

ÉSTERES DE FORBOL EM TORTAS DE PINHÃO MANSO

Adelia F. Faria-Machado (Embrapa Agroindústria de Alimentos, adelia@ctaa.embrapa.br), Maria de Lourdes M. de Souza (Embrapa Agroindústria de Alimentos, mlourdes@ctaa.embrapa.br), Izabela M. de Castro (Embrapa Agroindústria de Alimentos, imcastro@ctaa.embrapa.br), Humberto R. Bizzo (Embrapa Agroindústria de Alimentos, bizzo@ctaa.embrapa.br), Simone Mendonça (Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br), Rosemar Antoniassi (Embrapa Agroindústria de Alimentos, adelia@ctaa.embrapa.br).

Palavras Chave: ésteres diterpênicos, UPLC-MS/MS, *Jatropha curcas*.

1 - INTRODUÇÃO

O crescimento da produção de oleaginosas para produção de biodiesel tem gerado um aumento e diversificação de tortas e farelos desengordurados que devem ser aproveitados de forma a melhorar a sustentabilidade da cadeia produtiva. A torta resultante da extração do óleo das sementes de pinhão manso (*Jatropha curcas*) é rica em proteína (53-63 %), o que a torna potencialmente útil como suplemento proteico para alimentação animal, sendo necessário, no entanto, que os fatores antinutricionais e tóxicos sejam removidos Aderibigbe et al., 1997; Makkar et al., 1998). Os principais compostos tóxicos de pinhão-manso são os ésteres de forbol, os quais podem induzir a formação de tumores e respostas inflamatórias, sendo que os efeitos biológicos são dependentes da estrutura molecular do éster (Makkar et al., 1997).

A Embrapa está selecionando genótipos de pinhão manso mais adaptados às condições de cultivo no Brasil, com boa produtividade, resistência a pragas e que apresentem baixos conteúdos de ésteres de forbol. O conteúdo de ésteres de forbol em sementes de 11 acessos de pinhão manso do banco de germoplasma da Embrapa Cerrados variou desde níveis não detectáveis até 5,4 mg/g (Laviola et al., 2010). Em tortas desengorduradas esses valores foram de 0,9 a 1,3 mg/g (Pires et al., 2011).

Há grande interesse nos processos de extração e destoxificação das tortas de pinhão manso, sendo que os processos de remoção dos ésteres de forbol da torta estão em estudo no Brasil e em outros países. Nesse sentido, a identificação dos ésteres de forbol presentes na torta desengordurada de pinhão manso é um fator importante na avaliação da toxicidade e da eficiência dos processos de destoxificação da torta. Hirota et al. (1988) relatam a identificação de um diéster de 12-deoxi-16-hidroxi-forbol isolado do óleo de sementes de *J. curcas*, cuja estrutura foi revisada por Haas et al. (2002). Estes autores identificaram ainda outros cinco diésteres de 12-deoxi-16-hidroxi-forbol também isolados do óleo de sementes de *J. curcas* (Haas et al., 2002). Considerando o exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de confirmar a identidade dos ésteres de forbol presentes em torta parcialmente desengordurada e desengordurada de pinhão manso, utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS).

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas uma amostra de torta de pinhão

manso parcialmente desengordurada por prensagem, obtida em empresa produtora de óleo para biodiesel, e uma amostra de torta de pinhão manso desengordurada, obtida a partir do material parcialmente desengordurado por meio da extração do óleo com solvente. Os ésteres de forbol foram extraídos por Soxhlet durante 6 h, utilizando metanol como solvente (Pires et al., 2011). Os extratos foram concentrados e diluídos com metanol e analisados por UPLC-MS/MS em um cromatógrafo Waters Acquity conectado em série a um espectrômetro de massas Waters Quattro Premier XE Tandem MS/MS, equipado com fonte de ionização eletrospray (ESI) e analisador triplo-quadrupolo. Os ésteres de forbol foram separados em coluna de fase reversa Acquity UPLC BEH C₁₈ (10 cm × 2,1 mm, 1,7 µm), utilizando como fase móvel um gradiente de acetonitrila/água, ambos com 0,1 % de ácido fórmico e 5 mmol/L de formiato de amônio. Nas análises por espectrometria de massas foram utilizadas as seguintes condições: modo positivo, voltagem no capilar 2,5 kV, voltagem no cone 25 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura do gás de dessolvatação (N₂) 500 °C a um fluxo de 700 L/h, energia de colisão 15 eV. Baseado no método relatado por Vogg et al. (1999) para identificação de ésteres diterpênicos, as amostras foram monitoradas por experimento de MRM (monitoramento de reações múltiplas) para a transição 311 → 293 e varredura dos íons precursores de *m/z* 311. O padrão forbol-12-miristato-13-acetato (TPA) foi utilizado em co-cromatografia com as amostras como controle positivo.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta o cromatograma obtido para a amostra de torta parcialmente desengordurada a partir do monitoramento por MRM 311 → 293. A amostra de torta desengordurada apresentou perfil cromatográfico e características espectrais similares à amostra parcialmente desengordurada.

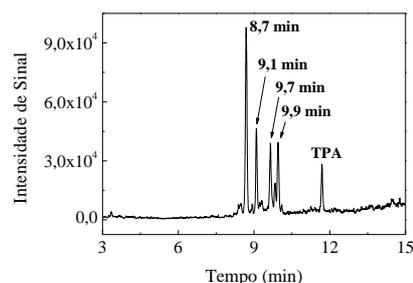


Figura 1. Cromatograma, obtido por UPLC-MS/MS, dos ésteres de forbol presentes na torta parcialmente desengordurada de pinhão manso.

O íon em m/z 311 é característico do núcleo forbol (Figura 2A) e a transição $311 \rightarrow 293$ refere-se à perda de uma molécula de água que é esperada devido à presença de hidroxilas no núcleo forbol. Assim, o monitoramento dessa transição ($311 \rightarrow 293$) permite detectar os ésteres de forbol presentes na amostra com alta seletividade e sensibilidade.

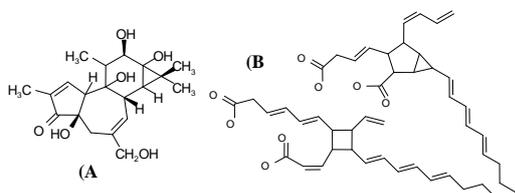


Figura 2. Estruturas moleculares do núcleo forbol (A) e de dois ácidos dicarboxílicos encontrados em *J. curcas* (B)

De acordo com o cromatograma da Figura 1, foram detectados, além do padrão TPA em 11,7 min, pelo menos quatro possíveis picos de ésteres de forbol ($t_R = 8,7; 9,1; 9,7$ e $9,9$ min). Esse perfil cromatográfico está de acordo com o obtido por HPLC-DAD em estudos anteriores (Pires et al., 2011), onde se verificou que os picos apresentavam espectros de absorção UV-visível com as mesmas características reportadas por Haas et al. (2002).

A Figura 3 apresenta o espectro de massas obtido para o pico em t_R 8,7 min (principal éster de forbol), a partir da varredura dos íons precursores do fragmento em m/z 311, sendo que os demais picos de ésteres de forbol presentes na torta de pinhão manso apresentaram padrão de fragmentação similar ao éster de forbol principal. Os dados dos espectros de massas demonstram que os quatro compostos apresentaram a mesma massa molecular com molécula protonada ($[M+H]^+$) em m/z 711, cuja perda de água gera o íon em m/z 693 $[M+H-18]^+$, que é o pico base do espectro. Além disso, a partir do pico base ocorreu outra perda de água (m/z 675 $[M+H-18]^+$) e não ocorreu a formação de outros fragmentos intermediários com m/z maior que 311, indicando que o ácido esterificado ao núcleo forbol é liberado como um fragmento único após sofrer perda de água.

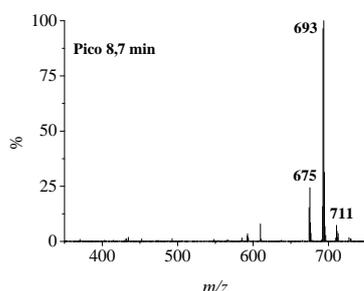


Figura 3. Espectro de massas dos íons precursores de m/z 311 do principal ésteres de forbol ($t_R = 8,7$ min) encontrado na torta parcialmente desengordurada de pinhão manso.

Esses resultados, junto com as características de absorção UV-visível (dados não apresentados), indicam que os ésteres de forbol presentes nas amostras das tortas avaliadas apresentam estruturas moleculares similares àqueles identificados por Haas et al. (2002) em óleo de *J. curcas*, cuja estrutura básica é de diéster de 12-deoxi-16-

hidroxiforbol, onde o resíduo ácido esterificado ao núcleo forbol é um ácido dicarboxílico ramificado (Figura 2B).

4 - CONCLUSÕES

Por meio das análises por UPLC-MS/MS, foi possível confirmar que os principais ésteres de forbol encontrados nas amostras de torta parcialmente desengordurada e desengordurada de pinhão manso são diésteres de 12-deoxi-16-hidroxiforbol esterificados a um ácido dicarboxílico.

5 - AGRADECIMENTOS

A FINEP, CNPq e FAPERJ pelo financiamento do projeto e ao CNPq pela concessão de bolsas.

6 - REFERÊNCIAS

- 1 ADERIBIGBE, A.O.; JOHNSON, C.O.L.E.; MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K.; FOIDL, N. Chemical composition and effect of heat on organic matter – and nitrogen degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. **Animal Feed Science Technology**, v.67, p.223-243, 1997.
- 2 HAAS, W.; STERK, H.; MITTELBAACH, M. Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**, v.65, p.1434-1440, 2002.
- 3 HIROTA, M.; SUTTAJIT, M.; SUGURI, H.; ENDO, Y.; SHUDO, K.; WONGCHAI, V.; HECKER, E.; FUJIKI, H. A new tumor promoter from the seed oil of *Jatropha curcas* L., an intramolecular diester of 12-deoxy-16-hydroxyphorbol. **Cancer Research**, v.48, p.5800-5804, 1988.
- 4 LAVIOLA, B.G.; MENDONÇA, S.; RIBEIRO, J.A.A. Caracterização de acessos de pinhão manso quanto a toxidez. In: IV Congresso Brasileiro de Mamona e I Simpósio Internacional de Oleaginosas Energéticas, 2010, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.
- 5 MAKKAR, H.P.S., ADERIBIGBE, A.O., BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**, v.62, p. 207-215, 1998.
- 6 MAKKAR, H.P.S.; BECKER, K; SPORE, F., WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n.45, p.3152-3157, 1997.
- 7 PIRES, J.M.F.; FRAUCHES, C.; SOUZA, R.S.C.; FARIA-MACHADO, A.F.; MENDONÇA, S.; ANTONIASSI, R. Éster de forbol em sementes e tortas de pinhão manso. In: 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBQ, 2011.
- 8 VOGG, G.; ACHATZ, S.; KETTRUP, A.; SANDERMANN-JR., H. Fast, sensitive and selective liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of tumor-promoting diterpene esters. **Journal of Chromatography A**, v.855, p.563-573, 1999.