Departamento de

Engenharia Agrícola e Biosistemas da Universidade Estadual de Dakota do Norte (*Pilot Plant, Agriculture and Biosystems Engineering Department, North Dakota State University – NDSU, Fargo – ND – USA*).

Tabela 1. Datas das coletas e valores de temperatura máxima (°C), temperatura mínima (°C), temperatura média (°C), umidade relativa do ar – UR (%) e precipitação (mm) durante o período de desenvolvimento de sementes de crambe. Departamento de Engenharia Rural, Fazenda Lageado. FCA/UNESP – Botucatu – SP.

Coleta	Data	T°C Máxima	T°C Mínima	T°C Média	UR Média (%)	Precipitação (mm)
1	28-07-14	18,2	13,1	15,0	82,5	0,0
2	04-08-14	29,9	18,5	23,5	39,5	0,0
3	11-08-14	27,8	13,8	21,1	36,9	0,0
4	18-08-14	25,6	14,7	19,6	75,1	0,0
5	25-08-14	30,9	17,0	14,4	29,1	0,0
6	01-09-14	24,9	14,0	18,8	83,5	2,8
7	08-09-14	28,5	18,3	22,9	49,8	0,0

Fonte: Estação Meteorológica da Fazenda Lageado. Site: <http://www.fca.unesp.br/#!/meteorologia>. Acesso em: 27/07/2016.

2.2. Tratamentos e delineamento experimental

O processo de desenvolvimento das sementes de crambe foi estudado a partir do monitoramento de características fisiológicas e bioquímicas das sementes colhidas em sete épocas distintas (7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49 dias após a floração).

2.3. Análises laboratoriais

As análises de teor de água, teor de lipídeo, atividade da enzima peroxidase, quantificação dos teores de lipoperóxidos e perfil de ácidos graxos foram realizadas em todas as sementes colhidas nas sete distintas épocas. Para as análises de índice de acidez, índice de peróxidos e ácidos graxos livres, foram selecionados os estádios com maiores teores de lipídeo, então foram utilizadas as sementes colhidas aos 42 e 49 dias após a floração.

2.3.1. Teor de água

O teor de água das sementes foi determinado pelo método gravimétrico a $105 \pm 3^\circ\text{C}$, por 24 horas, utilizando-se três repetições de $4,5 \pm 0,5$ gramas. Os resultados foram expressos em base úmida (BRASIL, 2009).

2.3.2. Teor de lipídeos

A quantificação de lipídeos totais foi realizada em triplicatas de acordo com o método de Manirakiza et al. (2001) e Ambalkar et al. (2011). Para a obtenção do extrato foi pesado cerca de 1,0 a 2,0 gramas de amostra maceradas em nitrogênio líquido. Nestas amostras foi adicionado 100 mL de hexano, dispostos em balões de fundo chato e colocado no extrato de material graxo em 3 ciclos de 8 horas. Posteriormente o material foi filtrado ainda quente, e levado para um evaporador rotativo para separação do solvente e lipídeos. Os lipídeos foram retirados dos balões com ajuda de uma pipeta de Pasteur e transferidos para recipientes de vidro com tampa, pesados e etiquetados e foram congelados, para posterior análise em espectrofotometria de massa, para realização do perfil de ácidos graxos.

2.3.3. Perfil de ácidos graxos

O perfil de ácidos graxos dos lipídeos foi determinado de acordo com a metodologia [AOCS method Ce-1j-07]. A hidrólise das amostras ocorreu adicionando 5mL de H_2SO_4 (2% v/v) em 200 mg/L de metanol. Agitou-se a amostra e manteve por uma hora em aquecimento à 80°C , misturando a cada 15 minutos até o fim de uma hora, e depois esperou-se mais 15 minutos em temperatura ambiente. A separação dos ácidos graxos foi realizada adicionando 3 mL de hexano, misturou-se e foi adicionado 3 mL de água deionizada, misturou-se e esperou-se 10 minutos para separação das fases. Com a ajuda de uma pipeta de pasteur a fase hexano+óleo foi transferida para GC vials. Foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Shimadzu GC – 2014) para determinação do perfil de ácidos graxos.

2.3.4. Atividade da Peroxidase (PODs, EC 1.11.1.7)

A determinação da atividade da enzima peroxidase foi realizada de acordo com o método de Allain et al. (1974) modificado por Lima et al. (1999). O material finamente moído foi pesado (aproximadamente, 0,5 g) e colocado em tubos de ensaio onde foi adicionado 5 mL de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M pH 6,7). Os tubos foram levados à centrífuga refrigerada a 5°C por 10 minutos à velocidade de 8.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e armazenado em vidros com tampas. O sistema de reação foi obtido adicionando-se 500 µL do extrato enzimático (amostra), 500 µL de solução de diclorofenol com aminoantipirina (163 mg de diclorofenol + 81,3 mg de aminoantipirina em 100 mL de água destilada) e 500 µL de uma solução de H₂O₂ a 30%. Os tubos contendo o sistema de reação foram mantidos em banho-maria a 30°C por 5 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 2 mL de etanol absoluto e a leitura foi efetuada imediatamente, em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade específica da peroxidase foi quantificada em µmol de H₂O₂ decomposta min⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca.

2.3.5. Atividade da Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Beuchamp & Fridovich (1973), onde há produção de formazana azul, resultante da foto-redução do NBT (absorbância a 560 nm). Os resultados foram definidos como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT.

2.3.6. Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com metodologia proposta por Peixoto et al. (1999). O sistema de reação foi composto por 100 µL de extrato enzimático e 1900µL de solução tampão fosfato de potássio (50 mmol L⁻¹, pH 7,0) suplementado com peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 12,5 mmol L⁻¹), totalizando um volume final de 2000 µL. A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 80 segundos. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 240 nm aos 0 e 80 segundos, a fim de verificar quanto ocorreu decréscimo na absorbância. Para calcular a atividade

específica da enzima, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do H₂O₂ (39,4 mmol L⁻¹ cm⁻¹) e a atividade foi expressa em nmol de H₂O₂ consumido min⁻¹ mg⁻¹ proteína.

2.3.7. Quantificação dos teores de lipoperóxidos

A peroxidação de lipídeos foi determinada de acordo com a metodologia de Heath e Packer (1968) citado por Rama e Prasad (1998). As amostras foram homogeneizadas em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido ticloroacético (TCA) 10% e incubadas em banho-maria a 90°C por 1h. Após resfriamento, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido a leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 560 e 600 nm. Para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (155 mmol.L⁻¹.cm⁻¹) e os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).g⁻¹ de matéria fresca.

2.3.8. Índice de peróxidos dos lipídeos

O índice de peróxidos foi determinado de acordo com metodologia [AOCS Official Method Cd8-53 (1997)]. Frascos erlenmeyer de 25 mL foram pré-lavados com hexano, e aguardou-se até completa secagem. Foram pesadas 0,5 g de lipídeo (+/- 0,02g) e adicionadas nos frascos erlenmeyer. Adicionou-se 3 mL da solução de ácido acético: clorofórmio, 3:2. Adicionou-se então 50 µL de iodeto de potássio, e procedeu-se agitação por exatamente um minuto. Posteriormente, foi adicionado 300 µL de solução indicadora de amido. Então, procedeu-se a titulação utilizando solução de tiosulfato de sódio.

O índice de peróxidos foi expresso pela fórmula:

$$\text{Índice de peróxidos: } ((S-B) \times N \times 1000) / \text{peso da amostra}$$

Em que:

B = titulação do branco em mL

S = titulação da amostra em mL

N = normalidade do titulante.

2.3.9. Índice de acidez dos lipídeos

O índice de acidez foi determinado seguindo a metodologia [AOCS method Ca 5a-40 (1997)]. As análises foram realizadas em duplicatas, onde foram transferidos 5g do lipídeo extraído das sementes de crambe, para frascos erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 50 mL de etanol 95% e 5 gotas do indicador naphtolobenzene. As amostras foram tituladas em hidróxido de potássio 0.1 normal (KOH 0.1N).

O índice de acidez foi expresso pela fórmula:

$$\text{Índice de acidez} = ((\text{mL KOH} - \text{mL branco}) \times N \times 56,11) / \text{peso da amostra}$$

Em que:

N = normalidade da solução de KOH

56,11 = peso molecular da solução de KOH

2.3.10. Ácidos graxos livres em lipídeos

Utilizando-se dos dados do índice de acidez, calculou-se a porcentagem de ácidos graxos livres nos lipídeos através da fórmula:

$$\% \text{ Ácidos graxos livres} = ((\text{mL KOH} - \text{mL branco}) \times N \times 28,2) / \text{peso da amostra}$$

Em que:

N = normalidade da solução de KOH

28,2 = peso molecular do ácido oleico dividido por dez

2.3.11. Índice de estabilidade oxidativa

O índice de estabilidade oxidativa foi determinado de acordo com a metodologia [AOCS method– Cd 12b-92 (1997)]. As análises foram realizadas em triplicadas, mensurando 5g do lipídeo extraído das sementes e transferindo-o para tubos de ensaio e colocados no aparelho Modular OSI (Omnion Inc.), trabalhando com temperatura de 110°C com fluxo de ar de 20 L/h.

2.4. Análises estatísticas

Os dados de teor de lipídeos, atividade da enzima peroxidase e superóxido dismutase e quantificação dos teores de lipoperóxidos foram submetidos à análise de

variância (ANOVA), e as médias comparadas por análise de regressão ($p \leq 0,05$). Os dados de perfil de ácidos graxos, índice de peróxidos, acidez, estabilidade oxidativa e ácidos graxos livres foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste “t” ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 2 apresenta a variação do teor de água de sementes de crambe durante o desenvolvimento. Conforme esperado, houve um decréscimo do teor de água ao longo do desenvolvimento das sementes.

Tabela 2. Variação do teor de água ao longo do desenvolvimento de sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]. Botucatu/SP (2014).

Dias após a floração	Teor de água (%)
7	82
14	74
21	60
28	40
35	30
42	20
49	10

Os valores médios de teor de lipídeos, em sementes de crambe, são apresentados na Figura 2. Observa-se pelos resultados obtidos um aumento linear do conteúdo de lipídeos nas sementes de crambe ao longo do desenvolvimento, destacando-se um rápido aumento, entre 35 e 42 dias após a floração, onde no intervalo de 7 dias houve um acréscimo de 10% do teor de lipídeos encontrados nas sementes.

Encontrou-se aos 49 dias após a floração, quando as sementes continham 10% de teor de água, um teor de lipídeo de 28,0%. Estes valores corroboram os obtidos por outros autores, 28,92% (Silva et al., 2013), 36,42% (Donadon et al., 2015) e 27,82% (Oliveira et al., 2016).

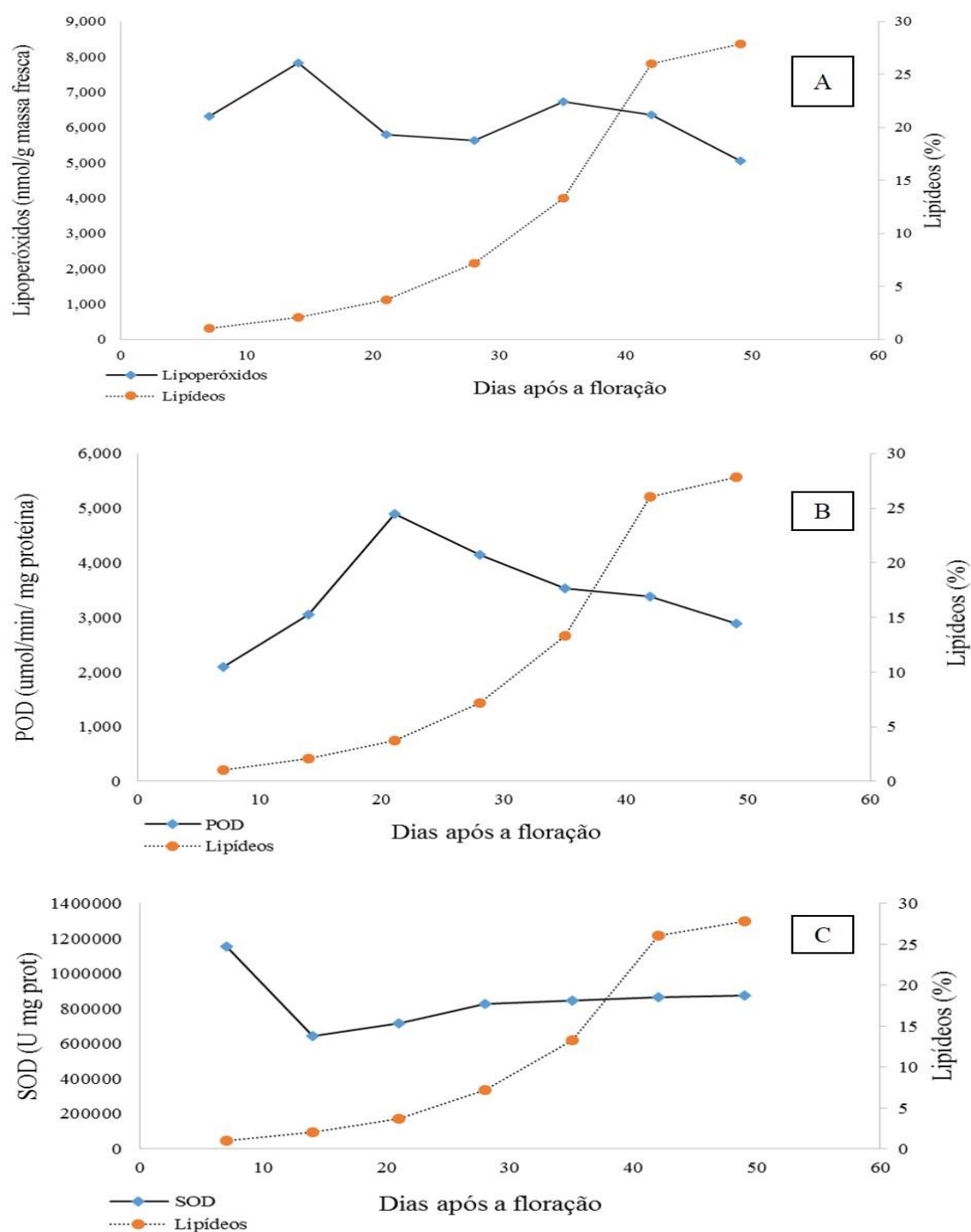


Figura 1. Comparativo entre a formação de lipídeos e a (A) quantificação dos teores de lipoperóxidos (nmol/g massa fresca) e as atividades específicas das enzimas (B) peroxidase (umol/min/ mg proteína), e (C) superóxido dismutase - SOD (U mg prot) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento. Botucatu/SP (2014).

A figura 1 apresenta os valores da atividade específica das enzimas peroxidase e superóxido dismutase, e a quantificação dos teores de lipoperóxidos comparadas com os teores de lipídeos.

Durante o desenvolvimento das sementes, ocorre acúmulo de reservas e perda de água, para que essa estrutura vegetal possa resistir ao processo de perda de água, inclusive durante a fase final do desenvolvimento são necessários mecanismos que envolvem mudanças na estrutura e reorganização celular (Marcos-Filho, 2005), entre os mecanismos se destacam um sistema antioxidante eficiente, com a presença de enzimas que atuem nesse processo contra a ação de radicais livres (Moore et al., 2009).

A peroxidação lipídica é o processo pelo qual as EROs atacam os ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípidios das membranas celulares, resultando na desintegração dessas membranas (Gill e Tuteja, 2010) (Figura 1A). A instabilidade da peroxidação lipídica que aconteceu nesse experimento pode estar relacionada à formação dos ácidos graxos durante o desenvolvimento e a variação da quantidade presente nas frações lipídicas.

A ação de radicais livres pode afetar a funcionalidade das membranas e a peroxidação de lipídeos, se não for controlada (Gregggains et al., 2000; Taveira et al., 2012). Comprovando o que sugerem estes autores a figura 3B mostra que existe um pico da atividade específica da peroxidase aos 21 dias após a floração, coincidindo com o momento de aceleração da produção de lipídeos nas sementes, a partir de então a atividade enzimática diminui, conforme aumenta a produção de lipídeos, mostrando a ação de radicais livres e estresse oxidativo das sementes ao final do processo de desenvolvimento (49 dias após a floração), e o maior acúmulo de lipídeos neste mesmo momento (Figura 1B).

Em relação à enzima superóxido dismutase, é perceptível um declínio da atividade da enzima no início do desenvolvimento das sementes, um leve aumento entre os 15 e 30 DAF, e uma estabilização da atividade deste ponto até o final do desenvolvimento (Figura 1C).

Pela tabela 3 pode-se observar o perfil de ácidos graxos livres dos lipídeos extraídos de sementes de crambe em cada época de colheita.

Como destacado na literatura (Li et al., 2012; Santos et al., 2016) observa-se que a fração de ácido erúico é a maior presente na composição dos ácidos graxos em espécies oleaginosas. O valor de ácido erúico teve um aumento linear a partir dos 28 DAF, apresentando aos 7 DAF 29,90% e no final do ciclo, aos 49 DAF 59,18%, sendo que esse valor teve uma queda aos 14 DAF e aumentou no restante do desenvolvimento.. Este valor no final do desenvolvimento do grão, confirmam os resultados obtidos por Santos

et al. (2015) que encontraram na composição de óleo de crambe, 59,4% de ácido erúico, seguido de 20,17% de ácido oleico, 7,52% de ácido linoleico e 5,71% de ácido linolênico.

Tabela 3. Perfil de ácidos graxos livres dos lipídeos extraídos das sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento. Botucatu/SP (2014).

Ácidos graxos (%)	Dias após a floração							
	7	14	21	28	35	42	49	CV
C16:0 palmítico	10,12 b	10,48 b	11,19 a	4,16 c	4,6 c	1,75 d	1,95 d	0,81
C18:1 oleico	8,25 d	15,95 b	15,44 b	12,4 c	19,32 a	12,7 c	15,87 b	0,58
C18:2 linoleico	1,59 c	1,77 c	1,26 d	0,26 e	6,32 b	6,56 b	8,95 a	1,24
C18:3 linolênico	2,27 c	1,40 e	1,52 e	1,91 d	2,17 c	4,74 b	5,31 a	1,73
C20:1 elaídico	3,49 d	6,34 a	4,81 c	5,32 b	4,54 c	5,22 b	4,9 c	0,99
C22:0 behênico	4,31 c	4,53 b	4,89 b	3,30 d	3,4 d	5,26 a	2,43 e	1,25
C22:1 erúico	29,90 d	23,57 e	27,08 d	48,22 c	53,2 b	54,96 b	59,18 a	1,15

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste “t” ($p \leq 0,05$).

CV: Coeficiente de Variação

Além do ciclo de desenvolvimento de espécies vegetais, outro fator que pode afetar a composição de ácidos graxos em sementes oleaginosas é a temperatura. Como o crambe é cultivado no Brasil como uma cultura de inverno, a variação de temperatura entre o início do cultivo e a colheita das sementes pode ter influenciado na composição dos ácidos graxos. A semeadura ocorreu em maio de 2014, com uma temperatura média de 20,2°C. A primeira coleta de sementes ocorreu em julho de 2014, onde a média registrada foi de 15°C, já a última coleta em setembro de 2014, e a temperatura média observada foi de 22,9°C, um aumento de 7,9°C entre o primeiro e o último dia de coleta das sementes.

Estudando o desenvolvimento de sementes de canola (*Brassica napus* L.), Deng e Scarth (1998) observaram um efeito da temperatura ambiente na composição de ácidos graxos dessas sementes, destacando que temperaturas de 30/25°C (dia/noite) durante 40 dias diminuí o conteúdo de ácido linolênico, como também aumenta a fração de ácidos palmítico e oleico.

Ao longo do desenvolvimento de sementes de soja [*Glycine max* (L.) Merrill], Lanna et al. (2005) verificaram que a temperatura não afetou o conteúdo dos ácidos

palmítico, no entanto, baixas temperaturas (5°C) favoreceram a diminuição do conteúdo de ácido oleico enquanto o conteúdo de ácido linoleico e linolênico aumentaram. Os autores também afirmam que a variação da temperatura teve efeito na composição de ácidos graxos, como também na fração lipídica das sementes em desenvolvimento.

O índice de acidez e a porcentagem de ácidos graxos livres são iguais nas duas épocas de colheita, no entanto pelos índices de peróxido e estabilidade oxidativa, percebe-se que não houve diferença estatística significativa entre os 42 e 49 DAF (Tabela 4).

Tabela 4. Índice de peróxidos, índice de acidez, índice de estabilidade oxidativa e ácidos graxos livres (%), em lipídeo extraído de sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] colhidos aos 42 e 49 dias após a floração. Botucatu/SP (2014).

Dias após a floração	Índice de Peróxidos	Índice de acidez	Índice de estabilidade oxidativa	Ácidos graxos livres
42	5,73 a	0,86 a	5,0 a	0,43 a
49	4,77 a	0,86 a	5,5 a	0,43 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste “t” ($p \leq 0,05$).

Em relação ao índice de acidez e ácidos graxos livres, os resultados obtidos aos 42 e 49 DAF foram 0,86 e 0,43 respectivamente nas duas épocas de colheita. Em sementes de crambe recém-colhidas, Silva et al. (2013) obtiveram valores menores variando entre 0,43 e 0,61 dependendo do método de secagem adotado. Bezerra et al. (2015) encontraram valores muito elevados, variando de acordo com as condições do armazenamento dos grãos, variação entre 0,41 a 3,11 em condições adversas de armazenagem.

O índice de estabilidade oxidativa refere-se à resistência que componentes lipídicos apresentam à reação de oxidação (Rittner, 2001). Sendo assim, maiores valores representam óleo de melhor qualidade. Os valores aos 42 e 49 DAF foram 5,0 e 5,5 respectivamente, que apontam uma maior estabilidade oxidativa do óleo aos 49 DAF. O índice de peróxidos também aponta para um lipídeo de maior qualidade aos 49 DAF.

O índice de peróxidos reflete a quantidade de rancidez em óleos e gorduras, causada por processo de oxidação do óleo (Waraho et al., 2011). Aos 42 DAF o índice de peróxidos foi 5,73, sendo que aos 49 DAF esse valor foi menor, 4,77, pontando lipídeo menos oxidado no final do ciclo de desenvolvimento, no entanto por se tratarem de

estruturas instáveis, tal resultado pode indicar apenas que ele não estava sendo produzido neste momento.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que aos 49 dias após a floração as sementes de crambe apresentam a maior quantidade e qualidade de lipídeos para produção de biodiesel além de teor de água adequado para colheita mecanizada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBALKAR, V.U. et al. Soxhlet extraction of Neem seed (*Azadirachta indica* A. Juss) using hexane as a solvent. *Int. J. Chem. Anal. Sci.* 2:2.2011.

APARICIO, R. et al. Detection of Rancid Defect in Virgin Olive Oil by the Electronic Nose. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 853–860

AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY - AOCS. **Official methods and recommended practices**. 5 ed. Champaign: AOCS, 1997

BAILEY, A. E.; **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, 5th ed., John Wiley: New York, 1996, vol. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. 2009. 399 p.

BEZERRA, P. H. S. et al. Efeito do armazenamento na qualidade dos grãos e do óleo de crambe para produção de biodiesel. **Energ. Agric.**, Botucatu, vol. 30, n.3, p.310-318, julho-setembro, 2015.

BEAUCHAMP, C.O. & FRIDOVICH, I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. **Bichemica Et Biophysica Acta**, v. 317, p.50-64, 1973.

BRANDÃO, F. J. B. et al. Variation of static pressure in a crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) grains column. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 11(1), pp. 16-22, 7 January, 2016.

DENG, X.; SCARTH, R. J. Temperature effects on fatty acid composition during development of low-linolenic oilseed rape (*Brassica napus* L.). **Amer Oil Chem Soc** (1998) 75: 759. doi:10.1007/s11746-998-0223-4

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. Volume 48, Issue 12, December 2010, Pages 909–930.

GRAHAM, I. A. Seed storage oil mobilization. **Annu. Ver. Plant. Biol.** 2008.

GREGGAINS, V.; FINCH-SAVAGE, W.E.; QUICK, W.P.; ATHERTON, N.M. Metabolism-induced free radical activity does not contribute significantly to loss of viability in moist-stored recalcitrant seeds of contrasting species. **New Phytologist**, v.148, p.267-276, 2000.

HERNANDEZ, J.A.; FERRER, M.A.; JIMENEZ, A.; BARCELO, A.R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O₂ / H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, p. 827-831, 2001.

FLORES, A. V. et al. Atividade enzimática durante a germinação de sementes de *Melanoxylon brauna schott* sob diferentes temperaturas. **CERNE [online]**. 2014, vol.20, n.3 [cited 2016-08-19], pp.401-408.

LANNA, A. C. et al. Effect of temperature on polyunsaturated fatty acid accumulation in soybean seeds. **Braz. J. Plant Physiol.**, 17 (2): 213-222, 2005.

LI, X. et al. Development of ultra-high erucic acid oil in the industrial oil crop *Crambe abyssinica*. **Plant Biotechnology Journal** (2012) 10, pp. 862–870.

LIMA, G. P. P. et al . Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sobre estresse salino. **Scientia Agrícola** , v. 56, n. 1, 1999.

MANORAKIZA P. et al.. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **J. Food Composit. Anal.** 14(1):93-100.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas** . FEALQ, Piracicaba, 2005, 495p.

MOORE, J.P., LE, N.T., BRANDT, W.F., DRIOUICH, A. & FARRANT, J.M. Towards a systems-based understanding of plant desiccation tolerance. **Trends in Plant Science**, v.14, p.110-117, 2009.

OLIVA, A. C. E.; BIAGGIONI, M. A. M.; CAVARIANI, C. Efeito imediato do método de secagem na qualidade de sementes de crambe. **Energia na Agricultura**, Botucatu, vol. 27, n.3, julho-setembro, 2012, p.16-30.

OLIVEIRA, M. B. et al. Épocas de colheita e qualidade fisiológica de sementes de crambe. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 1785-1792, jul./ago. 2014

OLIVEIRA, F. E. et al. Degradation of reserves of crambe seed (*Crambe abyssinica*) during germination. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 11(11), pp. 920-924, 17 March, 2016.

PEIXOTO, H. P. P. et al. Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

RAMA DEVI, S.; PRASAD, M. N. V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L.(Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, v. 138, n. 2, p. 157-165, 1998.

RITTNER, H. **Tecnologia das matérias graxas: vol. 1 – extração**. Impressão autorizada. São Paulo, 2001. 1089 pg.

SANTOS, K. A. et al. Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythropappus*): Superficial CO₂ oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling. **J. of Supercritical Fluids** **114** (2016) 1–8.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 38, n. 7, p. 995-1014, 2005.

SILVA, M. A. P. et al. Qualidade do óleo bruto de grãos de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) sob diferentes métodos de secagem. **Energ.Agric.**, Botucatu, vol. 28, n.3, p.193-199, julho-setembro, 2013.

SILVA, M. A. P. et al. Seed quality of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) submitted to different drying methods. **Rev. Ciênc. Agron.**, v. 47, n. 2, p. 358-365, abr-jun, 2016.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, **Maryland Heights**, v. 327, p. 649-662, 2004.

TAIZ E ZEIGER. **Fisiologia Vegetal**. 5. Ed. Porto Alegre. 2013. Artmed.

TAVEIRA, J. H. S. et al. Perfis proteicos e desempenho fisiológico de sementes de café submetidas a diferentes métodos de processamento e secagem. **Pesq. agropec. bras.** [online]. 2012, vol.47, n.10

WARAHO, T.; Mc CLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Mechanisms of lipid oxidation in food dispersions. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. 3-13, 2011.

Capítulo III: “**ACÚMULO DE RESERVAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] E DANOS OXIDATIVOS OCASIONADOS PELA SECAGEM**”⁴

⁴ Artigo escrito de acordo com as normas do Periódico : Drying Technology

ACÚMULO DE RESERVAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE SEMENTES DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] E DANOS OXIDATIVOS OCASIONADOS PELA SECAGEM”⁵

Magnun Antonio Penariol da Silva^{1*}, Marco Antonio Martin Biaggioni¹ e Gisela Ferreira²

¹Departamento de Engenharia Rural. Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu – SP. Rua Dr. José Barbosa de Barros, 1780 - Portaria 1, Botucatu - SP, 18610-307.

²Departamento de Botânica. Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu – SP. Distrito de Rubião Junior, s/n, Botucatu - SP, 18618-970.

*Autor para correspondência: penariol@gmail.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi verificar o acúmulo de substâncias de reservas durante o desenvolvimento e os danos oxidativos que são ocasionados pelo processo de secagem em sementes de crambe. O experimento foi instalado na Fazenda Experimental Lageado, na cidade de Botucatu – SP. Os tratamentos consistiram em coletar as sementes em campo em diferentes épocas de colheita (7, 14, 21, 28 e 25 dias após a floração) que foram submetidos à 4 métodos de secagem (natural, 30°C, 80°C e testemunha (sem secagem)). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Conclui-se que em grãos de crambe os lipídeos são as reservas que mais são acumuladas durante o desenvolvimento e que a secagem em alta temperatura ocasiona danos oxidativos nas sementes.

Palavras-chave: proteínas, lipídeos, açúcares, sistemas antioxidantes

INTRODUÇÃO

A cultura do crambe têm ganhado destaque, entre outros fatores, por apresentar elevado teor de óleo no final do ciclo de desenvolvimento das sementes, podendo chegar em torno de 30% de óleo em massa seca. (Silva et al. 2013; Silva et al, 2016).

Estudos têm sido realizados com o intuito de encontrar a melhor época de colheita do crambe, para ser usado como veículo de propagação, pois além de apresentar maturidade irregular, as sementes desta espécie apresentam dificuldade para germinar

⁵ Artigo escrito de acordo com as normas do Periódico : Drying Technology

quando recém-colhidas. Segundo Oliveira et al. (2014), as sementes de crambe apresentam maior qualidade fisiológica (germinação e vigor) quando colhidas entre 14 e 26 dias após a floração.

No entanto, para processo industrial de produção de biodiesel de óleo de crambe, necessita-se estudar o processo de desenvolvimento de outra maneira, verificando os aspectos quantitativos e qualitativos da produção de lipídeo pela planta e a acumulação desta substância durante o desenvolvimento, tendo em vista que outras substâncias, como proteínas e açúcares podem também ser acumuladas durante o ciclo de desenvolvimento. (Silva et al., 2016).

Quando se verifica a época ideal para colheita, muitas vezes o grão pode ser colhido com elevado teor de água, e necessita-se então da utilização de métodos de secagem para atingir o teor de água ideal para beneficiamento e/ou armazenamento (Brandão et al., 2016). Durante o processo de secagem Donadon et al. (2013) verificaram que a utilização de métodos para acelerar a perda de água pode ocasionar danos oxidativos ou celulares em sementes de crambe.

As sementes de crambe apresentam elevada constituição lipídica de reserva, e os lipídeos juntamente com as proteínas e o DNA, são os principais alvos biológicos dos radicais livres e das espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo que, nos lipídeos, a oxidação altera as propriedades físicas das membranas celulares e, conseqüentemente, a sua função no vegetal. Para evitar o acúmulo das EROs, as plantas possuem sistemas de defesas antioxidantes enzimáticos ou não-enzimáticos que eliminam essas espécies ativas e a proteção contra danos oxidativos (Sorg, 2004; Hernández et al., 2001). O sistema oxidativo enzimático envolve entre outras, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD) (Scandalios, 2005).

Dessa maneira, o objetivo do presente trabalho foi verificar o acúmulo de substâncias de reservas durante o desenvolvimento e os danos oxidativos que são ocasionados pelo processo de secagem em sementes de crambe.

MATERIAL E MÉTODOS

Instalação do experimento

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, Câmpus de Botucatu/SP. O experimento foi instalado na Fazenda Experimental Lageado.

O município de Botucatu encontra-se em um local com coordenadas geográficas Latitude - 22° 52' 20" S Longitude - 48° 26' 37" W Greenwich, altitude média de 770 metros, declividade média de 4,5% e clima subtropical, com verões quentes e úmidos e invernos frios e secos.

Foram utilizadas para a semeadura, sementes de crambe da cultivar FMS Brilhante.

Os tratamentos experimentais foram realizados no Laboratório de Processamento de Produtos Agrícolas do Departamento de Engenharia Rural da Faculdade de Ciências Agrônômicas e no Laboratório de Germinação do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu.

Tratamentos e delineamento experimental

O processo de desenvolvimento das sementes de crambe foi estudado a partir do monitoramento de características fisiológicas e bioquímicas das sementes colhidas em cinco épocas distintas (7, 14, 21, 28 e 35 dias após a floração – DAF e submetidas a quatro condições de secagem (80 e 30° C e secagem natural – bancada do laboratório e sem secagem – testemunha).

O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco repetições. Sendo um fatorial simples (5 épocas de colheita X 4 condições de secagem).

Análises bioquímicas

Determinação das proteínas

Para a extração das proteínas foram utilizadas três repetições de cada grão. A extração foi realizada conforme Suda e Giorgini (2000). As proteínas foram extraídas de acordo com sua solubilidade. Das sementes inteiras foram extraídos, consecutivamente, albuminas (com água destilada), globulinas (com 5% de cloreto de sódio), prolaminas (com 60% de etanol) e glutelinas (com 0,4% de hidróxido de sódio), a cada 24 horas. Os extratos eram centrifugados a 15000 g por 30 minutos e os sobrenadantes quantificados de acordo com Bradford (1976). A cada 24 h era extraída uma proteína, de acordo com o solvente.

Teor de lipídeos

A quantificação de lipídeos totais foi realizada de acordo com o método de Manirakiza et al. (2001) e Ambalkar et al. (2011). Para a obtenção do extrato foi pesado cerca de 1,0 a 2,0 gramas de amostra maceradas em nitrogênio líquido. Nestas amostras foi adicionado 100mL de hexano, dispostos em balões de fundo chato e colocado no extrato de material graxo em 3 ciclos de 8 horas. Posteriormente o material foi filtrado ainda quente, e levado para um evaporador rotativo para separação do solvente e lipídeos.

Atividade da Peroxidase (PODs, EC 1.11.1.7)

A determinação da atividade da enzima peroxidase foi realizada de acordo com o método de Allain et al. (1974) modificado por Lima et al. (1999). O material finamente moído foi pesado (aproximadamente, 0,5 g) e colocado em tubos de ensaio onde foi adicionado 5 mL de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M pH 6,7). Os tubos foram levados à centrífuga refrigerada a 5°C por 10 minutos à velocidade de 8.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e armazenado em vidros com tampas. O sistema de reação foi obtido adicionando-se 500 µL do extrato enzimático (amostra), 500 µL de solução de diclorofenol com aminoantipirina (163 mg de diclorofenol + 81,3 mg de aminoantipirina em 100 mL de água destilada) e 500 µL de uma solução de H₂O₂ a 30%. Os tubos

contendo o sistema de reação foram mantidos em banho-maria a 30°C por 5 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 2 mL de etanol absoluto e a leitura foi efetuada imediatamente, em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade específica da peroxidase foi quantificada em μmol de H_2O_2 decomposta $\text{min}^{-1} \text{g}^{-1}$ de matéria fresca.

Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com metodologia proposta por Peixoto et al. (1999). O sistema de reação foi composto por 100 μL de extrato enzimático e 1900 μL de solução tampão fosfato de potássio (50 mmolL^{-1} , pH 7,0) suplementado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , $12,5 \text{ mmol L}^{-1}$), totalizando um volume final de 2000 μL . A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 80 segundos. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 240 nm aos 0 e 80 segundos, a fim de verificar quanto ocorreu decréscimo na absorbância. Para calcular a atividade específica da enzima, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 ($39,4 \text{ mmol L}^{-1} \text{cm}^{-1}$) e a atividade foi expressa em nmol de H_2O_2 consumido $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína.

Quantificação dos teores de lipoperóxidos

A peroxidação de lipídeos foi determinada de acordo com a metodologia de Heath e Packer (1968) citado por Rama e Prasad (1998). As amostras foram homogeneizadas em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido ticloroacético (TCA) 10% e incubadas em banho-maria a 90°C por 1h. Após resfriamento, o homogeneizado foi centrifugado a $10.000 \times g$ por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido a leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 560 e 600 nm. Para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do malondialdeído ($155 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). g^{-1} de matéria fresca.

Açúcares solúveis totais

Para a extração dos carboidratos solúveis foram utilizados 100mg de amostra por replicata. No caso da amostra fresca foi realizado um cálculo para a relação da quantidade de massa fresca e de massa seca das amostras, para que os dados possam ser expressos em mg de açúcar por grama de amostra seca.

Para a inativação do material adicionou-se etanol a 70% a 100 mg de amostra e em seguida submete o material a extração tripla à fervura em etanol por 5 minutos, tempo suficiente para inativar as enzimas que poderiam degradar os carboidratos (DURDA et al., 2007).

Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Os maiores conteúdos de albumina são encontrados no final do ciclo de desenvolvimento das sementes de crambe, quando as sementes apresentam 30% (35 DAF) de teor de água. A secagem em alta temperatura (80 °C) atuou na degradação da albumina, diminuindo significativamente em relação aos demais métodos de secagem. A secagem a 30°C das sementes colhidos com 30% de teor de água apresentou o maior conteúdo de albumina (Tabela 1).

As sementes quando colhidas aos 7 DAF submetidos à secagem a 80 °C apresentaram o menor conteúdo de globulina. As sementes colhidas aos 28 DAF e não submetidos à secagem obtiveram o maior conteúdo dessa proteína. Pode-se ainda perceber que existe um aumento do conteúdo de globulina durante o ciclo do desenvolvimento de sementes de crambe (Tabela 2).

Houve um aumento de conteúdo de promalina ao longo do desenvolvimento das sementes de crambe, onde os maiores conteúdos dessa proteína foram encontrados aos 35 DAF. A secagem natural foi o método que menos degradou as proteínas das sementes, enquanto que as sementes submetidas à secagem a 80 °C sofreram degradação significativa do conteúdo de promalina (Tabela 3).

Não houve um comportamento padrão do aumento da quantidade de glutelina durante o desenvolvimento das sementes, existindo uma variação do conteúdo de acordo com a variação da época de colheita. No entanto, como observado nas demais proteínas, quando as sementes foram submetidas à secagem em temperatura elevada (80°C) o conteúdo dessa proteína tendeu a diminuir. (Tabela 4).

Ao se analisar os demais componentes de formação das sementes, verifica-se que os maiores níveis de açúcares solúveis totais foram encontrados nas sementes no início do desenvolvimento, com 82% de teor de água secas naturalmente, sem necessidade de secagem artificial (Tabela 5). Em relação ao conteúdo de lipídeos, percebe-se um aumento linear dessa substância de reserva ao longo do ciclo de desenvolvimento das sementes, sendo aumentado com a diminuição do teor de água, e o maior valor encontrado com 30% de teor de água na secagem a 30 °C (Tabela 6).

Verificou-se um padrão de comportamento quando se analisa os sistemas antioxidantes, percebe-se que a secagem a 80 °C causou maiores danos oxidativos nas sementes. A atividade específica das enzimas peroxidase e catalase foi maior na secagem em alta temperatura, mais especificamente nas sementes no início do desenvolvimento, aos 7 DAF com 82% de teor de água (Tabelas 7 e 8). Os maiores teores de lipoperóxidos também foram observados nas sementes secas a 80 °C com teor de água de 82% aos 7 DAF (Tabela 9).

DISCUSSÃO

Durante o processo de desenvolvimento das sementes, ocorre uma redução do teor de água no final do ciclo. De maneira geral, ao longo do processo de desenvolvimento, reservas como proteínas, lipídeos e açúcares são transportadas da planta-mãe para a semente via floema em meio aquoso (Taiz e Zeiger, 2013).

No processo de desnaturação, as proteínas apresentam expansão do volume resultante do desdobramento da cadeia, e a aplicação de pressão, em princípio, pode reduzir a desnaturação pelo calor (Lehninger et al., 2006). Observou-se nesse trabalho um aumento do conteúdo das proteínas (albumina, globulina, promalina e glutelina) desde o início, até o final do desenvolvimento dos grãos (Tabelas 1, 2, 3 e 4). No entanto, ocorreu diminuição desse conteúdo quando as sementes foram secas à 80°C, ocorrendo então, desnaturação das proteínas pelo calor. Assim como nas sementes de crame, foi

observado degradação de proteína em sementes de trigo submetidos à secagem em temperaturas superiores a 70°C (Elias et al., 2009).

Em relação às principais reservas, a maior proporção encontrada foi de lipídeos, quando comparado com as demais substâncias (proteínas e açúcares). Segundo Marcos-Filho (2005) essa maior proporção lipídica é característica das sementes de espécies oleaginosas. Todavia, quando submetidas à secagem em altas temperaturas, essas substâncias podem ser degradadas, como mostra a tabela 6, que aos 35 DAF, quando as sementes foram submetidas à secagem a 80 °C houve diminuição do conteúdo de lipídeos. Como observado por Silva et al. (2013), que ao submeter sementes de crambe à alta temperatura de secagem, teve a porcentagem de lipídeos diminuída após o processo.

De acordo com Buckeridge al. 2000, os açúcares solúveis representam uma pequena parte dos carboidratos solúveis em sementes. E além de atuarem como mecanismos de reservas de utilização rápida, constituem também um papel de proteção, limitando os danos causados pela secagem. Neste trabalho, foi observado um aumento do conteúdo de açúcares solúveis totais durante o desenvolvimento (Tabela 5), o que não é comum para a maioria das espécies estudadas (Marcos – Filho, 2005). Embora não seja comum entre as demais espécies, esse pode ser um mecanismo que a espécie desenvolveu para tolerar perda rápida de água, durante seu ciclo de desenvolvimento que é relativamente curto, se comparado a outras culturas agronômicas.

As sementes apresentam mecanismos que possibilitam que eles tolerem a secagem, principalmente quando essa ocorre naturalmente no campo, sem influência de secagem artificial. Esses mecanismos são os sistemas antioxidantes, que são capazes de eliminar radicais livres que são gerados pelo metabolismo celular evitando dando às membranas (Pamplona, 2008).

Quando se observa as tabelas 7, 8 e 9 nota-se que as maiores atividades específicas das enzimas peroxidase e catalase, como também a maior quantidade de lipoperóxidos são observados na secagem a 80 °C, o que mostra que a ação desses mecanismos não foi suficiente para evitar danos celulares as sementes expostas à tão elevada temperatura. Verifica-se, neste trabalho, que as substâncias de reservas, como proteínas e lipídeos são acumuladas durante o desenvolvimento das sementes de crambe, no entanto ocorre um decréscimo da quantidade de açúcares neste processo, e que quando as sementes são submetidas à secagem com alta temperatura, os mecanismos protetores não agem

suficientemente para evitar danos celulares as sementes, ocasionando desnaturação de proteínas e diminuição do conteúdo de açúcares e lipídeos.

CONCLUSÃO

Conclui-se que a quantidade de albumina, açúcares e a atividade da catalase e peroxidase não variam ao longo do desenvolvimento e que a secagem na temperatura de 80°C causa danos oxidativos nas sementes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBALKAR, V.U. et al. Soxhlet extraction of Neem seed (*Azadirachta indica* A. Juss) using hexane as a solvent. **Int. J. Chem. Anal. Sci.** 2:2.2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDÃO, F. J. B. et al. Variation of static pressure in a crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) grains column. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 11(1), pp. 16-22, 7 January, 2016.

DONADON, J. R. et al. Effect of Hot Air Drying on Ultrastructure of Crambe Seeds. **Drying Technology**, v. 31, p. 269-276, 2013.

DONADON, J. R. et al. Armazenamento do crambe em diferentes embalagens e ambientes: Parte I - Qualidade química. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental** (Online), v. 19, p. 231-237, 2015.

HERNANDEZ, J.A.; FERRER, M.A.; JIMENEZ, A.; BARCELO, A.R.; SEVILLA, F. Antioxidant systems and O₂ / H₂O₂ production in the apoplast of pea leaves. Its relation with salt-induced necrotic lesions in minor veins. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 127, p. 827-831, 2001.

MANORAKIZA P. et al. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roesse-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **J. Food Composit. Anal.** 14(1):93-100.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas**. FEALQ, Piracicaba, 2005, 495p.

OLIVEIRA, M. B. et al. Épocas de colheita e qualidade fisiológica de sementes de crambe. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 4, p. 1785-1792, jul./ago. 2014

OLIVEIRA, F. E. et al. Degradation of reserves of crambe seed (*Crambe abyssinica*) during germination. **African Journal of Agricultural Research**. Vol. 11(11), pp. 920-924, 17 March, 2016.

PAMPLONA, R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777 (2008) 1249 – 1262.

SAATH, R. et al. Activity of some isoenzymatic systems in stored coffee grains. **Ciênc. Agrotec.**, Lavras, v.38, n. 1, p.15-24, jan./fev., 2014

SILVA, M. A. P. et al. Qualidade do óleo bruto de grãos de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) sob diferentes métodos de secagem. **Energ.Agric.**, Botucatu, vol. 28, n.3, p.193-199, julho-setembro, 2013.

SILVA, M. A. P. et al . Seed quality of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) submitted to different drying methods. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza , v. 47, n. 2, p. 358-365, June 2016 .

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, **Maryland Heights**, v. 327, p. 649-662, 2004.

TAIZ E ZEIGER. **Fisiologia Vegetal**. 5. Ed. Porto Alegre. 2013. Artmed.

Tabela 1. Conteúdo de albumina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento (DAF – dias após a floração) e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.

DAF	Secagem			
	Testemunha*	Natural	30 °C	80 °C
7	9,61 aB	5,29 aB	6,51 aB	2,01 aA
14	11,16 aC	6,44 abcB	6,67 aB	2,81 aA
21	12,41 aB	8,91 abcA	6,97 aA	3,77 aA
28	12,57 aB	10,77 bcA	7,79 abA	5,25 aA
35	13,73 aA	13,14 cA	20,59 bB	14,18 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*A testemunha refere-se as sementes que não foram submetidos à secagem.

Tabela 2. Conteúdo de globulina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento (DAF – dias após a floração) e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.

DAF	Secagem			
	Testemunha*	Natural	30 °C	80 °C
7	8,05 bcB	8,22 cB	6,28 abB	1,72 aA
14	6,14 abB	6,43 bcB	5,83 abB	3,04 aA
21	8,33 bcB	4,98 abA	7,23 bB	3,99 abA
28	9,93 cB	4,01 aA	4,37 aA	3,79 abA
35	4,29 aA	5,30 abA	6,27 abA	5,99 bA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*A testemunha refere-se as sementes que não foram submetidos à secagem.

Tabela 3. Conteúdo de prolamina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento (DAF – dias após a floração) e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.

DAF	Secagem			
	Testemunha*	Natural	30 °C	80 °C
7	0,88 aA	1,45 aA	1,42 aA	0,99 aA
14	0,95 aA	2,31 bB	2,43 bB	1,35 abA
21	1,05 aA	2,73 bcC	2,98 bcC	1,97 bcB
28	1,86 bA	3,18 cB	3,41 cB	2,22 cA
35	2,14 bA	3,35 cB	3,3 CB	2,46 cA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*A testemunha refere-se as sementes que não foram submetidos à secagem.

Tabela 4. Conteúdo de glutelina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento (DAF – dias após a floração) e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.

DAF	Secagem			
	Testemunha*	Natural	30 °C	80 °C
7	9,29 aA	14,01 bB	12,57 aB	6,84 aA
14	12,62 bB	12,28 abB	11,69 aB	8,25 aA
21	10,99 abB	11,73 abB	12,63 aB	6,59 aA
28	10,89 abB	9,74 aB	10,96 aB	6,80 aA
35	9,14 aAB	10,90 aB	10,48 aB	7,06 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*A testemunha refere-se as sementes que não foram submetidos à secagem.

Tabela 5. Conteúdo de açúcares solúveis totais ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento (DAF – dias após a floração) e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.

DAF	Secagem			
	Testemunha*	Natural	30 °C	80 °C
7	46,68 aA	293,83 cB	286,26 bB	371,04 cB
14	51,54 aA	230,72 bC	132,13 aB	310,11 cB
21	75,20 aA	115,78 aA	113,23 aA	192,73 bB
28	44,29 aA	110,18 aAB	84,69 aAB	147,01 abB
35	65,36 aA	82,11 aA	76,23 aA	71,64 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*A testemunha refere-se as sementes que não foram submetidos à secagem.

Tabela 6. Conteúdo de lipídeos totais ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento (DAF – dias após a floração) e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.

DAF	Secagem			
	Testemunha*	Natural	30 °C	80 °C
7	5,16 aA	4,87 aB	4,37 aB	1,07 aB
14	2,27 bB	7,46 bC	9,21 bA	5,44 bB
21	9,17 cA	9,01 bB	13,83 cA	9,22 cA
28	20,03 dA	20,28 cB	20,45 dB	16,43 dB
35	25,95 eA	26,81 dB	27,19 eB	22,65 dB

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*A testemunha refere-se as sementes que não foram submetidos à secagem.

Tabela 7. Atividade específica da enzima peroxidase – POD (umol/min/ mg proteína) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento (DAF – dias após a floração) e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.

DAF	Secagem			
	Testemunha*	Natural	30 °C	80 °C
7	2,46 aA	4,43 aA	18,73 aA	73,25 cB
14	3,27 aA	3,92 aA	4,22 aA	36,24 bB
21	4,89 aA	3,46 aA	6,69 aA	14,28 abA
28	4,15 aA	5,95 aA	5,89 aA	7,08 aA
35	3,38 aA	5,32 aA	4,4 aA	8,64 abA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*A testemunha refere-se as sementes que não foram submetidos à secagem.

Tabela 8. Atividade específica da enzima catalase – CAT (mKat µg proteína) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento (DAF – dias após a floração) e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.

DAF	Secagem			
	Testemunha*	Natural	30 °C	80 °C
7	0,32 aA	0,95 aA	0,35 aA	5,83 bB
14	0,24 aA	1,01 aAB	0,40 aA	3,52 abB
21	0,55 aA	1,63 abA	1,15 aA	4,43 abB
28	0,64 aA	2,73 abB	2,01 aAB	2,69 aAB
35	3,08 aA	2,56 bA	2,14 aA	4,48 abA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*A testemunha refere-se as sementes que não foram submetidos à secagem.

Tabela 9. Quantificação dos teores de lipoperóxidos (nmol/g massa fresca) em sementes de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] durante o desenvolvimento (DAF – dias após a floração) e submetidos a diferentes métodos de secagem. Botucatu - SP. 2014.

DAF	Secagem			
	Testemunha*	Natural	30 °C	80 °C
1	6,3 abA	5,79 aA	6,97 aA	12,74 bB
14	7,82 bB	6,21 aA	6,15 aA	6,90 aB
21	5,52 aA	5,70 aA	5,86 aA	6,23 aA
28	5,61 aA	6,39 aAB	6,21 aAB	7,26 aB
35	6,85 abA	6,89 aA	6,67 aA	7,7 abA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na vertical e maiúscula na horizontal não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

*A testemunha refere-se as sementes que não foram submetidos à secagem.

Capítulo IV: **ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]: SISTEMAS ANTIOXIDANTES, PIGMENTAÇÃO E METABOLISMO DE RESERVAS⁶**

⁶ Artigo escrito nas normas do Periódico: Revista Brasileira de Engenharia Agrícola

ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]: SISTEMAS ANTIOXIDANTES, PIGMENTAÇÃO E METABOLISMO DE RESERVAS

Magnun Antonio Penariol da Silva^{1*}, Marco Antonio Martin Biaggioni¹ e Gisela Ferreira²

¹Departamento de Engenharia Rural. Faculdade de Ciências Agronômicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu – SP. Rua Dr. José Barbosa de Barros, 1780 - Portaria 1, Botucatu - SP, 18610-307.

²Departamento de Botânica. Instituto de Biociências de Botucatu. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Botucatu – SP. Distrito de Rubião Junior, s/n, Botucatu - SP, 18618-970.

*Autor para correspondência: penariol@gmail.com

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar se o período de armazenamento altera a degradação de reservas, a variação da pigmentação e a atividade enzimáticas de sementes de crambe armazenados ao longo de 12 meses. As sementes de crambe foram colhidos com 10,2 % de teor de água e armazenados em sacos de papel em condições laboratoriais. As análises das reservas, pigmentação e sistemas antioxidantes foram realizadas assim que as sementes foram colhidos (tempo 0) e aos 4, 8 e 12 meses de armazenamento. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A quantidade de lipídeos não variou significativamente, ao longo dos 12 meses de armazenamento. Não houve efeito do tempo de armazenamento no sistema antioxidante. No entanto, levando em consideração o aumento da pigmentação e a degradação dos açúcares solúveis totais, conclui-se que as sementes de crambe podem ser armazenadas por até 6 meses após a colheita.

INTRODUÇÃO

O crambe é uma espécie oleaginosa que têm sido estudada no Brasil devido ao potencial para produção de biodiesel, por ser uma espécie resistente à seca, tolerante à geadas quando estabelecida, e que apresenta em torno de 30% de proporção lipídica em seus grãos no final do ciclo de desenvolvimento (Oliva et al., 2014; Silva et al., 2016).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de produtos agrícolas, no entanto muito têm se investido em aumento da produção dentro da propriedade rural, e pouco se investindo no setor de pós-colheita de grãos (secagem, beneficiamento, armazenamento e transporte) (Silva et al., 2013).

Alguns autores como Bessa et al. (2015), Bezerra et al. (2015) estudaram o armazenamento de grãos de crambe, no entanto, a ação de enzimas durante este período ainda não foi estudada. A deterioração dos grãos durante o armazenamento pode apresentar aspectos visuais e então ser mensurada através da análise dos pigmentos dos grãos, e ainda, pela perda das reservas dos grãos, como açúcares e lipídeos.

Em um estudo com sementes de crambe, Bessa et al. (2015) avaliaram o efeito de diferentes embalagens, ambientes e tempos de armazenamento. Os autores concluíram que houve maior preservação das características bioquímicas quando as sementes foram armazenadas em ambiente refrigerado, independente da embalagem utilizada por até 9 meses de período de armazenamento.

Bezerra et al. (2015) afirmam que grãos de crambe armazenados em embalagem hermética mantêm a qualidade química, do óleo extraído quando os grãos são armazenados por até 12 meses.

Bessa et al. (2015b) avaliando a qualidade fisiológica de sementes de crambe em diferentes condições de armazenamento concluíram que a embalagem politereftalato de etileno mantêm a qualidade fisiológica das sementes de crambe e preserva o vigor quando armazenadas em condições naturais, durante seis meses de armazenamento, e que o ambiente refrigerado a 10 °C não é recomendado para o armazenamento das sementes de crambe.

Com a utilização de sementes de crambe para produção de biodiesel, necessita-se de óleo de coloração clara e o elevado índice de pigmentos pode encarecer o refinamento do óleo para uso industrial (Silva, 2013).

Com as evidências de que o período de armazenamento pode afetar características químicas, físicas e fisiológicas de sementes de crambe, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a degradação de reservas, a variação da pigmentação e a atividade enzimáticas de sementes de crambe armazenados durante 12 meses.

MATERIAL E MÉTODOS

Instalação do experimento

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências Agrônômicas – FCA, Câmpus de Botucatu/SP. O experimento foi instalado na Fazenda Experimental Lageado.

O município de Botucatu encontra-se em um local com coordenadas geográficas Latitude - 22° 52' 20" S Longitude - 48° 26' 37" W Greenwich, altitude média de 770 metros, declividade média de 4,5% e clima subtropical, com verões quentes e úmidos e invernos frios e secos.

Foram utilizadas para a semeadura, sementes de crambe da cultivar FMS Brilhante, na proporção de 1 g m⁻¹. A semeadura foi realizada no dia 16 de maio de 2014, a emergência em campo ocorreu no dia 26 de maio de a floração no dia 15 de julho. A adubação foi realizada com 300 Kg ha⁻¹ de NPK (08-28-16). As sementes foram tratadas com o fungicida Carboxin (200 g L⁻¹) + Tiram (200 g L⁻¹), o espaçamento entre linhas utilizado foi de 0,45 cm, e a semeadura realizada com uma semeadora-adubadora de fluxo contínuo (Semeato SHM).

As sementes de crambe foram colhidas com 10,2 % de teor de água e armazenados em sacos de papel, acondicionados em condições laboratoriais. As análises foram realizadas assim que os grãos foram colhidos (tempo 0) e aos 4, 8 e 12 meses de armazenamento.

Análises bioquímicas

Pigmentos

O teor de clorofila (a e b), de antocianinas e de carotenoides nas sementes de crambe foi avaliado conforme a metodologia descrita por Sims & Gamon (2002). O preparo ocorreu pesando-se entre 0,020 e 0,05g de sementes, macerados em nitrogênio líquido, e adicionando-se solução de acetona a 80% (80% de acetona e 20% de solução tamponada Tris). As amostras então foram mantidas em freezer por uma hora. Posteriormente, as amostras foram colocadas em centrífuga refrigerada (4°C) por 5 minutos, e realizada a leitura em espectrofotômetro nos seguintes comprimentos de onda: Clorofila a = 663 nm e Clorofila b = 647 nm.

O teor de clorofila foi determinado pela equação:

$$\text{Clorofila a} = 0,01273 * (A663) - 0,000897 * (A537) - 0,003046 * (A647)$$

$$\text{Clorofila b} = 0,02405 * (A647) - 0,004305 * (A537) - 0,005507 * (A663)$$

A estimativa de carotenoides totais foi feita a partir dos mesmos extratos usados para as clorofilas, utilizando a equação de Lichtenthaler & Wellburn (1983):

$$\text{carotenoides } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = (1000A_{470} - 3,27 \text{ cl a} - 104 \text{ cl b})/229.$$

As concentrações de antocianina foram calculadas de acordo com as equações de MURRAY & HACKETT (1991) com correção do efeito da clorofila (AA) por meio da subtração de 24% da absorbância do comprimento de onda máximo da clorofila (A653):

$$\text{Antocianinas } (\mu\text{g. mL}^{-1}) = A_{532} - 0,24 A_{653}.$$

Em que,

A= Valor de leitura no espectrofotômetro.

Atividade da Peroxidase (PODs, EC 1.11.1.7)

A determinação da atividade da enzima peroxidase foi realizada de acordo com o método de Allain et al. (1974) modificado por Lima et al. (1999). O material finamente moído foi pesado (aproximadamente, 0,5 g) e colocado em tubos de ensaio onde foi adicionado 5 mL de solução tampão de fosfato de potássio (0,1 M pH 6,7). Os tubos foram levados à centrífuga refrigerada a 5°C por 10 minutos à velocidade de 8.000 rpm. O sobrenadante foi retirado e armazenado em vidros com tampas. O sistema de reação foi obtido adicionando-se 500 µL do extrato enzimático (amostra), 500 µL de solução de diclorofenol com aminoantipirina (163 mg de diclorofenol + 81,3 mg de aminoantipirina em 100 mL de água destilada) e 500 µL de uma solução de H₂O₂ a 30%. Os tubos contendo o sistema de reação foram mantidos em banho-maria a 30°C por 5 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de 2 mL de etanol absoluto e a leitura foi efetuada imediatamente, em espectrofotômetro a 505 nm. A atividade específica da peroxidase foi quantificada em µmol de H₂O₂ decomposta min⁻¹ g⁻¹ de matéria fresca.

Atividade da Superóxido Dismutase (SOD, EC 1.15.1.1)

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Beauchamp & Fridovich (1973), onde a produção de formazana azul, resultante da foto-redução do NBT (absorbância a 560 nm). Os resultados foram definidos como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a foto-redução do NBT.

Atividade da Catalase (CAT, EC 1.11.1.6)

A atividade da catalase foi determinada de acordo com metodologia proposta por Peixoto et al. (1999). O sistema de reação foi composto por 100 μL de extrato enzimático e 1900 μL de solução tampão fosfato de potássio (50 mmol L^{-1} , pH 7,0) suplementado com peróxido de hidrogênio (H_2O_2 , 12,5 mmol L^{-1}), totalizando um volume final de 2000 μL . A reação foi conduzida à temperatura ambiente por 80 segundos. As leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 240 nm aos 0 e 80 segundos, a fim de verificar quanto ocorreu decréscimo na absorbância. Para calcular a atividade específica da enzima, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do H_2O_2 (39,4 $\text{mmol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) e a atividade foi expressa em $\text{nmol de H}_2\text{O}_2 \text{ consumido min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$.

Quantificação dos teores de lipoperoxídeos

A peroxidação de lipídeos foi determinada de acordo com a metodologia de Heath e Packer (1968) citado por Rama e Prasad (1998). As amostras foram homogeneizadas em 5 mL de solução contendo ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,25% e ácido tiocloroacético (TCA) 10% e incubadas em banho-maria a 90°C por 1h. Após resfriamento, o homogeneizado foi centrifugado a 10.000 x g por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante coletado de cada amostra foi submetido a leituras de absorbância em espectrofotômetro UV-visível a 560 e 600 nm. Para os cálculos, foi utilizado o coeficiente de extinção molar do malondialdeído (155 $\text{mmol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\text{nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).g}^{-1}$ de matéria fresca.

Teor de lipídeos

A quantificação de lipídeos totais foi realizada de acordo com o método de Manirakiza et al. (2001) e Ambalkar et al. (2011). Para a obtenção do extrato foi pesado cerca de 1,0 a 2,0 gramas de amostra maceradas em nitrogênio líquido. Nestas amostras foi adicionado 100mL de hexano, dispostos em balões de fundo chato e colocado no extrato de material graxo em 3 ciclos de 8 horas. Posteriormente, o material foi filtrado, ainda quente, e levado para um evaporador rotativo para separação do solvente e lipídeos.

Os lipídeos foram retirados dos balões com ajuda de uma pipeta de Pasteur e transferidos para recipientes de vidro com tampa, pesados e etiquetados.

Açúcares solúveis totais

Para a extração dos carboidratos solúveis foram utilizados 100mg de amostra por replicata. No caso da amostra fresca foi realizado um cálculo para a relação da quantidade de massa fresca e de massa seca das amostras, para que os dados possam ser expressos em mg de açúcar por grama de amostra seca.

Para a inativação do material adicionou-se etanol a 70% a 100 mg de amostra e em seguida submete o material a extração tripla à fervura em etanol por 5 minutos, tempo suficiente para inativar as enzimas que poderiam degradar os carboidratos (DURDA et al., 2007).

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, consistindo em 4 períodos de armazenamento (0, 4, 8 e 12 meses), com cinco repetições. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 são apresentados os valores médios das atividades específicas das enzimas superóxido dismutase, peroxidase, catalase e a quantificação dos teores de lipoperóxidos. Verifica-se que não houve diferença estatística entre os tratamentos para a atividade das enzimas superóxido dismutase, peroxidase, catalase e, também, na quantificação dos teores de lipoperóxidos.

A atividade α das enzimas superóxido dismutase e peroxidase também não se diferiu em lotes de sementes de crambe submetidas ao envelhecimento acelerado, teste este que pode ser utilizado para simular períodos de armazenamento. Toledo et al. (2011) avaliaram a influência das temperaturas (38, 40 e 48°C) no teste de envelhecimento acelerado com períodos de exposição de 28, 48 e 72 h em dois lotes de sementes de crambe, e não verificaram diferença estatística significativa entre os tratamentos quando determinaram a atividade específica das enzimas superóxido dismutase e peroxidase.

Tabela 1. Atividade específica das enzimas superóxido dismutase – SOD (U mg prot), peroxidase – POD (umol/min/ mg proteína), catalase – CAT (mKat µg proteína) e quantificação dos teores de lipoperóxidos (nmol/g massa fresca) em grãos de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] armazenados ao longo de 0, 4, 8 e 12 meses.

Meses	Sistemas antioxidantes			
	SOD	POD	CAT	Lipoperóxidos
0	739170,78 a	2,89 a	2,94 a	5,05 a
4	757253,64 a	4,23 a	3,15 a	5,08 a
8	870964,28 a	2,34 a	1,31 a	5,86 a
12	873689,42 a	1,93 a	1,50 a	4,94 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Armazenando sementes de crambe em condições criogênicas, Matos et al. (2014) também não encontraram variação na atividade enzimática da peroxidase e da superóxido dismutase.

Em grãos de café (*Coffea arabica* L.) secos em terreiro, à temperatura de 40 °C, à temperatura de 60 °C, e em temperaturas alternadas de 40/60 °C, armazenados ao longo de 12 meses, Saath et al. (2014) analisaram as atividades específicas das enzimas, peroxidase, superóxido dismutase e catalase, e verificaram aumento da atividade específica dessas enzimas, que estão associadas a deterioração dos grãos durante o armazenamento.

Avaliando a influência do tempo de armazenamento (0, 60, 120 e 180 dias) em sementes de araticum de terra-fria (*Annona emarginata*) colhidas com 5, 10, 15, 20 e 59% de teor de água, Corsato (2014) quantificou os teores de lipoperóxidos das sementes e a atividade específica das enzimas peroxidase e superóxido dismutase. A autora observou que para estas análises existiu maior influência do teor de água do que do tempo de armazenamento das sementes, no entanto, maiores atividades enzimáticas e maior quantificação dos teores de lipoperóxidos foram observadas aos 180 dias de armazenamento.

Na tabela 2 são apresentados os valores médios de clorofila *a*, clorofila *b*, antocianinas e carotenoides.

Tabela 2. Valores médios de clorofila *a* ($\mu\text{g g}^{-1}$), clorofila *b* ($\mu\text{g g}^{-1}$) antocianinas ($\mu\text{g g}^{-1}$) e carotenoides ($\mu\text{g g}^{-1}$) em grãos de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] armazenados ao longo de 0, 4, 8 e 12 meses.

Meses	Pigmentos			
	Clorofila <i>a</i>	Clorofila <i>b</i>	Antocianinas	Carotenoides
0	0,85 a	1,85 a	10,51 a	6,21 a
4	22,91 b	4,96 a	37,18 a	11,9 a
8	194,67 c	25,42 b	383, 25 b	94,24 b
12	239,21 d	91,67 c	850, 07 c	104,85 b

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

De acordo com a tabela 2, a quantidade das clorofilas *a* e *b*, antocianinas e carotenoides aumentaram significativamente ao longo do armazenamento.

Para a indústria não é desejável retenção de pigmentos em óleos (Teixeira, 2010; Teixeira, 2014). Fukushima e Lanfer-Marquez (2000) afirmam que a retenção de pigmentos encarece o refino do óleo também na indústria de alimentos.

Os grãos de crambe podem escurecer durante o armazenamento, o que justifica o aumento dos valores de pigmentação aos 12 meses de armazenamento, como foi observado por Bezerra (2014), que ao armazenar grãos de crambe, verificou um escurecimento gradativo dos grãos, o qual foi maior aos 12 meses de armazenamento.

Na tabela 3 são apresentados os valores médios de açúcares solúveis totais e da quantidade de lipídeos.

Tabela 3. Conteúdo de açúcares solúveis totais ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) e lipídeos ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) em grãos de crambe [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA] armazenados ao longo de 0, 4, 8 e 12 meses.

Meses	Reservas	
	Açúcares	Lipídeos
0	70,98 c	28,25 a
4	68,68 c	28,02 a
8	32,30 b	27,33 a
12	18,26 a	27,28 a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Verifica-se, pela tabela 3, que houve degradação dos açúcares solúveis totais ao longo dos 12 meses de armazenamento, sendo que no início do período de armazenagem os grãos apresentavam 70,98 mg g massa seca⁻¹ e esse valor foi diminuindo no decorrer do tempo, chegando a 18,26 mg g massa seca⁻¹ no final do período de armazenamento.

De acordo com Marcos-Filho (2005), sementes de espécies oleaginosas podem degradar reservas durante o armazenamento.

No entanto, Silva et al (2013) observaram que sementes de crambe armazenadas em crioconservação mantêm o conteúdo de açúcares solúveis totais. Mas quando utilizados comercialmente, como grãos, a crioconservação inviabiliza economicamente o armazenamento.

Em relação aos lipídeos, observa-se pela tabela 3 que não houve diferença estatística entre os tratamentos. No entanto, as condições de armazenamento podem influenciar na degradação dos lipídeos, como foi observado em sementes de crambe por Bessa et al. (2015) Bezerra (2014).

CONCLUSÃO

Nas condições em que foram realizadas este experimento, pode-se concluir que a quantidade de lipídeos não variou significativamente, ao longo dos 12 meses armazenamento, como também não houve efeito significativo do período de armazenamento no sistema antioxidante. No entanto, levando em consideração o aumento da pigmentação e a degradação dos açúcares solúveis totais, sugere-se o armazenamento dos grãos de crambe até 6 meses após a colheita.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBALKAR, V.U. et al. Soxhlet extraction of Neem seed (*Azadirachta indica* A. Juss) using hexane as a solvent. *Int. J. Chem. Anal. Sci.* 2:2.2011.

BESSA, Jaqueline F. V. et al . Armazenamento do crambe em diferentes embalagens e ambientes: Parte I - Qualidade fisiológica. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, Campina Grande , v. 19, n. 3, p. 224-230, Mar. 2015 .

BESSA, Jaqueline F. V. et al . Armazenamento do crambe em diferentes embalagens e ambientes: Parte II - Qualidade química. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, Campina Grande , v. 19, n. 3, p. 224-230, Mar. 2015 b.

BEZERRA, P.H.S. Efeito do armazenamento na qualidade dos grãos e do óleo de crambe para produção de biodiesel. **Dissertação**. Mestrado em Agronomia (Energia na Agricultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas. UNESP. Botucatu. 2014.

BEZERRA, P. H. S. et al. Efeito do armazenamento na qualidade dos grãos e do óleo de crambe para produção de biodiesel. **Energ. Agric.**, Botucatu, vol. 30, n.3, p.310-318, julho-setembro, 2015.

BEAUCHAMP, C.O. & FRIDOVICH, I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 317, p.50-64, 1973.

FUKUSHIMA, P.S.; LANFER-MARQUEZ, U.M. Chlorophyll derivatives of soybean during maturation and drying conditions. In: INTERNATIONAL SOYBEAN PROCESSING AND UTILIZATION CONFERENCE, 3., 2000, **Tukuba**. Proceedings .Tukuba: Korin, 2000. p.87-88.

LIMA, G. P. P. et al .Poliaminas e atividade da peroxidase em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado sobre estresse salino. **Scientia Agrícola** , v. 56, n. 1, 1999.

MANORAKIZA P. et al..Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. **J. Food Composit. Anal.**14(1):93-100.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas** .FEALQ, Piracicaba, 2005, 495p.

PEIXOTO, H. P. P. et al.Aluminium effects on lipid peroxidation and the activities of enzymes of oxidative metabolism in sorghum. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Londrina, v. 11, n. 3, p. 137-143, 1999.

RAMA DEVI, S.; PRASAD, M. N. V. Copper toxicity in *Ceratophyllum demersum* L.(Coontail), a free floating macrophyte: Response of antioxidant enzymes and antioxidants. **Plant Science**, v. 138, n. 2, p. 157-165, 1998.

SAATH, R. et al. Activity of some isoenzymatic systems in stored coffee grains. **Ciênc. Agrotec.**,Lavras, v.38, n. 1, p.15-24, jan./fev., 2014

SILVA, M. A. P., BIAGGIONI, M. A. M., SPEROTTO, F. C. S., BEZERRA, P. H. S., BRANDÃO, F. J. B. Qualidade do óleo bruto de grãos de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) sob diferentes métodos de secagem. **Energ.Agric.**,Botucatu, vol. 28, n.3, p.193-199, julho-setembro, 2013.

SILVA, M. A. P. et al . Seed quality of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) submitted to different drying methods. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza , v. 47, n. 2, p. 358-365, June 2016 .

SILVA, M. A. P. et al. Effect of drying methods on crambe (*Crambe abyssinica* HOCHST) seed coat pigmentation and oil and biodiesel quality. **Rev. Eng. Agric.** vol.36, nº. 6, nov./dez. 2016 b.

SIMS, D.A. & GAMON, J.A. Relationships between leaf pigment content and spectral reflectance across a wide range of species, leaf structures and developmental stages. **Remote Sensing of Environment**, v.31, n.3, p.37-354, ago. 2002.

TEIXEIRA, R. N. Teor de clorofila, danos oxidativos e qualidade fisiológica de sementes de soja. **Dissertação**. Mestrado em Agronomia (Agricultura). Faculdade de Ciências Agronômicas. UNESP. Botucatu. 2010.

TEIXEIRA, R. N. Retenção de clorofila em sementes de soja (*Glycine Max.* (L.) Merr.): estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares. **Tese**. Doutorado em Agronomia (Agricultura). Faculdade de Ciências Agronômicas. UNESP. Botucatu. 2014.

TOLEDO, M. Z. et al. Physiological quality and enzymatic activity of crambe seeds after the accelerated aging test. **Acta Scientiarum. Agronomy**. Maringá, v. 33, n. 4, p. 687-694, 2011

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Durante a execução dos experimentos várias características foram observadas.

Com 49 dias após a floração os grãos de crambe atingiram 10% de teor de água em média, o que seria um teor de água ideal para a colheita mecanizada. No entanto nem todos os grãos estavam com o mesmo teor de água, por se tratar de valores médios, e foi observado muitos grãos que haviam se desligado da planta e foram encontrados no campo, o que ocasionaria perda quantitativa para o produtor rural.

Diferente da maioria das sementes de espécies de interesse agrônomo, que tem o conteúdo de açúcares solúveis totais durante o desenvolvimento aumentado, como afirma Marcos-Filho (2005), neste experimento os grãos de crambe tiveram degradação desta substância. Seria interessante então, em um próximo trabalho o estudo do perfil dos açúcares solúveis, para verificação se isso ocorre na totalidade dos açúcares solúveis, ou apenas com um açúcar específico.

Em relação à secagem, quando submetidos à 80 °C de temperatura de secagem, os grãos sofreram perdas qualitativas refletidas na qualidade do óleo bruto extraído. Já a secagem à 30 °C se mostrou uma boa opção para o produtor que deseja ter um método rápido para a secagem de grãos sem, contudo, ocasionar danos que possam resultar em perdas qualitativas do óleo bruto extraído.

A partir de 6 meses de armazenamento, os grãos de crambe apresentaram aumento significativo na pigmentação, o que sugere um escurecimento dos grãos, que pode ser prejudicial durante o refinamento do óleo bruto, como relatado por Teixeira (2010) e Bezerra et al. (2015).

Em próximos trabalhos, pode-se ser interessante a verificação das proteínas resistentes ao calor durante e perda de água e secagem desses grãos. A análise ultra estrutural dos grãos durante sua formação. Acompanhar através de análises anatômicas ou por meio de análises de raio-X a formação dos grãos durante o desenvolvimento e relacioná-las com a atividade enzimática e acúmulo de reservas.

Outra sugestão também é submeter esses grãos às condições adversas de temperatura, umidade relativa do ar e gases durante o armazenamento, para verificar se essas condições afetariam a atividade enzimática, pigmentação e o metabolismo de reserva dos grãos, pois foi observado por autores como Bessa et al. (2015 b), que características químicas são alteradas quando os grãos de crambe passam por tais condições durante o armazenamento.

5. CONCLUSÃO

Pelos resultados obtidos neste trabalho nas condições em que foram realizados os experimentos, chegou-se às seguintes conclusões:

1. Aos 49 dias após a floração os grãos de crambe apresentam a maior quantidade e qualidade adequada de lipídeos para produção de biodiesel, com teor de água adequado para colheita mecanizada
2. As reservas dos grãos de crambe são acumuladas ao longo do desenvolvimento, com maior proporção de lipídeos, seguido de açúcares e proteínas, e que a secagem em alta temperatura ocasiona danos oxidativos nos grãos.
3. A quantidade de lipídeos não variou significativamente, ao longo dos 12 meses armazenamento. No entanto, levando em consideração o aumento a pigmentação e a degradação dos açúcares solúveis totais, sugere-se o armazenamento dos grãos de crambe até 6 meses após a colheita.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BESSA, J. F. V. et al . Armazenamento do crambe em diferentes embalagens e ambientes: Parte I - Qualidade fisiológica. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, Campina Grande , v. 19, n. 3, p. 224-230, Mar. 2015 .

BESSA, J. F. V. et al . Armazenamento do crambe em diferentes embalagens e ambientes: Parte II - Qualidade química. **Rev. bras. eng. agríc. ambient.**, Campina Grande , v. 19, n. 3, p. 224-230, Mar. 2015 b.

BEZERRA, P.H.S. Efeito do armazenamento na qualidade dos grãos e do óleo de crambe para produção de biodiesel. **Dissertação**. Mestrado em Agronomia (Energia na Agricultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas. UNESP. Botucatu. 2014.

BEZERRA, P. H. S. et al. Efeito do armazenamento na qualidade dos grãos e do óleo de crambe para produção de biodiesel. **Energ. Agric.**, Botucatu, vol. 30, n.3, p.310-318, julho-setembro, 2015.

BRASIL. **Lei nº. 11.097**, de 13 de Janeiro de 2005. Dispõe sobre a criação do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e sobre a adição de biodiesel ao óleo diesel. Disponível em: www.anp.gov.br. Acesso em 02/09/12.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. **Balanco Energético Nacional**. 2012.

DONADON, J. R. et al. Effect of Hot Air Drying on Ultrastructure of Crambe Seeds. **Drying Technology**, v. 31, p. 269-276, 2013.

JASPER, S. P. **Cultura do crambe (*Crambe abyssinica Hochst*): Avaliação energética, de custo de produção e produtividade em sistema de plantio direto**. 2009. 103 f. Tese (Doutorado em Agronomia/Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

FUNDAÇÃO MATO GROSSO DO SUL. **Crambe FMS Brilhante**. Maracajú, 2009. Disponível em: <<http://www.fundacaoms.org.br/page.php?34>>. Acesso em: 11 de outubro de 2011.

MARCOS FILHO, J. **Fisiologia de sementes de plantas cultivadas** .FEALQ, Piracicaba, 2005, 495p.

OLIVA, A. C. E. et al. Efeito imediato do método de secagem na qualidade de sementes de crambe. **Energia na Agricultura**, Botucatu, vol. 27, n.3, julho-setembro, 2012, p.16-30

SILVA, M. A. P. **Efeito do sistema de secagem de crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) na qualidade dos grãos e do óleo para produção de biodiesel**. Dissertação. Mestrado em Agronomia (Energia na Agricultura). 2013. 66 f. Faculdade de Ciências Agrônômicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, 2013.

SILVA, M. A. P. et al . Seed quality of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) submitted to different drying methods. **Rev. Ciênc. Agron.**, Fortaleza , v. 47, n. 2, p. 358-365, June 2016 .

SOUZA, A. D. V.; FÁVARO, S. P., ÍTAVO, L. C.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansão, nabo-forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 10, p. 1328 – 1335, 2009.

TEIXEIRA, R. N. Teor de clorofila, danos oxidativos e qualidade fisiológica de sementes de soja. **Dissertação**. Mestrado em Agronomia (Agricultura). Faculdade de Ciências Agrônômicas. UNESP. Botucatu. 2010.