

Extração supercrítica dos ésteres de forbol da torta de *Jatropha curcas*: avaliação preliminar do uso do etanol como co-solvente

Supercritical extraction of phorbol esters from *Jatropha curcas* cake: preliminary evaluation of the ethanol as co-solvent

Cristiane de Souza Siqueira Pereira¹, Fernando Luiz Pelegrini Pessoa², José Antônio de Aquino Ribeiro³, Simone Mendonça³, Marisa Fernandes Mendes⁴.

Resumo

O pinhão manso (*Jatropha curcas* L.), pertencente a família das Euphorbiaceae e é uma oleaginosa que possui um alto teor de óleo que se destaca como uma planta com características favoráveis para a produção de biodiesel. Após a extração do óleo, toneladas de torta são produzidas como coproduto. Essa torta contém alto valor nutricional, mas a presença de éster de forbol, um composto tóxico, restringe a sua utilização como alimentação animal. Diferentes processos de destoxificação têm sido desenvolvidos em virtude da necessidade da remoção deste componente tóxico visando o aproveitamento da torta. Os compostos bioativos, como os ésteres de forbol, estão normalmente presentes em matrizes vegetais em baixas concentrações, sendo necessários processos de extração mais seletivos e efetivos para recuperação destes materiais. A utilização do fluido supercrítico é uma técnica alternativa para recuperação de compostos bioativos a partir de materiais vegetais. Neste trabalho avaliou-se o uso do etanol como co-solvente no processo de extração supercrítica. As condições experimentais utilizadas foram: 40 °C – 300 bar, 70 °C – 300 bar, 50 °C – 440 bar, 90 °C – 440 bar, 70 °C – 500 bar. A extração se mostrou eficiente, sendo o melhor resultado obtido na condição operacional de 70 °C e 500 bar, removendo 61% da concentração inicial de éster presente na torta após 5 horas de extração.

Palavras-Chave: Biodiesel. Euphorbiaceae. Produtos Naturais.

Abstract

Jatropha curcas, belonging to Euphorbiaceae family, is an oilseed with a high oil content and it stands as a plant with potential for biodiesel production. As a result of its oil extraction, tonnes of seed cake are produced as byproduct. This seed cake has high nutritional value, but the presence of phorbol ester, a toxic compound, restricts its use in animal feed. Different detoxification processes have been developed due to the need for removal of this toxic component in order to take advantage of the cake. The bioactive compounds, such as the phorbol esters, are usually present in vegetable matrices in low concentrations, requiring more selective and effective extraction processes for recovery of these materials. The use of supercritical fluid is an alternative technique for recovery of bioactive compounds from plant materials. This work evaluated the use of ethanol as a co-solvent in supercritical extraction process. The experimental conditions were: 40 °C - 300 bar, 70 °C - 300 bar, 50 °C - 440 bar, 90 °C - 440 bar, 70 °C - 500 bar. The extraction was efficient, with the best results obtained in the operational condition of 70 °C and 500 bar, removing 61% of the initial concentration of ester present in the cake after 5 hours of extraction.

Keywords: Biofuel. Euphorbiaceae. Natural Products.

Como citar esse artigo. Pereira CSS, Pessoa FLP, Ribeiro JAA, Mendonça S, Mendes MF. Extração supercrítica dos ésteres de forbol da torta de *Jatropha curcas*: avaliação preliminar do uso do etanol como co-solvente. Revista Teccen. 2015 Jul./Dez.; 08 (2): 37-43.

Introdução

São muitos os estudos, publicados na literatura, que relatam processos de produção do biodiesel a partir de diferentes matérias-primas. No processo de produção do biodiesel são gerados resíduos sólidos e líquidos. Um dos resíduos sólidos, gerado em larga escala e com potencial econômico, são as tortas oriundas da prensagem, presentes na etapa de extração dos óleos vegetais. O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma das oleaginosas potenciais para o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel. A espécie vem sendo cultivada em diversas regiões do Brasil, principalmente na região Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. É uma

oleaginosa com alto teor de óleo que pode variar de 40-60%. De acordo com Mendonça & Laviola (2009), a industrialização do pinhão manso gera como produto principal, o óleo e, como subproduto, a torta. A produção anual de 90 mil toneladas de grãos geraria, na extração do óleo, uma produção de, aproximadamente, 58,5 mil toneladas/ano de torta.

A torta resultante da extração do óleo das sementes de pinhão manso constitui excelente adubo orgânico, rico em nitrogênio, fósforo e potássio (Laviola *et al.*, 2009). É rica em proteína, cuja percentagem varia de 46 – 63% dependendo do método de extração do óleo. No entanto, atualmente, o uso da torta para alimentar animais ainda não é possível devido à presença de

1. Universidade Severino Sombra, Vassouras-RJ, Brasil.

2. Universidade Federal do Rio de Janeiro, TPQB/EQ.

3. Embrapa Agroenergia, Brasília, Brasil.

4. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

fatores antinutricionais em sua composição, como a lectina, também chamada de curcina, inibidor de protease e demais substâncias como a saponina, fitato e ésteres de forbol. Por ser lipossolúvel, grande parte dos ésteres de forbol é extraída juntamente com o óleo, no entanto permanece também na torta devido ao fato da extração mecânica não retirar totalmente o óleo presente (residual de aproximadamente 6 - 14%) [Mendonça & Laviola (2009) citado por Guedes (2010)].

Os compostos tóxicos/antinutricionais encontrados nas sementes do pinhão-mansão são os ésteres de forbol, lectinas e curcinas, porém os ésteres de forbol são considerados os mais tóxicos presentes nas sementes. A concentração desses ésteres de forbol nas sementes de pinhão-mansão varia de 2 a 3 mg/g. De acordo com Mendonça & Laviola (2009) o aproveitamento da torta para a ração animal geraria importante renda e viabilizaria economicamente a cultura. Os primeiros estudos de toxicidade relatam a curcina, também conhecida como lectina, sendo o principal componente tóxico do pinhão manso (Cortesão, 1956). Porém,

estudos posteriores comprovam que atividade tóxica das sementes, bem como do óleo de *Jatropha curcas*, deve-se à presença de ésteres de forbol.

Os ésteres de forbol são derivados de diterpenos tetracíclicos. Esses compostos são encontrados nas famílias *Euphorbiaceae* e *Thymelaceae* e já foram isolados de diversas plantas como *Euphorbia fischeriana*, *Homalanthus nutans*, *Homalanthus acuminatus*, *Neoboutonia melleri*, *Excoecarcia agallocha*, *Croton californicus*, *Croton tiglium*, *Sapium indicum*, *Sapium japonicum*, *Euphorbia frankiana*, *Euphorbia cocrulescence*, *Euphorbia ticulli*, *Croton spareiflorus ciliatoglandulifer* e *Jatropha curcas* (Devappa 2010).

Haas, Sterk & Mittelbach (2002) isolaram 6 tipos de ésteres de forbol da *Jatropha* com mesma massa molecular. Os compostos foram isolados do óleo das sementes através da extração em fase sólida (SPE) e analisados por HPLC e espectrometria de massa. Os compostos isolados apresentaram o mesmo diterpeno 12-deoxi-16-hidroxi-forbol e são apresentados na Figura 1.

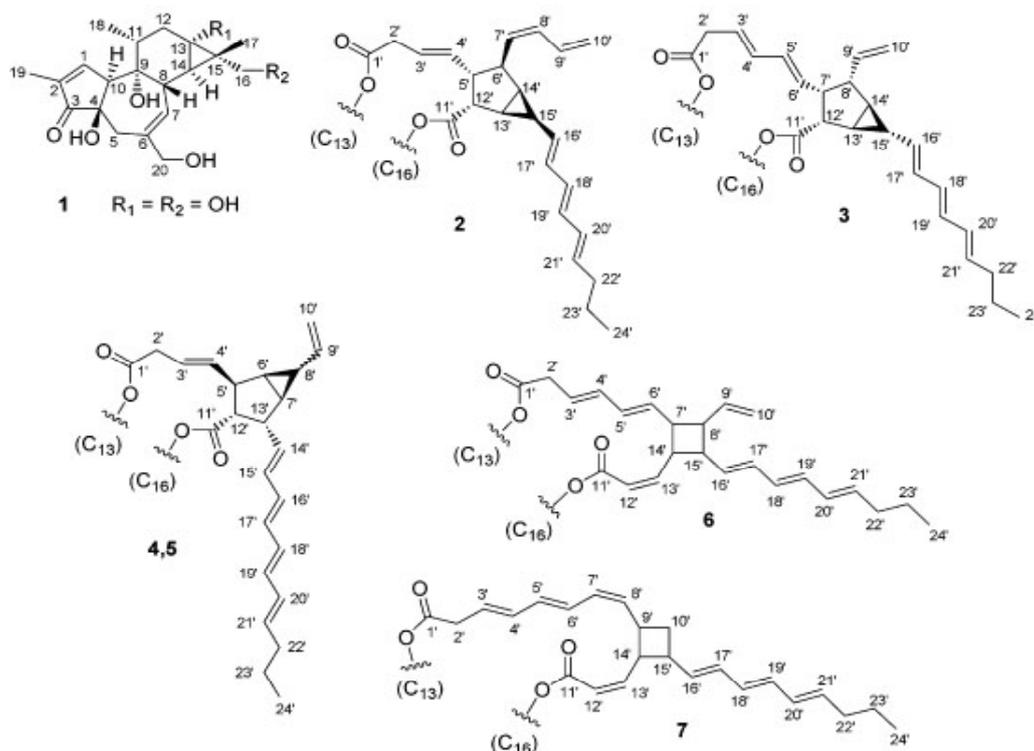


Figura 1. Estrutura molecular dos ésteres de forbol [Hass et al. 2002]

Estudos têm sido realizados com o objetivo de destoxificação da torta por métodos químicos, físicos e biológicos para remoção dos ésteres ou promover alteração em sua molécula de forma que a toxidez seja eliminada. A maioria dos trabalhos estão direcionados a destoxificação da torta com a degradação e eliminação dos ésteres de forbol e não agregam valor econômico ao éster.

Apesar dos trabalhos citados estarem voltados para a toxidez do éster de forbol, o interesse por eles não está relacionado apenas a sua atividade tóxica. Extratos metanólicos obtidos das sementes da *Jatropha* apresentam atividade molucida, sendo essa atividade associada a presença desses compostos (Liu *et al.*, 1997). Os ésteres de forbol purificados podem ser convertidos ou transformados quimicamente em composto não tóxicos com atividades benéficas como a prostratin (agente promissor anti – HIV).

Os compostos bioativos, como os ésteres de forbol, estão normalmente presentes em matrizes vegetais em baixas concentrações, sendo necessários processos de extração mais seletivos e efetivos para recuperação destes materiais. Diante deste fato, ressalta-se a importância de técnicas de extração que proporcionem melhor qualidade e seletividade destes compostos. A utilização do fluido supercrítico é uma técnica alternativa para recuperação de compostos bioativos a partir de materiais vegetais.

De acordo com Dalmolin *et al.* (2010), a utilização de pequenas quantidades de co-solventes orgânicos combinado com dióxido de carbono supercrítico tem sido estudado com o objetivo de aumentar a eficiência da extração. O uso de co-solvente pode alterar algumas características tais como polaridade, interações com o soluto formando ligações de hidrogênio ou interagindo com sítios ativos das matrizes sólidas, melhorando a eficiência da extração.

Lim & Lee (2013) avaliaram a influência de diferentes co-solventes na extração supercrítica e transesterificação simultânea das sementes de *Jatropha curcas* para produção de biodiesel. De acordo com os autores a adição de co-solventes aumentam as taxas extração devido o aumento da miscibilidade das fases metanol e óleo durante a reação, demonstrando que a técnica sugerida pode ser bastante promissora como uma rota alternativa para a produção de biodiesel.

Com o objetivo de melhorar o rendimento do processo de extração dos ésteres de forbol, avaliou-se o uso do etanol como co-solvente no processo de extração. A escolha do etanol se deu por ser considerado um solvente “verde” e por ser o Brasil o 1º produtor mundial de açúcar, responsável por 25 % da produção mundial e o 2º produtor mundial de etanol, sendo responsável por 20% da produção mundial (Unica, 2015).

Material e Métodos

Material

As sementes do pinhão manso foram gentilmente cedidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG) e foram cultivadas na cidade de Janaúba, localizada no norte do estado de Minas Gerais. O dióxido de carbono foi adquirido da White Martins (Rio de Janeiro, Brasil) com pureza superior a 99,99% e o etanol (99,8% de pureza mínima, Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil)

Procedimento experimental da extração com dióxido de carbono supercrítico

Foram realizadas cinco extrações utilizando etanol como co-solvente. As condições operacionais escolhidas foram baseadas no trabalho de Pereira *et al.* (2013) e Silva *et al.* (2014), nas quais apresentaram os maiores rendimentos de éster de forbol. As condições experimentais utilizadas foram: 40 °C – 300 bar, 70 °C – 300 bar, 50 °C – 440 bar, 90 °C – 440 bar, 70°C – 500 bar. Adicionou-se cerca de 5 mL de etanol em 10 g de torta de pinhão manso, o que foi suficiente para umedecê-las e procedeu-se a extração por um período de 5 horas.

A extração dos ésteres de forbol da torta obtida após prensagem foi realizada na unidade experimental do Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis, do Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

A unidade é composta por um extrator de aço inoxidável 316S de 42 mL, com telas de 260 mesh no topo e no fundo para evitar a passagem de qualquer material, evitando o entupimento da linha. O extrator é acoplado a um banho termostático (modelo Fisatom) para controle da temperatura da extração. Uma bomba de alta pressão (Palm modelo G100) específica para bombeamento de CO₂ é responsável pela alimentação do solvente ao extrator. Um manômetro foi instalado na linha com o objetivo de monitorar a pressão durante todo o experimento e auxiliar na segurança do equipamento.

Análise do teor de éster de forbol na torta bruta e na torta pós extração supercrítica

As amostras de torta foram previamente dessecadas em estufa a vácuo a 50 °C e submetidas a procedimento de extração adaptado do método descrito por Makkar, Siddhuraju & Becker (2007). Resumidamente, 3 g de amostra foram transferidos para tubo falcon de 50 mL e triturados com 15 mL de

metanol grau HPLC com auxílio de bastão de vidro. A mistura é ultrassonicada em banho de gelo por 3 minutos, centrifugada a 9000 rpm e o sobrenadante é transferido para balão de fundo redondo de 100 mL. O procedimento foi repetido com mais duas porções de 15 mL de metanol, e os extratos metanólicos reunidos no mesmo balão de 100 mL. Subsequentemente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida a temperatura não superior a 40 °C e o resíduo foi quantitativamente ressuspensionado com 5 mL de metanol grau HPLC.

Análise do teor de éster de forbol no extrato após extração supercrítica

Os extratos da EFSC contidos nos tubos falcon de 15 mL foram agitados com 3 mL de metanol e centrifugados a 9000 rpm, transferindo-se o sobrenadante para balão volumétrico de 10 mL. O procedimento foi repetido com mais duas porções de 3 mL de metanol, reunindo-se os extratos metanólicos no mesmo balão de 10 mL e completando-se o volume com o mesmo solvente. As análises por cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC-PDA) foram realizadas conforme descrito por Ribeiro *et al.* (2014).

Resultados e Discussões

A concentração de éster de forbol na torta bruta foi de 1,31 mg/g e o cromatograma da análise é apresentado na Figura 2. Os resultados são expressos em nanogramas (equivalentes de TPA) e os picos de éster de forbol foram eluídos entre 7,4 e 9 minutos.

Para comparar os resultados, do quanto foi extraído de ésteres de forbol apenas com dióxido de carbono supercrítico e do quanto foi obtido com a extração com o etanol como co-solvente, procedeu-se a extração da condição operacional de 70 °C e 300 bar e tempo de extração de 5 horas. A Tabela 1 apresenta o rendimento de éster do extrato, o teor e a remoção de éster de forbol após a extração. O rendimento foi determinado pela relação entre a massa de éster presente no extrato e a massa de éster presente na torta alimentada no extrator.

Os resultados indicaram que comparando a extração com dióxido de carbono e a extração com dióxido de carbono e co-solvente, os extratos obtidos usando o co-solvente apresentaram maiores concentrações de éster de forbol, sendo a condição de extração de 70 °C e 500 bar a mais satisfatória, removendo 61% da concentração inicial de éster presente na torta após 5 horas de extração.

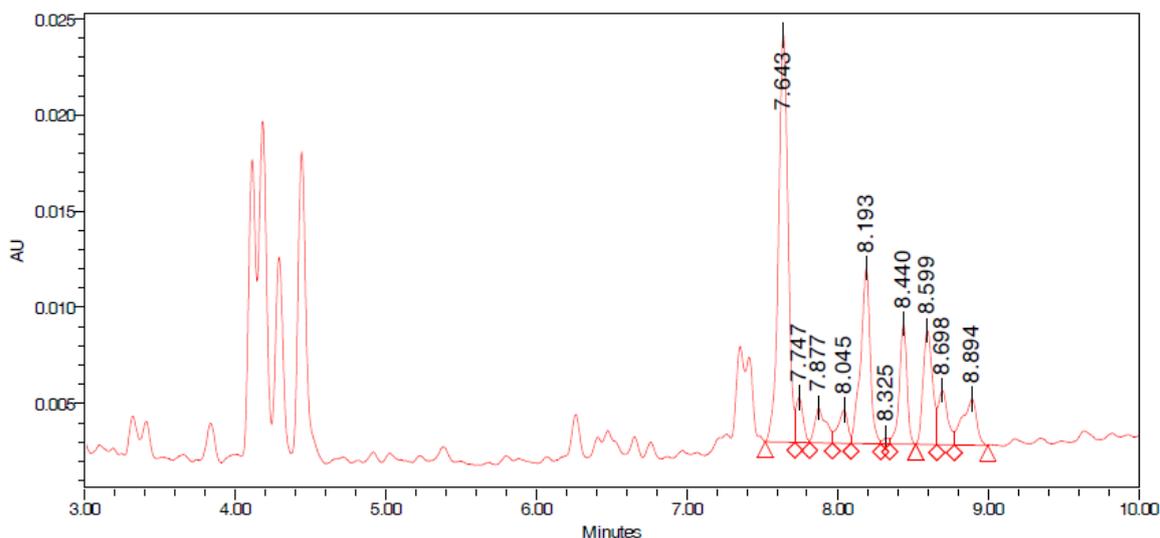


Figura 2. Cromatograma para torta bruta de pinhão manso

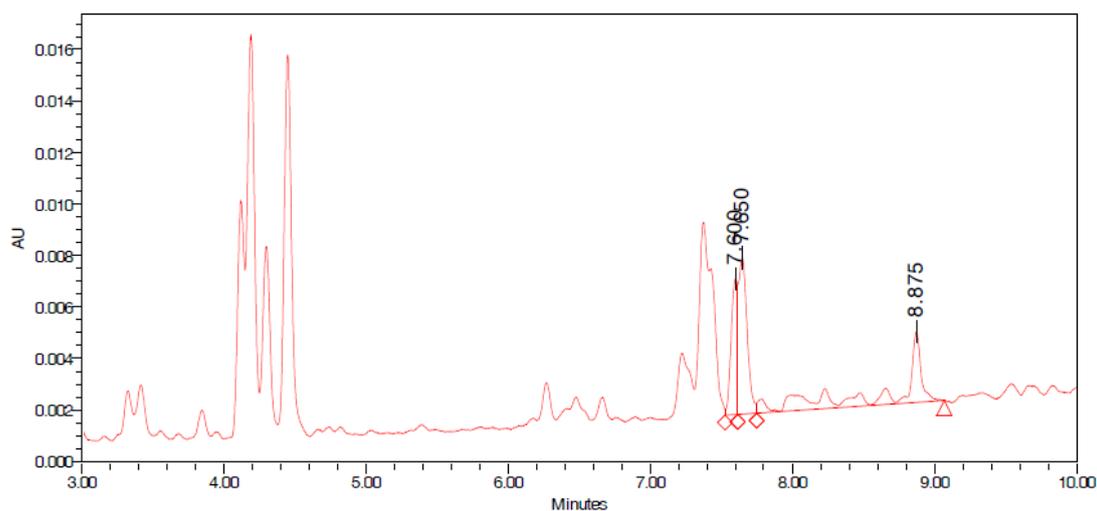
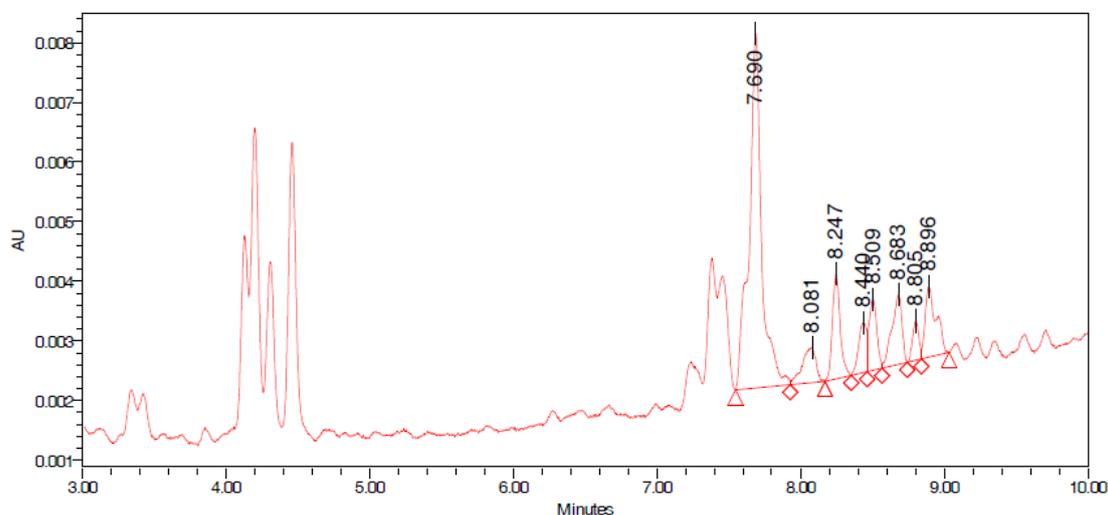
Tabela 1. Rendimento em éster de forbol (EF) após extração com CO₂ supercrítico e etanol como co-solvente e teor de éster de forbol na torta residual após a extração

Condições operacionais	Rendimento EF no extrato (%)	Teor EF na torta residual pós EFSC (mg/g)	Remoção de éster de forbol na torta (%)
40 °C – 300 bar + etanol	10,6	0,91	30,5
70 °C – 300 bar + etanol	20,8	0,94	28,2
50 °C – 440 bar + etanol	15,4	0,92	29,8
90 °C – 440 bar + etanol	27,7	0,78	40,4
70 °C – 500 bar + etanol	18,9	0,51	61,1
70 °C – 300 bar	5,6	1,32	3,1

As Figuras 3 e 4 apresentam os cromatogramas obtidos nas análises dos ésteres do extrato e da torta residual obtidos na melhor condição de extração de 70 °C a 500 bar.

Apesar do aumento no rendimento dos ésteres de forbol, o teor residual de éster na torta (0,51 mg/g)

não está dentro no nível aceitável recomendado por Makkar, Becker, Sporer & Wink (1997) para a torta ser considerada atóxica de 0,11 mg/g. Porém, os resultados foram satisfatórios quando o etanol é utilizado como co-solvente na extração.

**Figura 3.** Cromatograma obtido para o extrato de EFSC (70 °C - 500 bar)**Figura 4.** Cromatograma obtido para a torta residual após a EFSC (70 °C - 500 bar)

A Tabela 2 apresenta o teor de óleo (medido como extrato etéreo) da torta bruta e o teor de óleo na torta residual após a extração supercrítica.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 2, observa-se que o etanol tem efeito sobre

a concentração do teor de ésteres de forbol devido a diferença de solubilidade dos ésteres e do óleo. Na ausência de etanol no processo de extração, os ésteres de forbol são menos extraídos. Quando o etanol é utilizado, os ésteres são extraídos juntamente com o

Tabela 2. Teor de óleo e concentração de éster de forbol na torta após a extração supercrítica

Condição operacional	Teor de óleo residual na torta após EFSC (g/100g)	Teor EF na torta residual após EFSC (mg/g)
Torta Bruta	18,3	1,31
40 °C – 300 bar + etanol	13,6	0,91
70 °C – 300 bar + etanol	11,8	0,94
50 °C – 440 bar + etanol	9,4	0,92
90 °C – 440 bar + etanol	8,3	0,78
70°C – 300 bar sem etanol	8,4	1,27

óleo. A Figura 5 ilustra esse comportamento com os resultados de remoção de éster de forbol da torta após extração supercrítica com e sem o uso do co-solvente.

Este comportamento pode ser explicado devido a alteração da solubilidade do CO₂ pelo etanol (solvente

polar). Os ésteres de forbol apresentam afinidade por substâncias polares, apesar de serem moléculas lipofílicas. Isso acontece porque o núcleo forbol apresenta grupos hidroxilas polares, conferindo-lhes maior afinidade com solventes com maior índice de

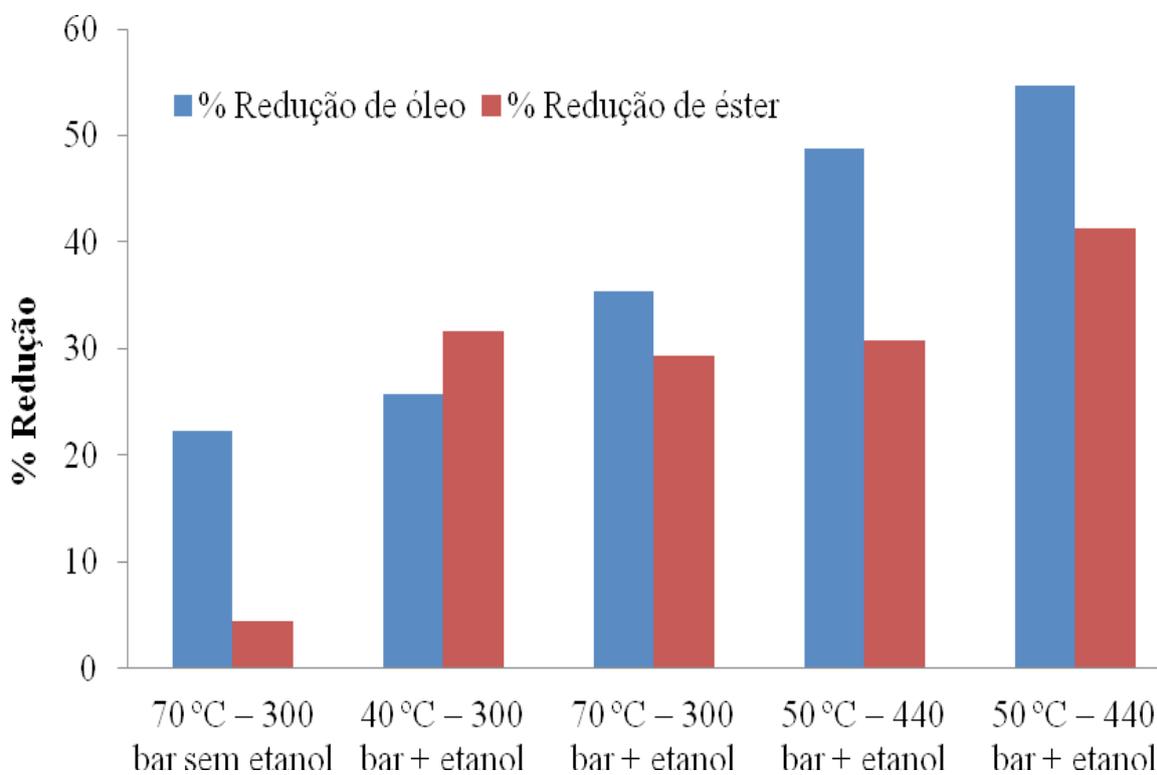


Figura 5. Remoção de óleo e éster de forbol da torta do pinhão manso após extração supercrítica

polaridade (Goel *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2010).

Alguns trabalhos relatam o uso do etanol para remoção dos ésteres de forbol do pinhão manso. Saetae & Suntornsuk (2011) utilizaram etanol para destoxificação das sementes de pinhão manso, concluindo que o éster de forbol pode ser total ou parcialmente removido por extração com etanol. Em seus estudos Cruz (2012) extraiu óleo da torta do pinhão manso com etanol para remoção do éster de forbol. A concentração de éster de forbol inicial de 5,93 mg/g na torta prensada foi reduzida para 0,015 mg/g após 4 extrações em escala laboratorial e 0,017 mg/g após 5 extrações em contra corrente em escala piloto. Estes dados corroboram o efeito positivo do etanol na extração dos ésteres de forbol.

Conclusão

Neste trabalho foi investigada a aplicação do etanol como co-solvente na extração com fluido supercrítico para remoção dos ésteres de forbol da torta de pinhão manso. A concentração de éster de forbol na torta residual após extração foi de 0,51 mg/g, porém não foi suficiente para promover a remoção total do forbol até níveis considerados não tóxicos (0,11 mg/g). Porém, a extração se mostrou mais eficiente quando comparada ao processo de extração supercrítica sem a adição do co-solvente, sendo o melhor resultado obtido na condição operacional de 70 °C e 500 bar, após 5 horas de extração. Apesar dos trabalhos encontrados na literatura estarem voltados para a destoxificação da torta do pinhão-manso, o interesse pelo éster de forbol não está relacionado apenas a sua atividade tóxica. Os ésteres de forbol purificados podem ser convertidos ou transformados quimicamente em composto não tóxicos com atividades benéficas.

A extração dos ésteres de forbol da torta do pinhão manso proporciona novas oportunidades de aproveitamento de compostos fito químicos altamente bioativos e sua utilização em aplicações agro-farmacêuticas, podendo aumentar ainda mais a rentabilidade e viabilidade econômica de uma biorrefinaria de *Jatropha*.

Referências

Cortesão, M. (1956). Culturas tropicais: plantas oleaginosas. Lisboa: Classica, p. 231.

Dalmolin, I., Mazutti, M. A., Batista, E. A., Meireles, M. A. A., & Oliveira, J. V. (2010). Chemical characterization and phase behaviour of grape seed oil in compressed carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 42(6), 797-801.

Devappa, R. K., Makkar, H. P. S., & Becker, K. (2010). Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. *Biomass and Bioenergy*, 34(8), 1125-1133.

Guedes, R. E., Cruz, F. D. A., Lima, M. C. D., Sant'Ana, L. D. O., Castro, R. N., & Mendes, M. F. (2014). Detoxification of *Jatropha curcas* seed cake using chemical treatment: Analysis with a central composite rotatable design. *Industrial Crops and Products*, 52, 537-543.

Haas, W., Sterk, H., & Mittelbach, M. (2002). Novel 12- deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. *Journal of Natural Products*, 65(10), 1434-1440.

Laviola, B. G., Bhering, L. L., Albrecht, J. C., Marques, S. S., & Rosado, T. B. (2009). Caracterização morfo-agronômica do banco de germoplasma de pinhão manso. In: Congresso Brasileiro de Plantas Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, Montes Claros. Anais. Lavras: UFLA, 6.

Lim S., & Lee K. (2013). Influences of different co-solvents in simultaneous supercritical extraction and transesterification of *Jatropha curcas* L. seeds for the production of biodiesel. *Chemical Engineering Journal*, 221, 436-445.

Liu, S. Y., Sporer, F., Wink, M., Jourdan, J., Hennig, R., Li, Y. L., & Ruppel, A. (1997). Anthraquinones. In *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae) and phorbol esters from *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against schistosomiasis vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*. *Tropical Medicine and International Health*, 2(2), 179-188.

Makkar, H. P. S., Becker, K., Sporer, F., & Wink, M. (1997). Studies of nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 45(8), 3152.

Makkar, H. P. S., Siddhuraju, P., & Becker, K. (2007). Phorbol Esters. In: *Plant Secondary Metabolites*. Totowa: Humana Press, 393, 101-105. (Methods in Molecular Biology).

Mendonça, S., & Laviola, B. G. (2009). Uso potencial e toxidez da torta de pinhão manso. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, *Comunicado técnico*, 001, 8p.

Pereira, C. S. S., Rocha, R. R., Pessoa, F.L., & Mendes, M. F. (2013). Phorbol esters extraction from *Jatropha curcas* seed cake using supercritical carbon dioxide. *III Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids Cartagena de Indias* (Colômbia).

Ribeiro, J. A. A., Ferreira, O. R., Oliveira, K. S., Mendonça, S., Abdelnur, P. V., & Rodrigues, C. M. (2014). Desenvolvimento de método RP-UPLC-PDA para determinação de ésteres de forbol em *Jatropha curcas*. In: *Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins*. Campos do Jordão. Livro de resumos, p. 207.

Saetae D., & Suntornsuk, W. (2010). Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. *Journal of Microbiology and Biotechnology* (20) 319.

Silva, C. S., Rocha, R. R., Pereira, C. S. S., & Mendes, M. F. (2014). Extração de ésteres de forbol da torta da semente de *Jatropha curcas* usando dióxido de carbono supercrítico. *X Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, 1(1). doi: 10.5151/chemeng-cobec-ic-03-ts-077.

Sun, Y., & Cheng, J (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83 (1), 1-11.

UNICA (2015) - União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/unica.php>>