

Avaliação da eficiência de obtenção de extratos e de metabólitos polares de *Crambe abyssinica* com o uso de solventes quimicamente limpos

Rodrigo Wesley Nascimento de Melo¹, Mauro Vicentini Correia², Patrícia Pinto Kalil Gonçalves Costa³, Clenilson Martins Rodrigues⁴

Resumo

Crambe abyssinica é uma planta oleaginosa pertencente à família *Brassicaceae*, nativa da região Mediterrânea, que ocorre principalmente nos locais de clima quente-temperado da Etiópia com moderada pluviosidade. É uma cultura de fácil adaptação nas regiões mais frias e secas, tendo alguns cultivos comerciais no Brasil. O crambe tem sido classificado como matéria-prima promissora para extração de óleo não alimentar que pode ser empregado na produção de biodiesel. O material de prensagem das sementes de crambe apresenta alto teor proteico, mas, em decorrência da toxicidade de algumas classes de substâncias pertencentes na sua composição, não pode ser utilizado como suplemento alimentar na dieta de animais. Por outro lado, esse material apresenta rica composição química, com metabólitos que podem apresentar aplicações variadas, em virtude das atividades biológicas de alguns desses compostos químicos. Dessa forma, visando agregar valor à cultura do *C. abyssinica*, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes processos de extração das sementes de crambe, com uso de solventes quimicamente limpos, como água e etanol, para obter o máximo de rendimento dos extratos obtidos, bem como do teor dos compostos químicos majoritários de interesse.

Introdução

As sementes de crambe (*Crambe abyssinica*) vêm sendo objeto de estudos pelo fato de apresentar grande potencial como matéria-prima para a produção do

¹ Graduando em Química, Universidade Católica de Brasília, rodrigo.melo@colaborador.embrapa.br

² Farmacêutico, doutor em Química, Universidade de São Paulo, mauro.correia@colaborador.embrapa.br

³ Química, mestre em Química Orgânica, analista da Embrapa Agroenergia, patricia.costa@embrapa.br

⁴ Químico, doutor em Química, pesquisador da Embrapa Agroenergia, clenilson.rodrigues@embrapa.br

biodiesel (FALASCA et al., 2010), além de fornecer outros compostos químicos que apresentam inúmeras atividades biológicas, tais como: antibactericida, anticancerígenas, inseticida e herbicida (VIG et al., 2009).

O crambe é oriundo da região Mediterrânea e ocorre principalmente nos locais de clima quente-temperado da Etiópia com moderada pluviosidade. Essa cultura vem sendo adaptada ao clima brasileiro com facilidade, podendo ser cultivado tanto em clima mais frio, como no Sul do País, como em lugares mais quentes e secos, como no Centro-Oeste. Outra vantagem dessa cultura é que o seu plantio ocorre entre abril e maio e não coincide com o período da safra da soja (FALASCA et al., 2010).

O material resultante do processamento das sementes de crambe apresenta elevada quantidade de proteínas, o que a tornaria excelente matéria-prima para nutrição animal. Entretanto, por conta da alta toxicidade de algumas classes de substâncias, o uso para suplementação animal é inviabilizado (ATABANI et al., 2013).

Em decorrência da importância biológica dos metabólitos de crambe e dos seus produtos de hidrólise, é necessário quantificar esses compostos químicos nas sementes. No entanto, existem inúmeras barreiras que precisam ser superadas para conseguir avaliar esses materiais de forma quantitativa. A principal delas é a ausência de padrões comerciais. Há também dificuldades em se obter todos os produtos da hidrólise enzimática. As estratégias mais comuns são a realização da quantificação relativa em caso de ausência de padrões e a quantificação específica quando há padrões comerciais ou quando é viável isolar esses componentes e usá-los como padrões na etapa de calibração (KONG et al., 2012). Dessa forma, seria possível estabelecer quais compostos são os responsáveis pelas atividades biológicas citadas na literatura.

Outro grande entrave esbarra na obtenção desses metabólitos que possuem características muito hidrofílicas. Por ser uma oleaginosa, a extração baseada em solventes orgânicos tende a remover principalmente os ácidos graxos das sementes e os compostos químicos de interesse acabam ocorrendo em concentrações muito baixas. Com isso, o objetivo deste trabalho foi realizar extrações das sementes de crambe, partindo de uma mesma proporção de material vegetal e com a variação do tipo de solvente utilizado (água e etanol) e da temperatura de extração. Com base nas massas recuperadas e com a

quantificação dos metabólitos extraídos, foi possível determinar quais processos apresentaram melhor rendimento.

Materiais e métodos

Extração das sementes de crambe

Sementes de crambe, doadas e coletadas junto ao Banco de Gemoplasma de Crambe da Fundação MS (Maracaju, MS), foram moídas, secas a temperatura ambiente e submetidas a extração com diferentes sistemas de solventes. Em seguida, as amostras tiveram o seu rendimento calculado a partir da quantidade de massa recuperada em relação à massa inicial do material vegetal. Utilizou-se quatro processos de extração descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Condições empregadas nos processos de extração dos principais metabólitos polares de *Crambe abyssinica*.

Processo	Material vegetal (g)	Solvente (L)	Temperatura (°C)
1	150,27	1,5	70
2	150,05	2,0	27
3	150,46	2,0	100
4	150,02	1,5	27

Remoção dos solventes de extração das amostras

Quando necessário, as amostras que continham etanol foram rotaevaporadas para remoção do solvente orgânico e ao final todas as amostras aquosas foram congeladas (inicialmente em freezer -18 °C por 12 horas e depois transferidas para freezer -80 °C por 10 horas). Na sequência, foram transferidas para frascos do sistema de liofilização e foram liofilizadas por 4 dias.

Análise cromatográfica

O material liofilizado de cada um dos quatro processos foi preparado na concentração de 5 mg/mL em acetonitrila/H₂O (1:1). As análises de UPLC-PDA-ELSD das amostras foram realizadas no equipamento UPLC *Acquity H-Class* acoplado ao detector PDA e ELSD. Nessas condições, os dois principais metabólitos extraídos pelos quatro processos estudados foram avaliados de

forma qualitativa e quantitativa. Alíquotas de 0,5 μ L das amostras foram injetadas nas seguintes condições:

- Coluna *Acquity UPLC[®] HILIC Amide* 1,7 μ m, 2,1 x 50 mm.
- Temperatura da coluna: 40 °C.
- Modo de eluição: gradiente (Tabela 2).
- Fase móvel – solvente A: Formiato de amônio 25 mmol/L; solvente B: Acetonitrila.

Tabela 2. Gradiente de eluição empregado na separação por UPLC-PDA-ELSD dos compostos químicos presentes dos extratos obtidos na Tabela 1.

Tempo (min.)	Vazão (mL/min.)	%A	%B
0,20	0,500	0,0	100,0
0,21	0,500	15,0	85,0
1,50	0,500	15,0	85,0
5,00	0,500	50,0	50,0
5,01	0,500	0,0	100,0
7,00	0,500	0,0	100,0

Resultados e discussões

A partir das análises feitas, foram obtidos os perfis dos compostos A e B, que são apresentados nas Figuras 1 a 4.

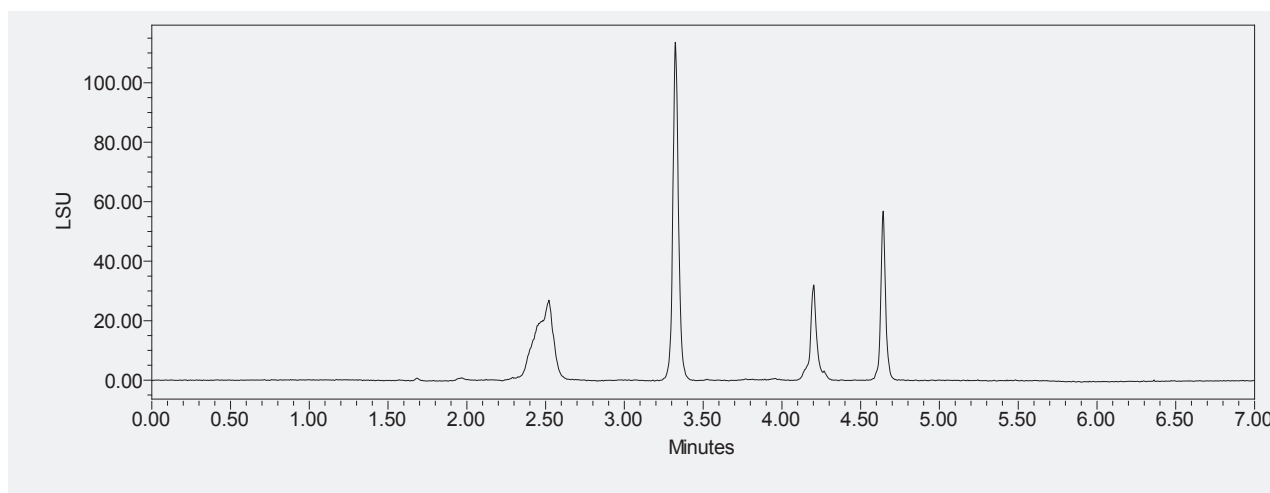


Figura 1. Cromatograma relativo ao composto A em $t_R = 3,3$ min (ELSD) a partir do processo 1 de extração.

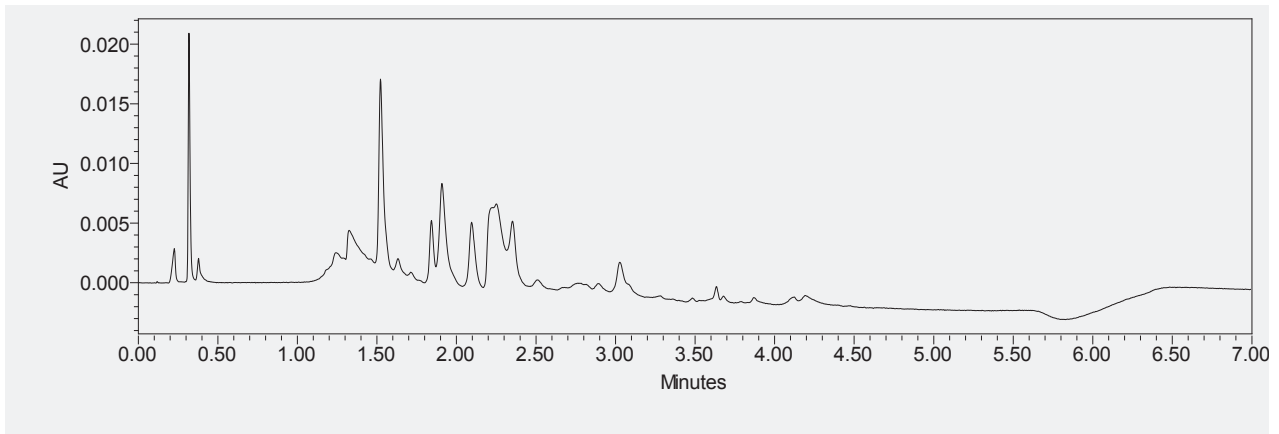


Figura 2. Cromatograma relativo ao composto B em $t_R = 0,3$ min (PDA 247 nm) a partir do processo 1 de extração.

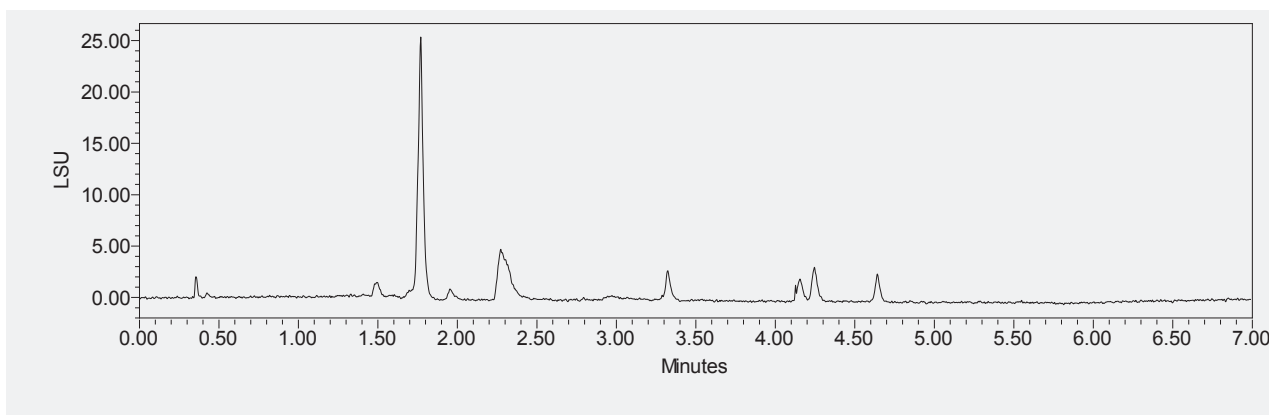


Figura 3. Cromatograma relativo ao composto A em $t_R = 3,3$ min (ELSD) a partir do processo 3 de extração.

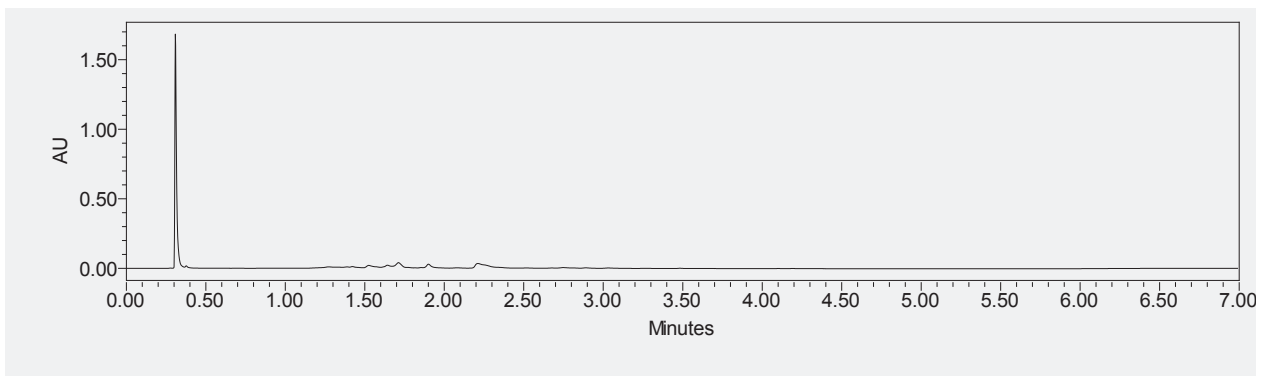


Figura 4. Cromatograma relativo ao composto B em $t_R = 0,3$ min (PDA 247 nm) a partir do processo 3 de extração.

Em termos de recuperação, o processo 4 foi o que obteve melhor rendimento em massa e a condição menos eficiente foi obtida pelo processo 3 (Tabela 3).

Tabela 3. Massas obtidas a partir da liofilização do extrato dos grãos de crambe.

Extração	Massa do material vegetal	Solvente	Massa recuperada	Rendimento (%)
Processo 1	150,27 g	1,5 L	20,77 g	13,82
Processo 2	150,05 g	2 L	15,96 g	10,64
Processo 3	150,46 g	2 L	14,62 g	9,72
Processo 4	150,02 g	1,5 L	22,85 g	15,23

Visando atribuir a melhor condição com base na obtenção dos dois principais compostos químicos-alvo (composto A e composto B), uma etapa de quantificação foi realizada para estabelecer os valores recuperados para os metabólitos A e B. Essas informações estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Massas obtidas dos metabólitos A e B.

Processo de extração	Composto A (mg/g de amostra)	Rendimento referente à massa recuperada (%)	Composto B (mg/g de amostra)	Rendimento referente à massa recuperada (%)
1	162,06	16,2	2,67	0,3
2	164,40	16,4	1,44	0,1
3	227,76	22,8	3,49	0,4
4	-	-	10,34	1,0

Conclusões

Todos os processos de extração mostraram-se efetivos para a extração seletiva dos compostos de interesse, A e B. Os rendimentos em termos de massa de extrato obtido variaram de 9,72% a 15,23%. Em relação à quantidade de cada um dos metabólitos recuperados, o processo 3 foi o mais significativo para se obter o metabólito A (227,76 mg/g) e o processo 4 foi o mais seletivo para se obter o metabólito B (10,34 mg/g). A próxima etapa do estudo será avaliar a ação biológica de cada extrato e, posteriormente, isolar cada um dos compostos para verificar qual deles será responsável pelas atividades observadas.

Apoio financeiro

Embrapa (SEG. Proc. N° 03.12.01.011.00.00).

Referências

ATABANI, A. E.; SILITONGA, A. S.; ONG, H. C.; MAHLIA, T. M. I.; MASJUKI, H. H.; BADRUDDIN, I. A.; FAYAZ, H. Non-edible vegetable oils: A critical evaluation of oil extraction, fatty acid composition, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, Oxford, v. 18, p. 211-245, 2013.

BONES A. M.; ROSSITER, J. T. The enzymic and chemically induced decomposition of glucosinolates. **Phytochemistry**, Oxford, v. 67, n. 11, p. 1053-1067, 2006.

FALASCA, S. L.; FLORES, N.; LAMAS, M. C.; CARBALLO, S. M.; ANSCHAU, A. Crambe abyssinica: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 35, n. 11, p. 5808-5812, 2010.

KONG, X. Y.; KISSEN, R.; BONES, A. M. Characterization of recombinant nitrile-specifer proteins (NSPs) of *Arabidopsis thaliana*: Dependency on Fe(II) ions and the effect of glucosinolate substrate and reaction conditions. **Phytochemistry**, Oxford, v. 84, p. 7-17, 2012.

VIG, A. P.; RAMPAL, G.; THIND, T. S.; ARORA, S. Bio-protective effects of glucosinolates-a review. **LWT-Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 42, n. 10 p. 1561-1572, 2009.