

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

**EFEITO DA ADUBAÇÃO FOSFATADA SOBRE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E
QUALIDADE DO ÓLEO DA CULTURA DE CRAMBE**

CAROLINE MARIANA DE AGUIAR

CASCAVEL - PARANÁ - BRASIL

FEVEREIRO 2016

CAROLINE MARIANA DE AGUIAR

**EFEITO DA ADUBAÇÃO FOSFATADA SOBRE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E
QUALIDADE DO ÓLEO DA CULTURA DE CRAMBE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Dr. Silvio César Sampaio.

Co-orientador: Dr. Edson Antônio da Silva.
Co-orientador: Dr. Pitágoras Augusto Piana.
Co-orientador: Dr. Ralpo Rinaldo dos Reis

CASCADEL - PARANÁ - BRASIL

FEVEREIRO 2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

A228e

Aguiar, Caroline Mariana de

Efeito da adubação fosfatada sobre características agrônômicas e qualidade do óleo da cultura de Crambe./Caroline Mariana de Aguiar; Cascavel, 2016.

63 p.

Orientador: Prof. Dr. Silvio César Sampaio

Coorientador: Prof. Dr. Edson Antônio da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Pitágoras Augusto Piana

Coorientador: Prof. Dr. Ralphe Rinaldo dos Reis

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2016

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Engenharia Agrícola

1. Crambe abyssinica. 2. Fósforo. 3. Produtividade. 4. Composição de ácidos graxos. 5. Antioxidantes. 6. Extração supercrítica. I. Sampaio, Silvio César. II. Silva, Edson Antônio da. III. Pitágoras Augusto Piana. IV. Reis, Ralphe Rinaldo dos. V. Capitani, Dhandara, Rev. VI. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. VII. Título.

CDD 21.ed. 633.85

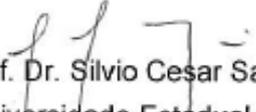
CIP-NBR 12899

Ficha catalográfica elaborada por Helena Soterio Beijo – CRB 9ª/965

CAROLINE MARIANA DE AGUIAR

**"EFEITO DA ADUBAÇÃO FOSFATADA SOBRE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E
QUALIDADE DO ÓLEO DA CULTURA DE CRAMBE"**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação "*Stricto Sensu*" em Engenharia Agrícola em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Agrícola, área de concentração Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, **aprovada** pela seguinte banca examinadora:


Orientador: Prof. Dr. Silvio Cesar Sampaio

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel


Prof. Dr. Alfredo Richart

Pontifícia Universidade Católica – PUC/Toledo


Prof.ª Dra. Clayton Antunes Martin

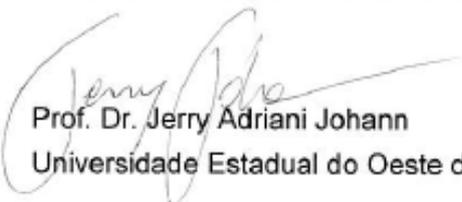
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – *Campus* de Toledo


Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel


Prof. Dr. Ralpo Rinaldo dos Reis

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel


Prof. Dr. Jerry Adriani Johann

Universidade Estadual do Oeste do Paraná – *Campus* de Cascavel

Cascavel, 05 de fevereiro de 2016.

BIOGRAFIA

Caroline Mariana de Aguiar, nascida na cidade de Medianeira em 14 de abril de 1982, possui graduação em Tecnologia em Controle de Processos Químicos pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Pato Branco (2005). Atuou como Técnica de Laboratório *Trainee* na empresa Sadia S.A. (2002 a 2007). Possui mestrado em Engenharia Química pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná (2010).

Atualmente é técnica de laboratório, na área de química, do curso de Tecnologia em Processos Químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Toledo. Participa do grupo de pesquisa Tecnologia de Alimentos, Química e Bioquímica – TECQB.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meu caminho durante esta longa jornada;

À minha família, pelo amor, o incentivo e a confiança;

Ao Prof. Dr. Silvio César Sampaio, pela orientação, a confiança, o apoio e os conhecimentos compartilhados durante a realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Alfredo Richart, pela colaboração e por ter cedido os grãos de crambe para que este trabalho pudesse ser realizado;

Aos Professores Edson Antônio da Silva, Pitágoras Augusto Piana e Ralpo Rinaldo dos Reis pela co-orientação;

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela oportunidade;

Ao corpo docente e técnico, amigos e colegas do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela possibilidade de utilização de equipamentos imprescindíveis ao estudo;

Às amigas Adriana da Silva Tronco Johann e Katia Andressa dos Santos pelo apoio, o conhecimento e as experiências compartilhados e, principalmente, pela força nos momentos mais difíceis;

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Toledo pela concessão do período de afastamento integral, aos colegas de trabalho Rafael Davis e Danielle Camargo pela amizade, o apoio e a enorme compreensão, e aos Professores Clayton Antunes Martin, Ricardo Fiori Zara e Viviane da Silva Lobo pelos conhecimentos compartilhados e o incentivo durante esta jornada;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

EFEITO DA ADUBAÇÃO FOSFATADA SOBRE CARACTERÍSTICAS AGRONÔMICAS E QUALIDADE DO ÓLEO DA CULTURA DE CRAMBE

RESUMO GERAL

O crambe destaca-se pela rusticidade, o potencial produtivo, o teor e a qualidade do óleo. Contudo, informações sobre o desenvolvimento da cultura frente à adubação fosfatada ainda são incipientes, bem como estudos avaliando o efeito do fósforo sobre a qualidade do óleo de forma completa, com investigação de carotenóides, clorofilas, fenólicos e atividade antioxidante. Além disso, o método de extração de óleos vegetais pode influenciar sua composição, destacando-se o método com CO₂ supercrítico que apresenta vantagens em termos econômicos e ambientais, extraíndo compostos de alto valor agregado sem resíduos de solventes. O objetivo foi verificar o efeito da adubação fosfatada sobre parâmetros no período de pré-florescimento e na pós-colheita. Ainda, foram avaliados os efeitos das doses sobre a composição de ácidos graxos, compostos minoritários e atividade antioxidante total do óleo de crambe extraído com hexano, bem como teor de água e índice de acidez. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco tratamentos (0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e quatro repetições. Para comparação dos métodos de extração sobre a qualidade do óleo extraído por Soxhlet (hexano) e CO₂ supercrítico, utilizou-se amostras de grãos cultivados com 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅, determinando-se no óleo componentes minoritários, cor, estabilidade oxidativa e atividade antioxidante total. O efeito do fósforo sobre as características do crambe e do óleo foi avaliado com teste de Shapiro-Wilk, correlação de Pearson e análise de covariância a 5% de significância. Para a comparação dos métodos de extração do óleo foi utilizado o teste t-pareado a 5% de significância. A cultura do crambe responde à adubação fosfatada com relação aos teores foliares de nitrogênio e potássio, peso de mil grãos, produtividade de grãos e rendimento do óleo. Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre os parâmetros fósforo foliar, altura, massa seca e massa fresca no período de pré-florescimento, e sobre os parâmetros altura e número de cápsulas por planta na pós-colheita. Verificou-se associação positiva dos tratamentos com os teores de fitosteróis e carotenóides, porém negativa com a atividade antioxidante total. Tocoferóis totais, ácidos graxos totais, compostos fenólicos totais e clorofila *a* não foram afetados pelas doses aplicadas. Sobre a correlação de P com tocoferóis, ácidos graxos e fitosteróis de forma individual, observou-se que o δ -tocoferol e o ácido palmitoleico (C16:1) tiveram associação negativa e positiva com as doses, respectivamente, e fitosteróis foram associados de forma positiva linear (stigmasterol) e quadrática (β - sitosterol). O campesterol foi quantificado apenas com dose de 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Estes resultados indicam aumento das concentrações de antioxidantes quando realizada a adubação fosfatada. Os rendimentos das extrações foram 5,67% e 33,86%, para CO₂ e hexano, respectivamente. O óleo extraído com CO₂ apresentou maior concentração de ácidos graxos livres, fitosteróis, tocoferóis e compostos fenólicos e menor concentração de carotenóides quando comparado ao óleo extraído por hexano. A atividade antioxidante foi maior no óleo extraído com CO₂, porém este foi menos estável do que o extraído com hexano. As concentrações de AGL e carotenóides foram associadas à redução da estabilidade à oxidação do óleo extraído com CO₂, e as concentrações de fitosteróis, tocoferóis e fenólicos à maior atividade antioxidante deste óleo. Clorofila não foi detectada no óleo extraído por CO₂ e a cor do óleo extraído com hexano foi mais intensa e amarelada, atribuída à maior concentração de pigmentos. O CO₂ foi mais seletivo em relação aos tocoferóis, fitosteróis e compostos fenólicos quando comparado ao método Soxhlet.

PALAVRAS-CHAVE: *Crambe abyssinica*, fósforo, produtividade, composição de ácidos graxos, antioxidantes, extração supercrítica.

PHOSPHATE FERTILIZER EFFECT ON AGRONOMIC CHARACTERISTICS AND OIL QUALITY OF THE CRAMBE CULTURE

GENERAL ABSTRACT

Crambe stands out for its rusticity, yield potential, and oil quality and capacity. However, literature about the plant's development considering phosphate fertilization is still insipient, as well as studies to thoroughly evaluate phosphorus effect in the oil quality, including research about carotenoids, chlorophylls, phenol and antioxidant activity. In addition, the method of vegetable oil extraction can influence its composition, particularly the supercritical CO₂ method, which shows economic and environmental advantages in, by extracting compounds with high added value without creating solvent residues. The aim of this study was to evaluate the effect of phosphorus fertilization on parameters in pre-flowering and in post-harvest periods. Moreover, the effects of phosphorus dosage were evaluated on the fatty acids composition, minority compounds and total antioxidant activity of crambe oil extracted with hexane, as well as water content and acid index. The experiment was carried out with randomized blocks with five treatments (0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅), and four repetitions. In order to compare the extraction method on the quality of the oil extracted by Soxhlet (hexane) and supercritical CO₂, samples of grain with 160 kg ha⁻¹ of P₂O₅ were used to determine minor components, color, oxidative stability and total antioxidant activity of extracted oils. The phosphorus effect on crambe plants and oil characteristics were evaluated through Shapiro-Wilk test, Pearson correlation and covariance analysis at 5% significance. In order to compare oil extraction methods, the paired t-test was used at 5% significance level. The crambe plants respond to phosphate fertilizer regarding to foliar nitrogen and potassium contents, a thousand grain weight, grain and oil yields. There was no significant effect of treatments on parameters such as leaf phosphorus content, plants height, dry and fresh weight in pre-flowering period, and plants height, number of capsules per plant in post-harvest period. Positive association of treatments was observed with phytosterols and carotenoids levels, but negative with total antioxidant activity. Total tocopherols, total fatty acids, phenolic compounds and chlorophyll *a* were not affected by applied doses. About P correlation with tocopherols, fatty acids and phytosterols individually, it was observed that δ-tocopherol and palmitoleic acid (C16: 1) showed negative and positive association with the doses, respectively. Phytosterols was associated with linear positive (stigmasterol) and quadratic (β-sitosterol). Campesterol was quantified only at 160 kg ha⁻¹ of P₂O₅ dose. These results suggest increased concentrations of antioxidants when phosphorus fertilization was used. The extraction yields were 5.67% and 33.86% for CO₂ and hexane, respectively. The oil extracted with CO₂ showed higher concentration of free fatty acids, phytosterols, tocopherols and phenolic compounds and lower concentration of carotenoids when compared to hexane extracted oil. The antioxidant activity was higher in the oil extracted with CO₂, but it was less stable than the oil that was extracted with hexane. The free fatty acids concentrations and carotenoids were associated with reduced oxidation stability of the oil extracted with CO₂. The phytosterol concentrations, tocopherols and phenolic were associated with a higher antioxidant activity of this oil. Chlorophyll *a* was not detected in oil extracted by CO₂ and the oil color extracted with hexane was more intense yellow due to its higher pigment concentration. The CO₂ was more selective in relation to tocopherols, phytosterols and phenolic compounds when compared to the Soxhlet method.

KEYWORDS: *Crambe abyssinica*, phosphorus, yield, fatty acids composition, antioxidants, supercritical extraction.

SUMÁRIO GERAL

LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
ARTIGO 1	
POTENCIAL PRODUTIVO DE CRAMBE EM RESPOSTA A ADUBAÇÃO FOSFATADA ...	1
ARTIGO 2	
COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS, ANTIOXIDANTES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE <i>CRAMBE ABYSSINICA</i> H. CULTIVADO COM DIFERENTES DOSES DE FÓSFORO.....	15
ARTIGO 3	
COMPONENTES MINORITÁRIOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO DE CRAMBE EXTRAÍDO POR DIFERENTES MÉTODOS: CO ₂ SUPERCRÍTICO E HEXANO	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

TABELA 1. Resultados das análises de solo da área experimental	4
TABELA 2. Valores de correlação de Pearson entre as doses de P na adubação e as variáveis avaliadas	6
TABELA 3. Valores de F e p da análise de covariância de parâmetros no pré-florescimento e na pós-colheita	6

ARTIGO 2

Tabela 1. Tocoferóis, ácidos graxos, fitosteróis, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante total, clorofila a e carotenóides totais do óleo de crambe para as doses de P..	22
Tabela 2. Correlação de Pearson para as concentrações totais das variáveis resposta em relação às doses de P na adubação.	23
Tabela 3. Correlação de Pearson para cada tocoferol, ácido graxo e fitosterol em relação às doses de P na adubação.	23
Tabela 4. Valores de F e p da análise de covariância para as variáveis correlacionadas com as doses de P aplicadas na adubação do crambe.	24

ARTIGO 3

Tabela 1	
Composição do óleo de crambe, cor, atividade antioxidante total e parâmetros da estabilidade oxidativa para os dois métodos de extração	45

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1

FIGURA 1. Precipitação pluviométrica (mm) e temperaturas (mínima e máxima) durante o ciclo do crambe.....	3
FIGURA 2. Esquema da área experimental: parcelas numeradas, suas dimensões e disposição dos tratamentos. Sendo: T1-0, T2-40, T3-80, T4-120 e T5-160 kg ha ⁻¹ de P ₂ O ₅ ; B: bloco.....	4
FIGURA 3. Análise de regressão para PMG (A), PROD (B) e REND (C).....	9

ARTIGO 2

Figura 1. Regressão para δ -Tocoferol. p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.....	24
Figura 2. Regressão para o ácido palmítoleico (C16:1). p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.	25
Figura 3. Regressão para β – Sitosterol (A) e Stigmasterol (B). p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.	27
Figura 4. Regressão para atividade antioxidante total. p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.	28
Figura 5. Regressão para carotenóides totais. p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.	29

ARTIGO 3

Fig. 1. Curva cinética experimental para a extração do óleo de crambe com CO ₂ supercrítico (20 MPa, 40 °C).....	43
Fig. 2. Curvas de oxidação do óleo de crambe no método não-isotérmico (DSC) a taxa de 10 °C min ⁻¹ , fluxo de O ₂ de 50 mL min ⁻¹ . T _{on} - temperatura de início, T _{p1} - primeiro pico, T _{p2} – segundo pico.	48

POTENCIAL PRODUTIVO DE CRAMBE EM RESPOSTA A ADUBAÇÃO FOSFATADA¹

RESUMO: O crambe destaca-se pela rusticidade, precocidade, potencial produtivo e teor de óleo. Porém, informações sobre o desenvolvimento da cultura frente aos níveis de adubação ainda são incipientes, principalmente em relação ao fósforo. O objetivo do estudo foi verificar o efeito da adubação fosfatada sobre parâmetros no período de pré-florescimento e pós-colheita da cultura do crambe. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco tratamentos (0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e quatro repetições. Utilizou-se o teste de Shapiro-Wilk, correlação de Pearson e análise de covariância a 5% de significância. A cultura do crambe responde à adubação fosfatada com relação aos teores foliares de nitrogênio e potássio, peso de mil grãos, produtividade de grãos e rendimento do óleo. Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre os parâmetros fósforo foliar, altura, massa seca e massa fresca no período de pré-florescimento, e sobre os parâmetros altura e número de cápsulas por planta na pós-colheita. A dose testada não foi suficiente para identificar o potencial máximo de produção de grãos e de óleo.

PALAVRAS-CHAVE: *Crambe abyssinica*, fósforo, oleaginosas, rendimento de óleo.

YIELD POTENTIAL OF CRAMBE IN RESPONSE TO PHOSPHORUS FERTILIZATION

ABSTRACT: The crambe stands out for rusticity, precocity, yield potential and grain oil content. However, the literature about the levels of fertilization of this crop is still incipient, especially regarding phosphorus. The objective of this work was to evaluate the effect of phosphorus fertilization on pre-flowering and post-harvest parameters of crambe culture. The experimental design was a randomized complete block design with five treatments (0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ of P₂O₅) and four repetitions. It was used Shapiro-Wilk test, Pearson's correlation and covariance analysis at 5% significance. The crambe crop responds to phosphorus fertilization for nitrogen and potassium foliar fertilization, to the weight of thousand grains and to the grain and oil yields. It was not significant effect of treatments on the parameters phosphorus foliar, plant height, fresh and dry weight in the pre-flowering, and on the parameters height and number of capsules in the post-harvest. The level tested was not sufficient to identify the maximum potential of grain and oil of the crop.

KEYWORDS: *Crambe abyssinica*, phosphorus, oilseed crops, oil yield.

INTRODUÇÃO

Com a redução de reservas de petróleo, alternativas produtivas vêm sendo desenvolvidas para sistemas viáveis economicamente, adequados e energeticamente equilibrados (EVANGELISTA et al., 2011). A cultura do crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) emerge como matéria-prima com grande potencial para a produção de biocombustíveis, além de atuar na rotação de culturas (JASPER et al., 2010; PITOL et al., 2010).

O crambe é uma oleaginosa da família *Brassicaceae*, originária do Mediterrâneo, adaptada ao clima frio e seco com potencial de produção de grãos entre 1.000 e 1.500 kg ha⁻¹ (SILVA et al., 2012). Seus grãos contêm entre 36 e 43% de óleo (ATABANI et al., 2013),

¹ Este artigo segue as normas da Revista Engenharia Agrícola.

mais elevado do que as principais oleaginosas cultivadas no país: soja e algodão (ROSCOE & DELMONTES, 2008).

O óleo de crambe possui características tecnológicas relevantes em relação aos óleos comestíveis como girassol, colza e soja (BONDIOLI et al., 1998) com aproximadamente 55% de ácido erúico (C22:1) e, por este motivo não pode ser utilizado para o consumo humano, pois este ácido está relacionado a lesões no coração (COLODETTI et al., 2012). Desta forma, este óleo não concorre com óleos destinados ao setor alimentício e permite não somente a produção de biodiesel, mas fins mais nobres, como lubrificante (CARLSSON, 2009; SHASHIDHARA & JAYARAM, 2010), poliéster, resinas alquídicas, aditivos para borracha, agentes tensoativos, novos tipos de nylon e outros polímeros (VARGAS-LOPEZ et al., 1999).

As pesquisas e produção comercial do *Crambe abyssinica* iniciaram nos anos 80 nos Estados Unidos, no Reino Unido, na Itália, na França, Portugal e vem se difundindo na Austrália, África do Sul, Paraguai e Brasil (PITOL et al., 2010). Neste contexto, o desenvolvimento e a estruturação da cadeia produtiva do crambe podem possibilitar inúmeros benefícios sociais, econômicos e ambientais para o Brasil (COLODETTI et al., 2012), em muitos segmentos industriais.

A produção de grãos e óleo de qualquer cultura é fortemente ligada ao seu estado nutricional. Dentre os nutrientes requeridos, o fósforo (P) interfere diretamente nos processos energéticos, compondo a molécula de adenosina trifosfato (ATP) e outras moléculas importantes na produção de ácidos graxos que irão compor óleos, proteínas e carboidratos (RAMOS et al., 2005; ROGÉRIO et al., 2013). O P tem ainda seu valor nutricional aumentado em regiões que apresentam baixo teor deste nutriente, decorrentes da predominância de acidez e altas taxas de adsorção, que induzem aplicação de altas doses para atingir níveis de produtividade adequados (CORREA et al., 2004).

Destacam-se estudos conduzidos com o objetivo de avaliar os efeitos de adubação fosfatada na produção de grãos e óleo de crambe: PITOL et al. (2010), FREITAS (2010), SILVA et al. (2011), ROGÉRIO et al. (2012), SORATTO et al. (2013) e VAZQUEZ et al. (2014). Porém, nenhum destes trabalhos observou o ponto máximo de produção de grãos e óleo em função da dose de P, sendo a maior dose avaliada a de 120 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Além disso, até o momento existem poucos estudos com o objetivo de avaliar o estado nutricional da planta e os parâmetros agrônômicos no período de pré-florescimento em conjunto com parâmetros produtivos, fatores de fundamental importância.

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros agrônômicos e nutricionais (pré-florescimento) e produtividade de grãos e rendimento de óleo (pós-colheita) do crambe submetido à adubação fosfatada com dose máxima de até 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅. Com isso, pretende-se contribuir com dados relevantes relacionados a adubação e adaptação da cultura, produtividade de grãos e rendimento de óleo.

MATERIAL E MÉTODOS

Localização e caracterização da área experimental

O experimento foi implantado no ano de 2013 em fazenda experimental localizada nas seguintes coordenadas geográficas: latitude 24° 43' 70" S e longitude 53° 46' 04" W, a 551 metros de altitude. De acordo com a classificação de Köppen, o clima local é subtropical úmido mesotérmico, com verões quentes e geadas pouco frequentes, com tendência de concentração das chuvas nos meses de verão, sem estação seca definida. O solo foi classificado como Latossolo Vermelho Distroférico típico (LVdf), textura muito argilosa, relevo suave ondulado, vegetação do tipo mata latifoliada subtropical (EMBRAPA, 2006).

Fatores climáticos e análise do solo

A Figura 1 apresenta os dados meteorológicos de precipitação pluviométrica e temperatura, bem como as fases de desenvolvimento e o período de coleta das amostras no período de ciclo do crambe.

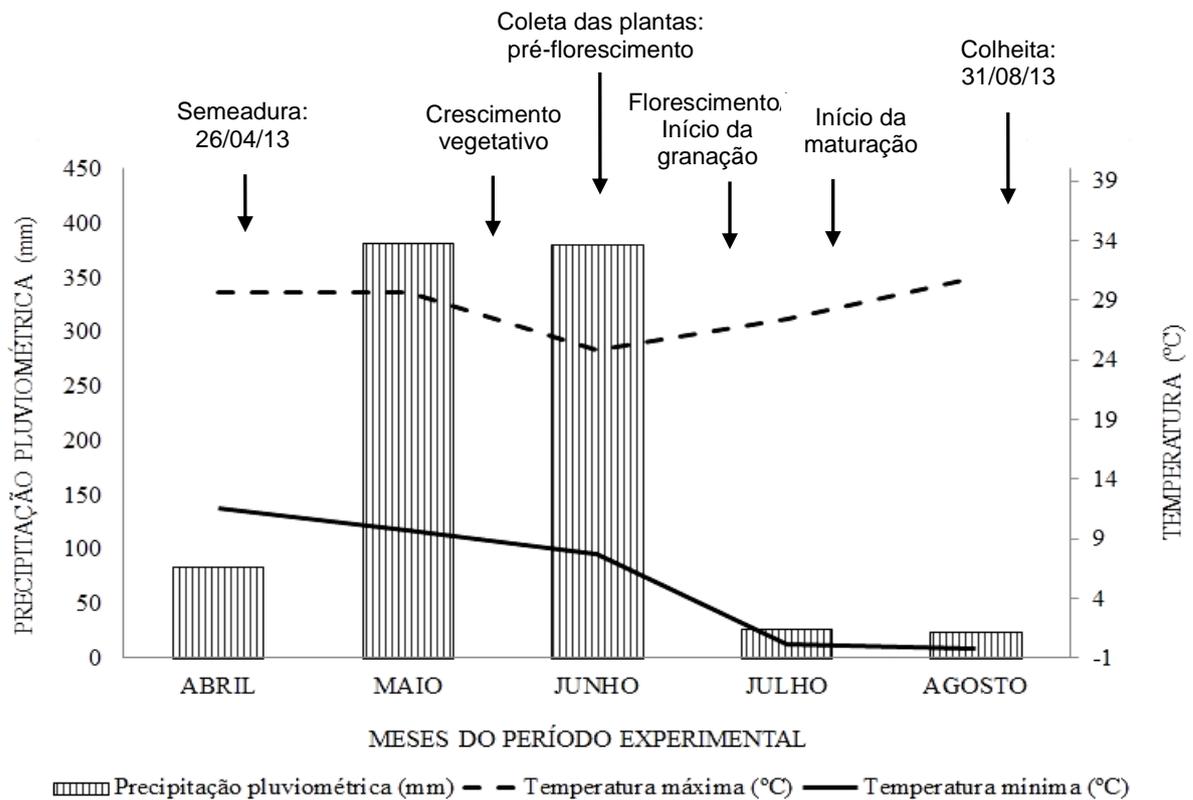


FIGURA 1. Precipitação pluviométrica (mm) e temperaturas (mínima e máxima) durante o ciclo do crambe

Previamente à implantação do experimento, foi realizada a coleta de amostras de solo no horizonte superficial, na profundidade de 0-0,2 m. As amostras foram secas ao ar, destorroadas, peneiradas, homogêneas, acondicionadas e enviadas para o laboratório. Os resultados estão apresentados pela Tabela 1.

TABELA 1. Resultados das análises de solo da área experimental (profundidade de 0-0,2 m)

pH	P	MO	Ca ²⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H ⁺ +Al ³⁺	CTC	SB	V	Al*
CaCl ₂	mg dm ⁻³	g dm ⁻³	-----cmol _c dm ⁻³ -----				-----			%	%
4,80	11,90	32,91	6,66	0,54	2,06	0,08	5,76	15,02	9,26	61,65	0,86

SB - Soma de bases; CTC - Capacidade de troca catiônica; V - Saturação por bases; Al* - Saturação por Al; MO - matéria orgânica. P e K⁺ - Mehlich 1; Ca²⁺, Mg²⁺ e Al³⁺ - KCl; C - Dicromato de sódio; pH - Cloreto de cálcio; H⁺+Al³⁺ - Tampão SMP (EMBRAPA, 2009).

Manejo, tratamentos e delineamento experimental

Antes da semeadura foi realizada a correção do solo com a aplicação de calcário (2 t ha⁻¹). Os tratamentos constituíram-se das doses de 0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅, sendo a fonte o superfosfato simples (20% de P₂O₅) aplicado em superfície a lanço. O experimento seguiu o delineamento em blocos casualizados (DBC), com cinco doses de fósforo (P) e quatro repetições, totalizando 20 parcelas de 24 m² (4 x 6 m). Na coleta das plantas, desprezou-se 0,5 m em cada extremidade das parcelas, obtendo-se uma área útil de 12,75m² em cada. A Figura 2 mostra o esquema da área experimental, bem como suas dimensões e disposição dos tratamentos.

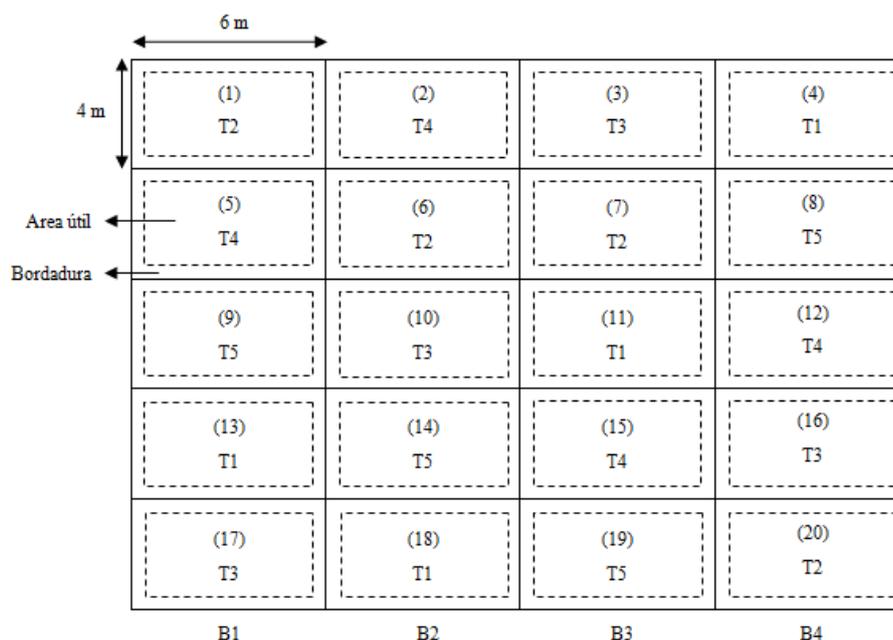


FIGURA 2. Esquema da área experimental: parcelas numeradas, suas dimensões e disposição dos tratamentos. Sendo: T1-0, T2-40, T3-80, T4-120 e T5-160 kg ha⁻¹ de P₂O₅; B: bloco

A adubação de base foi de 200 kg ha⁻¹ de N [(NH₄)₂SO₄] e 100 kg ha⁻¹ de K₂O (KCl) aplicada em superfície antes da semeadura. Utilizou-se o genótipo FMS-Brilhante semeado com semeadora de fluxo contínuo com 17 linhas, com densidade de 100 plantas m⁻², distância entre as linhas de 0,17 m, a 0,03 m de profundidade.

De acordo com BROCH & ROSCOE (2010), a adubação do crambe deve ser moderada, variando com a produtividade esperada, a exportação da cultura e a disponibilidade do nutriente no solo (10 a 20 Kg ha⁻¹ de N; 20 a 40 Kg ha⁻¹ de P₂O₅ e 15 a 20

Kg ha⁻¹ de K₂O). Levando-se em consideração a sugestão de recomendação de adubação da Fundação MS, as doses de N e K foram ampliadas com o objetivo de se obter um bom desenvolvimento da planta, uma maior produção e um ajuste mais preciso entre os macronutrientes.

Na definição das doses de P₂O₅ considerou-se os trabalhos de SILVA et al. (2011), ROGÉRIO et al. (2012, 2013) e VAZQUEZ et al. (2014), aumentando a dose máxima para 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅. De acordo com a Tabela 1, o teor de P (11,90 mg dm⁻³) pode ser classificado como alto (EMBRAPA, 1999). No entanto, não se pode afirmar que este nível seja elevado para o crambe, visto que não se tem informações concretas sobre a exportação de nutrientes e ainda não se tem recomendação de adubação (PITOL et al., 2010).

Parâmetros analisados no período do pré-florescimento

O período de pré-florescimento foi definido com base nos estudos de MAUAD et al. (2013) e SANTOS et al. (2013). Neste período, 50 dias após a semeadura, foram realizadas as seguintes determinações: altura por planta (ALT), massa fresca por planta (MF), massa seca por planta (MS) e teores de N, P e K na parte aérea (g kg⁻¹). Selecionou-se 20 plantas em cada parcela, de forma aleatória, para determinação de ALT com medição a partir da superfície do solo. Após esta determinação, estas plantas foram coletadas e levadas ao laboratório, pesadas para a determinação da MF e submetidas à secagem em estufa com ventilação forçada de ar a 65 °C, durante 72 h. Posteriormente, pesou-se as amostras para determinação de MS e, após moagem das folhas, foram realizadas análises foliares de N, P e K de acordo com metodologia de MALAVOLTA et al. (1997).

Parâmetros analisados após a colheita

No momento da colheita, selecionou-se aleatoriamente 20 plantas para determinação da altura final de planta (ALT2) com medição a partir da superfície do solo. As plantas foram debulhadas e, posteriormente, determinado o número de cápsulas por planta (NCP). O peso de mil grãos (PMG) foi realizado em triplicata. Após a debulha das plantas da área útil das parcelas, obteve-se a produtividade de grãos (PROD). O rendimento do óleo (REND) foi obtido utilizando-se os dados de PROD e a porcentagem de óleo obtida via extração Soxhlet com hexano (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008), a qual representa o teor de óleo nos grãos.

Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e, após, ao teste de correlação de Pearson, visto que todos os dados apresentaram normalidade e ausência de outliers, com o objetivo de verificar a correlação entre as doses de P e as variáveis.

Posteriormente, foi realizada a análise de covariância (ANCOVA). Todos os testes foram analisados a 5% de significância. A ANCOVA foi realizada para avaliar tanto a variável contínua (doses) e seu efeito linear e quadrático como a variável categórica (blocos) sobre as variáveis resposta. As variáveis independentes (doses) foram centradas para reduzir o efeito de multicolinearidade entre o tratamento com efeito linear e o tratamento com efeito quadrático. Para todos os testes utilizou-se o software Statistica 7. Nos dados de pré-florescimento, a variável MF foi retirada das análises, pois apresentou correlação positiva muito forte com a variável MS (0,96).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Correlação e análise de Covariância

Após constatação da normalidade dos dados, obteve-se a correlação de Pearson entre as doses de P e parâmetros determinados no pré-florescimento e pós-colheita (Tabela 2). Observa-se que existe correlação linear positiva significativa entre as doses de P e as variáveis K (pré-florescimento), PROD e REND (pós-colheita). A Tabela 3 apresenta os valores de F e p da análise de covariância para todos os parâmetros avaliados.

TABELA 2. Valores de correlação de Pearson entre as doses de P na adubação e as variáveis avaliadas

	N	P	K	ALT	MF	MS	ALT2	NCP	PMG	PROD	REND
Doses	0,18 ^{ns}	0,35 ^{ns}	0,58*	0,13 ^{ns}	0,34 ^{ns}	0,38 ^{ns}	0,36 ^{ns}	0,11 ^{ns}	0,44 ^{ns}	0,53*	0,44*

^{ns} não significativo; * significativo a 5% de probabilidade. Doses: doses de P na adubação – 0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ P₂O₅. Período de pré-florescimento - N: teor de nitrogênio foliar, P: teor de fósforo foliar, K: teor de potássio foliar, ALT: altura da planta, MF: massa fresca, MS: massa seca. Colheita - ALT2: altura da planta, NCP: número de cápsulas por planta, PMG: peso de mil grãos, PROD: produtividade de grãos, REND: rendimento de óleo.

TABELA 3. Valores de F e p da análise de covariância de parâmetros no pré-florescimento (N, P, K, ALT e MS) e na pós-colheita (ALT2, NCP, PMG, PROD, REND)

Fonte de Variação	GL	N		P		K		ALT		MS	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Linear	1	0,98	0,34	2,07	0,17	7,99	0,01*	0,25	0,62	2,61	0,13
Quadrático	1	6,42	0,02*	0,26	0,62	1,24	0,28	0,00	0,97	0,06	0,81
Bloco	3	2,72	0,08	0,15	0,93	0,12	0,95	0,15	0,93	0,59	0,63
Fonte de Variação	GL	ALT2		NCP		PMG		PROD		REND	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
Linear	1	2,31	0,15	0,17	0,69	4,58	0,05*	6,91	0,02*	4,40	0,05*
Quadrático	1	0,67	0,43	0,98	0,34	1,22	0,29	0,11	0,75	0,19	0,67
Bloco	3	0,41	0,75	0,13	0,94	1,33	0,30	1,29	0,32	1,22	0,34

* significativo a 5% de probabilidade; GL (Graus de liberdade); F calculado; p (probabilidade observada). N: teor de nitrogênio foliar, P: teor de fósforo foliar, K: teor de potássio foliar, ALT: altura da planta, MS: massa seca. ALT2: altura da planta, NCP: número de cápsulas por planta, PMG: peso de mil grãos, PROD: produtividade de grãos, REND: rendimento de óleo.

Pré-florescimento

Observa-se na Tabela 3 que modelos linear e quadrático foram significativos apenas

para K e N nas folhas de crambe, em relação às doses de P, respectivamente. Também verifica-se que os blocos não influenciaram significativamente qualquer parâmetro no pré-florescimento.

GRANT et al. (2001) afirmam que o P desempenha um papel importante na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese. Além disso, a adubação fosfatada em quantidades adequadas estimula o desenvolvimento radicular e o florescimento, atua na formação das sementes, aumenta a resistência ao frio e a produtividade (MALAVOLTA, 1989). De acordo com VIANA et al. (2013), os macronutrientes atuam em conjunto no desenvolvimento da planta e o P aumenta a absorção de nutrientes, especialmente a absorção do nitrogênio (NOVAIS & SMYTH, 1999).

Além disso, LIMA et al. (2011), ao avaliar o efeito de superfosfato simples sobre o crescimento e o teor de macronutrientes na parte aérea de pinhão manso, afirmam que o P melhora a capacidade fotossintética e a absorção de água e nutrientes das plantas, concluindo em seu estudo que a adição de P propiciou aumento dos teores de N e K no tecido vegetal. Este aumento do N foi provavelmente devido à maior quantidade de raízes e pela importância do P na fisiologia da planta, que está relacionado com a absorção e a assimilação do nitrogênio. Os fatores citados anteriormente podem estar envolvidos e podem ter contribuído para a absorção de N e K pelo crambe. Desta forma, o suprimento de P à planta pode ter atuado em seu estado nutricional de forma benéfica para que o N e o K fossem absorvidos de forma significativa.

Observa-se ainda na Tabela 3 que as doses de P não influenciaram significativamente os parâmetros P foliar, ALT e MS. Em relação aos parâmetros ALT e MS, pode-se atribuir estes resultados ao teor inicial de P no solo (BROCH & ROSCOE, 2010), o qual pode ser considerado alto (EMBRAPA, 1999).

No que diz respeito ao parâmetro fósforo foliar, de acordo com MALAVOLTA et al. (1997), o P é um elemento fundamental que participa das reações bioquímicas vitais, incluindo a síntese de proteínas, açúcares e óleos. ORLOVIUS (2003), em estudos relacionados com produtividade e qualidade de colza, da mesma família do crambe, afirma que a maior parte do P absorvido pela planta está presente nos grãos, como também reportado por MAUAD et al. (2013), em que o acúmulo de P foi obtido na fase de enchimento de grãos de crambe. Estes fatores podem explicar o fato do teor de P na folha não ter sido influenciado pelas doses de P aplicadas na adubação.

MAUAD et al. (2013), determinando acúmulo de macronutrientes na parte aérea das plantas de crambe, observaram que até o florescimento (42 dias após a emergência) obteve-se a seguinte ordem, em relação ao teor de macronutrientes nas folhas: N>Ca>Mg>S>P>K, o que corrobora com a ordem encontrada no presente trabalho para N, P e K foliares (N>P>K), com médias de 12,04, 0,16 e 1,02 x 10⁻³ g Kg⁻¹, respectivamente.

Colheita

Observa-se na Tabela 3 que os parâmetros ALT2 e NCP não foram influenciados pelos tratamentos. O fósforo absorvido durante as fases mais avançadas da planta participa efetivamente do enchimento dos grãos e da formação do óleo (HELDT, 2005; MAUAD et al., 2013), o que explica a ALT2 não ter sido influenciada pelas doses. Em relação aos resultados para NCP, este fato pode estar relacionado às condições climáticas no período experimental, no qual a ocorrência de baixas temperaturas e geadas durante o florescimento e início da granação (Figura 1) pode ter ocasionado abortamento dos grãos.

Verifica-se ainda, com a Tabela 3, que modelos lineares são ajustados ao nível de 5% para PMG, PROD e REND. As regressões significativas podem ser observadas na Figura 3.

O modelo linear encontrado neste trabalho para PMG teve o mesmo comportamento do observado por SILVA et al. (2011), que obtiveram valores variando entre 6,5 e 7,5 g com influência significativa das doses de P. Este fato pode ser devido à participação do P em muitos processos de desenvolvimento da planta, conforme explanado anteriormente. Mesmo com este comportamento frente às doses de P, os resultados encontrados neste trabalho variaram de 3,8 até 5,1 g (Figura 3A), inferiores aos encontrados por FREITAS (2010) (6,7 g), SORATTO et al. (2013) (6,8-9,3 g) e VAZQUEZ et al. (2014) (6,2 g) e superiores ao trabalho de ROGÉRIO et al. (2012) (2,3 g). Isto pode ter ocorrido devido às condições climáticas durante o enchimento e maturação dos grãos, durante os quais ocorreram geadas e temperaturas negativas (Figura 1).

FONTANA et al. (1998), em experimentos com crambe, afirmam que o peso de mil grãos é geralmente considerado como um componente de produtividade, mas não teve uma correlação direta em virtude das condições climáticas que podem afetar o desenvolvimento da cultura. Portanto, na análise dos resultados de PROD e REND aqui apresentados, tais condições devem ser consideradas.

Destacam-se os trabalhos de VAZQUEZ et al. (2014), que encontraram média de produtividade de 1.340 kg ha⁻¹, trabalhando com adubação fosfatada no crambe; SORATTO et al. (2013), que utilizaram NPK na cultura do crambe, obtendo-se produtividade variando de 539 a 2.209 kg ha⁻¹; ROGÉRIO et al. (2012), que aplicaram doses de P₂O₅ de 0 a 90 kg ha⁻¹, verificando um incremento significativo na produtividade (600-1600 kg ha⁻¹); ROGÉRIO et al. (2013), os quais avaliaram doses de P₂O₅ de 0 a 90 kg ha⁻¹, observando maior rendimento de grãos (290-1.225 kg ha⁻¹); e SILVA et al. (2011), que obtiveram 1.860 e 1.770 kg ha⁻¹ com doses de 120 kg ha⁻¹ de P. Neste trabalho encontrou-se valores entre 392 e 803 kg ha⁻¹ (Figura 3B), próximos aos valores encontrados por ROGÉRIO et al. (2013) e SORATTO et al. (2013).

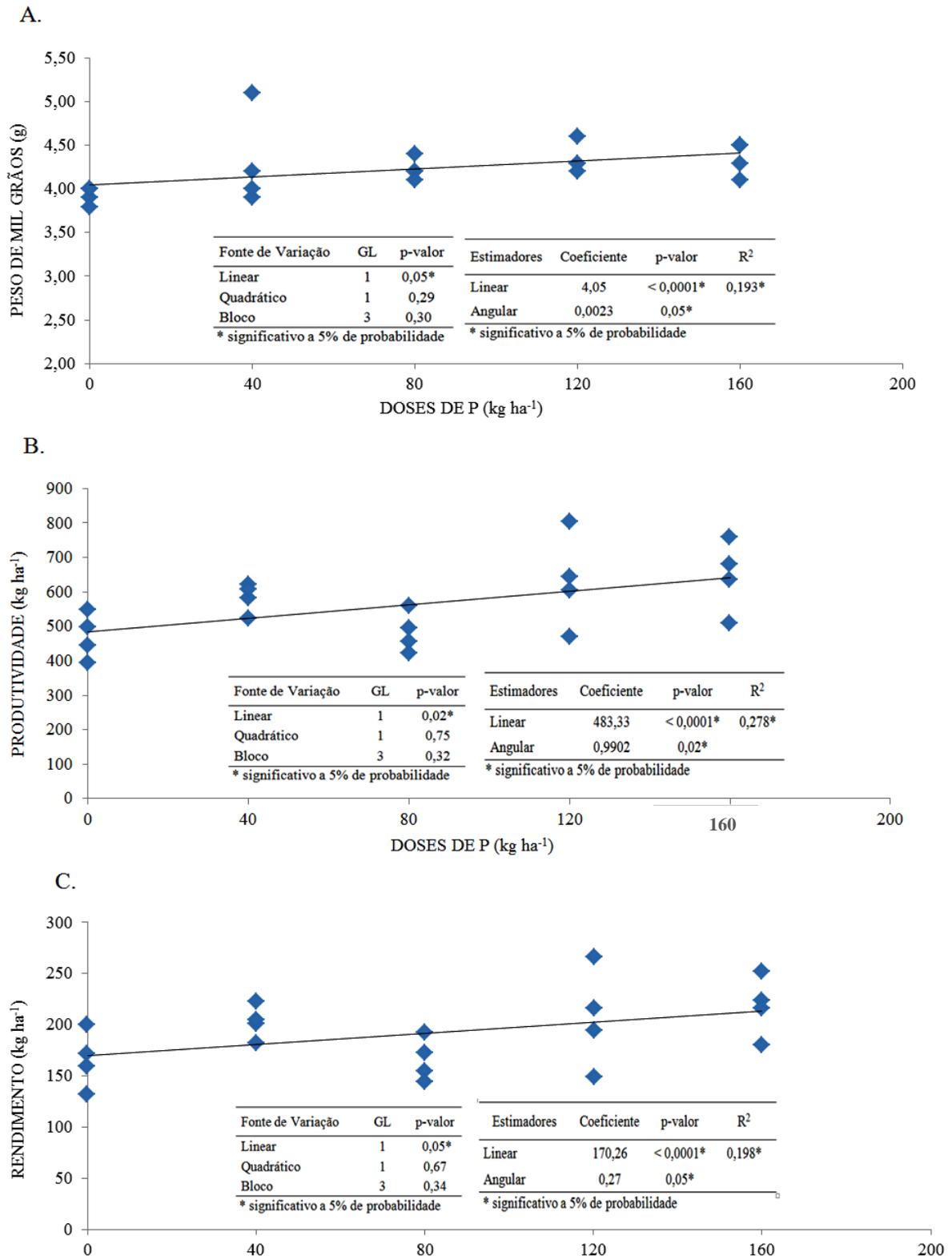


FIGURA 3. Análise de regressão para PMG (A), PROD (B) e REND (C)

Diante disso, pode-se atribuir que os resultados de produtividade aqui encontrados são inferiores à capacidade da cultura ($1.000-1.500 \text{ kg ha}^{-1}$) (ROSCOE & DELMONTES, 2008; SILVA et al., 2012) e aos encontrados na literatura, devido às condições climáticas no

período de cultivo. SANTOS et al. (2013) justificam a baixa produtividade de crambe devido às baixas temperaturas e geadas.

Observa-se que o rendimento de óleo (REND) encontrado neste estudo foi influenciado pelas doses de P variando entre 132 e 265 kg ha⁻¹ (Figura 3C). ROGÉRIO et al. (2013) verificaram que as doses de P (0, 15, 30, 60 e 90 kg ha⁻¹) induziram o aumento de rendimento de 350 kg ha⁻¹ a 600 kg ha⁻¹ relacionados, respectivamente, à testemunha e à maior dose. SANTOS et al. (2013) encontraram rendimento em torno de 300 kg ha⁻¹, sem influência do fósforo.

De acordo com MAIA (1998), o P faz parte de estruturas químicas como o DNA, o RNA e as moléculas intermediárias do metabolismo secundário, sendo sua presença ligada à disponibilidade de energia química (MALAVOLTA et al., 1997). Participa de importantes reações fisiológicas, com destaque aos processos ligados ao fluxo de energia e produtos armazenados em sementes, como, por exemplo, o óleo (MALAVOLTA et al., 1997; CRUSCIOL et al., 2008), sendo crucial na síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, na qual a reação inicial de síntese consome ATP (HELDT, 2005). Estes fatores ajudam a explicar o aumento de PROD e REND nas taxas mais elevadas de P neste estudo (Figuras 3B e 3C).

Os resultados de REND encontrados no presente estudo apresentam-se inferiores à capacidade de produção de óleo da cultura que, de acordo com ROSCOE & DELMONTES (2008), é em média 400 kg ha⁻¹ e também inferiores em relação aos trabalhos citados. Valores abaixo da capacidade de produção de óleo foram observados por ROGÉRIO et al. (2013), os quais atribuíram estes resultados à ocorrência de temperaturas abaixo de zero durante o cultivo.

Portanto, pode-se atribuir os resultados de PROD e REND aqui apresentados à capacidade da cultura frente às condições edafoclimáticas encontradas como: excesso de umidade e chuva com precipitação acumulada de 895,3 mm durante o período experimental, como reportado por FALASCA et al. (2010) e PITOL et al. (2010). A necessidade total da cultura varia entre 150 e 200 mm de água (ROSCOE et al., 2010); temperaturas abaixo de zero nas fases de florescimento e granação, com períodos de geada também observado por VIANA et al. (2013); altas temperaturas na fase de crescimento vegetativo, com temperaturas ultrapassando 25 °C, discutidos por JOHNSON et al. (1995); e perda de grãos durante a colheita da cultura devido ao estágio avançado de maturação.

LUNELLI et al. (2013), avaliando a produtividade de grãos e o rendimento de óleo de crambe sob diferentes arranjos nutricionais de NPK, afirmam que o rendimento do óleo está mais associado com a qualidade do que com a quantidade de grãos durante o cultivo. De acordo com ROSCOE & DELMONTES (2008), o crambe possui em torno de 38% de óleo. No presente estudo, o teor foi de 33,9% na dose de 160 Kg ha⁻¹ de P₂O₅, corroborando com FONTANA et al. (1998), em que a baixa produtividade não afetou o teor de óleo no grão.

SILVA et al. (2011), trabalhando com doses de P_2O_5 (0-120 kg ha⁻¹), observaram um teor de 35% referente à dose mais elevada. FREITAS (2010) verificou que os teores foram de 29,8% e 31,1% na dose de 60 kg ha⁻¹ de P_2O_5 , nos dois anos de cultivo. VAZQUEZ et al. (2014), trabalhando com doses de P nos níveis de 0, 25, 50, 75 e 100 kg ha⁻¹, obtiveram teor médio de óleo de 30,22%, e Soratto et al. (2013) obtiveram 36% de óleo com 300 kg ha⁻¹ de NPK. Diante de exposto, pode-se afirmar que mesmo com a produtividade de grãos e o rendimento de óleo inferiores aos reportados na literatura, atribuídos aqui às condições climáticas, o teor de óleo no grão não foi afetado, provavelmente devido aos fatores já citados anteriormente, relacionados à síntese de ácidos graxos e triglicerídeos, os quais dependem do P.

CONCLUSÕES

A cultura do crambe responde positivamente à adubação fosfatada com relação aos teores foliares de N e K, peso de mil grãos, produtividade de grãos e rendimento do óleo até a dose de 160 Kg ha⁻¹ de P_2O_5 . Não houve efeito significativo dos tratamentos sobre os parâmetros P foliar, altura, massa seca e massa fresca no período de pré-florescimento e sobre os parâmetros altura e número de cápsulas por planta após a colheita. Por meio destes resultados observa-se que a dose máxima de fósforo não foi suficiente para identificar o potencial máximo da cultura, sendo, portanto, ainda uma lacuna a ser preenchida na literatura.

REFERÊNCIAS

- ATABANI, A.E.; SILITONGAA, A.S.; ONGA, H.C.; MAHLIAC, T.M.I.; MASJUKIA, H.H.; BADRUDDINA, I.A.; FAYAZA, H. Non-edible vegetable oils: a critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. **Renewable & Sustainable Energy Reviews**, v. 18, p. 211–245. 2013.
- BONDIOLI, P.; FOLEGATTI, L.; LAZZERI, L.; PALMIERI, S. Native *Crambe abyssinica* oil and its derivatives as renewable lubricants: an approach to improve its quality by chemical and biotechnological processes. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p. 231–238. 1998.
- BROCH, D.L.; ROSCOE, R. **Fertilidade do solo, adubação e nutrição do crambe**. In: PITOL, C.; BROCH, D.L.; ROSCOE, R. Tecnologia e produção: crambe 2010. Maracajú: Fundação MS, 2010. Cap.4, p. 22-36.
- CARLSSON, A.S. Plant oils as feedstock alternatives to petroleum – A short survey of potential oil crop platforms. **Biochimie**, v. 91, p. 665-670. 2009.
- COLODETTI, T.V.; MARTINS, L.D.; RODRIGUES, W.M.; BRINATE, S.V.B.; TOMAZ, M.A. Crambe: aspectos gerais da produção agrícola. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 258-269. 2012.

CORREA, J.C.; MAUAD, M.; ROSOLEM, C.A. Fósforo no solo e desenvolvimento de soja influenciado pela adubação fosfatada e cobertura vegetal. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 1231-1237. 2004.

CRUSCIOL, C.A.C.; MORO, E.; LIMA, E.V.; ANDREOTTI, M. Taxa de liberação e de decomposição de aveia preta em plantio direto. **Bragantia**, v. 76, p. 481-489. 2008.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília, 1999, 412p.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de classificação de solos**. 2.ed. Rio de Janeiro, 2006. 306p.

EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes**. 2.ed. Brasília, 2009, 627p.

EVANGELISTA, A.W.P.; MELO, P.C.; OLIVEIRA, E.L.; FARIA, M.A. Produtividade e rendimento de sementes de pinhão-manso submetido à irrigação e adubação com OMM-Tech. **Engenharia Agrícola**, vol.31, n.2, p. 315-323. 2011.

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**, v. 35, p. 5808-5812. 2010.

FONTANA, F.; LAZZERI, L.; MALAGUTI, L.; GALLETI, S. Agronomic characterization of some *Crambe abyssinica* genotypes in a locality of the Po Valley. **European Journal of Agronomy**, v.9, n.2, p.117-126. 1998.

FREITAS, M. E. **Comportamento agrônomo da cultura do Crambe (*Crambe abyssinica* hoechst) em Função do manejo empregado**. 2010. 42f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

GRANT, C.A.; PLATEN, D.N.; TOMAZIEWICZ, D.J.; SHEPPARD, S.C. A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Informações Agronômicas**, Piracicaba, n. 95. 2001.

HELDT, H. W. **Plant biochemistry**. 3. ed. Elsevier Academic Press, 2005. 629 p.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 1.ed. digital. São Paulo, 2008. 1020p.

JASPER, P.A.; BIAGGIONI, M.A.M, SILVA, P.R.A.; SEKI, A.S.; BUENO, C.O. Análise Energética da Cultura do Crambe (*Crambe abyssinica* Hochst) produzida em Plantio Direto. **Engenharia Agrícola Jaboticabal**, v. 30, n. 3, p. 395-403. 2010.

JOHNSON, B.G.; MCKAY, B.L.; SCHNEITER, K.R.; HANSON, A.A.; SCHATZ, B.K.. Influence of planting date on canola and crambe production. **Journal of Production Agriculture**, v. 8, n. 4, p. 594- 599. 1995.

LIMA, R.L.S.; SEVERINO, L.S.; GHEYI, H.R.; SOFIATTI, V.; ARRIEL, N.H.C. Efeito da adubação fosfatada sobre o crescimento e teor de macronutrientes de mudas de pinhão manso. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 4, p. 950-956. 2011.

LUNELLI, I.E.; SECCO, D.; MARINS, A.C.; ROSA, H.A.; SANTOS, R.F.; BORSOI, A.; VELOSO, G.; BARICCATTI, R.A.; SOUZA, S.N.M.; SILVA, T.R.B. Effects of nutritional arrangements of NPK on the yield of grains and Crambe oil cultivation. **African Journal of Agricultural Research**, v. 8, n. 18, p. 2048-2052. 2013.

- MAIA, N.B. **Efeito da nutrição mineral na qualidade do óleo essencial da menta (*Mentha arvensis*) Cultivada em solução nutritiva.** In: MING, L.C. Plantas medicinais aromática e condimentares: avanços na pesquisa agrônômica. Botucatu: UNESP. 1998. p. 81-96.
- MALAVOLTA, E. **Abc da adubação.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1989. 304p.
- MALAVOLTA, E.; VITTI, G.C., OLIVEIRA, S.A. **Avaliação do estado nutricional das plantas, princípios e aplicações.** 2.ed. Piracicaba: Potafos, 1997. 319p.
- MAUAD, M., GARCIA, R.A., VITORINO, A.C.T., SILVA, R.R.M.F., GARBIATE, M.V.; COELHO, L.C.F. Matéria seca e acúmulo de macronutrientes na parte aérea das plantas de Crambe. **Ciência Rural**, v. 43, n. 5, p. 771-778. 2013.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.J. **Fósforo em solos e planta em condições tropicais.** Viçosa, MG: UFV, 1999. 399 p.
- ORLOVIUS, K. Fertilizing for High Yield and Quality. Oilseed Rape. IPI Bulletin n. 16. **International Potash Institute.** Switzerland. 2003. Disponível em: <<http://www.ipipotash.org/udocs/No%2016%20Oilseed%20rape.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2014.
- PITOL, C.; BROCHI, D. L.; ROSCOE, R. **Tecnologia e produção: crambe 2010.** Maracajú: Fundação MS, 2010. 60p.
- RAMOS, S.J.; FERNANDES, L.A.; MARQUES, C.C.L.; SILVA, D.D.; PALMEIRA, C.M.; MARTINS, E.R. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.** v. 8, n. 1, p. 9-12. 2005.
- ROGÉRIO, F.; DOS SANTOS, J.I.; DA SILVA, T.R.B.; MIGLIAVACCA, R.A.; GOUVEIA, B.; BARBOSA, M.C. Efeito de doses de fósforo no desenvolvimento da cultura do crambe. **Bioscience Journal.** v. 28, p. 251-255. 2012.
- ROGÉRIO, F.; SILVA, T.R.B.; SANTOS, J.I.; POLETINE, J.P. Phosphorus fertilization influences grain yield and oil content in crambe. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 266– 268. 2013.
- ROSCOE, R.; DELMONTES, A.M.A. **Crambe é nova opção para biodiesel.** In: ROSCOE, R.; DELMONTES, A.M.A. **AGRIANUAL - Anuário da Agricultura Brasileira.** São Paulo: Instituto FNP, 2008. p. 40-41.
- ROSCOE, R.; PITOL, C.; BROCH, D. L. **Necessidades climáticas e ciclo cultural.** In: **Tecnologia e produção: crambe 2010.** Maracajú: Fundação MS, 2010. P. 07-09.
- SANTOS, J.I.; SILVA, T.R.B.; ROGÉRIO, F.; SANTOS, R.F.; SECCO, D. Yield response in crambe to potassium fertilizer. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 297– 300. 2013.
- SHASHIDHARA, Y.M.; JAYARAM, S.R. Vegetable oils as a potential cutting fluid - An evolution. **Tribology International**, v.43, p. 1073–1081. 2010.
- SILVA, T.R.B., LAVAGNOLLI, R.F., NOLLA, A. Zinc and phosphorus fertilization of crambe (*Crambe abyssinica* Hoehst). **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 9, p. 264-267. 2011.
- SILVA, T.R.B.; REIS, A.C.S.; MACIEL, C.D.G. Relationship between chlorophyll meter readings and total N in crambe leaves as affected by nitrogen topdressing. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 135– 138. 2012.

SORATTO, R.P.; SOUZA-SCHLICK, G.D.; FERNANDES, A.M.; SOUZA, E.F.C. Effect of fertilization at sowing on nutrition and yield of crambe in second season. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, p. 658-666. 2013.

VARGAS-LOPEZ, J.M.; WIESENBORN, D.; TOSTENSON, K.; CIHACEK, L. Processing of crambe for oil and isolation of erucic acid. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 76, p. 801–809. 1999.

VAZQUEZ, G.H.; LAZARINI, E.; CAMARGO, F.P.; FERREIRA, R. B.; PERES, A.R. Produtividade, qualidade fisiológica e composição química de sementes de crambe em diferentes doses de fósforo. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3, p. 707-714. 2014.

VIANA, O.H.; BORSOI, A.; SANTOS, R.F.; SANDERSON, K. Productivity in relation to spatial arrangement and fertilization in the culture of *Crambe abyssinica* Hochst. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 11, n. 2, p. 721-723. 2013.

COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS, ANTIOXIDANTES E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO DE *CRAMBE ABYSSINICA* H. CULTIVADO COM DIFERENTES DOSES DE FÓSFORO²

RESUMO

Estudos com avaliação do efeito do fósforo na adubação sobre a qualidade de óleos vegetais de forma completa ainda são incipientes, principalmente, em relação ao óleo de crambe, bem como investigação das concentrações de carotenóides, clorofilas, compostos fenólicos e atividade antioxidante total neste óleo. O objetivo do estudo foi determinar a composição de ácidos graxos, tocoferóis, fitosteróis, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante total, clorofila *a*, carotenóides totais, teor de água e índice de acidez do óleo de crambe extraído com hexano e correlacionar os principais parâmetros ao manejo da cultura. O delineamento experimental foi em blocos casualizados com cinco tratamentos (0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e quatro repetições. Utilizou-se o teste de correlação de Pearson e análise de covariância a 5% de significância. Foram determinados o teor médio de água (0,89%) e o índice médio de acidez (2,26%) no óleo. Verificou-se associação positiva das doses de P com os teores totais de fitosteróis e carotenóides, porém negativa com a atividade antioxidante total. Tocoferóis totais, ácidos graxos totais, compostos fenólicos totais e clorofila *a* não foram afetados pelas doses aplicadas. Quando analisada a correlação das doses com as concentrações de tocoferóis, ácidos graxos e fitosteróis de forma individual, observou-se que o δ -tocoferol foi influenciado pelas mesmas, reduzindo sua concentração de forma linear, o ácido palmitoleico (C16:1) teve associação linear positiva e os três fitosteróis (β -sitosterol, stigmasterol e campesterol) também foram associados de forma positiva com comportamento linear para stigmasterol e quadrático para β -sitosterol. O campesterol foi quantificado apenas com dose de 160 kg ha⁻¹ de P₂O₅. O teor de água e o índice de acidez do óleo corroboraram com os encontrados na literatura. Os δ -tocoferol, ácido palmitoleico, fitosteróis, carotenóides totais e a atividade antioxidante total foram afetados pelos tratamentos com P, indicando aumento significativo das concentrações de alguns antioxidantes neste óleo quando realizada a adubação fosfatada. Os demais tocoferóis e ácidos graxos, clorofila *a* e compostos fenólicos totais não foram afetados pelos tratamentos.

PALAVRAS-CHAVE: Crambe, adubação fosfatada, tocoferóis, fitosteróis, carotenóides, clorofila.

FATTY ACIDS COMPOSITION, ANTIOXIDANTS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *CRAMBE ABYSSINICA* H. OIL CROPPED WITH DIFFERENT PHOSPHOROUS DOSES

ABSTRACT

Studies to evaluate the phosphorus fertilizer effect on the vegetable oils quality are still incipient, especially regarding crambe oil, as well as investigations of concentrations of carotenoids, chlorophylls, phenolics and total antioxidant activity in this oil. The aim of this study was to determine the fatty acids composition, tocopherols, phytosterols, total phenolic

² Este artigo segue as normas do Journal of the Science of Food and Agriculture.

compounds, total antioxidant activity, chlorophyll *a*, total carotenoids, water content and oil acid index of crambe oil extracted with hexane and correlate this with the main parameters with crop management. The experiment was carried out through randomized blocks with five treatments (0, 40, 80, 120 e 160 kg ha⁻¹ of P₂O₅) and four repetitions. The Pearson correlation test and analysis of covariance was used at 5% significance level. The water content (0.89%) and the average acid index (2.26%) in oil were determined. The positive association of P doses with the total concentration of phytosterols and carotenoids was observed, but negative to the total antioxidant activity. Total tocopherols, total fatty acids, phenolic compounds and chlorophyll *a* were not affected by the doses applied. The correlation of dose with tocopherols, fatty acids and phytosterols concentration were analyzed individually, and it was observed that the δ -tocopherol was influenced by them, reducing their concentration linearly. Palmitoleic acid (C16:1) had positive linear association and the three phytosterols (β -sitosterol, stigmasterol and campesterol) were also positively associated with linear and quadratic behavior for stigmasterol to β -sitosterol. Campesterol was quantified only at 160 kg ha⁻¹ of P₂O₅ dose. The oil water content and acid index agreed those ones found by other studies. The δ -tocopherol, palmitoleic acid, phytosterols, carotenoids and total antioxidant activity were affected by the treatments with P, which indicates significant increase in concentrations of some antioxidants when phosphorus fertilization was applied. The other tocopherols and fatty acids, chlorophyll *a* and total phenolic compounds were not affected by treatments.

KEYWORDS: Crambe, phosphate fertilizer, tocopherols, phytosterols, carotenoids, chlorophyll.

INTRODUÇÃO

Os óleos vegetais são compostos por triglicerídeos (95-97%) e compostos minoritários, como ácidos graxos livres, diglicerídeos, compostos fenólicos, esteróis, tocoferóis e tocotrienóis, carotenóides, fosfolipídios, pigmentos e ácidos terpênicos. Alguns destes compostos podem atuar como antioxidantes, protegendo os óleos contra a ação de radicais livres que iniciam a peroxidação lipídica, principal forma de degradação dos óleos. O teor de água e a acidez também podem atuar na oxidação dos óleos vegetais.¹⁻⁴

A composição química dos óleos varia entre as espécies vegetais e as condições agronômicas e climáticas durante o cultivo, a qualidade das sementes, os processos de extração e refino do óleo também influenciam esta composição.^{2,5,6} Ryan *et al.*⁷ relatam que condições de processamento, cultivares, desenvolvimento, época e localização de plantio são importantes para maximizar o conteúdo de fitosteróis, esqualeno e tocoferóis em produtos de origem vegetal.

Os óleos de crambe, canola, amendoim e palma apresentam melhor resistência à oxidação do que os óleos de soja e girassol, devido à sua diferença de composição em relação aos ácidos graxos.⁶ Szydłowska-Czerniak *et al.*⁸ concluíram que os óleos de canola e girassol apresentaram maior atividade antioxidante que o óleo de milho e o azeite oliva, devido à presença de maiores concentrações de tocoferóis e compostos fenólicos. Os tocoferóis (α , β , γ e δ) juntamente com os tocotrienóis são denominados de forma genérica

“vitamina E”, diferindo um do outro com o número e a localização de grupos no anel cromanol.⁹

Dentre os fatores que afetam a composição dos óleos vegetais, a fertilidade do solo é um fator primordial.¹⁰ A planta necessita de elementos minerais essenciais, como o nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K), sendo o P o elemento mais prontamente redistribuído na planta.¹¹ O P é um dos nutrientes mais limitantes para as culturas, especialmente em solos tropicais, que apresentam baixo teor disponível e predominância de acidez.¹²

Estudos mostram que o P desempenha papel importante, direta ou indiretamente nos processos de síntese realizados pelas plantas (ácidos graxos, triglicerídeos, tocoferóis, fitosteróis e carotenóides).^{13,14} Grant *et al.*¹⁵ afirmam que o P atua na transferência de energia da célula, respiração e fotossíntese, participando das reações fisiológicas, com destaque aos processos ligados ao fluxo de energia e produtos armazenados em grãos. Malavolta *et al.*¹¹ reportam que isto é devido ao fosfato absorvido pelas plantas durante o seu desenvolvimento, ser incorporado via assimilação durante a formação da adenosina trifosfato (ATP), sendo esta a molécula de energia da célula. Estudos apontam que a composição das sementes e do óleo de soja pode variar com a adubação fosfatada.¹⁶⁻¹⁸

A cultura do *Crambe abyssinica* (crambe) tem se destacado, pois, além de elevada quantidade de óleo (30-45%), este apresenta alta estabilidade oxidativa. O óleo não é comestível devido à alta concentração de ácido erúcido (55%),^{6,19,20} apresentando vantagens para a produção de biodiesel e outras destinações como, por exemplo, a produção de lubrificante, inibidor de corrosão, borracha sintética, filmes plásticos, nylon e adesivos, entre outros.²¹⁻²³

A estabilidade do óleo de crambe se deve à sua constituição majoritária em ácidos graxos monoinsaturados: ácido erúcido (C22:1) (59-63%), palmitoléico (C16:1) (0,05-0,1%), oleico (C18:1) (15-20%), gadoléico (C20:1) (2,5-3,6%) e nervônico (C24:1) (1%), totalizando 77,55-87,7%, e também pela presença de tocoferóis e fitosteróis. Além disso, os compostos fenólicos (polifenóis, fenóis simples ou ácidos) que podem estar presentes neste óleo, são capazes de agir como antioxidantes.²⁴⁻²⁶

Em relação a esta cultura, destacam-se os trabalhos de Silva *et al.*,²⁷ Rogério *et al.*,²⁸ Santos *et al.*,²⁹ Lunelli *et al.*,³⁰ Rogério *et al.*,³¹ e Santos *et al.*³², que avaliaram o manejo e sua relação com o rendimento do óleo de crambe, além de outros parâmetros agrônômicos. Outros trabalhos determinaram também a composição da semente, a caracterização do óleo, a estabilidade oxidativa e a concentração de alguns antioxidantes. No entanto, poucos estudos determinaram a composição de ácidos graxos totais, tocoferóis e fitosteróis neste óleo.^{24,25,33,34}

Em relação à influência do P sobre a cultura do crambe, destacam-se os trabalhos de Silva *et al.*,²⁷ Rogério *et al.*,^{28,31} e Vazquez *et al.*³⁴ que avaliaram, além de outros

parâmetros, o teor de óleo no grão de crambe, com dose máxima de 120 Kg P ha⁻¹. Entretanto, diante da literatura pesquisada, não foram encontrados estudos com qualquer planta, com o objetivo de avaliar o efeito do P na adubação sobre a qualidade do óleo de forma completa. Além disso, não foram encontrados trabalhos que determinaram carotenóides, clorofilas, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante total no óleo de crambe.

Diante do exposto, o objetivo do estudo foi determinar a composição de ácidos graxos, tocoferóis, fitosteróis, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante total, clorofila *a*, carotenóides totais, teor de água e índice de acidez do óleo de crambe e verificar a influência das doses de P com dose máxima de 160 Kg P₂O₅ ha⁻¹ sobre os principais parâmetros.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo dos grãos e extração do óleo

Os grãos provenientes do experimento anterior (20 amostras – Artigo 1) foram limpos, secos e armazenados em frascos fechados, ao abrigo da luz. As cascas dos grãos foram removidas incidindo ar frio sobre o material após a quebra do mesmo em processador industrial. A moagem dos grãos sem casca foi em moinho refrigerado (20 °C). Padronizou-se o tamanho das partículas, utilizando-se granulometria menor ou igual a 1,18 mm (14 mesh).

Uma amostra deste material foi pesada (10 g) em papel filtro, o qual foi armazenado em cartucho de celulose e transferido para o extrator tipo Soxhlet por 8h com hexano entre 70 e 80 °C (adaptado de IAL³⁵). Posteriormente, o solvente foi rotaevaporado a 40 °C e os balões foram deixados em estufa a 70 °C por, no máximo, duas horas.³⁵ As extrações foram realizadas em triplicada e as amostras foram armazenadas a -20 °C em frasco âmbar até a realização das análises. O rendimento foi determinado como a razão da massa do óleo extraído em relação à massa inicial de grãos de crambe moído. O rendimento médio de todas as extrações foi 33,86%.

Teor de água no óleo

O teor de água no óleo foi realizado por gravimetria em estufa a 105 °C até peso constante. O cálculo foi realizado conforme a fórmula: % Teor de água (m/m) = (100 × N) / P, onde N é a perda de massa em g; P = n° de gramas da amostra³⁵. As análises foram realizadas em triplicata.

Índice de acidez

O índice de acidez foi determinado por método titulométrico. As amostras foram dissolvidas em éter-álcool (2:1) com NaOH 0,1 mol L⁻¹. O cálculo foi: % acidez em solução

molar (V/P) = $(V \times Fc) \times 100 / P$, onde V = nº de mL de NaOH na titulação, Fc = fator de correção do NaOH e P = nº de g da amostra³⁵. As análises foram realizadas em triplicata.

Tocoferóis

Os tocoferóis α , $\beta+\gamma$ e δ foram determinados com metodologia de Freitas *et al.*³⁶ A Cromatografia de fase reversa não distingue os isômeros β e γ ⁷ devido aos grupos substituintes no anel cromanol serem o H (hidrogênio) e o CH₃ (metil), mudando apenas suas posições.⁹ Desta forma, será apresentada a soma destes dois compostos ao longo do trabalho. Aproximadamente 20 mg do óleo foram dissolvidos em isopropanol, em triplicata, antes da injeção no cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-20AT com detector UV/VIS SPD-20A (Shimadzu). A coluna foi a C-18 (4,6 mm x 25 cm) com diâmetro de partícula de 5 μm . Loop de 20 μL e fase móvel metanol:água (96:4 v/v) com vazão de 1 mL min⁻¹ foram utilizados no modo isocrático. O comprimento de onda foi 292 nm e quantificação foi via padronização externa com curva padrão a partir de soluções estoques dos padrões com concentrações de 0,25 a 20 mg L⁻¹.

Ácidos graxos totais

A derivatização dos ácidos graxos foi realizada em triplicata de acordo com Maia e Rodriguez-Amaya.³⁷ Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados (injeção de 1,0 μL) em cromatógrafo gasoso Clarus 680 (PerkinElmer) equipado com coluna capilar de sílica fundida SP - 2330 (60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,20 μm de fase estacionária) e detector de ionização em chama. A velocidade de fluxo do gás foi 1,4 mL min⁻¹ (hidrogênio). A razão de divisão da amostra (split) foi 1:50. A temperatura da coluna foi 140 °C por 5 min, sendo elevada para 240 °C a taxa de 4 °C min⁻¹, permanecendo por 5 min. As temperaturas do injetor e detector foram 220 °C e 245 °C, respectivamente. Os ácidos graxos foram identificados com mistura padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos C4-C24 (Supelco). Utilizou-se a padronização interna para a quantificação dos ácidos graxos³⁸ com o padrão heptadecanoato de metila (C17:0) (Sigma-Aldrich) a 1,0 mg mL⁻¹.

Fitosteróis

Metodologias de Lechner *et al.*³⁹ e Garcia *et al.*⁴⁰ foram adaptadas visando a determinação de fitosteróis. Aproximadamente 20 mg de óleo dissolvidos em *n*-heptano em triplicata foram derivatizados com 20 μL de N,O-bis (trimetilsilil) trifluoro-acetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS) em piridina volátil. Adicionou-se 50 μL do padrão 5-alfa-colestano como padrão interno (50 mg L⁻¹) e a solução permaneceu por 1 h a 60 °C. A injeção foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GCMS – QP2010SE) da Shimadzu. A coluna capilar foi a RTX – 5MS nas seguintes condições:

injeção de 1,0 μL no modo split 1:10, temperatura inicial de 100 $^{\circ}\text{C}$, mantida por 6 min, aumentando até 230 $^{\circ}\text{C}$ à taxa de 5 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ e para 280 $^{\circ}\text{C}$ à 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, permanecendo por 15 min. A vazão do gás de arraste (hélio) foi de 1 mL min^{-1} . A temperatura do injetor e detector foi de 280 $^{\circ}\text{C}$. A identificação dos compostos foi realizada por comparação dos espectros de massa da biblioteca NIST 08 e também com espectros da literatura.^{41,42} Além da identificação descrita anteriormente, foi feita a quantificação dos compostos de acordo com Beveridge *et al.*⁴¹, incluindo-se o fator de resposta determinado experimentalmente com o padrão analítico β -sitosterol (Sigma-Aldrich).

Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais seguiu metodologia de Szydłowska-Czerniak *et al.*⁸ com modificações. Aproximadamente 500 mg de óleo foram dissolvidos em 1,5 mL de hexano, adicionou-se 3 mL de metanol e as amostras foram deixadas e repouso durante a noite. Os extratos metanólicos foram lavados com 2,5 mL de hexano, sendo retirada alíquota de 1,0 mL para a reação com o reagente Folin-Ciocalteu. Esta foi realizada de acordo com Haiyan *et al.*⁴³, utilizando o ácido gálico para a curva de calibração (5-75 mg L^{-1}). As análises foram realizadas em triplicata.

Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante equivalente ao Trolox foi realizada conforme a metodologia de Pellegrini *et al.*⁴⁴ em triplicata, modificando-se o solvente para a dissolução do óleo (isopropanol). Utilizou-se o Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico, Sigma-Aldrich) para a curva padrão (2-75 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e os resultados foram expressos em $\text{mmol trolox Kg}^{-1}$ de óleo.

Clorofila e carotenóides totais

Para as determinações de clorofila *a* e carotenóides totais adaptou-se metodologias de Dere *et al.*⁴⁵ e Aladic *et al.*⁴⁶ Aproximadamente 40 mg de óleo foram dissolvidos em éter etílico em triplicata e as absorbâncias foram medidas na faixa de 400-700 nm em espectrofotômetro UV/VIS. Clorofila *a* apresentou absorbância máxima em 660 nm, clorofila *b* não apresentou absorbância máxima e carotenóides entre 437 e 448 nm.

Análise estatística

Todos os resultados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk, apresentando normalidade e ausência de outliers e, após, ao teste de correlação de Pearson com objetivo de verificar a associação entre as doses de P e as variáveis determinadas. Inicialmente foi feita a correlação das doses com as concentrações totais de tocoferóis, ácidos graxos e fitosteróis. Para verificar a associação das doses com estes compostos de forma individual,

foi realizado o teste com concentrações de cada tocoferol, ácido graxo e fitosterol e também compostos fenólicos totais, atividade antioxidante total, clorofila *a* e carotenóides totais.

Posteriormente, foi realizada a análise de covariância (ANCOVA) a 5% de significância para todas as variáveis. A ANCOVA foi realizada para avaliar tanto a variável contínua (doses) e seu efeito linear e quadrático como a variável categórica (blocos) sobre as variáveis resposta. As variáveis independentes (doses) foram centradas para reduzir o efeito de multicolinearidade entre o tratamento com efeito linear e o tratamento com efeito quadrático. O software utilizado foi o Statistica 7.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teor de água e índice de acidez

No presente estudo o teor médio de água no óleo foi de $0,89\% \pm 1,64$, independentemente dos tratamentos, sendo superior ao valor encontrado por Jasper *et al.*⁴⁷, que foi de 0,08% no óleo de crambe. Silva *et al.*³ e Kaijser *et al.*⁴⁸ afirmam que, conforme o teor de água aumenta, a velocidade de oxidação também aumenta, favorecendo reações de oxidação enzimática e mobilização de metais de transição (pró-oxidantes). O índice médio de acidez, independentemente dos tratamentos, foi de $2,26\% \pm 0,34$, menor do que os valores encontrados por Osawa *et al.*⁴, com valores de até 3,3% trabalhando com diversos óleos brutos, e maior do que os valores encontrados por Jasper *et al.*⁴⁷ (1,83%) e Lalas *et al.*²⁴ (0,97%), ambos trabalhando com óleo de crambe. O índice de acidez varia conforme o estado e as condições de conservação do óleo,⁴⁹ aumentando quando ocorre a quebra da ligação éster do triglicerídeo pela ação de enzimas ou calor e umidade, liberando ácidos graxos e contribuindo para a aceleração do processo oxidativo.⁴

Parâmetros determinados no óleo de crambe em relação às doses de fósforo

Os resultados dos parâmetros determinados no óleo de crambe para cada dose de P aplicada na adubação e seus respectivos coeficientes de variação estão apresentados na Tabela 1.

Relações do P com óleo de Crambe

As doses de P no solo resultaram em associação positiva com fitosteróis totais e carotenóides totais, porém negativa com atividade antioxidante total. Tocoferóis totais, ácidos graxos totais, compostos fenólicos totais e clorofila *a* não foram afetados pelas doses aplicadas (Tabela 2).

A Tabela 3 apresenta as associações para as mesmas variáveis, mas de forma individual para os tocoferóis, ácidos graxos e fitosteróis. Estes dados mostram que há associação positiva entre as doses de P e ácido palmitoleico (C16:1), β – sitosterol,

stigmasterol e campesterol e associação negativa entre as doses e δ -tocoferol. Os demais tocoferóis e ácidos graxos não foram influenciados pelas doses aplicadas na adubação.

Tabela 1. Tocoferóis, ácidos graxos, fitosteróis, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante total, clorofila a e carotenóides totais do óleo de crambe para as doses de P.

Parâmetros	Doses de P (Kg P ₂ O ₅ ha ⁻¹)										
	0	CV %	40	CV %	80	CV %	120	CV %	160	CV %	
Tocoferóis (mg 100 g ⁻¹)	α -Tocoferol	1,86	18,14	1,89	20,16	2,48	16,09	1,85	22,47	2,21	4,99
	β + γ -Tocoferol	55,37	11,34	61,29	9,31	66,93	6,55	56,86	15,01	59,95	2,48
	δ -Tocoferol	5,68	14,04	4,98	8,53	5,83	21,35	5,19	16,79	3,86	12,51
Ácidos graxos (mg g ⁻¹)	Palmitico (C16:0)	22,36	6,98	22,87	3,01	23,51	2,56	23,29	3,73	23,37	1,80
	Palmitoleico (C16:1)	2,82	7,09	2,90	4,55	2,96	4,43	3,01	4,11	3,03	2,90
	Esteárico (C18:0)	10,83	9,52	11,86	2,54	11,61	1,18	11,15	2,98	11,75	2,21
	Oleico (C18:1)	154,21	8,64	164,98	3,09	160,90	1,86	159,42	3,55	161,38	2,23
	Linoleico (C18:2)	94,39	7,43	103,37	1,35	101,89	3,46	98,73	5,26	102,70	1,80
	Araquídico (C20:0)	11,94	16,67	13,70	8,06	12,12	5,10	11,79	8,39	12,56	2,44
	Gadoleico (C20:1)	60,02	9,69	64,84	0,73	63,82	3,69	64,17	3,75	64,87	1,80
	Linolênico (C18:3)	46,15	13,95	48,76	4,56	47,81	6,49	45,79	8,23	49,33	5,77
	NI1	13,37	12,52	15,65	6,65	14,29	5,92	14,21	7,93	14,27	0,66
	Eicosadienóico (C20:2)	3,01	12,92	3,44	6,87	3,34	4,50	3,17	7,69	3,32	3,85
	Behênico (C22:0)	20,70	18,06	21,87	12,77	19,61	5,72	19,02	11,52	19,90	3,64
	Erúcico (C22:1)	537,88	11,82	561,18	3,37	521,89	7,60	524,76	10,39	548,17	2,62
	NI2	5,58	14,15	6,51	9,60	6,14	5,55	5,87	10,02	5,87	3,41
	Lignocérico (C24: 0)	7,55	17,52	7,97	10,59	7,66	9,42	7,10	12,17	7,51	6,53
	Nervônico (C24:1)	11,61	13,62	13,56	10,05	12,07	8,35	11,62	14,18	12,18	4,59
	NI3	3,35	18,48	4,36	23,91	3,58	5,83	1,04	18,52	4,39	12,50
	Fitosteróis (mg 100 g ⁻¹)	β - Sitosterol	99,77	1,55	151,34	5,10	141,26	14,16	143,40	3,78	150,17
Stigmasterol		24,28	3,77	34,97	30,18	31,95	12,63	35,73	6,07	34,93	8,77
Campesterol		ND	-	ND	-	ND	-	ND	-	12,74	3,93
Fenólicos Totais (mg EAG Kg ⁻¹)	137,73	4,54	120,77	7,37	127,41	11,74	137,78	24,96	103,30	11,25	
Atividade Antioxidante (mmol trolox Kg ⁻¹)	4,59	4,41	4,65	6,62	4,31	2,72	4,20	5,43	4,22	5,16	
Clorofila a (mg Kg ⁻¹)	41,34	10,19	52,91	10,97	49,17	12,87	48,30	16,90	56,94	5,91	
Carotenóides totais (mg Kg ⁻¹)	163,94	5,89	180,20	5,21	181,76	5,74	186,59	5,16	191,01	5,91	

CV % - coeficiente de variação para as repetições no campo; EAG - equivalentes de ácido gálico. ND - detectado. Limite de detecção - 0,05 mg 100 g⁻¹ óleo; NI - ácido graxo não identificado.

Tabela 2. Correlação de Pearson para as concentrações totais das variáveis resposta em relação às doses de P na adubação.

Tratamentos	Parâmetros						
	Tocoferóis totais	Ácidos graxos totais	Fitosteróis totais	Fenólicos totais	Atividade antioxidante total	Clorofila a	Carotenóides totais
Doses P	0,03 ^{ns}	0,03 ^{ns}	0,71*	-0,36 ^{ns}	-0,62*	0,35 ^{ns}	0,67*

^{ns} não significativo; * significativo a 5% de probabilidade. Doses: doses de P na adubação (0, 40, 80, 120 e 160 kg P₂O₅ ha⁻¹).

Tabela 3. Correlação de Pearson para cada tocoferol, ácido graxo e fitosterol em relação às doses de P na adubação.

	Parâmetros	Doses de P
Tocoferóis	δ-Tocoferol	-0,52*
	β+γ-Tocoferol	0,10
	α-Tocoferol	0,27
Ácidos graxos totais	Ácido palmítico (C16:0)	0,39
	Ácido palmitoleico (C16:1)	0,53*
	Ácido esteárico (C18:0)	0,27
	Ácido oleico (C18:1)	0,17
	Ácido linoleico (C18:2)	0,34
	Ácido araquídico (C20:0)	-0,08
	Ácido gadoleico (C20:1)	0,40
	Ácido linolênico (C18:3)	0,08
	NI1	0,04
	Ácido Eicosadienóico (C20:2)	0,19
	Ácido behênico (C22:0)	-0,31
	Ácido erúcico (C22:1)	-0,17
	NI2	-0,08
	Ácido lignocérico (C24: 0)	-0,22
	Ácido nervônico (C24:1)	-0,16
NI3	-0,15	
Fitosteróis	β – Sitosterol	0,62*
	Stigmasterol	0,50*
	Campesterol	0,71*

NI: ácido graxo não identificado; *significativo a 5% de probabilidade. Doses: doses de P na adubação (0, 40, 80, 120 e 160 kg P₂O₅ ha⁻¹).

A Tabela 4 apresenta a análise de covariância para as variáveis que apresentaram relação significativa com as doses de P. As demais variáveis analisadas (α-tocoferol, β+γ-tocoferol, demais ácidos graxos, compostos fenólicos totais e clorofila a) não foram influenciadas pelas doses de P na adubação (p>0,05).

Tabela 4. Valores de F e p da análise de covariância para as variáveis associadas às doses de P aplicadas na adubação do crambe.

Fonte de Variação	GL	Variáveis															
		Ácido				β – Sitosterol				Stigmasterol		Campesterol		Atividade Antioxidante total		Carotenóides totais	
		δ – Tocoferol palmitoleico (C16:1)															
F	P	F	P	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p				
Linear	1	10,91	5x10 ^{-3*}	7,13	0,02*	13,28	2x10 ^{-3*}	5,67	0,03*	48,60	7x10 ^{-6*}	16,40	1,2x10 ^{-3*}	24,76	2x10 ^{-4*}		
Quadrático	1	2,07	0,17	0,33	0,58	6,58	0,02*	2,18	0,16	34,72	4x10 ^{-5*}	0,19	0,67	2,01	0,18		
Bloco	3	4,63	0,02*	1,23	0,34	0,11	0,95	0,38	0,77	9x10 ⁻³	1,00	4,07	0,03*	4,56	0,02*		

* significativo a 5% de probabilidade; GL (Graus de liberdade); F calculado; p (probabilidade observada).

Tocoferóis

A regressão significativa na ANCOVA (Tabela 4) está apresentada na Figura 1 para o δ-Tocoferol.

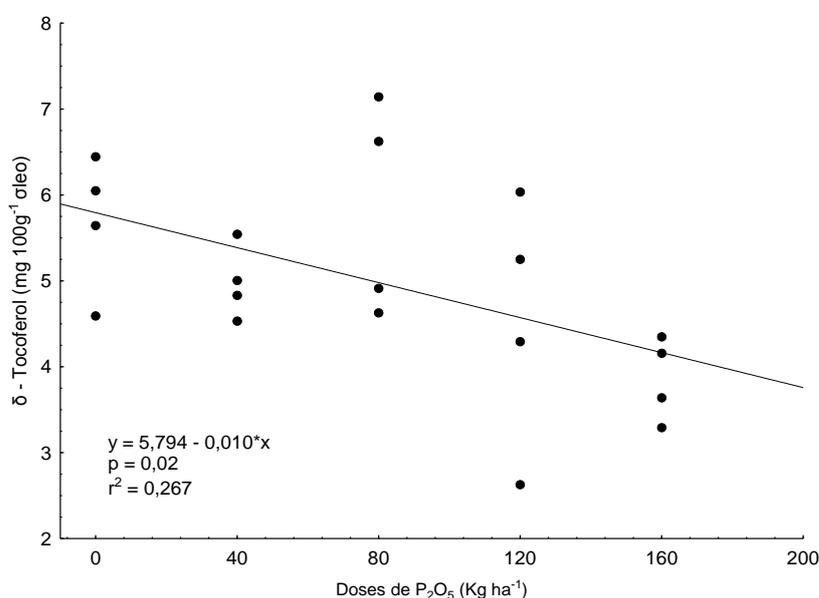


Figura 1. Regressão para δ-Tocoferol. p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.

A Figura 1 e a Tabela 4 mostram que o δ-tocoferol foi influenciado pelas doses de P, reduzindo sua concentração conforme as doses aumentam. No entanto, quando analisada a concentração total de tocoferóis (Tabela 2), observa-se que esta não é afetada pelos tratamentos. Lalas *et al.*²⁴ afirmam que estes compostos presentes no óleo de crambe podem atuar na sua proteção à oxidação durante o armazenamento e o processamento. Isto sugere que, mesmo um dos tocoferóis sendo afetado de forma negativa pelo P, de forma geral, sua ação antioxidante não seria afetada, devido à presença dos outros tocoferóis. Observa-se ainda, na tabela 4, que os blocos foram significativos para estes compostos. Este controle local foi utilizado devido ao histórico da área experimental, que pode ter composição, compactação e/ou declividade diferentes, impactando na composição do óleo.

Devido às suas propriedades antioxidantes, os tocoferóis inibem a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados e outros compostos, impedindo a rancidez durante o armazenamento e podem ser utilizado na indústria química como aditivo para alimentos e cosméticos.³⁶

Os tocoferóis são sintetizados pela via de biossíntese dos isoprenóides, sendo a unidade básica destes o isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP).¹³ Além disso, a eritrose-4-fosfato, o fosfoenolpiruvato e o ATP iniciam a síntese do 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato (EPSP) pela via biossintética do ácido chiquímico. A síntese dos tocoferóis também depende desta via metabólica¹⁴ e o P atua constituindo as moléculas envolvidas nas reações. Os resultados obtidos podem estar relacionados às interferências durante a produção destes compostos pela planta, devido às condições climáticas durante o período experimental, que apresentaram baixas temperaturas com períodos de geada.

Lalas *et al.*²⁴ encontraram 0,77; 12,50 e 0,39 mg 100g⁻¹ de α , $\beta+\gamma$ e δ - tocoferol no óleo de crambe extraído com hexano, inferiores aos encontrados no presente estudo que foram, em média, 2,06; 60,08 e 5,11 mg 100g⁻¹, respectivamente (Tabela 1). Santos *et al.*²⁵ encontraram 2,63; 138,59 e 22,19 mg 100g⁻¹ de α , $\beta+\gamma$ e δ - tocoferol em óleo de crambe também extraído com hexano, superiores aos encontrados neste estudo. Guinazi *et al.*⁹ encontraram 18,39; 5,16; 39,02 e 1,19 mg 100g⁻¹ de α , β , γ e δ - tocoferol em óleo de colza, também da família *Brassicaceae*.

Ácidos graxos totais

A regressão significativa na ANCOVA (Tabela 4) está apresentada na Figura 2 para o ácido palmitoleico.

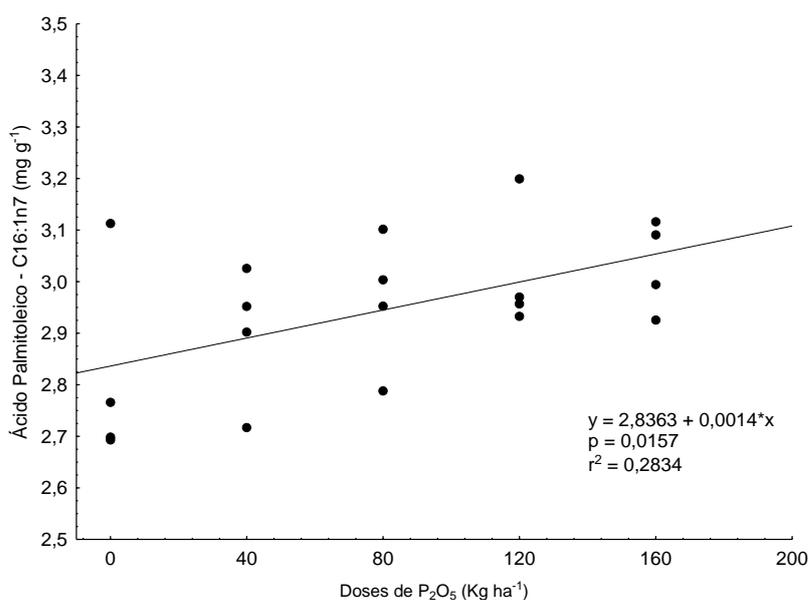


Figura 2. Regressão para o ácido palmitoleico (C16:1). p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.

O P participa da síntese de ácidos graxos como constituinte do ATP e da fosfatidilcolina (fosfolípido).¹⁴ Quando analisada a concentração total de ácidos graxos observa-se que a composição destes no óleo de crambe não está associada com doses de P (Tabela 2). No entanto, quando analisados estes compostos de forma individual, verifica-se que o ácido palmitoleico foi influenciado pelas doses e aumenta de forma linear com as mesmas (Tabela 4 e Figura 2).

O ATP é consumido durante a síntese de ácidos graxos, que se inicia com a carboxilação da acetil-CoA. A sequência desta reação é a ativação, condensação, redução, liberação de água e redução da dupla ligação da cadeia do ácido graxo, com alongação por átomos de carbono (C). Ocorrem mais alongações de cadeia, catalisadas pela ACP (coenzima ligada à proteína), até 16 C e 18 C. Posteriormente, o estearoil-ACP (C18:0) é dessaturado, formando o oleoil-ACP (C18:1). A formação destes compostos ocorre nos plastídios e, após, novamente o ATP é consumido para a liberação desses ácidos graxos para o citosol. Em todo o processo descrito o P participa efetivamente.¹⁴ Isto pode estar relacionado com o aumento da concentração do ácido palmitoleico no óleo neste estudo.

Considerando a composição de ácidos graxos apresentado na Tabela 1, observa-se que o óleo apresenta em torno de 93,45% de ácidos graxos insaturados. Destes, os majoritários são o ácido erúico (C22:1), com média de 54,44%, o ácido oleico (C18:1) com 16,02%, em média, e o linoleico (C18:2), com 10,02%, corroborando com os resultados reportados por Singh e Singh⁵⁰ e Onorevoli *et al.*³³ Além disso, em torno de 82,03% dos ácidos graxos insaturados são monoinsaturados e 7,34% do total de ácidos graxos são saturados. Estas características conferem ao óleo alta estabilidade à oxidação quando comparado, por exemplo, aos óleos de girassol, algodão, soja e babaçu⁶, visto que a taxa de oxidação aumenta exponencialmente com as duplas ligações do ácido graxo.⁵¹ Isto permite seu uso, por exemplo, na produção de biodiesel ou misturado ao diesel e/ou biodiesel provenientes de outros óleos vegetais, residuais ou gordura animal.⁴⁷

Fitosteróis

As regressões significativas na ANCOVA (Tabela 4) estão apresentadas na Figura 3 (β -Sitosterol e Stigmasterol).

A Tabela 4 e a Figura 3 mostram que concentração de stigmasterol apresentou comportamento linear (Figura 3B) e o β – sitosterol (Figura 3A) apresentou comportamento quadrático com ajuste polinomial. O campesterol somente foi detectado para a maior dose (160 Kg P₂O₅ ha⁻¹) (Tabela 1). O P atua na síntese do esqualeno, constituindo a molécula de farnesil pirofosfato (farnesil – PP), a qual inicia a reação. Após, ocorre a introdução do grupo hidroxila e a ciclização da cadeia do esqualeno, formando-se os fitosteróis.¹⁴ Phillips *et al.*⁵² reportam que a quantidade destes compostos é dependente de fatores como variedade, condições de cultivo, armazenamento e método de extração.

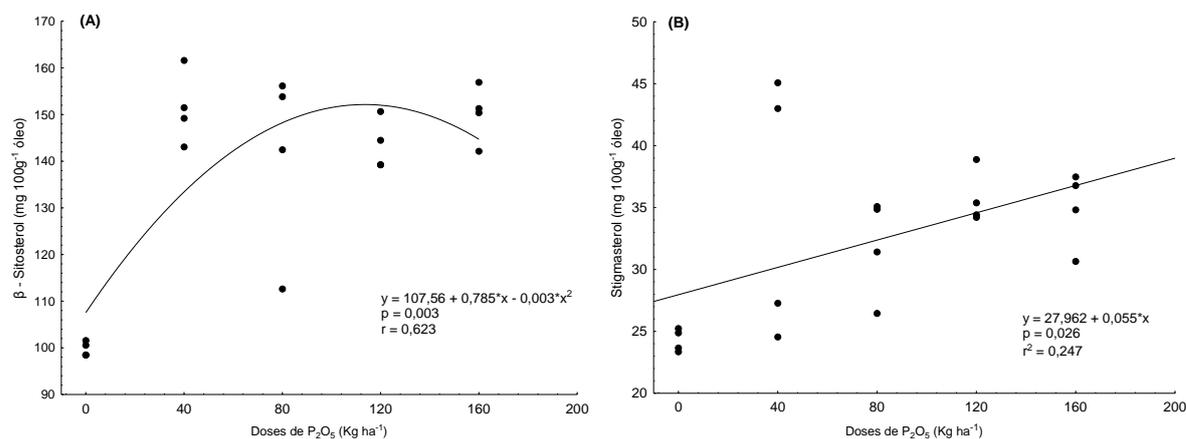


Figura 3. Regressão para β – Sitosterol (A) e Stigmasterol (B). p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.

Fitosteróis, principalmente o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol são componentes da membrana celular das plantas e são abundantes em óleos vegetais e grãos.⁷ No presente estudo os valores de β -sitosterol, stigmasterol e campesterol, quantificados para a dose de 160 Kg P₂O₅ ha⁻¹, foram 150,17; 34,93 e 12,74 mg 100g⁻¹ (Tabela 1). Santos *et al.*²⁵ encontraram 103,28 mg 100⁻¹ de β -sitosterol e 54,09 mg 100⁻¹ de campesterol. Lechner *et al.*³⁹ encontraram em média 232,8; 4,8 e 101,2 mg 100g⁻¹ de β -sitosterol, stigmasterol e campesterol, respectivamente, em óleo de crambe, muito similar ao comportamento apresentado pelo óleo de colza no mesmo estudo. Os estudos apresentados acima não avaliaram os efeitos da adubação sobre as características dos óleos analisados.

São encontradas na literatura afirmações sobre o poder antioxidante dos fitosteróis e sua atuação na proteção do óleo contra a oxidação.^{7,53-55} Estes compostos podem ser utilizados como matéria-prima para a síntese de hormônios, medicamentos, cosméticos e como aditivos em resinas termoplásticas na produção de materiais de borracha.⁴¹

Compostos fenólicos totais

Observa-se que os compostos fenólicos totais não foram afetados de forma significativa pelas doses de P (Tabela 2). Os compostos fenólicos, que podem ser polifenóis, fenóis simples ou ácidos, são capazes de agir como antioxidantes,²⁶ sendo pigmentos ou produtos do metabolismo secundário da planta em reações de defesa contra agressões do ambiente.⁵⁶

Os compostos fenólicos são importantes, pois além da questão nutricional, podem ter funções como antibióticos, pesticidas naturais, atraentes para polinizadores, na proteção contra radiação ultravioleta, manutenção das paredes celulares impermeáveis ao gás e à água e como material estrutural para proporcionar estabilidade às plantas.¹⁴ Não foram encontrados estudos que determinaram quais os compostos fenólicos presentes no óleo de

crambe. Tuberoso *et al.*⁵⁷ reportaram que, para o óleo de colza, não há evidências da presença de flavonóides, sendo encontrados os ácidos siríngico, ferúlico e sinápico. Para o óleo de crambe no presente estudo, encontrou-se 103,30-137,78 mg Kg⁻¹ de fenólicos totais (Tabela 1). Yang *et al.*⁵⁸ encontraram valores de 220-600 mg Kg⁻¹ em diferentes amostras de óleo de colza, e Szydłowska-Czerniak *et al.*⁸ encontraram 47 e 175 mg Kg⁻¹ em duas amostras de óleo desta planta.

Atividade antioxidante total

A regressão significativa na ANCOVA (Tabela 4) está apresentada na Figura 4 para a atividade antioxidante total.

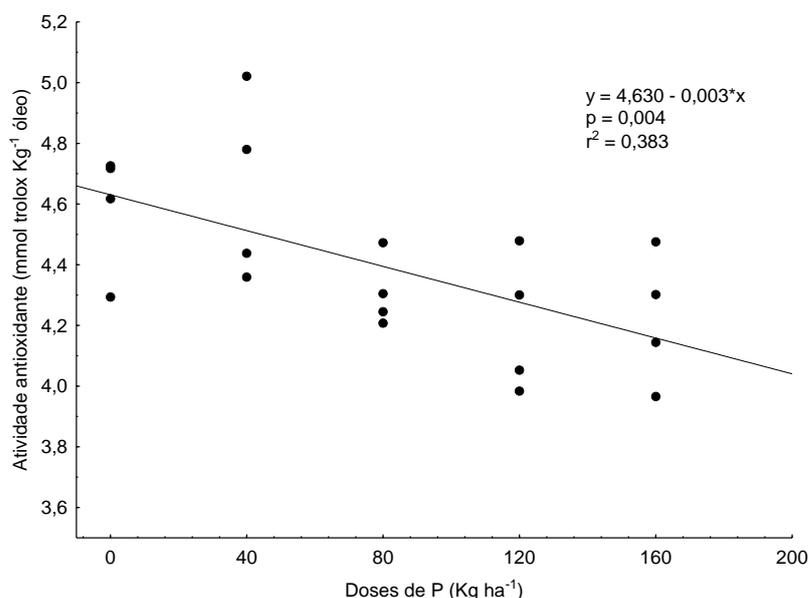


Figura 4. Regressão para atividade antioxidante total. p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.

Observa-se na Figura 4 e na Tabela 4 que a atividade antioxidante total está associada negativamente com o P aplicado na adubação. Estes dados sugerem que a atividade antioxidante pode estar mais relacionada a alguns compostos fenólicos que podem estar presentes, como, por exemplo, flavonóides e ácidos fenólicos (siríngico, ferúlico, sinápico)^{57,59} e com os tocoferóis,^{8,9} do que com os fitosteróis⁶⁰ ou carotenóides do óleo. Em relação aos tocoferóis, Diaz *et al.*⁶¹ afirmam que a atividade antioxidante de α , β , γ e δ – tocoferóis aumenta nesta ordem em óleos vegetais. Isto pode estar relacionado com a redução da atividade antioxidante no óleo de crambe, visto que a concentração do δ – tocoferol reduziu com os tratamentos e os blocos também foram significativos, ou seja, as duas variáveis apresentaram o mesmo comportamento em relação aos tratamentos.

Tuberoso *et al.*⁵⁷ determinaram a concentração de compostos antioxidantes e atividade antioxidante em diversos óleos vegetais e verificaram que a variabilidade das

correlações entre a atividade antioxidante e a composição das oleaginosas pode ser atribuída às concentrações de esqualeno, clorofilas, carotenóides e fenólicos dos óleos e às suas interações mútuas. No presente estudo foi identificada, durante a análise de fitosteróis, a presença de esqualeno, porém não foi possível sua quantificação. Não foram encontrados estudos que determinaram a atividade antioxidante total no óleo de crambe.

Clorofila e carotenóides totais

A regressão significativa na ANCOVA (Tabela 4) está apresentada na Figura 5 para carotenóides totais.

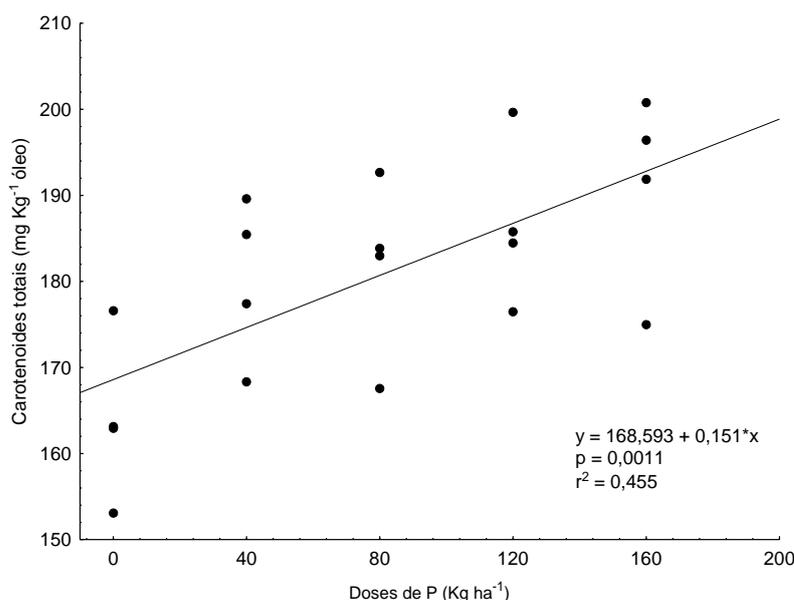


Figura 5. Regressão para carotenóides totais. p: p-valor a 5% de significância. Os quatro pontos referentes a cada dose representam os blocos.

Verifica-se com a Tabela 4 e Figura 5 que os carotenóides totais são influenciados de forma positiva pelas doses de P.

A clorofila é um cromóforo que existe em diversas formas nas plantas, sendo as formas primárias as clorofilas *a* e *b*,⁶² na taxa de três para um. Os pigmentos fotossintéticos presentes e sua abundância variam de acordo com a espécie. A clorofila *a* é o pigmento central da fotossíntese,¹⁴ enquanto os demais pigmentos auxiliam na absorção de luz e na transferência da energia para os centros de reação, chamados de pigmentos acessórios, por exemplo, a clorofila *b* e os carotenóides.⁶³

Ramalho e Jorge⁶⁴ reportam que o mecanismo de fotoxidação de óleos é promovido pela radiação UV na presença de fotossensibilizadores, como a clorofila, que absorvem a energia luminosa e a transferem para o oxigênio triplete (³O₂), gerando o estado singlete (¹O₂). O oxigênio singlete reage com os ácidos graxos, formando hidroperóxidos e, por degradação posterior, origina aldeídos, álcoois e hidrocarbonetos.

Bonfim-Silva *et al.*⁶⁵ reportam que a produção de fotoassimilados depende do P, o qual está associado diretamente ao crescimento da planta, visto que este elemento compõe a molécula de adenosina trifosfato (ATP).⁶⁶ Larson⁶⁷ reporta que os carotenóides agem como fotorreceptores na fotossíntese, absorvendo comprimentos de onda não absorvidos pelas clorofilas; portanto, estes compostos atuam em conjunto.⁶³ No presente estudo, as condições climáticas durante o experimento em campo foram adversas com temperaturas abaixo de zero em alguns períodos de desenvolvimento da planta. Este fator pode ter levado a uma baixa taxa fotossintética, proporcionando aumento do processo de respiração para a produção de ATP¹⁴ com absorção do P proveniente da adubação e aumento significativo da concentração de carotenóides. Observa-se na Tabela 2 que, mesmo as doses de P e a clorofila *a* não sendo associadas, sua correlação é positiva, o que também pode ser justificado pela baixa taxa fotossintética, refletindo na composição do óleo.

Não foram encontrados estudos que determinaram clorofilas e carotenóides totais em óleo bruto de crambe. Para efeito de comparação, pode-se citar o trabalho de Osawa *et al.*⁴, que reportam que o óleo bruto de canola, da mesma família do crambe, possui teor de clorofila entre 5 e 25 mg kg⁻¹ e teor de carotenóides entre 25 e 50 mg kg⁻¹; já o óleo de soja entre 40 e 50 mg kg⁻¹. No presente estudo o teor de clorofila foi 56,94 mg kg⁻¹ e carotenóides totais 191,01 mg kg⁻¹, ambos para o tratamento com maior dose de P (Tabela 1). Rodriguez-Amaya *et al.*⁶⁸ reportam alguns estudos com plantas pertencentes à mesma família do crambe, nas quais foram quantificados β -caroteno, luteína e zeaxantina.

Finalmente, Silva *et al.*³ afirmam que a oxidação lipídica é um fenômeno que implica diretamente no valor comercial de compostos graxos e de todos os produtos formulados a partir deles. Diante disso e das discussões apresentadas até aqui, ressalta-se a importância do conhecimento e do estudo da composição de óleos vegetais não comestíveis, como o de crambe, principalmente em relação à estabilidade e conservação, visto as inúmeras finalidades deste óleo.

CONCLUSÃO

O manejo da cultura do crambe com fósforo foi correlacionado com as propriedades químicas do óleo extraído em termos de componentes minoritários e majoritários. O δ -tocoferol, o ácido palmitoleico, os fitosteróis, carotenóides totais e atividade antioxidante total são afetados pelos tratamentos com P. Isto indica aumento significativo das concentrações de antioxidantes neste óleo quando realizada a adubação fosfatada. Os demais tocoferóis e ácidos graxos, clorofila *a* e compostos fenólicos totais não são afetados pelos tratamentos. Além disso, o teor de água e o índice de acidez do óleo corroboraram com os encontrados na literatura.

Destaca-se a importância de estudos relacionados à estabilidade oxidativa do óleo,

em termos de composição de antioxidantes e composição de ácidos graxos, visto que isto implica na conservação do óleo, custos com armazenamento e refino e qualidade dos produtos gerados.

REFERÊNCIAS

- 1 Castelo-Branco VN e Torres AG, Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Rev Nutr* **24**: 173-187, (2011).
- 2 Cert A, Moreda W and Pérez-Camino MC, Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable Oils. *J. Chromatogr. A* **881**: 131-148 (2000).
- 3 Silva FAM, Borges MFM e Ferreira MA, Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quim Nova* **22**: 94-103 (1999).
- 4 Osawa CC, Goncalves LAG e Ragazzi S, Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. *Quim Nova* **29**: 593-599 (2006).
- 5 Atabani AE, Silitongaa AS, Onga HC, Mahliac TMI, Masjukia HH, Badruddina IA *et al.*, Non-edible vegetable oils: a critical evaluation of oil extraction, fatty acid compositions, biodiesel production, characteristics, engine performance and emissions production. *Renew Sust Energ Rev* **18**: 211–245 (2013).
- 6 Cremones PA, Feroldi M, Nadaleti WC, Rossi E, Feiden A, Camargo MP *et al.*, Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. *Renew Sust Energ Rev* **42**: 415–428 (2015).
- 7 Ryan E, Galvin K, O'Connor TP, Maguire AR and O'Brien NM, Phytosterol, Squalene, Tocopherol Content and Fatty Acid Profile of Selected Seeds, Grains, and Legumes. *Plant Foods Hum Nutr* **62**:85–91 DOI 10.1007/s11130-007-0046-8 (2007).
- 8 Szydłowska-Czerniak A, Dianoczki C, Recseg K, Karlovits G and Szyka E. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta* **76**: 899–905 (2008).
- 9 Guinazi M, Milagres RCRM, Pinheiro-Sant'Ana HM e Chaves JBP, Tocoferóis e Tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Quim Nova* **32**: 2098-2103 (2009).
- 10 Silva TRB, Reis ACS and Maciel CDG, Relationship between chlorophyll meter readings and total N in crambe leaves as affected by nitrogen topdressing. *Ind Crops Prod* **39**: 135-138 (2012).
- 11 Malavolta E, Vitti GC e Oliveira AS, *Avaliação do estado nutricional das plantas, princípios e aplicações*. 2.ed. Piracicaba: Potafos, pp. 319 (1997).
- 12 Correa JC, Mauad M e Rosolem CA, Fósforo no solo e desenvolvimento de soja influenciado pela adubação fosfatada e cobertura vegetal. *Pesq agropec bras* **39**: 1231-1237 (2004).
- 13 DellaPenna D and Pogson BJ, Vitamin Synthesis in Plants: Tocopherols and Carotenoids. *Ann Rev Plant Biol* **57**:711–38. DOI: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144301 (2006).

- 14 Heldt HW, *Plant biochemistry*. 3.ed, Elsevier Academic Press, pp. 629 (2005).
- 15 Grant CA, Platen DN, Tomaziewicz DJ e Sheppard, SC, A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. *Informações Agronômicas* **95**: 1-16 (2001).
- 16 Gaydou EM and Arrivets J, Effects of phosphorus, potassium, dolomite, and nitrogen fertilization on the quality of soybean - yields, proteins, and lipids. *J Agric Food Chem* **31**: 765-769 (1983).
- 17 Haq MU and Mallarino AP, Response of soybean grain oil and protein concentrations to foliar and soil fertilization. *Agronomy Journal* **97**: 910-918 (2005).
- 18 Seguin P and Zheng W, Potassium, phosphorus, sulfur, and boron fertilization effects on soybean isoflavone content and other seed characteristics. *Journal of Plant Nutrition* **29**: 681-698 (2006).
- 19 Pitol C, Broch DL e Roscoe R, *Tecnologia e produção: crambe*. Fundação MS, Maracaju, pp. 60 (2010).
- 20 Colodetti TV, Martins LD, Rodrigues WM, Brinate SVB e Tomaz MA, Crambe: aspectos gerais da produção agrícola. *Enciclopédia Biosfera* **8**: 258-269 (2012).
- 21 Carlsson AS, Plant oils as feedstock alternatives to petroleum – A short survey of potential oil crop platforms. *Biochimie* **91**: 665-670 (2009).
- 22 Shashidhara YM and Jayaram SR, Vegetable oils as a potential cutting fluid - An evolution. *Tribol Int* **43**: 1073–1081 (2010).
- 23 Falasca SL, Flores N, Lamas MC, Carballo SM and Anschau A, *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. *Int J Hydrogen Energ* **35**: 5808-5812 (2010).
- 24 Lalas S, Gortzi O, Athanasiadis V, Dourtoglou E and Dourtoglou V, Full Characterization of *Crambe abyssinica* Hochst. Seed Oil. *J Am Oil Chem Soc* **89**: 2253–2258 (2012).
- 25 Santos KA, Bariccatti RA, Cardozo-Filho L, Schneider R, Palú F, Silva C *et al.*, Extraction of crambe seed oil using subcritical propane: Kinetics, characterization and modeling. *J Supercrit Fluids* **104**: 54–61 (2015).
- 26 Dimitrios B, Sources of natural phenolics antioxidants. *Trends Food Sci Technol* **17**: 505-512 (2006).
- 27 Silva TRB, Lavagnolli RF and Nolla A, Zinc and phosphorus fertilization of crambe (*Crambe abssynica* Hoechst). *J Food Agric Environ* **9**: 264-267 (2011).
- 28 Rogério F, Santos JI, Silva TRB, Migliavacca RA, Gouveia B e Barbosa MC, Efeito de doses de fósforo no desenvolvimento da cultura do crambe. *Biosci J* **28**: 251-255 (2012).
- 29 Santos JI, Rogério F, Migliavacca RA, Gouveia B, Silva TRB e Barbosa MC, Efeito da adubação potássica na cultura do crambe. *Biosci J* **28**: 346-350 (2012).
- 30 Lunelli IE, Secco D, Marins AC, Rosa HA, Santos RF, Borsoi A *et al.*, Effects of nutritional arrangements of NPK on the yield of grains and Crambe oil cultivation. *Afr J Agric Res* **8**: 2048-2052 (2013).
- 31 Rogério F, Silva TRB, Santos JI and Poletine JP, Phosphorus fertilization influences grain yield and oil content in crambe. *Ind Crops Prod* **41**: 266-268 (2013).

- 32 Santos JI, Silva TRB, Rogério F, Santos RF and Secco D, Yield response in crambe to potassium fertilizer *Ind Crops Prod* **43**: 297-300 (2013).
- 33 Onorevoli B, Machado ME, Dariva C, Franceschi E, Krause LC, Jacques RA *et al.*, A one-dimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatography study of the oil and the bio-oil of the residual cakes from theseeds of *Crambe abyssinica*. *Ind Crops Prod* **52**: 8-16 (2014).
- 34 Vazquez GH, Lazarini E, Camargo FP, Ferreira RB and Peres AR, Produtividade, qualidade fisiológica e composição química de sementes de crambe em diferentes doses de fósforo. *Biosci J* **30**: 707-714 (2014).
- 35 Instituto Adolfo Lutz - IAL. *Métodos físico-químicos para análise de alimentos*. 1.ed. São Paulo. pp 1020 (2008).
- 36 Freitas LS, Jacques RA, Richter MF, Silva AL and Caramão EB, Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. *J. Chromatogr. A* **1200**: 80–83 (2008).
- 37 Maia EL e Rodriguez-Amaya DB, Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Rev Inst Adolfo Lutz* **53**: 27-35 (1993).
- 38 Visentainer JV, Franco MRB. *Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação*. Ed. Eduem, pp. 122. (2012).
- 39 Lechner M, Reiter B and Lorbeer E, Determination of free and esterified sterols in potential new oil seed crops by coupled on-line liquid chromatography-gas-chromatography. *Eur J Lipid Sci Tech* **101**: 171-177 (1999).
- 40 Garcia VAS, Cabral VF, Zanoelo EF, Silva C, Cardozo-Filho L, Extraction of Mucuna seed oil using supercritical carbon dioxide to increase the concentration of L-Dopa in the defatted meal. *J Supercrit Fluids* **69**: 75-81 (2012).
- 41 Beveridge THJ, Li TSC and Drover JCG, Phytosterol Content in American Ginseng Seed Oil. *J Agric Food Chem* **50**: 744-750 (2002).
- 42 Li TSC, Beveridge THJ, Drover JCG. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chem* **101**: 1633–1639 (2007).
- 43 Haiyan Z, Bedgood Jr. DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K, Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils. *Food Chem* **100**: 1544–1551 (2007).
- 44 Pellegrini N, Serafini M, Colombi B, Del Rio D, Salvatore S, Bianchi M, Brighenti F, Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J Nutr* **133**:2812-2819 (2003).
- 45 Dere S, Günes T and Sivaci R, Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Tr J of Botany* **22**: 13-17 (1998).
- 46 Aladic K, Jarni K, Barbir T, Vidovic S, Vladoic J, Bilic M *et al.*, Supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Ind Crops Prod* **76**: 472–478 (2015).
- 47 Jasper SP, Biaggioni MAM e Silva PRA, Caracterização físico-química do óleo e do biodiesel de *Crambe abyssinica* Hochst. *Nucleus* **10**: 183-190 (2013).

- 48 Kaijser A, Dutta P and Savage G, Oxidative stability and lipid composition of macadamia nuts grown in New Zealand. *Food Chem* **71**: 67-70 (2000).
- 49 Farhoosh R, Einafshar S and Sharayei P, The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. *Food Chem* **115**: 933-938 (2009).
- 50 Singh SP and Singh D, Biodiesel production through de use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. *Renew Sustain Energy Rev* **14**: 200–216 (2010).
- 51 Kodali DR, High Performance Ester Lubricants from Natural Oils. *Ind Lubr Tribol* **54**: 165-170 (2002).
- 52 Phillips KM, Ruggio DM, Toivo JI, Swank MA and Simpkins AH, Free and esterified sterol composition of edible oils and fats. *J Food Compos Anal* **15**: 123–142 (2002).
- 53 Kmiecik D, Korczak J, Rudzinska M, Michałowska AG and Hes M, Stabilization of phytosterols in rapeseed oil by natural antioxidants during heating. *Eur J Lipid Sci Technol* **111**: 1124–1132 (2009).
- 54 Tsaknis J and Lalas S, Stability During Frying of *Moringa oleifera* Seed Oil Variety “Periyakulam 1”. *J Food Compost Anal* **15**: 79–101 DOI: 10.1006/jfca.2001.1043 (2002).
- 55 Winkler JK and Warner K, The effect of phytosterol concentration on oxidative stability and thermal polymerization of heated oils. *Eur J Lipid Sci Technol* **110**: 455-464 (2008).
- 56 Silva MLC, Costa RS, Santana AS, Koblitz MGB, Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. *Semina: Ciências Agrárias* **31**: 669-682 (2010).
- 57 Tuberoso CIG, Kowalczyk A, Sarritzu E and Cabras P, Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chem* **103**: 1494–1501 (2007).
- 58 Yang M, Zheng C, Zhou Q, Huang F, Liu C and Wang H, Minor components and oxidative stability of cold-pressed oil from rapeseed cultivars in China. *J Food Compost Anal* **29**: 1–9 (2013).
- 59 Angelo PM e Jorge N, Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz* **66**: 1-9 (2007).
- 60 Tsaknis J, Lalas S, Gergis V, Dourtoglou V and Spiliotis V, Characterization of *Moringa oleifera* Variety Mbololo Seed Oil of Kenya. *J Agric Food Chem* **47**: 4495-4499 (1999).
- 61 Diaz TG, Merás ID, Cabanillas AG and Franco MFA, Voltammetric behavior and determination of tocopherols with partial least squares calibration: analysis in vegetable oil samples. *Anal Chim Acta* **511**: 231-238 (2004).
- 62 Bianchi LM, Duncan SE, Webster JB, Neilson AP and O’Keefe SF, Contribution of Chlorophyll to Photooxidation of Soybean Oil at Specific Visible Wavelengths of Light. *J Food Sci* **80**: 252-261 (2015).
- 63 Streit NM, Canterle LP, Canto MW e Hecktheuer LHH, As Clorofilas. *Ciênc Rural* **35**: 748-755 (2005).

- 64 Ramalho VC e Jorge N, Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Quim Nova* **29**: 755-760 (2006).
- 65 Bonfim-Silva EM, Silva TJA, Cabral CEA, Gonçalves JM e Pereira MTJ, Produção e morfologia da leguminosa Java submetida a adubação fosfatada. *Enciclopédia Biosfera* **7**: 1-10 (2011).
- 66 Malavolta E, Vitti GC e Oliveira AS, *Avaliação do estado nutricional de plantas*. 2.ed. Piracicaba: Potafos, pp 201 (1989).
- 67 Larson RA, The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**: 969-978 (1988).
- 68 Rodriguez-Amaya DB, Kimura M, Godoy HT and Amaya-Farfan J, Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. *J Food Compos Anal* **21**: 445–463 (2008).

**COMPONENTES MINORITÁRIOS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ESTABILIDADE
OXIDATIVA DO ÓLEO DE CRAMBE EXTRAÍDO POR DIFERENTES MÉTODOS: CO₂
SUPERCRÍTICO E HEXANO³**

RESUMO

O método de extração de óleos vegetais pode influenciar sua composição. O método que utiliza CO₂ supercrítico apresenta vantagens em termos econômicos e ambientais, extraindo compostos de alto valor agregado sem resíduos de solventes. Porém, não foram encontrados na literatura estudos com este método na extração para o óleo de crambe. O objetivo do estudo foi comparar os métodos de extração com CO₂ supercrítico (SC-CO₂) e hexano (HEX) do óleo de crambe em termos de componentes minoritários (ácidos graxos livres, fitosteróis, tocoferóis, carotenóides totais, clorofila *a* e compostos fenólicos), cor, estabilidade oxidativa e atividade antioxidante total. Os resultados, exceto para teor de água e índice de acidez, foram submetidos ao teste t-pareado a 5% de significância. Os rendimentos das extrações foram 5,67% e 33,86%, para as extrações com SC-CO₂ (20 Mpa; 40 °C; 240min) e HEX (480min), respectivamente. A solubilidade do óleo de crambe foi $1,92 \times 10^{-3}$ g óleo g CO₂⁻¹. O óleo extraído com SC-CO₂ apresentou maior concentração de ácidos graxos livres (AGL) (3,11 g 100g⁻¹), fitosteróis (874,92 mg 100g⁻¹), tocoferóis (277,29 mg 100g⁻¹) e compostos fenólicos (122,30 mg EAG Kg⁻¹) e menores concentrações de carotenóides (76,84 mg Kg⁻¹) quando comparado ao óleo extraído por HEX. Em relação à clorofila, observa-se que não foi detectada no óleo extraído por SC-CO₂. A cor do óleo extraído com HEX foi mais intensa e amarelada do que o óleo extraído com SC-CO₂, atribuída à maior concentração de pigmentos. A atividade antioxidante foi maior no óleo extraído com SC-CO₂ (10,23 mmol trolox Kg⁻¹), porém este óleo foi menos estável (T_{p1}: 263,09 °C) do que o extraído com HEX (T_{p1}: 273,82 °C). As concentrações de AGL e carotenóides podem ter contribuído com a redução da estabilidade à oxidação do óleo extraído com SC-CO₂ e as concentrações de fitosteróis, tocoferóis e fenólicos podem estar relacionadas à maior atividade antioxidante deste óleo. Apesar de proporcionar menor estabilidade oxidativa ao óleo de crambe, o SC-CO₂ foi mais seletivo em relação aos tocoferóis, fitosteróis e compostos fenólicos em relação ao método Soxhlet, mesmo este proporcionando maior rendimento de óleo. A extração com SC-CO₂ é um processo ambientalmente vantajoso para extração de óleos vegetais com características de qualidade superiores sem resíduos de solventes.

PALAVRAS-CHAVE: *Crambe abyssinica*, extração supercrítica, antioxidantes, compostos fenólicos, carotenóides, clorofila.

**MINOR COMPONENTS, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND OXIDATIVE STABILITY OF
CRAMBE OIL EXTRACTED BY DIFFERENT METHODS: CO₂ SUPERCRITICAL AND
HEXANE**

ABSTRACT

The method of vegetable oil extraction can influence its composition. The method using supercritical CO₂ has economic and environmental advantages, extracting compounds with high added value without creating solvent residues. However, no studies in the literature were found with this method for the extraction of oil crambe. The aim of this study was to

³ Este artigo segue as normas do periódico Industrial Crops and Products.

compare extraction methods with supercritical CO₂ (SC-CO₂) and hexane (HEX) of crambe oil in terms of minor components (free fatty acids, phytosterols, tocopherols, carotenoids, chlorophyll *a* and phenolic compounds), color, oxidative stability and total antioxidant activity. The results, except for water content and acid index, were submitted to t-paired test at 5% significance. The oil extraction yields were 5.67% and 33.86% for extractions with SC-CO₂ (20 MPa, 40 °C; 240 min) and HEX (480 min), respectively. Crambe oil solubility was $1,92 \times 10^{-3}$ g oil CO₂⁻¹. The oil extracted with SC-CO₂ showed a higher free fatty acids concentration (FFA) (3.11 g 100 g⁻¹), phytosterols (874.92 mg 100 g⁻¹), tocopherols (277.29 mg 100 g⁻¹) and compound phenolics (GAE 122.30 mg kg⁻¹) and lower concentrations of carotenoids (76.84 mg kg⁻¹) when compared to oil extracted by HEX. Regarding to chlorophyll *a*, it was not detected in the oil extracted by SC-CO₂. The color of extracted oil with HEX was greater and more yellow than the oil extracted with SC-CO₂ because to the greater pigment concentration. The antioxidant activity was greater in the oil extracted with SC-CO₂ (trolox 10.23 mmol kg⁻¹), but such oil was less stable (T_{p1}: 263.09 °C) than the extracted with HEX (T_{p1}: 273.82 °C). Although, providing less oxidative stability of crambe oil, SC-CO₂ was more selective with respect to tocopherols, phytosterols and phenolic compounds, when compared to Soxhlet method, even this providing increased oil yield. Extraction with SC-CO₂ is environmentally favorable process for the extraction of vegetable oils with higher quality characteristics without solvent residues.

KEYWORDS: *Crambe abyssinica*, supercritical extraction, antioxidants, phenolic compounds, carotenoids, chlorophyll.

INTRODUÇÃO

O cultivo do *Crambe abyssinica* Hochst iniciou-se no Brasil em 1995 na Fundação do Mato Grosso do Sul (Fundação MS) (Jasper et al., 2013). Além das vantagens como tolerância a seca e geadas (Jasper et al., 2013), o crambe apresenta elevada quantidade de óleo (30-45%) (Cremonez et al., 2015) com alta estabilidade oxidativa (Pitol et al., 2010) e alta concentração de ácido erúico (55%), o que o torna não comestível (Colodetti et al., 2012; Cremonez et al., 2015). O óleo apresenta grande potencial como matéria-prima para a produção de biodiesel (Jasper et al., 2013), além de lubrificantes (Carlsson, 2009; Shashidhara e Jayaram, 2010), inibidor de corrosão, borracha sintética, filmes plásticos, nylon, entre outros (Falasca et al., 2010).

Tradicionalmente, os óleos vegetais são extraídos de grãos por prensagem a frio e por solventes orgânicos, como o hexano, devido a sua eficiência, proporcionando rendimentos mais elevados (Li et al., 2007). O método que utiliza solventes orgânicos é a extração Soxhlet, sendo uma técnica bem estabelecida e de referência para comparação com os demais métodos de extração (Wu et al., 2011).

O método de extração de óleos com fluido supercrítico vem sendo desenvolvido nos últimos anos, sendo o dióxido de carbono (CO₂) o solvente mais utilizado, visto que não é tóxico, é inerte, não inflamável, apresenta baixo custo e pode ser facilmente eliminado dos extratos. Além disso, o CO₂ apresenta temperatura e pressão críticas relativamente baixas (31,1 °C; 7,39 MPa), adequadas às condições industriais (Shao et al., 2015), e propriedades como: baixa viscosidade, próxima à dos gases, e alta difusividade, entre líquidos e gases.

Extração com CO₂ em condições supercríticas é um método que pode substituir ou complementar o processo industrial convencional, como a prensagem e a extração com solventes, pois possui vantagens como a preservação de compostos termossensíveis devido à baixa temperatura utilizada, consumo reduzido de energia (Moslavac et al., 2014) e produção de extratos livres de resíduos de solvente (Aladic et al., 2015).

O método de extração pode influenciar a concentração de alguns componentes minoritários dos óleos como tocoferóis, fitosteróis, ácidos graxos livres e pigmentos. A estabilidade oxidativa de óleos tem sido atribuída ao teor destes compostos e também a posição dos ácidos graxos na molécula de triglicerídeo, à presença de carotenóides, à variedade do grão e às condições de processamento (Malecka, 2002; Jachmanián et al., 2006; Merrill et al., 2008).

A avaliação do estado de oxidação de óleos e gorduras é uma determinação importante a nível industrial e os diversos métodos utilizados avaliam alterações nas propriedades químicas, físicas ou organolépticas de óleos durante a oxidação (Silva et al., 1999; Micic et al., 2015). Dentre estes métodos, pode-se destacar a calorimetria exploratória diferencial (DSC), visto que a reação de oxidação é exotérmica, liberando calor. Este é um método simples, econômico e não requer uso de produtos químicos tóxicos (Micic et al., 2015). Com este método pode-se utilizar o modo isotérmico ou não-isotérmico, sendo o segundo mais vantajoso em relação ao tempo, gastos de oxigênio e pelo fato de dar mais informações tanto sobre a primeira etapa de oxidação (método isotérmico) quanto às outras etapas em uma única corrida (Litwinienko et al., 1998).

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos com SC-CO₂ na extração de diversos óleos vegetais (Li et al., 2007; Corso et al., 2010; Nimet et al., 2011; Da Porto et al., 2012; Solati et al., 2012; Moslavac et al., 2014; Ruttarattanamongkol et al., 2014; Aladic et al., 2015; Danlami et al., 2015; Przygoda e Wejnerowska, 2015; Shao et al., 2014). Colza, canola e crambe pertencem à família *Brassicaceae* e, portanto, destaca-se os trabalhos de Boutin e Badens (2009), Pederssetti et al. (2011) e Uquiche et al. (2012), que extraíram óleo de colza/canola com SC-CO₂. Na literatura foram encontrados apenas dois trabalhos que investigaram o método supercrítico na extração de óleo de crambe. Onorevoli et al. (2014) estudaram a composição de ácidos graxos e o rendimento de óleo de crambe extraído com hexano, propano e prensa mecânica. Santos et al. (2015) avaliaram o efeito da temperatura e da pressão sobre o rendimento da extração com propano e compararam a composição química e a estabilidade oxidativa do óleo em relação à extração Soxhlet com hexano e diclorometano.

Destaca-se também estudos com caracterização do óleo de crambe, estabilidade oxidativa, composição de ácidos graxos e concentração de alguns antioxidantes (Lalas et al., 2012; Onorevoli et al., 2014; Santos et al., 2015). No entanto, não foram encontrados estudos de extração de óleo de crambe com SC-CO₂, bem como determinações de

parâmetros como atividade antioxidante, carotenóides, clorofila, cor e compostos fenólicos neste óleo.

Neste contexto, o objetivo do trabalho foi comparar os métodos de extração com SC-CO₂ e HEX do óleo de crambe em termos de componentes minoritários (ácidos graxos livres, fitosteróis, tocoferóis, carotenóides totais, clorofila *a* e compostos fenólicos), cor, estabilidade oxidativa e atividade antioxidante total.

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparo das amostras

Foram utilizados grãos de crambe obtidos do experimento anterior referente à dose de 160 Kg ha⁻¹ de fósforo (Artigo 1). A definição da amostra a ser utilizada nesta etapa foi realizada com base nos resultados de fitosteróis (Artigo 2), visto que o campesterol foi quantificado apenas na amostra referente à maior dose de fósforo. A moagem dos grãos sem casca foi realizada em moinho refrigerado (20 °C). Padronizou-se o tamanho das partículas, utilizando partículas menores ou iguais a 1,18 mm (14 mesh) para a extração Soxhlet e partículas entre 0,30 e 1,18 mm (14-48 mesh) para a extração supercrítica.

Extração do óleo

Extração com HEX

Uma amostra do material moído foi pesada (10g) em papel filtro, o qual foi armazenado em cartucho de celulose e transferido para o extrator tipo Soxhlet. A extração ocorreu por 8h com HEX entre 70 e 80 °C. Posteriormente, o solvente foi rotaevaporado a 40 °C e os balões foram deixados em estufa a 70 °C até peso constante (máximo duas horas) (adaptado de IAL, 2008). O óleo foi armazenado a -20 °C em frasco âmbar até a realização das análises. A extração foi realizada em triplicata. O rendimento foi determinado como a razão da massa do óleo extraído em relação à massa inicial de grãos de crambe moído.

Extração com SC-CO₂

A extração foi realizada em triplicata em módulo de escala laboratorial que consiste em: reservatório para o solvente, bomba seringa (Isco, modelo 500D), dois banhos termostáticos e extrator de aço inoxidável com 58 cm³ de capacidade (1,95 cm de diâmetro e 19,4 cm de altura). Um banho (Julabo, modelo FP-50) resfria o solvente antes de entrar na bomba e o outro (Marconi, modelo MA-184) mantém o extrator na temperatura desejada (Santos et al., 2015).

As condições de extração foram selecionadas visando a maior densidade possível do CO₂ (20 MPa, 40 °C) com base nos trabalhos de Nimet et al. (2011), Pederssetti et al. (2011)

e Przygoda e Wejnerowska (2015), nos quais temperaturas mais baixas e pressões mais altas proporcionaram maior rendimento de extração. O tempo foi fixado em 240 min. A pressão foi de 20 MPa devido às limitações operacionais da bomba.

O procedimento de operação do módulo seguiu metodologia de Santos et al. (2013) com modificações. Cerca 20 g de grãos de crambe moídos foram introduzidos no extrator. O solvente foi resfriado a 5 °C para prevenir sua vaporização antes de entrar na bomba. Resfriado e na fase líquida, o solvente foi bombeado e introduzido no extrator. O sistema foi pressurizado em intervalos de pressão de 2 MPa até alcançar a pressão desejada (20 MPa). Após a temperatura do banho de aquecimento alcançar o equilíbrio térmico (40 °C), iniciou-se a extração pelo acionamento da bomba seringa e abertura das válvulas de expansão. A vazão volumétrica para o CO₂ (Linde; 99,5%) foi de 3 mL min⁻¹, sendo regulada a partir do ajuste da válvula micrométrica na saída do extrator. A temperatura na saída do extrator foi mantida a 60 °C pelo termostato (Tholz, modelo MSC-04E) para a separação entre o extrato e o solvente. O extrato foi coletado em recipiente de vidro âmbar e pesado a cada 10-20 minutos até 240 minutos.

O rendimento foi determinado como a razão da massa do óleo extraído em relação à massa inicial de grãos de crambe moído. A solubilidade do óleo em SC-CO₂ foi obtida pela razão entre a massa total de óleo e a massa de solvente gasto durante toda a extração.

Composição do óleo

Compostos livres de glicerol

Metodologias de Lechner et al. (1999), Freitas et al. (2008) e Garcia et al. (2012) foram adaptadas visando a determinação de AGL e fitosteróis (β -sitosterol, campesterol e stigmasterol). Aproximadamente 20 mg de óleo dissolvidos em *n*-heptano (triplicata) foram derivatizados com 20 μ L de N,O-bis (trimetilsilil) trifluoro-acetamida (BSTFA) e trimetilclorosilano (TMCS) em piridina volátil. Adicionou-se 50 μ L de 5-alfa-colestano (50 mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich) como padrão interno de fitosteróis e 50 μ L de heptadecanoato de metila (50mg L⁻¹) (Sigma-Aldrich) como padrão interno para ácidos graxos e a solução permaneceu por 1 h a 60 °C.

A injeção foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GCMS – QP2010SE) da Shimadzu. A coluna capilar foi a RTX – 5MS nas seguintes condições: injeção de 1,0 μ L no modo split 1:10, temperatura inicial de 100 °C, mantida por 6 min, aumentando até 230 °C à taxa de 5 °C min⁻¹ e para 280 °C à 15 °C min⁻¹, permanecendo por 15 min. A vazão do gás de arraste (hélio) foi de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura do injetor e detector foi de 280 °C. A identificação dos fitosteróis foi realizada por comparação dos espectros de massa da biblioteca NIST 08 e também com espectros da literatura (Beveridge et al., 2002; Li et al., 2007). Sua quantificação foi realizada de acordo com Beveridge et al. (2002), incluindo-se o fator de resposta determinado

experimentalmente com o padrão analítico β -sitosterol (Sigma-Aldrich). Os ácidos graxos foram identificados com mistura padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos C4-C24 (Supelco) e sua quantificação seguiu metodologia de Visentainer e Franco (2012). Devido à grande quantidade de AGL identificados, apresentou-se o resultado total destes para os dois métodos de extração.

Tocoferóis

Os tocoferóis α , $\beta+\gamma$ e δ foram determinados com metodologia de Freitas et al. (2008). A cromatografia de fase reversa não distingue os isômeros β e γ (Ryan et al., 2007). Aproximadamente 20 mg do óleo foram dissolvidos em isopropanol, em triplicata, antes da injeção no cromatógrafo líquido de alta eficiência LC-20AT com detector UV/VIS SPD-20A (Shimadzu). A coluna foi a C-18 (4,6 mm x 25 cm) com diâmetro de partícula de 5 μ m. Loop de 20 μ L e fase móvel metanol:água (96:4 v/v) com vazão de 1,0 mL min⁻¹ foram utilizados no modo isocrático. O comprimento de onda foi 292 nm e quantificação foi via padronização externa com curva padrão a partir de soluções estoques dos padrões com concentrações de 0,25 a 20 mg L⁻¹.

Clorofila e carotenóides totais

Para as determinações de clorofila *a* e carotenóides totais adaptou-se metodologias de Dere et al. (1998) e Aladic et al. (2015). Aproximadamente 40 mg de óleo foram dissolvidos em éter etílico em triplicata e as absorvâncias foram medidas na faixa de 400-700 nm em espectrofotômetro UV/VIS. Clorofila *a* apresentou absorvância máxima em 660 nm, carotenóides entre 437 e 448 nm e clorofila *b* não foi quantificada.

Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais seguiu metodologia de Szydłowska-Czerniak et al. (2008) com modificações. Aproximadamente 500 mg de óleo foram dissolvidos em 1,5 mL de HEX, adicionou-se 3 mL de metanol e as amostras foram deixadas e repouso durante a noite. Os extratos metanólicos foram lavados com 2,5 mL de hexano, sendo retirada alíquota de 1,0 mL para a reação com o reagente Folin-Ciocalteu. Esta foi realizada de acordo com Haiyan et al. (2007), utilizando o ácido gálico para a curva de calibração (5-75 mg L⁻¹). As análises foram realizadas em triplicata.

Análise de cor

Para a análise de cor do óleo foi seguido o trabalho de Tuberoso et al. (2007), que determinaram as coordenadas CIELAB em diversos óleos vegetais. Utilizou-se colorímetro digital da marca Konica Minolta®, modelo CR 410, com abertura de 50 mm. A calibração do equipamento foi realizada em placa de cerâmica, com padrões pré-estabelecidos pelo

fabricante com iluminante D65. Realizou-se leituras em triplicata, obtendo-se valores médios de C^* , L^* , a^* e b^* . O parâmetro a^* caracteriza coloração vermelha (+60) à verde (-60). O parâmetro b^* assume valores positivos para cores amareladas (+60) e negativos para tons azuis (-60). O L^* indica a luminosidade que varia do branco (100) ao preto (zero). O parâmetro C^* (Croma) indica a intensidade de cor da amostra percebida por seres humanos (Granatto e Masson, 2010).

Atividade antioxidante total

A atividade antioxidante equivalente ao Trolox foi realizada conforme a metodologia de Pellegrini et al. (2003), em triplicata, modificando-se o solvente para a dissolução do óleo (isopropanol). Utilizou-se o Trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico, Sigma-Aldrich) para a curva padrão ($2-75 \mu\text{mol L}^{-1}$), e os resultados foram expressos em $\text{mmol trolox Kg}^{-1}$ de óleo.

Estabilidade oxidativa

A estabilidade oxidativa do óleo de crambe foi determinada utilizando calorimetria exploratória diferencial (DSC Shimadzu-60). O procedimento foi adaptado do trabalho de Micic et al. (2015). Foram pesados $2 \pm 0,5$ mg de óleo em recipiente de alumínio e este colocado no calorímetro juntamente com um recipiente vazio, como referência. Foi utilizado o método não-isotérmico, com taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, a partir de $30 \text{ }^\circ\text{C}$ até $350 \text{ }^\circ\text{C}$. Para a reação de oxidação foi utilizado fluxo de oxigênio (99,99%) de 50 mL min^{-1} .

Análise estatística

Foram apresentados resultados de média e desvio padrão das extrações para todos os parâmetros determinados. Com o objetivo de comparar os métodos de extração, os resultados obtidos para o óleo de crambe foram submetidos ao teste t-pareado a 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Rendimento das extrações

Os rendimentos das extrações foram $5,67\% \pm 0,11$ e $33,86\% \pm 0,98$, para as extrações com SC-CO₂ (20 Mpa; $40 \text{ }^\circ\text{C}$; 240min) e HEX (480min), respectivamente. A porcentagem de remoção de óleo dos grãos de crambe com a extração supercrítica foi de 16,74%, considerando a remoção por HEX como 100%. Pederssetti et al. (2011), extraindo óleo de canola com SC-CO₂ na condição de 20 Mpa e $40 \text{ }^\circ\text{C}$, obtiveram rendimento de aproximadamente 11% com 240 min de extração, com remoção de óleo em torno de 29,9%. Boutin e Badens (2009) obtiveram rendimento de 8,00% de óleo de colza a 15 MPa e $35 \text{ }^\circ\text{C}$

e 45% a 45 MPa na mesma temperatura. Uquiche et al. (2012) obtiveram rendimento de 10,4% nas condições de 20 MPa e 40 °C com 120 min de extração.

A Fig. 1 apresenta a curva cinética para a média das três extrações do óleo de crambe com SC-CO₂.

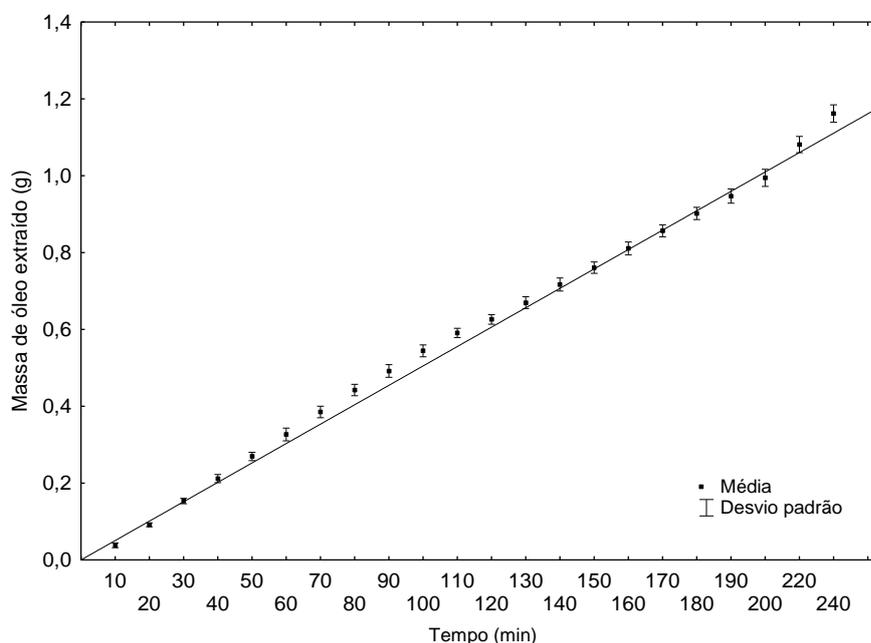


Fig. 1. Curva cinética experimental para a extração do óleo de crambe com SC-CO₂ (20 MPa; 40 °C).

De acordo com Han et al. (2009), no primeiro período da extração o solvente está saturado com a fração de óleo facilmente removível e a extração ocorre a uma taxa constante, determinada pela solubilidade do óleo em SC-CO₂. O segundo período é de transição, durante a qual as partículas na entrada do leito perdem o óleo facilmente acessível que continha inicialmente e a taxa de extração cai rapidamente. Portanto, a solubilidade seria determinada com os dados da parte linear da curva de extração (primeiro período). No presente estudo, o tempo utilizado não foi suficiente para atingir o segundo estágio da extração. A solubilidade foi obtida utilizando-se todos os pontos da curva de extração, visto que seu comportamento foi linear até 240 min (Fig. 1). A solubilidade do óleo de crambe foi $1,92 \times 10^{-3}$ g óleo g CO₂⁻¹.

Pederssetti et al. (2011) obtiveram solubilidade entre $1,71 \times 10^{-3}$ e $3,08 \times 10^{-3}$ g óleo g CO₂⁻¹, removendo de 29,9 a 52,7% do óleo contido nos grãos de canola (40-60 °C; 20-25 MPa; 480 min). Boutin e Badens (2009) obtiveram solubilidades de $1,9 \times 10^{-3}$ g óleo g CO₂⁻¹ e $1,04 \times 10^{-2}$ g óleo colza g CO₂⁻¹, verificando que em pressões menores a solubilidade dos lipídeos diminui com o aumento de temperatura, comportamento reportado também por Dunford e Temelli (1997). Tomita et al. (2013), extraíndo óleo de *Cannabis sativa*, encontraram valor médio de solubilidade de $1,75 \times 10^{-3}$ g óleo g CO₂⁻¹ (40-80 °C; 20-40 MPa; 180min).

O baixo rendimento encontrado no presente estudo em relação aos citados pode ser justificado por alguns fatores, como o tempo de extração, o qual pode influenciar o rendimento como reportado por Boutin e Badens (2009) e Uquiche et al. (2012). Além disso, estes autores trabalharam com pressões mais elevadas, o que aumentou significativamente a solubilidade e o rendimento da extração. Todos os estudos citados acima observaram que o aumento da densidade do CO₂, inerente ao aumento da pressão durante o processo, aumentaram a solubilidade do óleo com melhores rendimentos das extrações. No entanto, por limitações da bomba utilizada neste estudo, não foi possível se trabalhar com pressões maiores que 20 MPa. Estes fatores, aliados à baixa solubilidade, justificam o baixo rendimento da extração do óleo de crambe com SC-CO₂.

Comparação dos métodos de extração

A Tabela 1 apresenta as propriedades do óleo de crambe determinadas para os dois métodos de extração.

Composição do óleo

No que diz respeito aos AGL, observa-se que o óleo de crambe extraído com SC-CO₂ apresentou maior concentração destes em relação ao óleo extraído por HEX, apesar deste método ter ocorrido em condições de temperatura e tempo mais elevados (Tabela 1).

De acordo com Sahena et al. (2009) o SC-CO₂ é mais seletivo em relação ao HEX, extraindo compostos menos polares, como os ácidos graxos. Boutin e Badens (2009) observaram que a acidez do óleo de colza aumentou no início da extração e diminuiu ao longo do tempo (20-120min), e Ruttarattanamongkol et al. (2015) constataram que o óleo de *Moringa oleifera* extraído com SC-CO₂ a menores pressões (15 MPa) apresentou maior concentração de AGL do que o óleo extraído por Soxhlet e prensa, atribuindo este comportamento à maior solubilidade destes em CO₂.

Em relação aos teores dos antioxidantes, observa-se na Tabela 1 que o SC-CO₂ extraiu maiores concentrações de fitosteróis e tocoferóis e menores concentrações de carotenóides ($p < 0,05$) em relação ao HEX. Aladic et al. (2015) e Nimet et al. (2011) encontraram maiores concentrações de tocoferóis com SC-CO₂ e Soxhlet em óleos de *Cannabis sativa* e girassol, atribuindo esta diferença à alta temperatura e ao longo tempo de extração (Soxhlet). Przygoda e Wejnerowska (2015) encontraram valores quase cinco vezes maiores de tocoferóis extraídos com SC-CO₂ em relação ao HEX em óleo de quinoa. No presente estudo, esta relação foi de aproximadamente quatro vezes.

Tabela 1

Composição do óleo de crambe, cor, atividade antioxidante total e parâmetros da estabilidade oxidativa para os dois métodos de extração.

Parâmetros analisados no óleo	Soxhlet (HEX)	Supercrítico (SC-CO ₂) ^d	p-valor ^e
	Média±D.P.	Média±D.P.	
Ácidos graxos livres totais (g 100 g ⁻¹)	1,68±0,21	3,11±0,22	0,00388*
Fitosteróis totais (mg 100 g ⁻¹)	200,44±0,74	874,92±16,38	0,00020*
Tocoferóis totais (mg 100 g ⁻¹)	66,024±1,83	277,29±6,73	0,00025*
Carotenóides Totais (mg Kg ⁻¹)	196,28±4,44	76,84±4,84	0,00050*
Clorofila a (mg Kg ⁻¹)	56,45±4,09	n.d. ^f	0,00174*
Determinação de Cor ^a			
C*	57,34±2,72	41,62±1,95	0,00288*
L*	85,98±3,47	91,55±3,08	0,13938 ^{ns}
a*	-7,03±1,04	-7,38±0,26	0,60292 ^{ns}
b*	56,97±2,95	40,96±2,00	0,00339*
Compostos fenólicos totais ^b (mg EAG Kg ⁻¹)	103,95±7,67	122,30±5,41	0,01997*
Atividade antioxidante total (mmol trolox Kg ⁻¹)	3,86±0,06	10,23±0,21	0,000005*
Estabilidade oxidativa (°C) ^c			
T _{on}	206,89±0,98	193,14±3,53	0,00803*
T _{p1}	273,82±2,82	263,09±1,31	0,01378*
T _{p2}	324,02±0,88	318,15±2,08	0,02774*

^a C*indica intensidade de cor (croma), L* indica luminosidade (branco-preto), a* (vermelho-verde), b* (amarelo-azul).

^b Compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico (EAG).

^c T_{on} indica a temperatura de início da oxidação, T_{p1} indica o primeiro pico e T_{p2} indica o segundo pico.

^d extração com SC-CO₂ a 20 MPa e 40 °C.

^e p-valor para o teste t-pareado a 5% de significância.

^f não detectado. Para o teste estatístico foi utilizado zero como resultado para este parâmetro.

* Significativo (p<0,05).

^{ns} Não significativo (p>0,05).

Além disso, Da Porto et al. (2012) afirmam que existe seletividade do CO₂ em extrair os tocoferóis em óleo de *Cannabis sativa*, indicando que a concentração de tocoferol no óleo é mais elevada durante a fase inicial de extração, como reportam também Leo et al. (2005), que observaram maior concentração em óleo de amêndoas durante as primeiras 2 h de extração com CO₂ (50 °C; 42 MPa). Estes autores afirmam que altas concentrações de tocoferóis durante a fase inicial de extração pode ser devido à alta proporção de lipídios mais solúveis, tais como AGL. Observaram ainda que, após este tempo, os AGL reduziram e os triglicerídeos aumentaram gradualmente, atribuindo isto à estreita relação entre a solubilidade do óleo e a quantidade de AGL.

Li et al. (2007) observaram o mesmo comportamento para o teor de fitosteróis (Tabela 1) em relação às extrações com SC-CO₂ e Soxhlet para óleo de espinheiro-marítimo, atribuindo estes resultados às diferentes solubilidades destes compostos nos solventes utilizados. Ruttarattamongkol et al. (2014) também encontraram concentrações de fitosteróis significativamente maiores no óleo de *Moringa oleífera* com método supercrítico (CO₂; 35 °C; 15 MPa) em relação ao Soxhlet.

O comportamento para os teores de carotenóides totais (Tabela 1) foi semelhante aos obtidos por Jachmanián et al. (2006) e Uquiche et al. (2012) para óleos de canola e colza, respectivamente. Em relação à clorofila, observa-se que não foi detectada na extração supercrítica (Tabela 1). Sahena et al. (2009) reportam que o HEX extrai ambos os pigmentos polares e não polares, justificando os resultados encontrados neste estudo.

No que diz respeito aos compostos fenólicos totais, observa-se na Tabela 1 que houve diferença entre as extrações ($p < 0,05$), com maior concentração destes compostos no óleo extraído com SC-CO₂. Em óleos vegetais os compostos fenólicos podem ser polifenóis, fenóis simples ou ácidos (Dimitrios, 2006). Para o óleo de colza, Tuberoso et al. (2007) reportaram que não há evidências da presença de flavonóides, sendo encontrados os ácidos siríngico, ferúlico e sinápico. Os compostos fenólicos no geral apresentam certa polaridade (Angelo e Jorge, 2007) devido à presença de hidroxilas na molécula e, como o HEX extrai tanto compostos polares como não polares (Sahena et al., 2009), este pode ter extraído maior concentração destes compostos, mas devido à alta temperatura utilizada na extração (70-80 °C) em relação à extração supercrítica (40 °C), estes podem ter sido degradados por serem termossensíveis (Boutin e Badens, 2009; Corso et al., 2010; Moslavac et al., 2014).

Análise de cor

De acordo com Aladic et al. (2015), a cor do óleo está associada aos pigmentos como clorofilas e carotenóides. Observa-se na Tabela 1 que os parâmetros C* e b* apresentaram diferença ($p < 0,05$) e os parâmetros a* e L* não foram significativos ($p > 0,05$) entre as extrações.

O parâmetro C* (Croma) indica a intensidade de cor da amostra, sendo mais percebida por seres humanos quanto maior o valor de C* (Granatto e Masson, 2010). O óleo extraído com HEX apresenta maior intensidade de cor, provavelmente devido à presença de maior quantidade de pigmentos (Aladic et al., 2015).

O b* assume valores positivos para cores amareladas (+60) e negativos para tons azuis (-60) (Granatto e Masson, 2010). Observa-se na Tabela 1 que os óleos extraídos com HEX e SC-CO₂ apresentam valores de 56,97 e 40,96, respectivamente, indicando a coloração amarela nos dois óleos com intensidade maior no óleo extraído com HEX. Estes resultados podem ser atribuídos à presença de carotenóides que apresentam coloração que

vai do amarelo ao vermelho (Uenojo et al., 2007), corroborando com o estudo de Tuberoso et al. (2007), no qual o parâmetro b^* estava correlacionado significativamente aos carotenóides em diversos óleos vegetais.

Atividade antioxidante total

Na Tabela 1 verifica-se que a atividade antioxidante do óleo de crambe é maior no óleo extraído com SC-CO₂ ($p < 0,05$). Não foram encontrados estudos com atividade antioxidante neste óleo. Pode-se atribuir estes resultados às maiores concentrações de tocoferóis, fitosteróis e fenólicos no óleo.

Lalas et al. (2012) afirmam que os tocoferóis presentes no óleo de crambe podem atuar na proteção à oxidação durante o armazenamento e o processamento, devido às suas propriedades antioxidantes durante a formação de hidroperóxidos (Yang et al., 2013). São encontradas na literatura afirmações sobre o poder antioxidante dos fitosteróis e sua atuação na proteção do óleo contra a oxidação (Ryan et al., 2007; Kmiecik et al., 2009; Uquiche et al., 2012). Os compostos fenólicos também são capazes de agir como antioxidantes (Dimitrios, 2006; Yang et al., 2013). Portanto, a atuação destes compostos pode estar relacionada à maior atividade antioxidante no óleo de crambe extraído com SC-CO₂.

Estabilidade oxidativa

A Fig. 2 apresenta as curvas de oxidação das amostras do óleo de crambe extraídas por Soxhlet e SC-CO₂ no modo não-isotérmico. Observou-se três pontos distintos: temperatura de início (T_{on}), primeiro pico (T_{p1}) e segundo pico (T_{p2}). A T_{on} foi obtida considerando-se a intersecção da linha de base com a linha tangente na borda da isoterma.

Com a Tabela 1 e Fig. 2 observa-se que as temperaturas para os pontos observados durante a oxidação do óleo de crambe (T_{on} , T_{p1} e T_{p2}) são estatisticamente maiores para a extração Soxhlet em relação à supercrítica, indicando que o óleo extraído com SC-CO₂ é menos estável à oxidação, como reportado por Uquiche et al. (2012), que comparam a estabilidade do óleo de colza extraído com HEX (extração exaustiva) e SC-CO₂ (40 MPa; 60 °C; 60 min).

Micic et al. (2015) reportam que os dois primeiros picos são os principais indicadores do processo de oxidação, sendo o primeiro (T_{p1}) considerado na avaliação oxidativa do óleo no método não-isotérmico. Os antioxidantes são consumidos durante o período de indução (até T_{on}); após, são produzidos hidroperóxidos pelo ataque do oxigênio às duplas ligações dos ácidos graxos (até T_{p1}), e o segundo pico é o resultado da decomposição destes hidroperóxidos em outros produtos (Litwinienko et al., 1997; Litwinienko e Kasprzycka-Guttman, 1998; Micic et al., 2015).

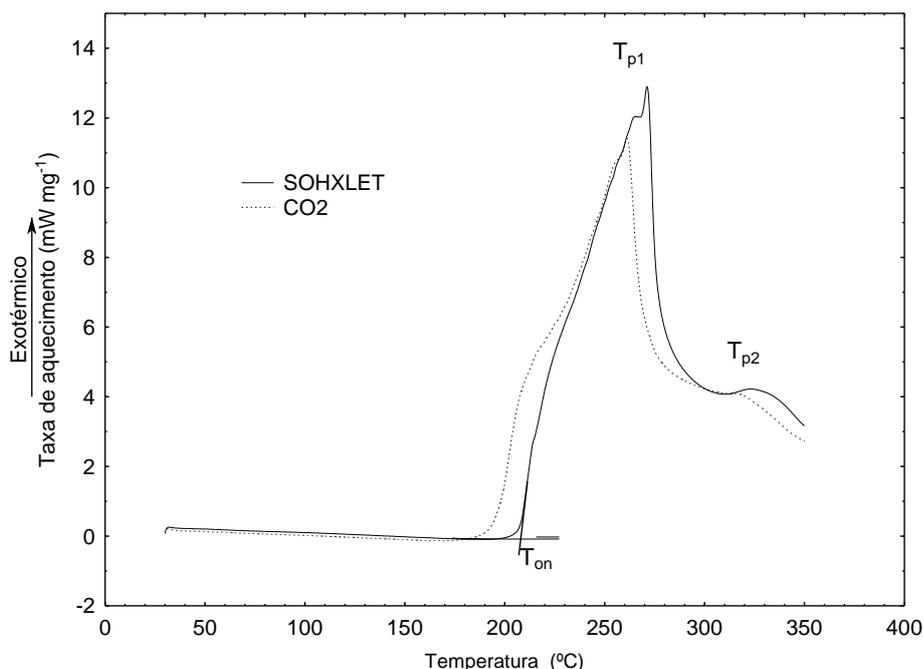


Fig. 2. Curvas de oxidação do óleo de crame no método não-isotérmico (DSC) a taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, fluxo $50\text{ mL O}_2\text{ min}^{-1}$. T_{on} - temperatura de início, T_{p1} - primeiro pico, T_{p2} - segundo pico.

No presente estudo os valores de T_{on} , T_{p1} e T_{p2} foram $206,89$; $273,82$ e $324,02\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente, para o óleo extraído com HEX e $193,14$; $263,09$ e $318,15\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o óleo extraído com SC- CO_2 . Thurgood et al. (2007) avaliando a estabilidade do óleo de soja pelo método DSC não-isotérmico, obtiveram temperaturas de aproximadamente $190\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{on}), $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{p1}) e $350\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{p2}) a taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Litwinienko e Kasprzycka-Guttman (1998) avaliando a estabilidade do óleo de mostarda também com o mesmo método obtiveram valores próximos de $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{on}), $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{p1}) e $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ (T_{p2}) a taxa de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

A estabilidade dos óleos pode ser influenciada pela presença e composição de tocoferóis, carotenóides e esteróis, variedade do grão e pelas condições de processamento (Merrill et al., 2008; Jachmanián et al., 2006). Jachmanián et al. (2006) verificaram que a estabilidade do óleo de canola extraído com SC- CO_2 foi menor do que a estabilidade para o óleo extraído com HEX, atribuindo este fato ao teor de carotenóides mais elevado, corroborando com o presente estudo. Uquiche et al. (2012) também observaram o mesmo comportamento no óleo de colza, atribuindo este fato à maior concentração de antioxidantes no óleo extraído com HEX (tocoferóis, fenólicos e fosfolipídios).

Ramadan e Mörsel (2004) concluíram que compostos polares, como os fosfolipídios, presentes nos óleos brutos de cominho preto, coentro e níger foram os principais responsáveis pela estabilidade a oxidação destes óleos. Desta forma, observa-se que outros compostos como os fosfolipídios, não determinados neste estudo, podem contribuir com a maior estabilidade oxidativa do óleo extraído com HEX, visto que este pode extrair também compostos polares. Przybylski et al. (1998) observaram que a estabilidade à oxidação do

óleo de canola extraído com SC-CO₂ aumentou quando fosfolipídios estavam presentes e a concentração de AGL era reduzida, concluindo que estes compostos foram os principais fatores que afetaram a estabilidade do óleo de canola. Este fator deve ser considerado, pois o óleo extraído com SC-CO₂ apresentou maior concentração de AGL e a liberação destes contribui com o processo oxidativo dos óleos vegetais (Osawa et al., 2006). Além disso, a clorofila tem um efeito pró-oxidante na presença de luz, mas tem sido demonstrado que funciona como antioxidante na sua ausência (Yang et al., 2013).

A maior concentração de AGL e a menor concentração de carotenóides podem ter contribuído com a redução da estabilidade à oxidação do óleo extraído com SC-CO₂. Apesar disso, deve-se destacar que esta extração foi mais seletiva em relação aos tocoferóis, fitosteróis e fenólicos, que apresentaram concentrações significativamente maiores quando comparadas à extração por Soxhlet.

CONCLUSÃO

Verificou-se que o HEX proporcionou maior rendimento (33,86%) em relação à extração supercrítica (5,67%) e maior estabilidade a oxidação. Por outro lado, a qualidade do óleo de crambe extraído com HEX foi inferior em termos de antioxidantes (fitosteróis, tocoferóis e fenólicos) e atividade antioxidante. A menor estabilidade oxidativa do óleo extraído com SC-CO₂ provavelmente está relacionada com a maior concentração de AGL e a menor concentração de carotenóides. Além disso, a clorofila, que foi extraída em maior concentração pelo HEX, pode estar atuando como antioxidante. A cor do óleo de crambe extraído com HEX é mais intensa e apresenta tom mais amarelado do que o óleo extraído com SC-CO₂, atribuídos à maior quantidade de pigmentos.

Destaca-se que o método supercrítico é mais seletivo na extração de compostos de alto valor agregado como antioxidantes, já que solventes orgânicos extraem, além de compostos lipídicos, porções não lipídicas, pigmentos e água presentes na matriz. Assim, a extração com SC-CO₂ é um processo ambientalmente vantajoso para extração de óleo com características de qualidade superiores, sem resíduos de solventes.

REFERÊNCIAS

- Aladic, K., Jarni, K., Barbir, T., Vidovic, S., Vladic, J., Bilic, M., Jokic, S. 2015. Supercritical CO₂ extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Ind. Crops Prod.* 76, 472–478.
- Angelo, P.M., Jorge, N. 2007. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Ver. Inst. Adolfo Lutz.* 66: 1-9.
- Beveridge, T.H.J., Li, T.S.C., Drover, J.C.G. 2002. Phytosterol Content in American Ginseng Seed Oil. *J. Agric. Food. Chem.* 50, 744-750.

- Boutin, O., Badens, E. 2009. Extraction from oleaginous seeds using supercritical CO₂: Experimental design and products quality. *J. Food Eng.* 92, 396–402.
- Carlsson, A.S. 2009. Plant oils as feedstock alternatives to petroleum – A short survey of potential oil crop platforms. *Biochimie*, 91, 665-670.
- Colodetti, T.V., Martins, L.D., Rodrigues, W.M., Brinate, S.V.B., Tomaz, M.A. 2012. Crambe: aspectos gerais da produção agrícola. *Enciclopédia Biosfera*. 8, 258-269.
- Corso, M.P., Fagundes-Klen, M.R., Silva, E.A., Cardozo Filho, L., Santos, J.N., Freitas, L.S., Dariva, C. 2010. Extraction of sesame seed (*Sesamun indicum* L.) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids*. 52, 56-61.
- Cremonese, P.A., Feroldi, M., Nadaleti, W.C., Rossi, E., Feiden, A., Camargo, M.P., Cremonese, F.E., Klajn, F.F. 2015. Biodiesel production in Brazil: Current scenario and perspectives. *Renew. Sust. Energ. Ver.* 42, 415–428.
- Da Porto, C., Decorti, D., Tubaro, F. 2012. Fatty acid composition and oxidation stability of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil extracted by supercritical carbon dioxide. *Ind. Crops Prod.* 36, 401–404.
- Danlami, J.M., Zaini, M.M.A.A., Arsad, A., Yunus, M.A.C. 2015. Solubility assessment of castor (*Ricinus communis* L) oil in supercritical CO₂ at different temperatures and pressures under dynamic conditions. *Ind. Crops Prod.* 76, 34–40.
- Dere, S., Günes, T., Sivaci, R. 1998. Spectrophotometric Determination of Chlorophyll - A, B and Total Carotenoid Contents of Some Algae Species Using Different Solvents. *Tr. J. of Botany*. 22, 13-17.
- Dimitrios, B. 2006. Sources of natural phenolics antioxidants. *Trends Food Sci. Technol.* 17, 505-512.
- Dunford, N.T., Temelli, F., 1997. Extraction conditions and moisture content of canola flakes as related to lipid composition of supercritical CO₂ extracts. *J. Food Sci.* 62, 155–159.
- Falasca, S.L., Flores, N., Lamas, M.C., Carballo, S.M., Anschau, A. 2010. *Crambe abyssinica*: An almost unknown crop with a promissory future to produce biodiesel in Argentina. *Int. J. Hydrogen Energ.* 35, 5808-5812.
- Freitas, L.S., Oliveira, J.V., Dariva, C., Jacques, R.A., Caramão, E.B. 2008. Extraction of grape seed oil using compressed carbon dioxide and propane: extraction yields and characterization of free glycerol compounds. *J. Agric. Food. Chem.* 56, 2558–2564.
- Garcia, V.A.S., Cabral, V.F., Zanoelo, E.F., Silva, C., Cardozo-Filho, L. 2012. Extraction of Mucuna seed oil using supercritical carbon dioxide to increase the concentration of L-Dopa in the defatted meal. *J. Supercrit. Fluids*. 69, 75-81.
- Granatto, D., Masson, M.L. 2010. Instrumental color and sensory acceptance of soy-based emulsions: a responder surface approach. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 30, 1090-1096.
- Haiyan, Z., Bedgood Jr., D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K. 2007. Endogenous biophenol, fatty acid and volatile profiles of selected oils. *Food Chem.* 100, 1544–1551.
- Han, X., Cheng, L., Zhang, R., Bi, J. 2009. Extraction of safflower seed oil by supercritical CO₂. *J. Food Eng.* 92, 370–376.

- Instituto Adolfo Lutz - IAL. 2008. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 1.ed., São Paulo, pp 1020.
- Jachmanián, I., Margenat, L., Torres, A., GromponE, M. 2006. Estabilidad oxidativa y contenido de tocoferoles en el aceite de canola extraído con CO₂ supercrítico. *Grasas Y Aceites*. 2,155-159.
- Jasper, S.P., Biaggioni, M.A.M., Silva, P.R.A. 2013. Caracterização físico-química do óleo e do biodiesel de *Crambe abyssinica* Hochst. *Nucleus*. 10, 183-190.
- Kmiecik, D., Korczak, J., Rudzinska, M., Michałowska, A.G., Hes, M. 2009. Stabilization of phytosterols in rapeseed oil by natural antioxidants during heating. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.* 111, 1124–1132.
- Lalas, S., Gortzi, O., Athanasiadis, V., Dourtoglou., Dourtoglou, V. 2012. Full Characterization of *Crambe abyssinica* Hochst. Seed Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 89, 2253–2258.
- Lechner, M., Reiter, B., Lorbeer, E. 1999. Determination of free and esterified sterols in potential new oil seed crops by coupled on-line liquid chromatography-gas-chromatography. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* 101, 171-177.
- Leo, L., Rescio, L., Ciurlia, L., Zacheo, G., 2005. Supercritical carbon dioxide extraction of oil and α -tocopherol from almond seeds. *J. Sci. Food Agric.* 85, 2167–2174.
- Li, T.S.C., Beveridge, T.H.J., Drover, J.C.G. 2007. Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chem.* 101, 1633–1639.
- Litwinienko, G., Kasprzycka-Guttman, T. 1998. A DSC study on thermoxidation kinetics of mustard oil. *Thermochim. Acta.* 319, 185-191.
- Litwinienko, G., Kasprzycka-Guttman, T., Studzinski, M. 1997. Effects of selected phenol derivatives on the autoxidation of linolenic acid investigated by DSC non-isothermal methods. *Thermochim. Acta.* 307, 97–106.
- Malecka, M. 2002. Antioxidant properties of theunsaponifiable matter isolated from tomato seeds, oat grains and wheat rem oil. *Food Chem.* 79, 327-330.
- Merrill, L.I., Pike, O.A., Ogden, L.V., Dunn, M.L. 2008. Oxidative Stability of Conventional and High-Oleic Vegetable Oils with Added Antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85, 771-776.
- Micic, D.M., Ostojic, S.B., Simonovic, M.B., Krstic, G., Pezo, L.L., Simonovic, B.R. 2015. Kinetics of blackberry and raspberry seed oils oxidation by DSC. *Thermochim. Acta.* 601, 39–44.
- Moslavac, T., Jokic, S., Subaric, D., Aladic, K., Vukoja, J., Prce, N. 2014. Pressing and supercritical CO₂ extraction of *Camelina sativa* oil. *Ind. Crops Prod.* 54, 122–129.
- Nimet, G., Silva, E.A., Palú, F., Dariva, C., Freitas, L.S., Neto, A.M., Cardozo Filho, L. 2011. Extraction of sunflower (*Heliantus annuus* L.) oil with supercritical CO₂ and subcritical propane: Experimental and modeling. *Chem. Eng. J.* 168, 262–268.

- Onorevoli, B., Machado, M.E., Dariva, C., Franceschi, E., Krause, L.C., Jacques, R.A. Caramão, E.B. 2014. A one-dimensional and comprehensive two-dimensional gas chromatography study of the oil and the bio-oil of the residual cakes from theseeds of *Crambe abyssinica*. *Ind. Crops Prod.* 52, 8-16.
- Osawa, C.C., Goncalves, L.A.G., Ragazzi, S. 2006. Titulação potenciométrica aplicada na determinação de ácidos graxos livres de óleos e gorduras comestíveis. *Quim. Nova.* 29, 593-599.
- Pederssetti, M.M., Palú, F., Silva, E.A., Rohling, J.H., Cardozo-Filho, L., Dariva, C. 2011. Extraction of canola seed (*Brassica napus*) oil using compressed propane and supercritical carbon dioxide. *J. Food Eng.* 102, 189-196.
- Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. 2003. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different in vitro assays. *J. Nutr.* 133, 2812-2819.
- Pitol, C., Broch, D.L., Roscoe, R., 2010. Tecnologia e produção: crambe. Fundação MS, pp. 60.
- Przybylski, R., Lee, Y., Kim, I. 1998. Oxidative Stability of Canola Oils Extracted with Supercritical Carbon Dioxide. *Lebenson. Wiss. Technol.* 31, 687-693.
- Przygoda, K., Wejnerowska, G. 2015. Extraction of tocopherol-enriched oils from Quinoa seeds by supercritical fluid extraction. *Ind. Crops Prod.* 63, 41–47.
- Ramadan, M.F., Mörsel, J. 2004. Oxidative stability of black cumin (*Nigella sativa* L.), coriander (*Coriandrum sativum* L.) and niger (*Guizotia abyssinica* Cass.) crude seed oils upon stripping. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 35–43.
- Ruttarattanamongkol, K., Siebenhandl-Ehn, S., Schreiner, M., Petrasch, A.M. 2014. Pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction, physico-chemical properties and profile characterization of *Moringa oleifera* seed oil in comparison with conventional extraction methods. *Ind. Crops Prod.* 58, 68–77.
- Ryan, E., Galvin, K., O'Connor, T.P., Maguire, A.R., O'Brien, N.M. 2007. Phytosterol, Squalene, Tocopherol Content and Fatty Acid Profile of Selected Seeds, Grains, and Legumes. *Plant Foods Hum. Nutr.* 62, 85–91.
- Sahena, F., Zaidul, I.S.M., Jinap, S., Karim, A.A., Abbas, K.A., Norulaini, N.A.N., Omar, A.K.M. 2009. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction – A review. *J. of Food Eng.* 95, 240–253.
- Santos, K.A., Bariccatti, R.A., Cardozo-Filho, L., Schneider, R., Palú, F., Silva, C., Silva, E.A. 2015. Extraction of crambe seed oil using subcritical propane: Kinetics, characterization and modeling. *J. Supercrit. Fluids.* 104, 54–61.
- Santos, W.J., Silva, E.A., Taranto, O.P. 2013. Supercritical Fluid Extraction from Mango (*Mangifera indica* L.) Leaves: Experiments and Modeling. *Chemical Engineering Transactions.* 32, 2005-2010.
- Shao, P., Liu, Q., Fang, Z., Sun, P. 2015. Chemical composition, thermal stability and antioxidante properties of tea seed oils obtained by different extraction methods: Supercritical fluid extraction yields the best oil quality. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117, 355-365.

- Shashidhara, Y.M., Jayaram, S.R. 2010. Vegetable oils as a potential cutting fluid - An evolution. *Tribol. Int.* 43, 1073–1081.
- Solati, Z., Baharin, B.S., Bagheri, H. 2012. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of *Nigella sativa* L. oil using full factorial design. *Ind. Crops Prod.* 36, 519–523.
- Szydłowska-Czerniak, A., Dianoczki, C., Recseg, K., Karlovits, G., Szłyka, E. 2008. Determination of antioxidant capacities of vegetable oils by ferric-ion spectrophotometric methods. *Talanta.* 76, 899–905.
- Thurgood, J., Ward, R., Martini, S. 2007. Oxidation kinetics of soybean oil/anhydrous milk fat blends: A differential scanning calorimetry study. *Food Res. Int.* 40, 1030–1037.
- Tomita, K., Machmudah, S., Quitain, A.T., Sasaki, M., Fukuzato, R., Goto, M. 2013. Extraction and solubility evaluation of functional seed oil in supercritical carbon dioxide. *J. Supercrit. Fluids.* 79, 109–113.
- Tuberoso, C.I.G., Kowalczyk, A., Sarritzu, E. Cabras. P. 2007. Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chem.* 103, 1494–1501.
- Uenojo, M., Maróstica Junior, M.R., Pastore, G.M. 2007. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Quim. Nova.* 30, 616-622.
- Uquiche, E., Romero, V., Ortíz, J., del Valle, J.M. 2012. Extraction of oil and minor lipids from cold-press rapeseed cake with supercritical CO₂. *Braz. J. Chem. Eng.* 29, 585 - 597.
- Visentainer, J.V., Franco, M.R.B. 2012. Ácidos Graxos em Óleos e Gorduras: Identificação e Quantificação, Ed. Eduem, pp. 122.
- Wu, H., Shi, J., Xuea, S., Kakuda, Y., Wanga, D., Jiang, Y., Yee, X., Lif, Y., Subramanian, J. 2011. Essential oil extracted from peach (*Prunus persica*) kernel and its physicochemical and antioxidant properties. *Food Sci. Technol.* 44, 2032-2039.
- Yang, M., Zheng, C., Zhou, Q., Huang, F., Liu, C., Wang, H. 2013. Minor components and oxidative stability of cold-pressed oil from rapeseed cultivars in China. *J. Food Compos. Anal.* 29, 1–9.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Seguem abaixo algumas sugestões para trabalhos futuros:

1. Testes com outros nutrientes/doses na adubação e sua influência sobre as características agronômicas e qualidade do óleo de crambe;
2. Testar métodos e condições de extração do ácido erúxico do óleo, visto que apresenta alto valor agregado;
3. Realizar planejamento experimental visando a otimização da extração com SC-CO₂, com variação de pressão, temperatura e tempo de extração;
4. Utilizar outros métodos de extração do óleo como, por exemplo, prensagem mecânica e/ou ultrassom com posterior comparação entre as extrações em termos de componentes e características do óleo.