

**Isolamento do (5*R*)-5-vinil-oxazolidina-2-tiona (5-VOT) Presente nas Sementes de Crambe (*Crambe abyssinica*)**



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Agroindústria Tropical  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 99**

## **Isolamento do (5*R*)-5-vinil- oxazolidina-2-tiona (5-VOT) Presente nas Sementes de Crambe (*Crambe abyssinica*)**

*Ana Carolina Moreira de Barros Duarte*

*Patrícia Gonçalves Furtado*

*Kirley Marques Canuto*

*Edy Sousa de Brito*

*Tigressa Helena Soares Rodrigues*

*Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro*

**Embrapa Agroindústria Tropical**

Fortaleza, CE

2015

**Unidade responsável pelo conteúdo e edição:**

Embrapa Agroindústria Tropical  
Rua Dra. Sara Mesquita 2270, Pici  
CEP 60511-110 Fortaleza, CE  
Fone: (85) 3391-7100  
Fax: (85) 3391-7109  
www.embrapa.br/agroindustria-tropical  
www.embrapa.br/fale-conosco

**Comitê de Publicações da Embrapa Agroindústria Tropical**

Presidente: *Gustavo Adolfo Saavedra Pinto*

Secretária-executiva: *Celli Rodrigues Muniz*

Membros: *Janice Ribeiro Lima, Marlos Alves Bezerra, Luiz Augusto  
Lopes Serrano, Marlon Vagner Valentim Martins,  
Guilherme Julião Zocolo, Rita de Cássia Costa Cid,  
Eliana Sousa Ximendes*

Supervisão editorial: *Marcos Antônio Nakayama*

Revisão de texto: *Marcos Antônio Nakayama*

Normalização: *Rita de Cássia Costa Cid*

Editoração eletrônica: *Arilo Nobre de Oliveira*

Foto da capa: *Rubens Sonsol Gondim*

**1ª edição**

On-line (2015)

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Agroindústria Tropical

---

Isolamento do (5*R*)-5-vinil-oxazolidina-2-tiona (5-VOT) presente nas sementes de  
Crambe (*Crambe abyssinica*) / Ana Carolina Moreira de Barros Duarte...[et al.]. –  
Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2015.

18 p. : il. ; 14,8 cm x 21 cm. – (Boletim de pesquisa e desenvolvimento /  
Embrapa Agroindústria Tropical, ISSN 1679-6543; 99).

Publicação disponibilizada on-line no formato PDF.

1. Glicosinolato. 2. RMN. 3. Biodiesel. 4. Oleaginosa. 5. Padrão analítico. I. Duarte,  
Ana Carolina Moreira de Barros. II. Furtado, Patrícia Gonçalves. III. Canuto, Kirley  
Marques. IV. Brito, Edy Sousa de. V. Rodrigues, Tigressa Helena Soares. VI. Ribeiro,  
Paulo Riceli Vasconcelos. VII. Série.

CDD 665.776

---

© Embrapa 2015

# Sumário

<b>Resumo .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>6</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>7</b>
<b>Material e Métodos.....</b>	<b>9</b>
<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>10</b>
<b>Conclusões.....</b>	<b>16</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>16</b>
<b>Referências .....</b>	<b>17</b>

# Isolamento do (5*R*)-5-vinil-oxazolidina-2-tiona (5-VOT) Presente nas Sementes de Crambe (*Crambe abyssinica*)

---

**Ana Carolina Moreira de Barros Duarte<sup>1</sup>**

**Patrícia Gonçalves Furtado<sup>2</sup>**

**Kirley Marques Canuto<sup>3</sup>**

**Edy Sousa de Brito<sup>4</sup>**

**Tigressa Helena Soares Rodrigues<sup>5</sup>**

**Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro<sup>6</sup>**

## Resumo

O crambe (*Crambe abyssinica*) é uma oleaginosa da família Brassicaceae, cujas sementes têm alto teor de óleo, que pode ser aplicado na síntese do biodiesel. Entretanto, uma oleaginosa somente é viável economicamente para essa finalidade se gerar uma torta de processamento que renda algum coproduto de valor agregado ou seja aproveitado na própria cadeia produtiva. No caso do crambe, a ocorrência de glicosinolatos (principalmente *epi*-progoitrina) e seus produtos de hidrólise inviabiliza o uso do coproduto na fabricação de ração animal devido à toxicidade dessas substâncias. O objetivo deste trabalho foi isolar o (5*R*)-5-vinil-oxazolidina-2-tiona(5-VOT) ou goitrina, o qual é o principal produto da hidrólise da *epi*-progoitrina, visando à sua aplicação futura como padrão analítico para quantificação de glicosinolatos. O 5-VOT foi isolado do extrato aquoso das sementes de

---

<sup>1</sup> Químico, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, anacarolmdb@gmail.com

<sup>2</sup> Graduada em Farmácia pela Universidade de Fortaleza, Fortaleza, CE, patricia\_gfb@hotmail.com

<sup>3</sup> Farmacêutico, D.Sc. em Química Orgânica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, kirley.canuto@embrapa.br

<sup>4</sup> Químico, D.Sc. em Ciência de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, edy.brito@embrapa.br

<sup>5</sup> Engenheira química, D.Sc. em Engenharia Química, técnica da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, tigressa.rodrigues@embrapa.br

<sup>6</sup> Químico, doutorando em Química Orgânica pela Universidade Federal do Ceará, analista da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE, paulo.riceli@embrapa.br

crambe utilizando cromatografia líquida de alta eficiência preparativa e caracterizado quimicamente por meio de métodos espectrométricos como ressonância magnética nuclear, incluindo técnicas uni e bidimensionais, além de espectrometria de massas de alta resolução (Emar) e infravermelho. O rendimento de extração do 5-VOT foi 0,2%, e o grau de pureza, 99,8%, demonstrando que a hidrólise e a extração com tampão Tris-HCl seguida de isolamento por CLAE compõem um método eficiente e prático na produção do composto.

Termos para indexação: glicosinolato, RMN, biodiesel, oleaginosa, padrão analítico.

# Isolation of (5*R*)-5-vinyl-oxazolidine-2-thione Present in Crambe Seed (*Crambe abyssinica*)

---

## Abstract

*Crambe* (*Crambe abyssinica*) is an oilseed crop of the Brassicaceae family. Due to high oil content of the seeds, crambe is considered a potential feedstock for the biodiesel synthesis. However, an oilseed is only economically feasible for this purpose if it generates a seed cake that is a byproduct of added value or it is reused in the value chain itself. The occurrence of glucosinolates (mainly epi-progoitrin) and their hydrolysis products preclude its use as animal feed due to their substances. The aim of this study was to isolate the (5*R*)-5-vinyl-oxazolidine-2-thione (5-VOT) or goitrin, which is the major product of hydrolysis of epi-progoitrin, in order to use it in future applications as analytical standard for quantification of glucosinolates. The VOT-5 was isolated from the aqueous extract of crambe seeds by High Performance Liquid Chromatography. Chemical characterization was accomplished through spectrometric methods such as nuclear magnetic resonance, including uni and two dimensional techniques, as well as high resolution mass spectrometry (HRMS) and infrared spectroscopy (IR). Extraction yield was 0.2% and 5-VOT purity was 99.8%, demonstrating that hydrolysis and extraction are an efficient and practical method for producing the compound.

*Index terms: glucosinolate, NMR, biodiesel, oilseed, analytical standard.*

## Introdução

O crambe (*Crambe abyssinica* – Brassicaceae) é uma herbácea de ciclo de crescimento curto (90-100 dias) e produz sementes com elevado teor de óleo (26%-38%), rico em ácido erúcido (55%), destacando-se como uma das culturas potenciais para produção de biodiesel. Originário do Mediterrâneo, mas cultivado desde a década de 1970 no Brasil, o crambe vem ganhando importância devido à sua boa adaptação ao heterogêneo clima brasileiro, mostrando-se resistente desde a geadas típicas do Sul até a climas quentes e secos como os do Centro-Oeste. Além disso, o crambe apresenta outras vantagens, como o plantio entre os meses de abril e maio – coincidindo com o período de entressafra da soja – e ser uma alternativa não concorrente de culturas alimentícias (DESAI et al., 1997; MACHADO et al., 2007; JASPER et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011; FUNDAÇÃO MS, 2013).

Entretanto, o uso do crambe para produção de biodiesel ainda esbarra em uma questão de viabilidade econômica, pois, como qualquer oleaginosa utilizada para fins energéticos, é desejável que sua torta de processamento renda algum produto de valor agregado ou seja aproveitada na própria cadeia produtiva. A torta das sementes de crambe tem elevado teor proteico, que a princípio permitiria seu aproveitamento como matéria-prima para ração animal; porém, essa aplicação é inviável devido à toxicidade de glicosinolatos presentes na torta, tais como *epi*-progoitrina, (2*S*)-2-hidroxitil-3-enil glicosinolato (Figura 1) (DAUBOS et al., 1998; LEONI et al., 2003).

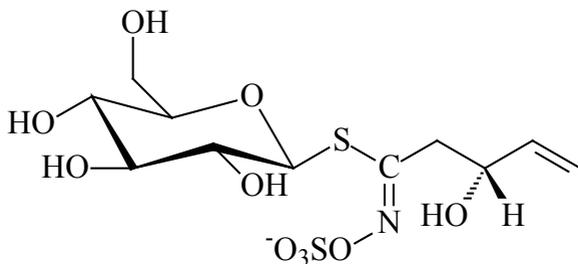
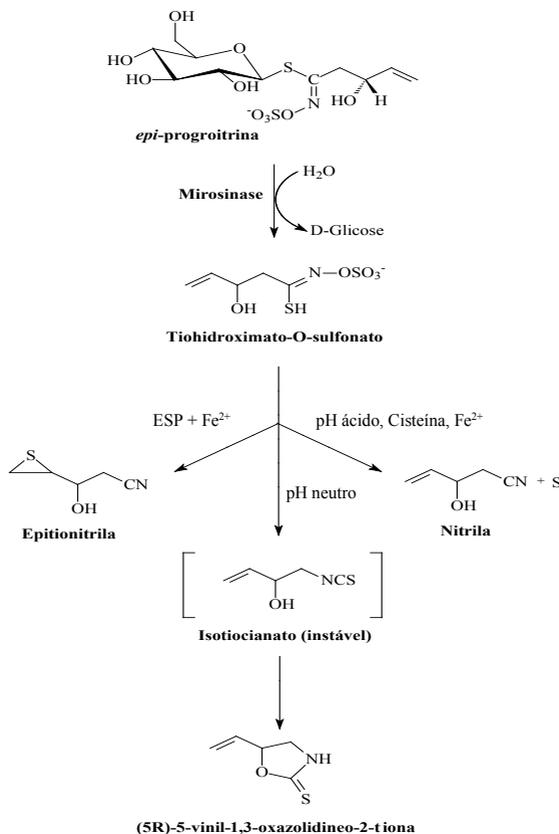


Figura 1. Estrutura química da *epi*-progoitrina

Por outro lado, existem trabalhos atribuindo uma série de atividades biológicas aos produtos de hidrólise do crambe: antifúngica, antibacteriana, anticâncer, inseticida e herbicida (VIG et al., 2009).

A *epi*-progoitrina é quimicamente muito sensível e pode ser decomposta por uma enzima endógena denominada “mirosinase”, que é liberada quando o tecido vegetal é danificado. Nesse caso, o glicosinolato é rapidamente hidrolisado a intermediários instáveis, que espontaneamente se rearranjam em uma variedade de produtos de degradação biologicamente ativos, dependendo do pH do meio: nitrilas, tiocianatos e oxazolidinonas (Figura 2) (BONES; ROSSITER, 2006).



**Figura 2.** Mecanismo da hidrólise catalítica via mirosinase da *epi*-progoitrina (LEONI et al., 2003).

Em virtude da natureza quimicamente lábil da epi-progitrina, é recomendável que a metodologia de quantificação dessa substância seja feita indiretamente a partir do teor de (5*R*)-5-vinil-oxazolidina-2-tiona (5-VOT) ou goitrina, que é o principal produto da hidrólise da epi-progoitrina. No entanto, o padrão analítico é caro (aproximadamente R\$ 4.000/20 mg) e pouco acessível, visto que existem apenas poucos fornecedores desse produto e com uma complicada logística de comercialização. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar quimicamente o 5-VOT visando à sua aplicação futura como padrão analítico para quantificação de glicosinolatos em projetos de melhoramento genético e destoxificação do crambe (DAUBOS et al., 1998; LEONI et al., 2003).

## Material e Métodos

### Extração das sementes de crambe

Sementes de crambe (variedade FMS Brilhante), oriundas do Banco de Germoplasma de Crambe da Fundação MS (Maracaju, MS), foram trituradas, submetidas à ação enzimática da mirosinase endógena, extraídas e posteriormente separadas por cromatografia, segundo o método otimizado descrito por Leoni et al. (2003). No experimento, 43,5 g de sementes foram imersas em 1 L de solução tampão Tris-HCl 100 mM (pH 8,5), durante 30 minutos a 37 °C. Em seguida, o material foi filtrado a vácuo, sendo adicionado etanol à solução aquosa até se atingir a concentração de 70%, a fim de induzir a precipitação de proteínas. A mistura foi mantida em banho de gelo durante 30 minutos e posteriormente centrifugada a 4.500 rpm (4.415 G) por 15 minutos. O sobrenadante foi recolhido, rotaevaporado a 40 °C sob pressão reduzida (70 mbar) para a eliminação do etanol e liofilizado, resultando em 16,5 g de extrato. Uma alíquota desse extrato (8,0 g) foi analisada por cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE).

### Isolamento do 5-VOT

O isolamento do 5-VOT foi realizado em um cromatógrafo preparativo (Waters), com detector de ultravioleta, munido de coluna C18 Sunfire (19 mm x 100 mm, 5 µm), vazão de 17 mL/min, utilizando-se uma fase móvel isocrática de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (15:85). O grau de pureza foi

determinado por CLAE analítica em um cromatógrafo Shimadzu, equipado com coluna analítica Shim-pack CLC-ODS (15 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m), detector de arranjo de diodo, empregando-se a mesma fase móvel da condição preparativa. Em ambas as condições, a detecção foi feita a 240 nm.

## Caracterização química do 5-VOT

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ), incluindo bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), foram obtidos em um espectrômetro DD2-Agilent de 600 MHz, por meio de uma sonda de detecção direta de 5 mm, utilizando-se clorofórmio deuterado como solvente.

O espectro de massas (EM) foi obtido por infusão direta, utilizando-se uma sonda de ionização por *electrospray* operando no modo positivo, sendo os íons conduzidos por um sistema de analisadores de massas do tipo quadrupolo-tempo de *voe tandem*. O espectro de infravermelho (IV) foi obtido em um espectrômetro FT-IR VARIAN 660 por meio do módulo de reflectância total atenuada ou *attenuated total reflectance* (ATR), munido de cristal de seleneto de zinco (ZnSe). A faixa de comprimento de onda adotada foi de 800  $\text{cm}^{-1}$  a 4.000  $\text{cm}^{-1}$ .

## Resultados e Discussão

Hidrólise e extração com tampão Tris-HCl das sementes de crambe seguidas de separação cromatográfica por CLAE resultaram no isolamento de 96 mg (rendimento de 0,2%) de um sólido amarelo (**1**), o qual foi caracterizado como oxazolidiona 5-VOT (pureza de 99,8%) após análises espectrométricas.

O espectro na região do infravermelho do composto **1** (Figura 3) apresentou uma banda larga em 3.200  $\text{cm}^{-1}$  devido ao estiramento da ligação N – H de amina secundária alifática, cuja ligação C – N foi evidenciada pela banda de 1.151  $\text{cm}^{-1}$ . O pico em 1.515  $\text{cm}^{-1}$  foi associado à ligação C = S da tiocarbonila ligada ao nitrogênio da amina. O espectro de massas do composto **1** exibiu um pico com  $m/z$  130,0332, compatível com a fórmula molecular  $[\text{C}_5\text{H}_7\text{NOS} + \text{H}]^+$  (Figura 4).

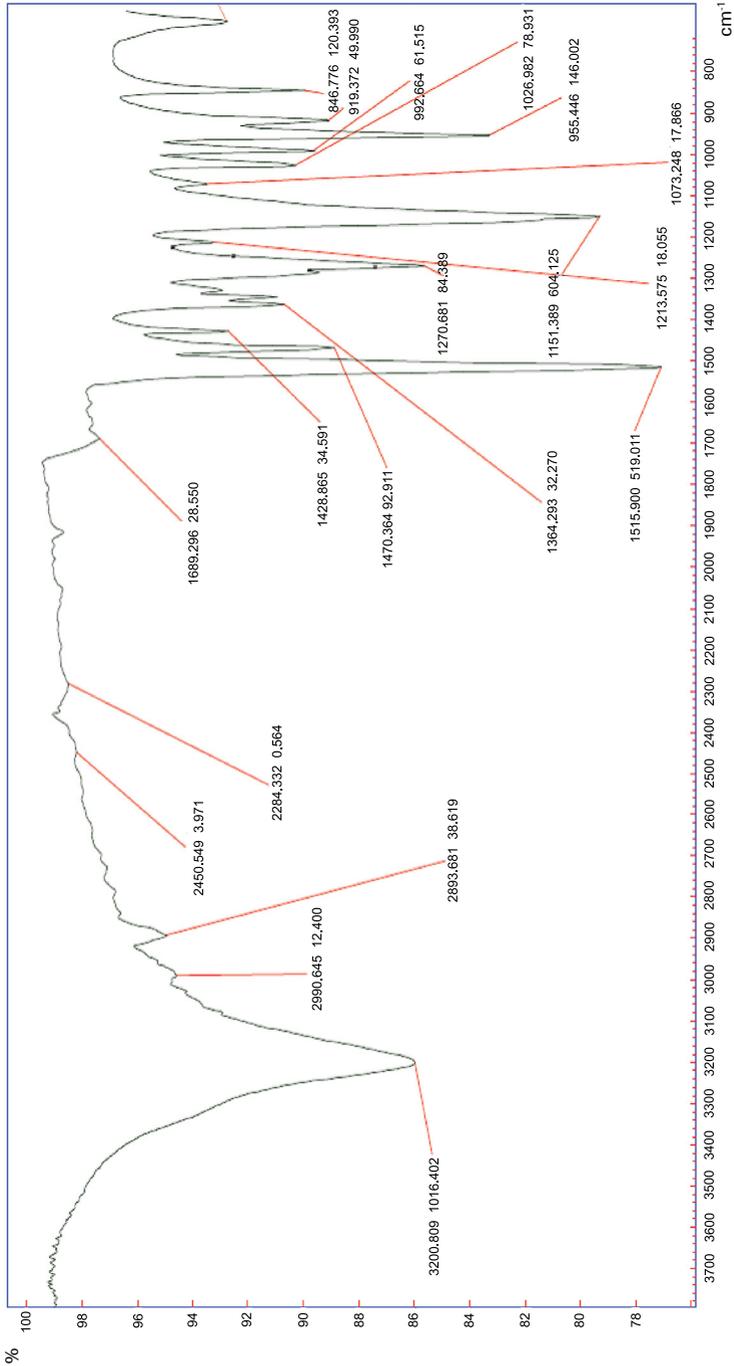
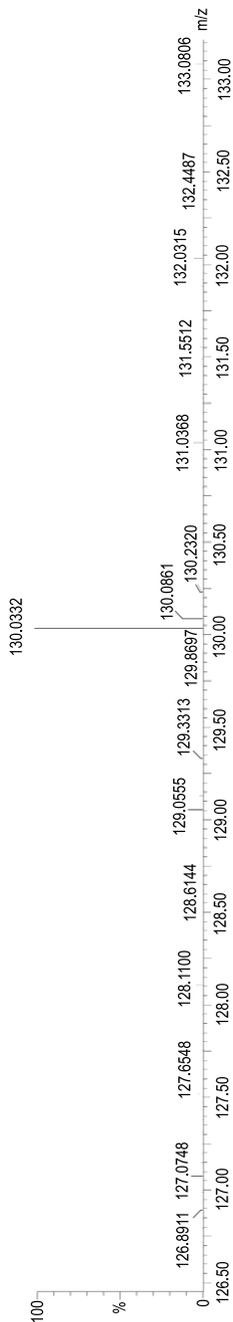


Figura 3. Espectro de IV do 5-VOT.



**Figura 4.** Espectro de massas de alta resolução para o 5-VOT.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) do composto **1** (Figura 5) apresentou sinais em  $\delta$  3,53 (H-4a), 3,92 (H-4b) e 5,33 (H-5), correspondentes a hidrogênios ligados a carbono oxigenado/nitrogenado, sinais em  $\delta$  5,40 (H-7a), 5,47 (H-7b) e 5,96 (H-6), referentes a hidrogênios vinílicos e um simpleto em  $\delta$  7,97 (3-NH), atribuído ao hidrogênio do grupo amino. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  exibiu 5 linhas espectrais, das quais uma em  $\delta$  189,6 (C-2) foi associada a tiocarbonila (Figura 6). Os sinais em  $\delta$  132,9 (C-6) e 120,6 (C-7) foram relacionados com carbonos olefínicos, enquanto os sinais em  $\delta$  83,4 (C-5) e 49,1 (C-4) foram caracterizados como carbonos oxigenado/nitrogenado (Tabela 1). O espectro de RMN bidimensional HSQC permitiu correlacionar cada hidrogênio ao seu respectivo carbono (Figura 7).

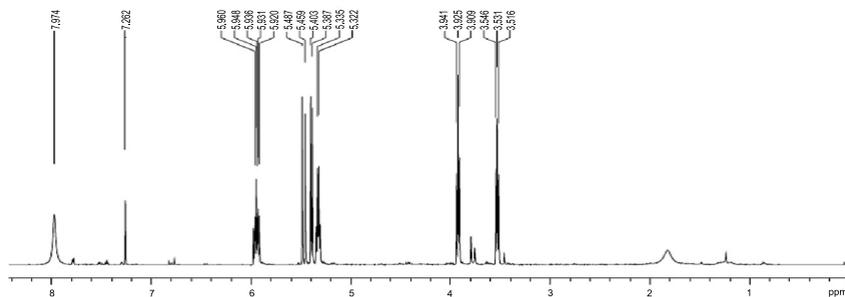
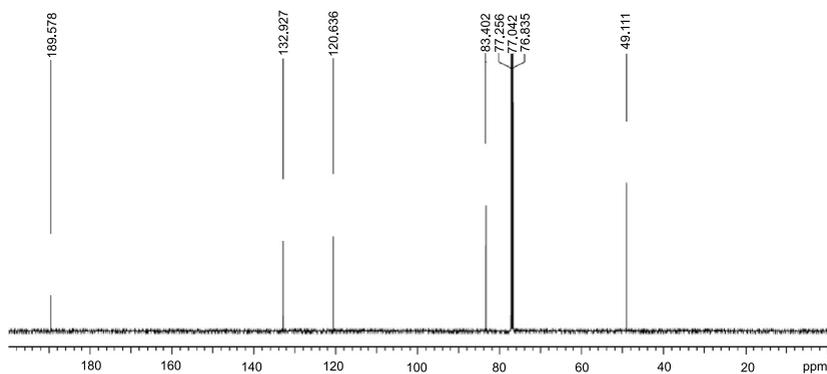
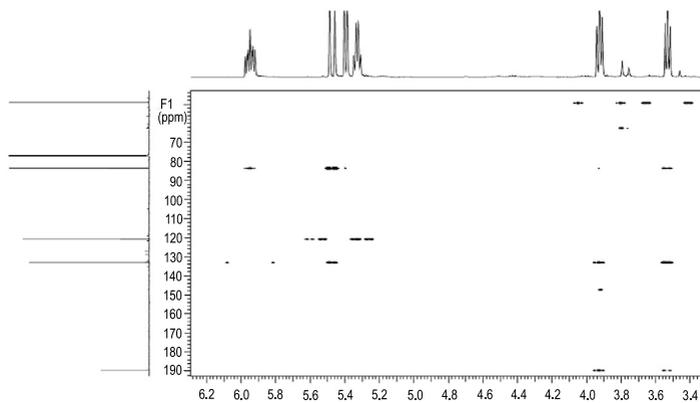
Figura 5. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de 5-VOT ( $\text{CDCl}_3$ ).Figura 6. Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  de 5-VOT ( $\text{CDCl}_3$ ).

Figura 7. Espectro de RMN HSQC do 5-VOT.

**Tabela 1.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do composto 1 e do 5-VOT ( $\text{CDCl}_3$ ).

# C	5-VOT $\delta_{\text{C}}$ (ppm) (LEONI et al., 1999)	5-VOT $\delta_{\text{C}}$ (ppm) Composto 1	HSQC $\delta_{\text{H}}$ (ppm)(int., mult. <sup>(1)</sup> , $J_{\text{H,H}}$ ) Composto 1
2	189,7	189,6	-
4	49,5	49,1	3,53 e 3,92 (1H, t, 9; 9,6 Hz)
5	83,8	83,4	5,33 (1H, dd, 8,4 Hz)
6	133,4	132,9	5,96 (1H, t)
7	121,0	120,6	5,47 e 5,39 (1H, dd, 16,8; 9,6 Hz)
3-NH	-	-	7,97 (1H, s)

<sup>(1)</sup>Int: integração; mult.: multiplicidade.

O espectro bidimensional COSY mostrou os acoplamentos escalares entre os seguintes sinais de hidrogênios: correlações entre os sinais de hidrogênios geminais  $\delta$  3,53 (H-4a) e 3,92 (H-4b), bem como entre eles e o sinal em  $\delta$  5,33 (H-5). O sistema vinílico foi evidenciado pelas correlações entre os sinais de hidrogênio em 5,96 (H-6),  $\delta$  5,40 (H-7a) e 5,47 (H-7b) (Figura 8). O espectro bidimensional HMBC mostrou correlações heteronucleares a duas e três ligações ( $J^2$  e  $J^3$ ). A presença da tiocarbonila no anel oxazolidínico foi caracterizada por meio das correlações dos sinais de hidrogênio em  $\delta$  3,53 (H-4a) e 3,92 (H-4b) com o sinal de carbono em  $\delta$  189,6 (C-2) (Figuras 9 e 10). As correlações entre os sinais de hidrogênio em  $\delta$  5,96 (H-6),  $\delta$  5,40 (H-7a) e 5,47 (H-7b) com o sinal de carbono em  $\delta$  83,4 (C-5) indicaram que o grupo vinila estava ligado ao anel no carbono 5.

Todos os dados espectrais estavam em concordância com os descritos na literatura (LEONI et al., 1999). No crambe, o 5-VOT é produzido exclusivamente na forma *R*, enquanto na colza (*Brassica napus*), oleaginosa pertencente à mesma família Brassicaceae, são encontrados os dois enantiômeros.

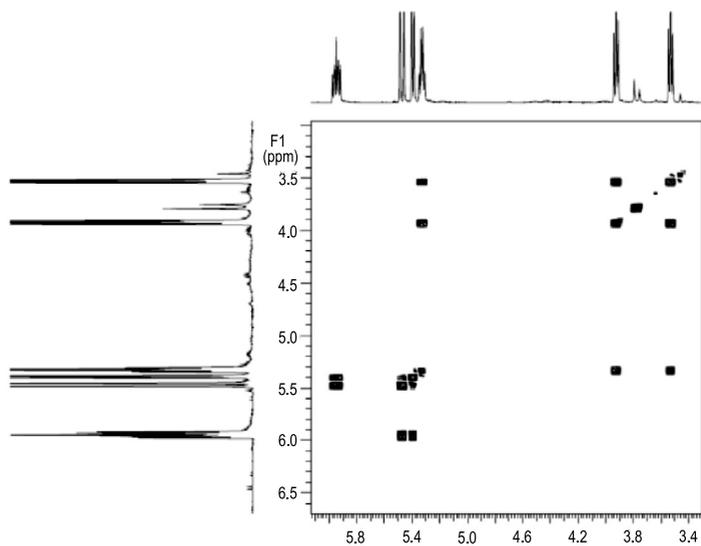


Figura 8. Espectro de RMN <sup>1</sup>H COSY.

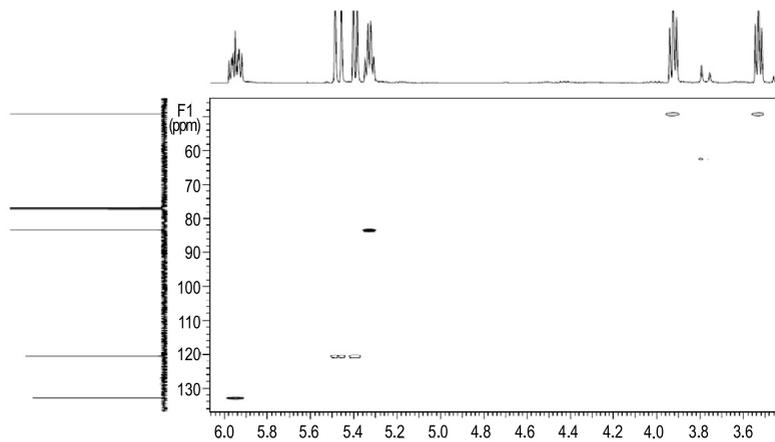
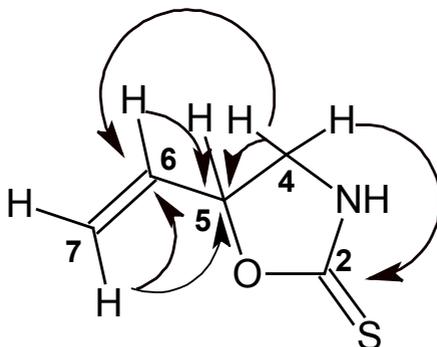


Figura 9. Espectro de RMN HMBC de 5-VOT.



**Figura 10.** Estrutura química do composto 1 com seus acoplamentos de HMBC.

## Conclusões

A hidrólise e a extração com tampão Tris-HCl seguida de isolamento por CLAE compõem um método eficiente e prático para a produção do composto 5-VOT na forma enantiomericamente pura, o qual é um produto de alto custo e pouco acessível comercialmente.

## Agradecimentos

À Fundação MS pela doação das sementes de crambe e à Embrapa pelo apoio financeiro ao projeto "Fastchrom"-SEG 03.12.01.011.0000.

# Referências

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

DAUBOS, P.; GRUMEL, V.; IORI, R.; LEONI, O.; PALMIERI, S.; ROLLIN, P. Crambe abyssinica meal as starting material for the production of enantiomerically pure fine chemicals. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 187-193, 1998.

DESAI, B. B.; KOTECHEA, P. M.; SALUNKHE, D. K. **Seeds handbook: biology, production processing and storage**. New York: Marcel Dekker, 1997. p.627.

FUNDAÇÃO MS PARA A PESQUISA E DIFUSÃO DE TECNOLOGIAS AGROPECUÁRIAS. Disponível em: <<http://www.fundacaoms.org.br/produto/crambe>>. Acesso em: 09 set. 2013.

JASPER; S. P.; BIAGGIONI; M. A. M; SILVA; P. R.A.; SEKI; A. S.; BUENO, O. C. Análise Energética da cultura do crambe (*Crambe abyssinica* hochst) produzida em plantio direto. **Engenharia Agrícola**, v. 30, n. 3, p. 395-403, 2010.

LEONI, O.; BERNARDI, R.; GUEYRARD, D.; ROLLIN, P.; PALMIERI, S. Chemo-enzymatic preparation from renewable resources of enantiopure 1,3-oxazolidine-2-thiones. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 4775-4780, 1999.

LEONI, O.; CINTI, S.; ALIANO, N.; TITTONEL, E.D. A rapid chromatographic method for determining the glucosinolate content in crambe seed. **Plant Breeding**, v. 122, p. 517-520, 2003.

MACHADO, M. F.; BRASIL, A. N.; OLIVEIRA, L. S.; NUNES, D. L. **Estudo do Crambe (*Crambe abyssinica*) como fonte de óleo para produção de biodiesel**: ENERBIO,2007,

Itaúna, MG. Grupo de Pesquisa em Energias Renováveis, UIT. Itaúna, MG. 2007. Disponível em: <[http://www.enerbio.ind.br/wp-content/uploads/2011/05/Artigo\\_Crambe\\_RBTB.pdf](http://www.enerbio.ind.br/wp-content/uploads/2011/05/Artigo_Crambe_RBTB.pdf)>. Acesso em: 05 out. 2013.

TEIXEIRA, R. N.; TOLEDO, M. Z.; FERREIRA, G.; CAVARIANI, C.; JASPER, S. P. Germinação e vigor de sementes de crambe sob estresse hídrico. *Irriga*, v. 16, p. 42-51, 2011.

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

**Embrapa**

---

***Agroindústria Tropical***

Ministério da  
**Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PÁTRIA EDUCADORA