



DOI: <http://dx.doi.org/10.17224/EnergAgric.2018v33n3p258-263>

ARMAZENAMENTO DE GRÃOS DE CRAMBE [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]: SISTEMAS ANTIOXIDANTES E QUANTIFICAÇÃO DE AÇÚCARES, LIPÍDEOS E PIGMENTOS**

Magnun Antonio Penariol da Silva^{1*}, Ana Cláudia Macedo², Fernando João Bispo Brandão³, Marco Antonio Martin Biaggioni⁴ e Gisela Ferreira⁵

RESUMO: O objetivo do presente trabalho foi avaliar a degradação de reservas, a variação da pigmentação e a atividade enzimáticas de grãos de crambe armazenados durante 12 meses. Os grãos de crambe foram colhidos 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. Após obtenção dos dados, os resultados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Conclui-se que 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.

PALAVRAS-CHAVE: clorofila, biodiesel, sementes oleaginosas.

STORAGE OF CRAMBE SEEDS COATS [*Crambe hyspanica* subesp. *abyssinica* (Hochst ex R.E.Fr) PRINA]: ANTIOXIDANTS SYSTEMS, PIGMENTATION AND RESERVES METABOLISM

ABSTRACT: The objective of the present work was to evaluate the degradation of reserves, the variation of the pigmentation and the enzymatic activity of crambe grains stored during 12 months. The crambe beans were harvested with 10.2% water content and stored in paper bags, conditioned under laboratory conditions. The analyzes were performed as soon as the grains were harvested (time 0) and at 4, 8 and 12 months storage. After obtaining the data, the results were submitted to analysis of variance and the means were compared by the Tukey test ($p \leq 0.05$). It was concluded that the amount of lipids did not vary significantly over the 12 months storage. However, taking into account the increased pigmentation and degradation of the total soluble sugars, it is suggested that the crambe grains be stored up to 6 months after harvesting.

KEYWORDS: chlorophyll, biodiesel, oilseeds.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do crambe têm se destacado devido seu potencial para produção de biodiesel, por apresentar significativa proporção lipídica em seus grãos, em torno de 30% (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).

Autores como Bessa et al (2015) e Bezerra et al. (2015) estudaram o armazenamento de grãos de crambe, no entanto, não se atentaram para a ação de enzimas durante este período. 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 as sementes armazenadas em embalagem laminada no ambiente natural apresentaram o maior teor de proteína bruta no 3º mês de armazenamento, e as em ambiente refrigerado obtiveram maiores índices de peróxido, nos 3º e 6º meses. Em ambiente refrigerado, as sementes em embalagens de PEAD denotaram menor acidez em álcool solúvel. Os teores de proteína bruta e de óleo diminuíram durante o armazenamento, o índice de peróxido e o pH aumentaram e o índice de iodo apresentou variação nos valores, já no fim do armazenamento os valores de acidez em álcool solúvel eram semelhantes aos do início. O índice de acidez não sofreu interferência dos tratamentos empregados.

¹Universidade Federal Rural da Amazônia, Campus Tomé-Açu.

²Stoller do Brasil.

³Instituto Federal de Mato Grosso – Campus Avançado de Diamantino.

⁴Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Departamento de Engenharia Rural.

⁵Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Departamento de Botânica.

*Autor para correspondência: penariol@gmail.com

**Extraído da tese de doutorado do primeiro autor.

Avaliando diferentes condições de armazenamento na qualidade dos grãos de crambe e no óleo extraído, Bezerra et al. (2015) acondicionaram os grãos em dois tipos de embalagens: mini-bolsas herméticas e sacaria de rafia e mantiveram-nas em três ambientes: 1 - Sala climatizada com umidade relativa constante (80%) e com alternância de temperatura (30°C por 16 horas e 25°C por 8 horas), reproduzindo uma condição de estresse por alta temperatura e elevada umidade relativa. 2 - Estufa agrícola, sem controle de ambiente, representando uma condição de “armazenagem a céu aberto” com estresse por alta temperatura e elevada insolação. 3 - Sala não climatizada, sem controle de ambiente, simulando uma condição de “armazém convencional”. Os autores concluíram que houve efeito da embalagem hermética na qualidade dos grãos armazenados. O tempo de 12 meses de armazenamento apresentou níveis inseguros de qualidade para os grãos de crambe, independente da embalagem e do ambiente. Os grãos, quando submetidos ao armazenamento em câmara climatizada apresentaram evidências de deterioração em todos os quesitos avaliativos quando armazenados em bolsa hermética e sacaria convencional. Os grãos quando armazenados em bolsa hermética, demonstram melhor eficiência na manutenção de sua qualidade para produção de biodiesel, de acordo com as análises de índice de iodo e acidez realizadas no óleo bruto.

Bessa et al. (2015b) avaliando a qualidade fisiológica de sementes de crambe em diferentes condições de armazenamento: embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD), garrafas reutilizadas de polietileno tereftalato (PET) e embalagens laminadas, armazenadas nas seguintes condições: refrigerado a $10 \pm 1,19$ °C e $34,84 \pm 4,09\%$ de umidade relativa (UR) e natural a $24,81 \pm 1,82$ °C e $54,93 \pm 12,77\%$ de umidade relativa (AN), concluíram que: ambiente natural e a embalagem PET 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.

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

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 INSTALAÇÃO DO EXPERIMENTO

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Faculdade de Ciências Agrônomicas – 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 sementeira, sementes de crambe da cultivar FMS Brilhante, na proporção de 1 g m⁻¹. A sementeira foi realizada no dia 16 de maio de 2014, a emergência em campo ocorreu no dia 26 de maio de 2014 e 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 sementeira realizada com uma sementeira-adubadora de fluxo contínuo (Semeato SHM).

Os grãos de crambe foram colhidos 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.

2.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

2.2.1 PIGMENTOS

O teor de clorofila (a e b), de antocianinas e de carotenoides nos grãos de crambe foi avaliado conforme a metodologia descrita por Sims e Gamon (2002). O preparo ocorreu pesando-se entre 0,020 e 0,05g de grãos, 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 e Wellburn (1983):

$$\text{carotenoides } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = (1000A470 - 3,27 \text{ cl a} - 104 \text{ cl b})/229.$$

As concentrações de antocianina foram calculadas de acordo com as equações de Murray e 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):

$$\text{Antocianinas } (\mu\text{g. mL}^{-1}) = A532 - 0,24 A653.$$

Em que,

A= Valor de leitura no espectrofotômetro.

2.2.2 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.

2.2.3 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD, EC 1.15.1.1)

A análise foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico de Beuchamp e 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.

2.2.4 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.

2.2.5 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 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 mmol.L⁻¹.cm) e os resultados foram expressos em nmol de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).g⁻¹ de matéria fresca.

2.2.6 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.

2.2.7 AÇÚCARES SOLÚVEIS TOTAIS

Para a extração dos carboidratos solúveis foram utilizados 100mg de amostra por 3 replicatas. 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).

2.3 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, totalizando 20 parcelas. Os resultados foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey (p≤0,05).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios da atividade específica das enzimas superóxido dismutase, peroxidase, catalase e a quantificação dos teores de lipoperóxidos são apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Valores médios da 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 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 por letras iguais não diferem entre si segundo o Teste de Tukey (p>0,05)

Verifica-se pela tabela 1 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 das enzimas superóxido dismutase e peroxidase também não se diferiu em lotes de sementes de crambe submetidas ao envelhecimento acelerado. 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. Em muitos casos, o teste de envelhecimento acelerado é utilizado para simular condições de armazenamento, ao verificar o vigor de sementes.

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. O autor 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.

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

Com a utilização de grãos 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).

Outros autores como Teixeira (2010) e Teixeira (2014) afirmam que, para indústria, não é desejado retenção de pigmentos em óleos. 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.

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).

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 armazenados ao longo de 0, 4, 8 e 12 meses.

Meses	Pigmentos			
	Clorofila a	Clorofila b	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 por letras iguais não diferem entre si segundo o Teste de Tukey ($p>0,05$)

Tabela 3 - Valores médios de açúcares solúveis totais ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) e lipídeos ($\text{mg g massa seca}^{-1}$) em grãos de crambe 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 por letras iguais não diferem entre si segundo o Teste de Tukey ($p>0,05$)

4 CONCLUSÕES

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. 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.

5 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento de bolsas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento de bolsa de Doutorado-Sanduiche.

6 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.*, Cidade, v. 2, n. 2, p. ,

2011. escrever o nome da revista por extenso / escrever todos os autores

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. escrever o nome da revista por extenso / escrever todos os autores

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. 2015b. Inserir todos os autores / escrever o nome da revista por extenso

BEZERRA, P. H. S. **Efeito do armazenamento na qualidade dos grãos e do óleo de crambe para produção de biodiesel**. 2014. Número de páginas. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônomicas, UNESP, Botucatu. Escrever o nome da universidade por extenso

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, v. 30, n. 3, p. 310-318, jul./set. 2015. Inserir todos os autores / escrever o nome da revista por extenso

BEAUCHAMP, C. O.; FRIDOVICH, I. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ. **Biochemica Et Biophysica Acta**, Cidade, 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**, Cidade, v. 56, n. 1, p. , 1999. Inserir todos os autores

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.**, Cidade, v. 14, n. 1, p. 93-100, ano. Inserir todos os autores / escrever o nome da revista por extenso

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

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. Inserir todos os autores

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**, Cidade, 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. Inserir todos os autores

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, v. 28, n. 3, p. 193-199, jul./set. 2013. escrever o nome da revista por extenso

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 2016a. Inserir todos os autores / escrever o nome da revista por extenso

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.**, Cidade, v. 36, n. 6, nov./dez. 2016b. Inserir todos os autores / escrever o nome da revista por extenso

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**, Cidade, v. 31, n. 3, p. 37-354, ago. 2002.

TEIXEIRA, R. N. **Teor de clorofila, danos oxidativos e qualidade fisiológica de sementes de soja**. 2010. Número de páginas. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu. Escrever o nome da universidade por extenso

TEIXEIRA, R. N. **Retenção de clorofila em sementes de soja (*Glycine Max. (L.) Merr.*): estudos fisiológicos, bioquímicos e moleculares**. 2014. Número de páginas. Tese (Doutorado em Agronomia/Agricultura)- Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu. Escrever o nome da universidade por extenso

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. Inserir todos os autores