



ALINE GOMES DIAS PINTO MONTEIRO

**DETOXIFICAÇÃO DE COPRODUTOS
OBTIDOS NA EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS DE
PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) E DE
MAMONA (*Ricinus communis* L.) PARA
PRODUÇÃO DE ALIMENTOS PARA ANIMAIS**

LAVRAS – MG

2014

ALINE GOMES DIAS PINTO MONTEIRO

**DETOXIFICAÇÃO DE COPRODUTOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO DOS
ÓLEOS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) E DE MAMONA
(*Ricinus communis* L.) PARA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS PARA
ANIMAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Mário César Guerreiro

LAVRAS – MG

2014

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e
Serviços da Biblioteca Universitária da UFLA**

Monteiro, Aline Gomes Dias Pinto.

Detoxificação de coprodutos obtidos na extração dos óleos de
pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e de mamona (*Ricinus communis*
L.) para a produção de alimentos para animais/ Aline Gomes Dias
Pinto Monteiro. – Lavras : UFLA, 2014.

128 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2014.

Orientador: Mário César Guerreiro.

Bibliografia.

1. Fenton homogêneo. 2. Coproduto. 3. Pinhão manso. 4.
Mamona. 5. Ruminante. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

CDD – 541.395

ALINE GOMES DIAS PINTO MONTEIRO

**DETOXIFICAÇÃO DE COPRODUTOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO DOS
ÓLEOS DE PINHÃO MANSO (*Jatropha curcas* L.) E DE MAMONA
(*Ricinus communis* L.) PARA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS PARA
ANIMAIS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2014.

Dra. Maria Lucia Bianchi	UFLA
Dr. Jonas Leal Neto	UFLA
Dr. Cleiton Nunes	UFLA
Dr. Pedro Castro Neto	UFLA
Dr. Ulf Schuchardt	UNICAMP

Dr. Mário César Guerreiro
Orientador

LAVRAS – MG

2014

Ao meu querido marido e grande amigo, Bruno; à minha filha, Marina; aos meus queridos pais, Aladir e Lourdes; à minha querida tia Sô, responsáveis por mais uma vitória em minha vida, com muito amor e carinho.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre presente em minha vida e, principalmente, nos momentos mais difíceis, a me guiar pelo caminho correto da vida e me oportunizar a paz.

Aos meus pais, Aladir e Lourdes, responsáveis pela minha formação intelectual e moral.

Ao meu grande amigo, parceiro, eterno amor e marido, Bruno, por todo apoio, carinho e paciência.

À minha querida filha, Marina, por seu amor, carinho e compreensão nos momentos em que estive ausente, durante a realização deste projeto.

À minha tia Sô; meu irmão, Thiago e a toda minha família, que sempre torce pelo meu sucesso.

À amiga Glaci, com sua ajuda maternal, ficando com a Marina, me salvando, em TODOS os momentos em que precisei ficar na universidade até mais tarde... Não tenho palavras para agradecer. Nunca vou esquecer... "Não esquece da amiga não" (risos).

Às amigas Iúlica, Elaine do Paulo e Elaine do Pedro, por todo o apoio.

Ao professor Mário Guerreiro, por quem tenho muita admiração e gratidão, eu agradeço pela orientação, mas, acima de tudo, pela confiança, pelos ensinamentos, amizade e dedicação ao longo desses vários anos.

A todos os professores do Departamento de Química, em especial aos professores Jonas, Walcleé, Matheus e Malu, pelo carinho e ensinamentos.

Aos professores do DEG, Pedro Castro Neto (Pedrão) e do DAG, Antonio Carlos Fraga (Fraga), pelo fornecimento das tortas.

À grande minha amiga Kátia, por toda a ajuda técnica e fraternal.

À amiga Aline Marques, pela excepcional ajuda no teste *in vivo* e pela importante amizade e, também, pela ajuda durante o teste *in vivo*, agradeço aos colegas Carlos, Andreísa, “Caxumba” e “Furmiga”.

À amiga Eliane Resende, pela amizade e carinho nesse processo tão solitário.

Aos amigos de trabalho e de convivência diária: Andreísa, Aline Tireli, Ana Carolina, “Will”, Deise, Carlos, Bruna, Pri, Gui e professora Iara.

Aos funcionários do Departamento de Química, Joalis, Xulita, Marcelo, Wilson e Dedé, por toda a ajuda durante a parte experimental.

Aos professores Raimundo Vicente, Francisco Duque, Mary Susan, funcionário Willian Cortez e Mestre Rafael Costa do DMV/UFLA.

Aos professores Eduardo Valério, Elisângela Carvalho e Luis Carlos Lima, do DCA/UFLA, pelo apoio e confiança na reta final.

Aos novos amigos do Laboratório de Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças e do DCA/UFLA, Maísa, Glaucia, Rita, Rafaela, Juliana e Gilma, e a todas as meninas, pelas vibrações positivas.

À FINEP, pelo apoio financeiro aos diversos laboratórios utilizados neste projeto.

À CAPES, pelo apoio ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

Não pretendemos que as coisas mudem, se sempre fazemos o mesmo. A crise é a melhor benção que pode ocorrer com as pessoas e países, porque a crise traz progressos. A criatividade nasce da angústia, como o dia nasce da noite escura. É na crise que nascem as invenções, os descobrimentos e as grandes estratégias. Quem supera a crise, supera a si mesmo sem ficar 'superado'. Quem atribui à crise seus fracassos e penúrias violenta seu próprio talento e respeita mais os problemas do que as soluções. A verdadeira crise é a crise da incompetência... Sem crise não há desafios; sem desafios, a vida é uma rotina, uma lenta agonia. Sem crise não há mérito. É na crise que se aflora o melhor de cada um...

Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

Os principais coprodutos oriundos do processo de extração do óleo de pinhão-mansão e de mamona são a torta, o farelo e a casca. As tortas poderiam ser utilizadas como complemento proteico na alimentação animal, porém, as propriedades tóxicas do material inviabilizam sua utilização para este fim. A partir daí, este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver um novo processo para detoxificar os coprodutos oriundos da extração dos óleos de pinhão-mansão e mamona. A tecnologia desenvolvida teve como principais vantagens o baixo custo, a simplicidade e a facilidade de acesso para pequenos agricultores, características essas que conferem um caráter inovador ao processo de detoxificação. Para isso foram utilizadas reações de oxidação do tipo Fenton homogêneo para o tratamento de detoxificação. As tortas detoxificadas foram, então, caracterizadas quanto à presença das substâncias tóxicas presentes em cada uma. Posteriormente, foram realizados testes de composição centesimal para garantir a qualidade nutricional do material detoxificado. A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para a verificação das modificações físicas dos materiais, além da presença de inibidores de tripsina, como elemento antinutricional. A fim de garantir a total eficiência do processo, foi realizado teste *in vivo* com a inserção de níveis crescentes de 5%, 10% e 15% das tortas detoxificadas na dieta dos animais. Os resultados da detoxificação da torta de pinhão-mansão foram conferidos por análise em HPLC, sendo possível constatar a redução do teor de ésteres de forbol de $3,19 \text{ mg.kg}^{-1}$, na torta não tratada, para $0,00 \text{ mg.kg}^{-1}$. Nas tortas de mamona, 100% de redução da ricina, naturalmente presente na torta de mamona, foram conferidos pela técnica de eletroforese. A composição centesimal após o tratamento não apresentou diferenças significativas. A microscopia eletrônica de varredura mostrou as modificações ocorridas em ambas as tortas. Os inibidores de tripsina não foram reduzidos da torta de pinhão-mansão. Já para a torta de mamona houve uma redução expressiva, de 24,26 UTI para 0,00 UTI. No teste *in vivo*, os animais alimentados com a torta de pinhão-mansão detoxificada apresentaram reações de intoxicação, como diarreia, perda de peso, de pelo e de apetite, chegando ao óbito alguns animais alimentados com a ração contendo 15% de torta detoxificada. Os animais alimentados com a torta de mamona detoxificada apresentaram reações de tolerância para os três níveis testados, como ganho de peso superior ao dos animais alimentados com a dieta controle (isenta de torta). Ao final deste estudo foi possível sugerir o uso do processo desenvolvido para a detoxificação da torta de mamona, possibilitando seu uso como complemento proteico da ração de outros animais, nos níveis testados. Já para a torta de pinhão-mansão ainda se fazem necessários mais estudos para a sua completa detoxificação.

Palavras-chave: Detoxificação. Biodiesel. Pinhão-mansão. Mamona. Complementos Alimentares.

ABSTRACT

The main waste arising from the process of extraction of jatropha and castor oil are cake, bran and husk. Cakes could be used as a protein supplement in animal feed, but the toxic properties present in the material prevents their use for this purpose. Therefore the aim of this study was to develop a process to detoxify the waste arising from the extraction of oil from jatropha and castor bean. The developed technology has major advantages as low cost, simplicity and ease of access for small farmers, these characteristics that give an innovative character to the detoxification process. For this was used oxidation reactions of the type homogeneous Fenton treatment for detoxification. Detoxified cakes were then characterized for the presence of toxic substances in each. Subsequently, the chemical composition tests were performed to ensure the nutritional quality of detoxified material. The scanning electron microscopy was used to verify the physical changes of materials. Besides testing for the presence of trypsin inhibitors as anti-nutritional element. To ensure the overall efficiency of the process was conducted in vivo test by inserting increasing levels of 5, 10 and 15 % of cakes detoxified in the diet. The results of detoxification Jatropha cakes were checked by HPLC analysis, where it was possible to reduce the content of phorbol esters of 3.19 mg / kg in untreated cake to 0.00 mg / kg. In castor bean cakes 100 % reduction of ricin, naturally present in castor bean, was conferred by electrophoresis. The proximate composition after treatment showed no significant differences. The scanning electron microscopy showed the changes occurring in both cakes. Trypsin inhibitors were not reduced Cake jatropha. As for the castor bean was a significant reduction of 24.26 to 0.00 UTI. In the in vivo test, the animals fed the cake detoxified jatropha had reactions of intoxication, such as diarrhea, weight loss, and appetite at arriving to death some animals fed the diet containing 15 % of cake detoxified. The animals fed detoxified castor bean showed tolerance reactions to the three levels tested, as higher weight gain to eat animals fed control diet (free of cake). At the end of this study we can suggest the use of the process for the detoxification of castor bean, enabling its use as a protein supplement to the diet of other animals, in both levels. As for the jatropha cakes further studies to complete their detoxification is still needed.

Keywords: Detoxification. Biofuel. Jatropha. Ricin. Food supplements.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

- Figura 1 Estruturas moleculares do tigliane (molécula do meio) e de ésteres de forbol..... 22
- Figura 2 Estrutura da molécula da ricina 26

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

- Figura. 1 Esquema de detoxificação das tortas de pinhão-manso e de mamona 56
- Figura. 2 Teste de oxidação na presença do catalisador 63
- Figura. 3 Cromatograma e espectro de absorção da torta de pinhão-manso não tratada 65
- Figura. 4 Representação da relação entre quantidade de catalisador e quantidade de éster de forbol..... 66
- Figura. 5 Teor de ésteres de forbol nas amostras tratadas com Fe (III) e PDC e não tratadas 67
- Figura. 6 Gel de poliacrilamida *SDS-PAGE* 71
- Figura. 7 Micrografias da torta de pinhão-manso tratada (a) e sem tratamento (b) 74
- Figura. 8 Micrografias da torta de mamona tratada (b) e sem tratamento (a)... 74

ARTIGO 2

- Figure 1 Results of the weight gain of rats during the 28 day experiment: C = control, 0% castor bean; M1 = diet containing 5% castor bean; M2 = diet containing 10% castor bean; M3 = diet containing 15% castor bean..... 97

ARTIGO 3

- Figura 1 Perfil de crescimento dos ratos durante os 28 dias de experimento de cada tratamento..... 117
- Figura 2 Fotomicrografia do pulmão de um dos ratos alimentados com a dieta controle (A) e alimentados com a torta de pinhão manso detoxificada (B,C e D)..... 120

Figura 3 Fotomicrografia do fígado de um dos ratos alimentados com a dieta controle (A) e alimentados com a torta de pinhão manso detoxificada 121

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Tabela 1	Materiais empregados como catalisadores no processo oxidativo de detoxificação das tortas de pinhão-manso e mamona	57
Tabela 2	Variação da concentração dos catalisadores utilizados na detoxificação da torta de pinhão-manso	58
Tabela 3	Variação da concentração dos catalisadores utilizados na detoxificação da torta de mamona	59
Tabela 4	Variação da concentração dos catalisadores utilizados na detoxificação da torta de mamona	73
Tabela 5	Avaliação bromatológica da torta de mamona.....	75
Tabela 6	Avaliação bromatológica da torta de pinhão-manso.....	75
Tabela 7	Avaliação de macro e micronutrientes da torta de mamona	78
Tabela 8	Avaliação de macro e micronutrientes da torta de pinhão-manso ...	78

ARTIGO 2

Table 1	Diet composition used for animals	93
Table 2	Proximate composition of detoxified and untreated castor bean	96
Table 3	CMD, GMD and CEA of rats with experimental trial diets	96
Table 4	Hemogram of the rats after 28 days of feeding with the experimental diets	98
Table 5	Activity of enzymes in the blood serum of animals at the end of the experiment	98

ARTIGO 3

Tabela 1	Composição das dietas para os animais	113
Tabela 2	Atividade de inibidor de tripsina na torta de pinhão-manso sem tratamento e detoxificada via processo oxidativo avançado	116
Tabela 3	CMD, GMD e CEA dos ratos durante o período experimental	118
Tabela 4	Hemograma dos animais após 28 dias com as dietas experimentais	118
Tabela 5	Atividade de enzimas no soro dos animais, após 28 dias com as dietas experimentais.....	119

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	14
1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3	OBJETIVO GERAL	35
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
	REFERÊNCIAS	36
	SEGUNDA PARTE - ARTIGOS	50
	ARTIGO 1 Detoxificação das tortas de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) e de mamona (<i>Ricinus communis</i> L.) por reações oxidativas.....	50
	ARTIGO 2 The efficiency of detoxified castor bean cakes in diets of the <i>Rattus norvegicus</i> rats.....	86
	ARTIGO 3 Efeito da dieta de ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) Wistar contendo torta de pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.) detoxificada .	107

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

São utilizadas diversas matérias-primas para a fabricação de biodiesel, sendo a soja a principal, dentre gordura animal, algas e outras oleaginosas (FIGUEIREDO; FARIAS FILHO, 2009).

Segundo dados de Brasil (2013), o biodiesel não tem preço competitivo, quando comparado com o diesel de petróleo. Com isso, a maior preocupação com o custo final do produto se deve ao custo inicial com a matéria-prima, que é responsável por aproximadamente 80% do custo total da produção do óleo. Com isso, a busca contínua por novas matérias-primas que atendam a todos os requisitos para a obtenção de um biodiesel de qualidade, de maior rendimento, dentre outros fatores que contribuam para a redução do custo final desse biocombustível, é ainda um desafio técnico científico.

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e a mamona (*Ricinus communis* L.) são oleaginosas bastante estudadas, principalmente pelo seu alto potencial de rendimento e as propriedades que o óleo oferece. Enquanto a soja produz 500 kg de óleo/ha, o pinhão-manso tem capacidade produtiva de 1.500 kg de óleo/ha e a mamona, 450 kg de óleo/ha (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA, 2013). O processo de extração do óleo para a fabricação de biodiesel ou outro material, a partir de pinhão-manso ou mamona, gera a glicerina, a torta e os farelos.

A torta e o farelo são produzidos durante a extração do óleo, sendo dois importantes coprodutos da cadeia produtiva dos óleos de pinhão-manso e da mamona. Durante a extração mecânica, é produzida a torta e, na extração do óleo por solventes, obtém-se o farelo. Esses dois coprodutos são, frequentemente, utilizados como adubo por apresentarem quantidades

significativas de macro e de micronutrientes, até porque a torta e o farelo têm, em sua constituição, substâncias tóxicas e antinutricionais que impossibilitam uma destinação mais nobre, além da utilização como adubo.

Outro obstáculo são os inibidores de tripsina, que representam um considerável empecilho para a inclusão da torta de mamona e de pinhão-manso na alimentação animal, considerando seus efeitos de redução na digestibilidade de proteínas, isso porque a atividade dos inibidores de tripsina nem sempre é eliminada após o processo de detoxificação.

O foco principal deste projeto é tratar a torta e/ou o farelo, gerados na extração dos óleos a partir dessas oleaginosas, tornando viável a sua utilização como complemento proteico na alimentação animal e, por consequência, agregar maior valor ao produto final.

As tortas detoxificadas se tornariam um alimento alternativo, de baixo custo com alto valor nutricional. A importância da sua utilização como ração também se dá pela quantidade significativa de proteína, nitrogênio, potássio e fósforo encontrados na torta/farelo, além de outros componentes nutricionais importantes na alimentação animal.

Até o momento, já existem diversos processos de detoxificação para as tortas de pinhão-manso e de mamona relatados na literatura (ANANDAN et al., 2005; JIN et al., 2010; KHARE et al., 2011; MAKKAR et al., 2010; MARTINEZ-HERRERA et al., 2006; RAKSHIT et al., 2008). Esses tratamentos utilizam agentes físicos e químicos. Porém, devido ao alto custo desses processos, que os tornam industrialmente inviáveis, as tortas estão sendo utilizadas como adubo.

Para a detoxificação da torta/farelo de pinhão-manso, propõe-se, neste projeto, principalmente, a realização de reações de oxidação dos componentes tóxicos com a utilização de catalisadores homogêneos. Além disso, também será realizado teste *in vivo* com a inserção de teores crescentes de ambas as tortas

tratadas na alimentação de ratos Wistar, a fim de confirmar a eficiência do processo de detoxificação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biocombustíveis como fontes de energia renovável

A crise do petróleo tem motivado a busca por recursos energéticos alternativos. O biodiesel se destaca entre eles como um dos mais promissores da atualidade devido, particularmente, à sua natureza química e à diminuição da emissão de gases poluentes, quando comparados com os emitidos pelos combustíveis fósseis. Com isso, a preocupação com a crise energética mundial incentiva a realização de vários estudos, com o objetivo de tentar minimizar os impactos gerados, como, por exemplo, o efeito estufa e o aquecimento global.

No Brasil, as fontes de energias renováveis são particularmente de maior interesse, devido ao fato de que a principal fonte de energia do país é o petróleo, produto de origem mineral e alto custo e proveniente de fonte de energia não renovável. Esse fato justifica o grande interesse em biocombustível que, além de ser de origem vegetal renovável, é de mais fácil produção, quando comparado ao petróleo (BERMANN, 2008).

Os biocombustíveis são derivados de matérias agrícolas, como plantas oleaginosas, por exemplo, a mamona e o pinhão-mansão, além de biomassa florestal e de gordura animal, dentre outras matérias orgânicas. Os biocombustíveis podem ser classificados como etanol de primeira e segunda geração, biodiesel, biogás, biomassa, biometanol, bioéter dimetílico, bio-ETBE (bioéter etil-terc-butílico), bio-MTBE (bioéter metil-terc-butílico), biocombustíveis sintéticos, bio-hidrogênio, sendo os mais importantes o etanol de primeira geração, o biodiesel e o biogás (FIGUEIREDO; FARIAS FILHO, 2009).

O biodiesel é um combustível renovável, constituído de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos derivados de óleos ou gorduras vegetais ou

animais. Pode ser obtido por meio da transesterificação de triglicerídeos com um álcool de cadeia curta (etanol ou metanol) na presença de um catalisador (ácido, básico ou enzimático) (PINTO et al., 2005).

No processo de produção do biodiesel são obtidos os ésteres metílicos de ácidos graxos (biodiesel) e a glicerina (subproduto, valorizado no mercado de sabões, indústria de cosméticos e também em estudos para utilização em rações animais). Além da glicerina, são produzidos outros coprodutos, como as tortas e os farelos, que podem constituir outras fontes de renda importantes (ABDALLA et al., 2008). Com o aumento da produção de biodiesel cresce também a preocupação com o volume de coprodutos gerados por essa atividade.

2.2 Coprodutos do processo produtivo do Biodiesel

Segundo dados da Agência Nacional do Petróleo (ANP), atualizados em julho de 2013, a produção brasileira de biodiesel até maio de 2013 foi de, aproximadamente, 1,15 bilhão de litros. Trata-se do maior patamar para os cinco primeiros meses do ano. Em abril, a produção das usinas de biodiesel estabeleceu um novo recorde mensal, de cerca de 257 milhões de litros. O processo de produção do biodiesel gera um grande volume de coprodutos (tortas, farelos e cascas) que, com a expansão da cadeia produtiva do biodiesel, necessitará de uma destinação correta e preferencialmente sustentável (ASSIS et al., 1962). Somente no processo de extração de 1 kg do óleo de mamona ou de pinhão-mansão são gerados cerca de 0,6 kg de coprodutos, dentre eles a torta e o farelo.

O Brasil, devido ao clima favorável para essa vegetação, tem uma diversidade de oleaginosas que são utilizadas na fabricação de biodiesel. Dentre essas oleaginosas destacam-se a soja (*Glycine max*), o girassol (*Helianthus annuus*), a mamona (*Ricinus communis L.*), o dendê (*Elaeis guineensis*), o

pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.), o nabo forrageiro (*Raphanus sativus*), o algodão (*Gossypium* spp. L.), o amendoim (*Arachis hypogaea*), a canola (*Brassica napus*), o gergelim (*Sesamum orientale*), o babaçu (*Orrbignya speciosa*) e a macaúba (*Acrocomia aculeata*). Atualmente, as principais oleaginosas utilizadas para a produção de biodiesel são a soja, o algodão, o amendoim e o girassol. Porém, outras oleaginosas também despertam grande interesse, como o pinhão-manso e a mamona (BIODIESELBR.COM, 2011; PETROBIO, 2013; STORCK BIODIESEL, 2013).

A possibilidade de utilizar biomassas oriundas dos coprodutos agroindustriais para produzir novos materiais tem chamado a atenção de muitos pesquisadores. Esses coprodutos constituem matéria-prima renovável, de baixo custo e sua utilização possibilita o aumento da renda do produtor sem aumentar o custo com a produção e a área plantada (ABDALLA et al., 2008). Dessa forma, além de agregar valor a um coproduto, promove-se a redução do seu impacto ambiental.

Tem sido demonstrado, em estudos, que as tortas de mamona e de pinhão-manso são ricas em proteína bruta, no entanto, apresentam altos teores de compostos tóxicos e antinutricionais. Portanto, se tratados (detoxificados), esses coprodutos poderiam ser utilizados como complemento na dieta animal, funcionando como fonte de energia para ruminantes, monogástricos e aves.

2.3 Utilização das tortas na alimentação de animais ruminantes

Na criação de animais de corte, os gastos com alimentação representam um dos principais componentes do custo da produção. Com isso, alimentos alternativos e de baixo custo representam uma forma de maximizar os lucros. A agroindústria gera grandes quantidades de coprodutos que, muitas vezes, têm

valores nutritivos potenciais e podem ser utilizados na alimentação animal (GOES et al., 2008).

O Brasil importa insumos para compor rações animais. Além disso, em regiões como o semiárido brasileiro (local onde a mamona é extensamente cultivada), a exploração de animais domésticos é limitada pelas condições climáticas. Durante épocas secas, ocorre uma diminuição da disponibilidade de forrageiras e o amadurecimento fisiológico da planta com condições de lignificação mais intensa, resultando em redução da digestibilidade, proteína e alguns minerais importantes.

O uso das tortas, de pinhão-manso e mamona, na alimentação animal apresenta-se como uma alternativa importante, reduzindo a necessidade de importação de insumos para a complementação de ração e suprimindo a necessidade alimentar de animais de regiões, nas quais, principalmente em épocas de seca, a escassez de alimento (diminuição das forrageiras) é um fator de muita preocupação (RIBEIRO; VELOSO, 2006; STIRPE et al., 1976).

Vários estudos apontam essas tortas com grande potencial para uso como complemento nutricional na alimentação animal. Contudo, existem algumas desvantagens, como fatores antinutricionais (fitatos e inibidores de tripsina) e compostos tóxicos (ricina e ésteres de forbol), além de alguns compostos alergênicos (MAKKAR et al., 1997; MARTINEZ-HERRERA et al., 2006). Mesmo apresentando essas desvantagens, esses materiais podem ser utilizados, desde que recebam tratamentos adequados para a redução ou a eliminação desses fatores.

Os processos de detoxificação das tortas de pinhão-manso e de mamona têm chamando a atenção dos pesquisadores, pelo alto valor nutricional que elas apresentam. Este fato chama a atenção em virtude da necessidade de remoção ou da inativação dos componentes tóxicos, visando ao potencial aproveitamento, após a extração do óleo, da torta ou do farelo como ingrediente de ração animal.

Todos os processos de detoxificação desenvolvidos até o momento requerem a aplicação de temperaturas elevadas, o que torna o processo altamente dispendioso.

O presente projeto vem apresentar uma proposta de utilização de catalisadores no processo de detoxificação das tortas de pinhão-manso e de mamona. Esses catalisadores são sais de ferro que apresentam baixo custo econômico. Além disso, a temperatura utilizada durante o processo de detoxificação será a mais próxima da temperatura ambiente possível. O uso desses catalisadores e da não utilização da etapa de aquecimento tem a finalidade de tornar o processo viável economicamente.

2.3.1 Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

O pinhão-manso, *Jatropha curcas* L., é um tipo de vegetação característica de áreas cujo solo é pouco fértil e o clima é desfavorável para a cultura da grande maioria de vegetais, hortaliças e leguminosas. A vegetação de pinhão-manso é resistente a doenças e os insetos não o atacam, devido ao látex cáustico que escorre das folhas, quando arrancadas ou feridas. Seu ciclo produtivo pode chegar a 40 anos e manter a média de produtividade de 2 t/ha, segundo Azevedo e Lima (2001). Essa oleaginosa pode ser considerada uma das mais promissoras das regiões sudeste, centro-oeste e nordeste do Brasil, quando o objetivo é de substituir o diesel de petróleo.

A semente de pinhão-manso fornece de 40% de óleo extraído com solventes e de 30% a 35%, em caso de extração por expressão (trituração e aquecimento da semente). O coproduto gerado depende do tipo de extração realizada; se realizado por extração mecânica, é chamado de torta; se por solventes, é chamado de farelo.

A torta de pinhão-manso é rica em nitrogênio, potássio, fósforo e matéria orgânica, além de conter, aproximadamente, 8% de óleo residual, porém, não pode ser utilizada diretamente na alimentação animal, devido a componentes tóxicos presentes nas sementes. Por esse motivo, atualmente, tem sido muito utilizada como adubo. Essa toxicidade, por muito tempo, foi atribuída a uma lectina denominada curcina, porém, após muitas pesquisas e relatos na literatura, descobriu-se que essa atividade tóxica está relacionada com a presença de uma complexa mistura de ésteres (Figura 1) tetracíclico diterpeno, que apresentam atividades carcinogênicas e ação inflamatória (MAKKAR; ADERIBIGBE; BECKER, 1998; MAKKAR; BECKER, 1999).

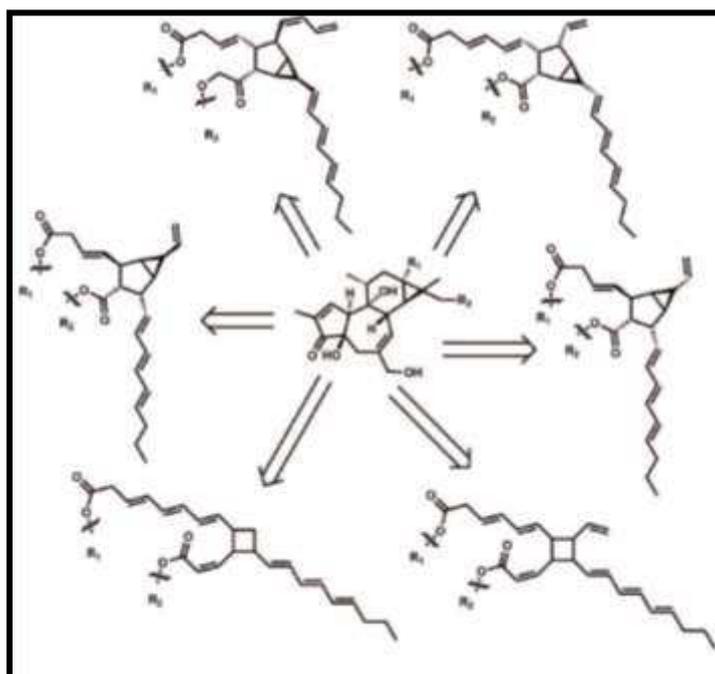


Figura 1 Estruturas moleculares do tigliane (molécula do meio) e de ésteres de forbol

Fonte: Chies (2013)

Até o momento, seis moléculas diferentes de ésteres de forbol foram identificadas na semente da planta. Acredita-se que outras possam existir, mas que ainda não foram identificadas, tornando este estudo um grande desafio para os pesquisadores. Essas moléculas de ésteres de forbol têm a estrutura de tigliane como um núcleo comum e que se diferenciam pelas cadeias laterais ligadas à função éster (CHIES, 2013). O arranjo estrutural dessas moléculas vai conferir ao pinhão-manso a característica de ser mais ou menos tóxica. A molécula de 12-dioxi-16-hidroxi-forbol-4'-[12',14'-butadienil]-6'-[16',18',20'-nonatrienil]-biciclo[3.1.0]hexane-(13-O)-2'-[carboxilato]-(16-O)-3'-[8'-butenoico-10']ato (DHPB) é um dos ésteres de forbol identificados nas sementes de *Jatropha curcas* L. (MAKKAR; BECKER, 1999). A concentração de ésteres de forbol na torta pode ser baixa, porém, sua ação tóxica é muito alta.

Os ésteres de forbol têm ação inflamatória e podem provocar diarreia, falta de ar, desidratação e até levar ao óbito de animais. Eles também agem no desenvolvimento de tumores em organismos que apresentem alguma predisposição (CHIES, 2013).

2.3.2 Mamona (*Ricinus communis* L.)

A mamona, *Ricinus communis* L., produz sementes ricas em óleo glicídico solúveis em álcool. O óleo de mamona é matéria-prima para várias aplicações. Pode ser cultivada em várias regiões do país, sendo a região nordeste a principal produtora de mamona, sendo responsável por mais de 90% da produção nacional (SEVERINO et al., 2006). Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2013), a safra desta oleaginosa, até agosto de 2013, foi de 15,3 mil toneladas.

Segundo pesquisas de desenvolvimento de novas tecnologias, o óleo de mamona é considerado matéria-prima do futuro, já que a mamona é uma planta

adaptada ao solo brasileiro, podendo ser cultivada em qualquer parte do país (CHIERICE; CLARO NETO, 2001). Contudo, o óleo era utilizado na obtenção do biodiesel, principalmente por apresentar solubilidade em metanol e não necessitar de calor e do conseqüente gasto de energia, que requerem outros óleos vegetais em sua transformação para o combustível (AZEVEDO; LIMA, 2001).

O óleo de mamona é também chamado de óleo de rícino e, internacionalmente, como *castor oil*. A importância do óleo de mamona é evidenciada por meio da vasta aplicação industrial em que os derivados são sintetizados pelas respectivas reações na molécula do grupo hidroxila. O óleo de mamona tem utilização direta no processo produtivo de cosméticos (SAVY FILHO; BANZATTO; BARBOZA, 1999). Ressalta-se seu uso também na biomedicina, na elaboração de próteses, com destaque em cirurgias ósseas de mama e de próstata (BANCO DE DESENVOLVIMENTO DE MINAS GERAIS - BDMG, 2000). O óleo de mamona é também utilizado, em grande escala, na fabricação de tintas, vernizes e sabões.

Como lubrificante, a importância do óleo de mamona deve-se ao seu poder de queimar sem produzir coprodutos e sem perder a viscosidade, apresentando características superiores às dos derivados de petróleo, que são utilizados em motores de alta rotação (COELHO, 1979). A utilização do óleo de mamona também pode reduzir a emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa, como o gás carbônico e o enxofre, conferindo ao óleo uma condição especial e diferenciada, ao ponto de despertar grande interesse no mercado internacional (BELTRÃO, 2003). Como aditivo, é usado em tanques de aviões e foguetes, impedindo que o querosene se congele em voos de 5.000 metros, sempre que a temperatura atinge a 50 °C abaixo de zero (CARVALHO, 1991). Segundo Fornazieri Júnior (1986), isso somente é possível devido à alta resistência do óleo ao escoamento e de sua forte viscosidade, que são

responsáveis pela formação de uma película envolvente e isoladora do contato direto da superfície do equipamento em que o óleo é utilizado.

O processo de produção de óleo de mamona gera, principalmente, dois tipos de coprodutos, a casca e a torta. Com 100 kg de mamona obtêm-se 25 kg de casca e 37,5 kg de torta. A casca e a torta de mamona, juntas, correspondem a 62,5% da massa da baga (IBGE, 2011). O principal uso da torta de mamona tem sido como adubo orgânico. Na alimentação animal, o seu uso é limitado pela presença da proteína ricina, em pequena quantidade, a ricinina e princípios alergênicos (EVANGELISTA; LOPES; ABREU, 2007).

A ricina (Figura 2) é uma proteína presente nas sementes da mamona, considerada a mais potente toxina de origem vegetal. Ela pode ser classificada como uma lectina, ou seja, uma proteína que tem um sítio receptor específico para um açúcar ou uma unidade de oligossacarídeo. Pertence à família das lectinas A-B, compostas por duas cadeias, A e B, ligadas por uma ligação de dissulfeto, como representado na Figura 2 (OLSNES; KOZLOV, 2001). A lectina A tem atividade enzimática e a lectina B, um sítio de ligação específico ao açúcar galactose.

A ricina também é classificada dentro de um grupo especial de proteínas denominadas RIPS (do inglês *Ribosome-Inactivating-Proteins*), ou proteínas inativadoras de ribossomos. As proteínas desse grupo são capazes de entrar nas células e se ligar a ribossomos, paralisando a síntese de proteínas e causando morte celular. Esse processo pode ser denominado de ribotoxicidade ou toxicidade (LIMA, 2006).

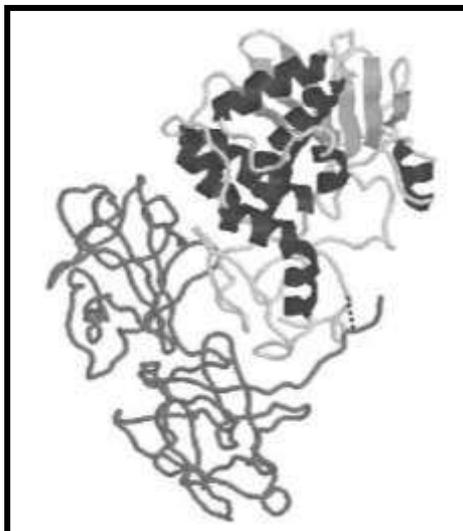


Figura 2 Estrutura da molécula da ricina
Fonte: Hartley e Lord (2004)

O processo de toxicidade, ocasionado pela ricina, se manifesta em várias etapas. Resumidamente, é possível verificar desde a entrada à atuação na célula.

A ricina entra na célula e impede a produção de proteínas, levando a célula à morte. Isso porque a cadeia B se liga a glicolipídeos e a glicoproteínas, contendo coprodutos de galactose que estão presentes na superfície da parede celular. Essa ligação facilita a entrada na célula e o transporte de uma célula para outra, com a formação de endossomas (BALDONI, 2010). Os endossomas, com a ricina, são transportados para o complexo de Golgi, porém, algumas moléculas podem voltar à superfície celular por exocitose, ou ser degradadas em lisossomas. A ricina é, então, transportada retrogradamente ao retículo endoplasmático (RAPAK; FALNES; OLSNES, 1997).

Nesta etapa, a ligação dissulfídica é clivada enzimaticamente (OLSNES; KOZLOV, 2001), ou seja, há a redução das pontes dissulfeto entre as cadeias A e B, por ação da enzima isomerase de dissulfeto. Ocorre, então, desenrolamento parcial da cadeia A, de modo a permitir a translocação pela membrana do

retículo endoplasmático, tal como acontece com as proteínas mal enroladas que, uma vez reconhecidas, são degradadas por proteínas associadas ao retículo endoplasmático (LIU; ZHAN, 2006; ROBERTS; SMITH, 2004).

A cadeia A é translocada ao citosol, onde a síntese proteica é cataliticamente inativada pela depurinação de uma adenina crítica do fator de alongação, ligando o sítio numa estrutura de base do loop de rRNA.

Com isso, ocorre a inibição da síntese proteica que, por si só, poderá levar à morte celular. Essa inativação é tão eficiente que uma única cadeia A no citosol inativa, aproximadamente, 1.500 ribossomos por minuto (AUDI et al., 2005).

2.4 Inibidores de tripsina

Os inibidores de tripsina são proteínas da classe das globulinas e estão largamente distribuídos no reino vegetal, onde aparecem em grandes quantidades nas leguminosas, nas gramíneas e nas solanáceas. A maioria destes alimentos, quando crus, apresenta elevada atividade do inibidor de tripsina (FREITAS et al., 2012).

A tripsina se liga a proteínas até que esteja em excesso. Quando isso acontece, a tripsina livre envia um sinal ao pâncreas, para reduzir a síntese de tripsinogênio. Porém, quando o inibidor se liga à tripsina, a secreção pelo pâncreas do tripsinogênio é maior (SILVA, 2013). Isso resulta em hipertrofia do pâncreas, uma resposta biológica reversível que não ocasiona dano ao órgão ou à sua função. A redução do crescimento causada por esses inibidores pode ser consequência da perda endógena de aminoácidos essenciais, os quais são secretados pelo pâncreas hiperativo, pois a tripsina e a quimotripsina são particularmente ricas em aminoácidos sulfurados (LIENER, 1991; RACKIS; GUNBMANN; LIENER, 1985).

Kakade et al. (1974) observaram que o inibidor de tripsina é rico em cisteína. Dessa forma, a resistência do inibidor de tripsina ao ataque de enzimas digestivas é um fator importante para a baixa disponibilidade de cisteína. Isso é importante porque o teor de cisteína no inibidor de tripsina chega a 15,5 g/16 g de N, enquanto, na amostra integral, é de apenas 1,0 g/16 g de N. Os inibidores dessa enzima digestiva, a tripsina, quando presentes na dieta, deduzem a atividade de enzimas pancreáticas, reduzindo a digestibilidade de proteínas e a absorção de aminoácidos. Com isso, interferem negativamente no desenvolvimento do animal (JACINTO, 2007).

2.5 Processos de detoxificação

Já existem diversos métodos para promover a detoxificação da torta de pinhão-manso e de mamona. Tais métodos utilizam processos físicos e agentes químicos, porém, uma das etapas seria a utilização de temperatura elevada (acima de 100 °C) e pressão (autoclave) (ANANDAM et al., 2005).

Os tratamentos descritos na literatura, relativos à remoção de ricina presente na torta da mamona e dos ésteres de forbol no pinhão-manso, são realizados por meio de tratamentos físicos e químicos. A seguir, são mostrados esses tratamentos, de acordo com as respectivas oleaginosas.

2.5.1 Processos de detoxificação do pinhão-manso

Em relação às pesquisas realizadas até o momento, ainda não foi possível obter metodologias de baixo custo e eficazes para detoxificação das tortas de pinhão-manso, principalmente visualizando seu uso para ração animal e em maior escala.

A presença de substâncias tóxicas, ésteres de forbol, restringe a sua utilização como ração animal. A eliminação dessas substâncias requer a degradação destes ésteres de forbol. Na tentativa de mostrar que grandes trabalhos estão sendo desenvolvidos para este fim, descrevem-se, a seguir, alguns processos de detoxificação.

Apesar de os trabalhos que serão apresentados a seguir mostrarem a redução dos componentes tóxicos, todos apresentam como desvantagens a inviabilidade econômica industrial do processo, pela utilização de temperaturas mais altas e/ou várias etapas que exigem diferentes tipos de maquinários e/ou reagentes químicos.

Martinez-Herrera et al. (2006) pesquisaram diferentes tratamentos com a semente de pinhão-manso, na tentativa de neutralizar os antinutrientes presentes nelas. Os inibidores de tripsina foram facilmente inativados com o aquecimento úmido, a 121 °C, por 25 minutos. Os níveis de fitato foram ligeiramente diminuídos por irradiação de 10 kgy. O conteúdo de saponina foi reduzido pela extração de etanol e de irradiação. A extração com etanol, seguida de tratamento com NaHCO₃ 0,07%, diminuiu consideravelmente a atividade da lectina. O mesmo tratamento também diminuiu em 97,9% o conteúdo de éster de forbol. A digestibilidade *in vitro* da farinha desengordurada ficou entre 78,6% e 80,6% e aumentou para cerca de 86%, no tratamento térmico.

Rakshit et al. (2008) descrevem a degradação de ésteres de forbol por tratamentos alcalinos e calor. Após o tratamento, o teor de ésteres de forbol foi reduzido até 89%, na farinha de sementes inteiras e descascadas. Os estudos de toxicidade foram conduzidos em ratos machos em crescimento, em que a farinha detoxificada foi utilizada como fonte alimentar. Todos os ratos tiveram redução do apetite e a ingestão de dieta foi acompanhada por diarreia baixa. Os ratos também exibiram atividade motora reduzida. Os ratos alimentados com refeições tratados apresentaram mortalidade tardia, em comparação com a não tratada.

Houve mudanças significativas, tanto em termos de consumo de alimentos como ganho de peso corporal. Exame macroscópico dos órgãos vitais indicou atrofia em relação ao controle, que foram os ratos alimentados apenas com caseína. No entanto, o exame histopatológico de vários órgãos vitais não revelou qualquer alterações microscópicas, sugerindo que a mortalidade de ratos ocorreu devido à falta de ingestão de alimentos, diarreia e emagrecimento. Novos estudos estão em andamento para a detoxificação completa do pinhão-manso.

Makkar et al. (2009) quantificaram ésteres de forbol nas frações obtidas em diferentes estágios de pré-tratamento de óleo durante a produção de biodiesel. Alguns ésteres de forbol foram removidos nas águas de lavagem. Isso implica no cuidado ao descartar a água de lavagem no meio ambiente. Tratamento de desodorização a 260 °C, a 3 mbar, com injeção de vapor de 1%, degradou completamente os ésteres de forbol.

A patente de Makkar et al. (2010) descreve a detoxificação da pinhão-manso, em que as sementes são lavadas com água a 60 °C e deixadas por 1 hora, depois ajusta-se com base (NaOH 6 mol.L⁻¹) até pH 11 e deixando-se em repouso durante 15 minutos. A mistura é, então, centrifugada e o sobrenadante coletado. Posteriormente, HCl 1 mol.L⁻¹ é adicionado até pH 8, seguido de álcool para a obtenção de um precipitado e, por último, separação e lavagem do coproduto gerado. Foi adicionada a solução etanol 95%, deixando-se sob agitação por 30 minutos e centrifugando-se por 10 minutos. O precipitado foi coletado e lavado novamente com etanol, deixado sob agitação, por 5 minutos e centrifugado por 10 minutos. O precipitado foi seco a 40 °C. Com esse tratamento não foram detectados ésteres de forbol na amostra tratada.

Khare et al. (2011) descrevem a degradação completa de ésteres de forbol por *Pseudomonas aeruginosa*, durante o estado de fermentação da semente isenta óleo. Ésteres de forbol estavam completamente degradados em

nove dias sob condições de fermentação otimizadas. Esse processo não é viável economicamente para a degradação completa dos ésteres de forbol.

2.5.2 Processos de detoxificação da mamona

Assim como o pinhão-manso, para a mamona ainda não foi apresentada uma solução viável, economicamente, para a retirada dos componentes tóxicos.

Vários trabalhos estão sendo desenvolvidos para este fim e serão descritos a seguir. Como desvantagem, em todos os trabalhos foi observada a inviabilidade econômica para processos em escala industrial.

Beltrão (2003) desenvolveu dois métodos de detoxificação. O primeiro foi cozinhar, por uma e o segundo, por duas horas, a mistura de torta moída e água, com mudança da água após cada fervura, levando à redução da ricina.

Anandan et al. (2005) desenvolveram cinco métodos de processamento físicos, ou seja, imersão, vapor, fervura, autoclavagem e aquecimento, em intervalos de tempo diferentes e seis tratamentos químicos, ou seja, amônia, formaldeído, cal, cloreto de sódio, ácido tânico e hidróxido de sódio, utilizando-se diferentes concentrações para detoxificar o coproduto. Eles concluíram que o tratamento de 1.000 g de torta em autoclave, a 2 bar, por 60 minutos, remove 100% da ricina. Os mesmos autores afirmam que o tratamento de 1.000 g da torta com 40 g de hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), à temperatura em torno de 60 °C, também reduz a ricina em 100%.

De acordo com Asqueri (2013), a detoxificação da torta de mamona também pode ser feita por meio de processos de extrusão combinados com outras variáveis, como adição de ácidos, bases, sais e enzimas, cisalhamento e aquecimento da torta a temperaturas que variam de 80 °C a 140 °C, a seco, úmido ou vapor, com diferentes tempos de exposição ao calor.

A patente de Jin et al. (2010) divulga um método de detoxificação da mamona por meio da tecnologia de extrusão. O método elimina a ricina por meio de alta temperatura, além de aplicação de alta pressão e adição de aditivos químicos e a aplicação de procedimentos, como peneiramento, refrigeração e similares. O método mostrou que o conteúdo de ricina após a detoxificação pela extrusão é menor ou igual a 0,015%. Em experimentos *in vivo* comprovou-se que a metodologia de detoxificação por extrusão pode ser seguramente utilizada na detoxificação da torta.

2.5 Processos oxidativos avançados (POA)

Uma grande preocupação com a preservação ambiental, inerente da conscientização dos riscos à saúde humana, vem motivando esforços para minimizar a contaminação do meio ambiente. Alguns desses esforços são a imposição de legislações mais restritivas, que visem à redução da quantidade e da toxicidade das emissões, além da reciclagem e do reuso de coprodutos, a adaptação e a otimização de processos de produção e a substituição de matérias-primas tóxicas. Com isso, nos últimos anos, os POAs vêm despertando grande interesse na área científica e industrial.

Os processos oxidativos avançados (POA) se baseiam em transformar, por meio de reações de degradação oxidativa com a presença de espécies oxidantes, compostos orgânicos complexos em moléculas de CO₂, H₂O e ânions inorgânicos (DOMENECH; JARDIM; LITTER, 2001).

Esse processo ocorre por meio do radical hidroxila (OH•), sendo esses altamente oxidantes (2,8 V). Além disso, os POAs são considerados processos limpos, mas que têm baixa seletividade, possibilitando a oxidação de inúmeros compostos orgânicos (DOMENECH; JARDIM; LITTER, 2001). A geração destes radicais é muito importante para a eficiência dos POAs. Quanto mais

eficientemente estes radicais forem gerados, maior será o poder oxidativo (MACIEL; SANT'ANNA JUNIOR; DEZOTTI, 2004). Atualmente, já se sabe que os POAs são importantes ferramentas, do ponto de vista ambiental. Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas na tentativa de elucidar não só os mecanismos das reações, como também a eficiência comparativa dos diferentes POAs e seu modelamento matemático (RAMOS, 2011; YANG; HU; ITO, 1998). Com isso, muitos métodos já estão disponíveis para a geração de radicais livres $\bullet\text{OH}$, utilizando oxidantes fortes (como O_3 e H_2O_2), com ou sem radiação ultravioleta (UV) e semicondutores (como TiO_2 e ZnO). Estes também podem ser não fotoquímicos (não ocorre absorção da luz ultravioleta) ou fotoquímicos (absorvem luz UV) (CATALKAYA; KARGI, 2009).

O método utilizado neste trabalho é baseado nas reações de Fenton, ou seja, sistema que utiliza H_2O_2 como o agente oxidante, na presença de íons de Ferro (II).

O reagente de Fenton é uma mistura de H_2O_2 e íons ferrosos, gerando radical hidroxila. Esse radical ataca os compostos orgânicos presentes na solução. Este mecanismo de reação, bastante complexo, pode ser representado pela Equação 1.



O ferro (II) atua como catalisador e a reação entre o peróxido é mais rápida, quando comparado com o ferro (III). Porém, o ferro (III) é mais vantajoso para a reação, considerando que, neste estado de oxidação, o ferro é mais abundante (GOODELL et al., 1997). A decomposição de peróxido por ferro (III) gera a espécie reduzida ferro (II) (Equações 2 a 4). As espécies de ferro em solução aquosa (Fe^{2+} e Fe (III)) existem como aquocomplexos.



Essa espécie reduzida também reage com o peróxido e o radical hidroperóxido (Equação 5). O íon Fe (III) também pode ser reduzido por esse radical, gerando OH.



Os íons de ferro formados podem decompor o H_2O_2 cataliticamente, em meio ácido, a H_2O e O_2 , formando íons ferrosos e radicais.

A Equação 6 mostra a atuação do H_2O_2 como sequestrador de radical hidroxila, formando o radical hidroperóxido (HO_2^\bullet), que apresenta menor potencial de redução que o HO^\bullet , prejudicando o processo de degradação. Isso acontece quando há excesso de H_2O_2 , que faz com que a concentração de Fe (II) no meio seja mais baixa do que a de Fe (III), sendo a reação entre Fe (III) e H_2O_2 (Equações 2 e 3) muito mais lenta que a decomposição de H_2O_2 na presença de Fe (II) (Equação 1).

O reagente de Fenton tem sido utilizado com sucesso no tratamento de diversos tipos de efluentes, contendo, por exemplo, clorofenóis (KWON et al., 1999) e surfactantes (LIN; LIN; LEU, 1999), e também na degradação de corantes (SZPYRKOWICZ; JUZZOLINO; KAUL, 2001), e no aumento da biodegradabilidade do contaminante para posterior tratamento biológico (KITIS et al., 2000).

3 OBJETIVO GERAL

Este trabalho foi realizado com o objetivo de desenvolver uma nova tecnologia para a detoxificação de tortas e farelos oriundos da extração de óleo de pinhão-manso e mamona, possibilitando, assim, o uso destes coprodutos na alimentação de animais, agregando valor aos mesmos.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Especificamente, buscou-se, neste trabalho:

- a) desenvolver um novo processo de detoxificação de tortas e farelos de pinhão-manso e de mamona, utilizando processos oxidativos avançados e reações do tipo Fenton;
- b) testar diferentes tipos de catalisadores à base de ferro, tendo como base a catálise homogênea, além de aperfeiçoar o processo de detoxificação utilizando a menor concentração possível do catalisador, temperatura o mais próximo da ambiente e o menor tempo de reação.;
- c) testar e garantir que o melhor processo possa preservar as principais características nutricionais nas tortas detoxificadas, necessárias para complementar a alimentação animal;
- d) realizar teste *in vivo*, utilizando doses crescentes (de 5%, 10% e 15%) das tortas de pinhão-manso e de mamona detoxificadas na alimentação de ratos (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, para garantir que a sugestão de inserir as tortas tratadas na alimentação animal possa ser feita com segurança, nas dosagens testadas.

REFERÊNCIAS

ABDALLA, A. L. et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 37, p. 260-258, 2008. Suplemento especial.

ANANDAN, A. et al. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 120, n. 1, p. 159-168, May 2005.

ASQUERI, J. L. **Pesquisa da Embrapa quer viabilizar torta de mamona para ração animal**. Disponível em: <<http://www.agrosoft.org.br/agropag/209184.htm>>. Acesso em: 12 ago. 2013.

ASSIS, F. P. et al. Valor do farelo de torta de mamona atoxicada na alimentação de vacas leiteiras, em comparação com os farelos de torta de algodão e de amendoim. **Boletim Industrial de Animais**, São Paulo, v. 20, p. 35-38, 1962.

AUDI, J. et al. Ricin poisoning: a comprehensive. **The Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.

AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: EMBRAPA, 2001. 227 p.

BALDONI, A. B. **Acúmulo de ricina em sementes de mamona e silenciamento do gene em plantas geneticamente modificadas**. 2010. 123 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2010.

BANCO DE DESENVOLVIMENTO DE MINAS GERAIS. **Aspectos de mercado para o óleo de mamona “castor oil”**. Belo Horizonte, 2000. 15 p.

BELTRÃO, N. E. M. **Torta de Mamona (*Ricinus communis* L. L.):** fertilizante e alimento. Brasília: EMBRAPA, 2003. (Comunicado Técnico, 171). Disponível em:

<http://www.cnpa.embrapa.br/plataforma_mamona/publicacoes/comunicacoes/02.PDF>. Acesso em: 2 out. 2013.

BERMANN, C. Crise ambiental e as energias renováveis. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 3, p. 20-29, 2008.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Departamento de Energias Renováveis. **Boletim mensal dos combustíveis renováveis**. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/spg/galerias/arquivos/publicacoes/boletim_mensal_combustiveis_renovaveis/Boletim_DCR_nx_063_-_abril_de_2013.pdf>. Acesso em: 15 maio 2013.

CARVALHO, L. O. de. **Cultura da mamoneira (*Ricinus communis* L. L.)**. São Paulo: CATI, 1991. 17 p.

CATALKAYA, E. C.; KARGI, F. A statistical experiment design approach for advanced oxidation of Direct Red azo-dye by photo-Fenton Treatment. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 162, n. 1, p. 230-236, Feb. 2009.

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Org.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: EMBRAPA Comunicação para Transferência de Tecnologias, 2001. p. 89-120.

CHIES, V. Métodos analíticos para avaliar a toxidez do pinhão manso. **Agroenergia em Revista**, Brasília, ano 3, n. 6, p. 28-31, 2013.

COELHO, I. **Avaliação das exportações tradicionais baianas:** caso de sisal e mamona. 1979. 174 f. Dissertação (Mestrado em Economia) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 1979.

DOMENECH, X.; JARDIM, W. F.; LITTER, M. I. Processos avanzados de oxidación para la eliminación de contaminantes. In: CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA EL DESARROLLO. **Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogênea**. La Plata: M. A. Blesa, 2001. p. 121-141.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Mamona**.

Disponível em:

<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/zoneamento_pb.pdf>. Acesso em: 11 fev. 2013.

EVANGELISTA, A. R.; LOPES, J.; ABREU, J. G. Avaliação da composição química de tortas de amendoim e mamona obtidos por extração com etanol. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília. **Anais...** Brasília: ABIPTI, 2007. Disponível em: <<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/producao/7.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2013.

FIGUEIREDO, C. B.; FARIAS FILHO, J. R. Os impactos sociais dos biocombustíveis. In: CONGRESSO NACIONAL DE EXCELÊNCIA EM GESTÃO E GESTÃO DO CONHECIMENTO PARA A SUSTENTABILIDADE, 5., 2009, Niterói. **Anais...** Niterói: UEF, 2009. 1 CD-ROM.

FORNAZIERI JÚNIOR, A. **Mamona**: uma rica fonte de óleo e divisas. São Paulo: Ícone, 1986. 71 p.

FREITAS, S. C. et al. Qualidade nutricional de farelos destoxificados de mamona. In: SIMPÓSIO DE SEGURANÇA ALIMENTAR, 4., 2012, Gramado. **Anais...** Gramado: SBCTA-RS, 2012. 1 CD-ROM.

GOES, R. H. T. B. et al. Degradabilidade ruminal da matéria seca e da proteína bruta de diferentes subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação de bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Brasília, v. 9, n. 3, p. 715-725, out./dez. 2008.

GOODELL, B. et al. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood: invited paper for special issue on pulp and paper biotechnology. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 53, n. 2/3, p. 133-162, 1997.

HARTLEY, M. R.; LORD, J. M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins & Proteomics**, Alberta, v. 1701, n. 1/2, p. 1-14, Sept. 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Destaque:** produção agrícola 2010/2011. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 ago. 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Destaque:** produção agrícola 2011/2012. Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 abr. 2013.

JACINTO, K. A. **Efeito do consumo de farinha de linhaça (*linum usitatissimum*) no crescimento de ratos wistar e sua relação com a digestibilidade de globulinas e fatores antinutricionais protéicos nas albuminas**. 2007. 82 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.

JIN, Z. et al. **Method for preparing nontoxic forage ricin by extrusion technology**. Wuxi: Jiangnan University, 2010. CN n. 101695335(A), 21 Apr. 2010. Disponível em: <<http://worldwide.espacenet.com/publicationDetails/biblio>>. Acesso em: 6 dez. 2013.

KAKADE, M. L. et al. Determination of trypsin inhibitor activity of soy products: a collaborative analysis of an improved procedure. **Cereal Chemistry**, Saint Paul, v. 51, n. 3, p. 376-382, 1974.

KHARE, S. K. et al. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. **Bioresource Technology**, Essex, v. 102, n. 7, p. 4815-4819, Apr. 2011.

KITIS, M. et al. Effects of ozone/hydrogen peroxide pretreatment on aerobic biodegradability of nonionic surfactants and polypropylene glycol. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 34, n. 11, p. 2305-2310, May 2000.

KWON, B. G. et al. Characteristics of p-chlorophenol oxidation by Fenton's reagent. **Water Research**, New York, v. 33, n. 9, p. 2110-2118, Sept. 1999.

LIENER, I. E. From soybeans to lectins: a trail of research revisited. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 203, n. 1, p. 1-5, June 1991.

LIMA, J. F. **Tamanho ótimo de parcela, alocação de fitomassa e crescimento de mamoeiro em casa de vegetação**. 2006. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal da Bahia, Cruz das Almas, 2006.

LIN, S. H.; LIN, C. M.; LEU, H. G. Operating characteristics and kinetic studies of surfactant wastewater treatment by Fenton oxidation. **Water Research**, New York, v. 33, n. 7, p. 1735-1741, July 1999.

LIU, Q.; ZHAN, E. Ricin A chain reaches the endoplasmic reticulum after endocytosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 6, n. 343, p. 857-863, 2006.

MACIEL, R.; SANT'ANNA JUNIOR, G. L.; DEZOTTI, M. Phenol removal from high salinity effluents using Fenton's reagent and photo-Fenton reactions. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, n. 7, p. 711-719, Nov. 2004.

MAKKAR, H. P. S.; ADERIBIGBE, A. O.; BECKER, K. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. **Food Chemistry**, London, v. 62, n. 2, p. 207-215, June 1998.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Plant toxins and detoxification methods to improve feed quality of tropical seeds: review. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 12, n. 3, p. 467-480, May 1999.

MAKKAR, H. et al. **Method for detoxifying plant constituents**. Stuttgart: Hohenheim University, 2010. WO n. 2010/092143, 19 Aug. 2010.

MAKKAR, H. et al. Removal and degradation of Phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. **Journal of the American Oil Chemistry Society**, Chicago, v. 86, n. 2, p. 173-181, Feb. 2009.

MAKKAR, H. P. S. et al. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, Aug. 1997.

MARTÍNEZ-HERRERA, J. et al. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food Chemistry**, London, v. 96, n. 1, p. 80-89, May 2006.

OLSNES, S.; KOZLOV, J. Ricin. **Toxicon**, Elmsford, v. 39, n. 11, p. 1723-1728, Nov. 2001.

PETROBIO. **Biodiesel**: viabilidade econômica. Ribeirão Preto, 2013. Acesso em: <<http://www.plantebiodiesel.com.br/MANUAIS.pdf>>. Acesso em: 28 set. 2013.

PINTO, A. C. et al. Biodiesel: an overview. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Brasília, v. 16, n. 6, p. 1313-1330, 2005.

RACKIS, J. J.; GUNBMANN, M. R.; LIENER, I. E. The USDA trypsin inhibitor study: I., background, objectives and procedural details. **Qualitas Plantarum Human Plant Foods for Human Nutrition**, The Hague, v. 35, p. 213-242, 1985.

RAKSHIT, K. D. et al. Toxicity studies of detoxified Jatropha meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 3621-3625, Dec. 2008.

RAMOS, P. H. **Complexos metálicos (ferro, níquel e cobalto) em sistemas de oxidação do tipo Fenton: reações e mecanismos**. 2011. 114 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

RAPAK, A.; FALNES, P. O.; OLSNES, S. Retrograde transport of mutant ricin to the endoplasmic reticulum with subsequent translocation to cytosol. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 94, n. 8, p. 3783-3788, Apr. 1997.

RIBEIRO, N. M.; VELOSO, M. C. Viabilização do processo de desintoxicação da torta de mamona visando sua utilização na alimentação animal. **Educação, Tecnologia e Cultura**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 1, p. 36-42, mar. 2006.

ROBERTS, L. M.; SMITH, D. Ricin: the endoplasmic reticulum connection. **Toxicon**, Elmsford, v. 44, n. 5, p. 469-472, Oct. 2004.

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N. V.; BARBOZA, M. Z. Mamoneira. In: COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA INTEGRAL. **Oleaginosas no Estado de São Paulo: análise e diagnóstico**. Campinas, 1999. p. 29.

SEVERIVO, L. S. et al. **Produção de biodiesel e geração de energia elétrica a partir de óleo de mamona em Quixeramobim-Ce**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2006. 26 p. (Documento, 136).

SILVA, M. D. **Efeitos dos processamentos da soja sobre o desempenho de frangos de corte**. 2013. 51 p. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

STIRPE, F. et al. Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. Toxic properties and inhibition of protein synthesis in vitro. **Biochemistry Journal**, Bethesda, v. 156, n. 1, p. 1-6, Apr. 1976.

STORCK BIODIESEL. **O que é o biodiesel?** Disponível em:
<<http://www.storckbiodiesel.com.br>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

SZPYRKOWICZ, L.; JUZZOLINO, C.; KAUL, S. N. A comparative study on oxidation of disperse dyes by electrochemical process, ozone, hypochlorite and Fenton reagent. **Water Research**, New York, v. 35, n. 9, p. 2129-2136, Sept. 2001.

YANG, M.; HU, J.; ITO, K. Characteristics of $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ oxidation process. **Environmental Technology**, London, v. 19, n. 2, p. 183-191, Feb. 1998.

6 SÍNTESE DOS CAPÍTULOS

Esta tese está dividida em duas partes distintas. A primeira contém uma introdução geral para o melhor entendimento dos assuntos expostos em todo o desenvolvimento do trabalho e a segunda é composta por três artigos científicos distintos, redigidos de acordo com as normas da revista a que foi ou será submetido e nos quais se discutem os resultados encontrados no presente estudo. Faz-se, a seguir, um breve relato sobre cada um dos três artigos que serão apresentados, com maiores detalhes, no corpo desta tese.

6.1 Descrição do primeiro artigo: Detoxificação das tortas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e de mamona (*Ricinus communis* L.) por reações oxidativas

Neste artigo estão relatados os primeiros resultados encontrados para atingir o objetivo central dessa tese, que é tornar atóxicas as tortas de pinhão-manso e de mamona. Para isso, foram escolhidas a torta de mamona, por se tratar de um coproduto oriundo da extração do respectivo óleo, cuja finalidade é a utilização em diversos segmentos industriais, e a de pinhão-manso, por ser uma possível oleaginosa a ser utilizada na cadeia produtiva de biodiesel. Os coprodutos tratados neste estudo foram as tortas e os farelos de pinhão-manso e de mamona.

Nesse artigo optou-se por um tratamento oxidativo, na tentativa de destruir as moléculas que tornam estes coprodutos inapropriados para serem utilizados em outra situação diferente de adubação e de geração de energia por meio de queima. O tratamento oxidativo se baseia em reações do tipo Fenton, com a utilização de catalisadores homogêneos. Nela são produzidos radicais hidroxilas (OH•) capazes de oxidar as moléculas de ésteres de forbol e ricina em

moléculas menores. Os radicais hidroxilas ($\text{OH}\cdot$) não são seletivos, com isso, outros componentes, como os alérgenos, também foram oxidados e destruídos.

Para a detoxificação das tortas/farelos de pinhão-manso e mamona, está sendo proposta, neste artigo, como enfoque principal, a realização de reações de oxidação dos componentes tóxicos com a utilização de catalisadores homogêneos. Para a verificação da presença de ésteres de forbol na torta de pinhão-manso foi realizada análise de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) e, para a determinação da presença de ricina na torta de mamona, foi aplicado um teste qualitativo com ninidrina e, posteriormente, com os melhores resultados, foi possível escolher o tratamento mais adequado e submeter a torta de mamona à análise de eletroforese para a obtenção de uma resposta com maior confiança.

Neste artigo também estão relatados os resultados que vão elucidar a eficiência do tratamento de detoxificação, no sentido de que o mesmo garantiu a manutenção das propriedades nutricionais das tortas de mamona e de pinhão-manso. As tortas detoxificadas foram caracterizadas quanto ao teor de celulose, hemiceluloses, macro e micronutrientes, fibras bruta, detergente neutro (FDN), detergente ácido (FDA) e gordura bruta.

Também foi realizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV), com a finalidade de confirmar as possíveis modificações morfológicas do material pelo tratamento de detoxificação.

Os resultados mostraram que o tratamento proposto pode ser utilizado para a retirada dos componentes tóxicos para as tortas de mamona e de pinhão-manso. Por esses resultados também foi possível escolher o melhor tratamento para a detoxificação de ambas as tortas, prosseguir com a pesquisa e submetê-las às demais análises.

Os resultados demonstram a manutenção das características nutricionais das tortas de pinhão-manso e de mamona detoxificadas e as modificações

morfológicas de ambas as tortas, possibilitando a continuidade da pesquisa com a realização do teste *in vivo*.

Os resultados obtidos foram publicados no XXI Congresso de Pós-Graduação da UFLA, no XXVI Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química e no 17º Congresso Brasileiro de Catálise e XXIII Congresso Ibero-Americano de Catálisis (CBCAT/VII MercoCAT, congresso Internacional), no V Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel (congresso nacional), no III Fórum de Química Ambiental (congresso nacional) e, no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), uma patente intitulada "Detoxificação de tortas e farelos de oleaginosas para uso na alimentação de ruminantes". Além das publicações, o trabalho sobre a detoxificação do pinhão-manso foi agraciado com o prêmio de Ciências Tecnologia e Inovação, dado pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação.

6.2 Descrição do segundo artigo: Toxicity of cake detoxified *Ricinus communis L.* in rats (*Rattus norvegicus*) Wistar

Este artigo foi redigido conforme normas da revista Food and Chemistry Toxicology. Nele estão descritos o teste *in vivo*, o hemograma e a avaliação da presença de inibidores de tripsina utilizando a torta de mamona. O teste *in vivo* foi realizado sob a autorização do Comitê de Ética da Universidade Federal de Lavras, nº 078/2011. A realização desse teste teve como objetivo confirmar a eficiência do processo de detoxificação, principalmente para que a torta de mamona pudesse ser sugerida, com segurança, para ser utilizado como componente proteico na formulação de uma ração animal.

O teste *in vivo* foi realizado com a introdução de torta de mamona detoxificada para 24 ratos (*Rattus norvegicus*) albinos, fêmeas, da linhagem Wistar, com 50 dias de idade e pesando em torno de 100 g. As dietas foram

formuladas de acordo com AIN-93G e em níveis crescentes de adição da torta detoxificada, com níveis de 5%, 10% e 15%. A dieta considerada controle não tinha, em sua formulação, nenhum percentual da torta. Os animais apresentaram ganho de peso, para as três doses estudadas, durante todo o tratamento.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, incisão ventral e a exsanguinação por anestesia, utilizando Tiopental® como anestésico, realizada por coleta de sangue do coração.

Após a eutanásia, foi realizada a necropsia, com a retirada dos órgãos internos (rins, fígado, coração, baço, cérebro e pulmão), que foram submetidos a exame histopatológicos. Não foi observado, nas fotomicrografias, nenhum dano hepático em nenhum dos órgãos analisados.

Também foram realizados os testes de hemograma, em que os três grupos submetidos às dietas experimentais não apresentaram diferenças significativas, quando comparados com o grupo controle.

Também foram realizadas avaliações da função hepática com dosagens bioquímicas do soro sanguíneo, pela utilização de kits enzimático-colorimétricos da Bioclin®. O teste determinou a concentração das enzimas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Por meio dos exames histopatológicos, de hemograma e da função hepática foi possível sugerir a utilização da torta de mamona detoxificada, utilizando-se a metodologia proposta no capítulo 1, na composição, como complemento da dieta de ruminantes, sem causar qualquer prejuízo à saúde do animal.

6.3 Descrição do terceiro artigo: Toxicidade da torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) em rato (*Rattus norvegicus*) Wistar

O teste *in vivo* foi realizado com o objetivo de verificar se era possível sugerir a utilização, com segurança, da torta de pinhão-manso na formulação de uma ração animal. Ele foi realizado com a autorização do Comitê de Ética da Universidade Federal de Lavras, nº 078/2011.

O teste *in vivo* foi realizado com a introdução de torta de pinhão-manso detoxificada para 24 ratos (*Rattus norvegicus*) albinos, fêmeas, da linhagem Wistar, com 50 dias de idade e pesando em torno de 100 g.

As dietas também foram formuladas de acordo com AIN-93G e em níveis crescentes de adição da torta detoxificada, de 5%, 10% e 15%. A dieta considerada controle não tinha, em sua formulação, nenhum percentual da torta.

Os animais tiveram perda significativa de peso nas três doses estudadas, durante todo o tratamento. As reações mais graves foram observadas nos animais alimentados com a maior dose de torta de pinhão-manso detoxificada (15%), levando-os ao óbito. Os demais animais apresentaram reações menos agressivas, como diarreia e perda de pelo.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, incisão ventral e a exsanguinação por anestesia, utilizando Tiopental[®] como anestésico, realizada por coleta de sangue do coração. Após a eutanásia, foi realizada a necropsia com a retirada dos órgãos internos (rins, fígado, coração, baço, cérebro e pulmão) que foram submetidos a exames histopatológicos. As fotomicrografias possibilitaram a constatação de diversos danos na maioria dos órgãos dos ratos alimentados com as tortas detoxificadas.

Também foram realizados os testes de hemograma e foram observadas diferenças significativas, nos três grupos submetidos às dietas experimentais, quando comparados com os resultados do grupo controle.

Também foram realizadas avaliações da função hepática com dosagens bioquímicas do soro sanguíneo, por meio da utilização de kits enzimático-colorimétricos da Bioclin®. O teste determinou a concentração das enzimas aspartato amino transferase (AST), alanina amino transferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA).

Com os exames histopatológicos, do hemograma e da função hepática foi possível concluir que o processo de detoxificação para a torta de pinhão-manso, proposto neste estudo, ainda precisa ser modificado e requer mais estudos para poder ser utilizado, com segurança, na alimentação, sem causar qualquer prejuízo à saúde do animal.

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

**Detoxificação das tortas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e de
mamona (*Ricinus communis* L.) por reações oxidativas**

Artigo redigido conforme norma da revista Química Nova
“Versão Preliminar”

Detoxificação das tortas de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e de mamona (*Ricinus communis* L.) por reações oxidativas

Aline G. D. P. Monteiro^{a*} e Mario C. Guerreiro^a

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

Abstract

Detoxify waste (cake) obtained in the extraction of oils from jatropha (*Jatropha curcas* L.) and Castor bean (*Ricinus communis* L.) consists of a new proposal to develop a project of scientific research and technological innovation of the biodiesel production chain. Whereas the manufacturing process of biodiesel from jatropha and castor oil generates waste applicability already consolidated, such as glycerin used in the cosmetic manufacturing industry, and others, like cake and underutilized meal as organic fertilizer. Detoxified bran and cake may be used for the production of food supplements for ruminants, in view of the significant amount of protein present in this material. With this, the supply chain of materials from oils such oil shall be greater added value. The process of detoxification cakes / sharps is the main focus of this work and was carried through oxidative processes using Fenton -type reactions (CAT / Fe). We developed and tested several catalysts (salts of iron (II) and (III) pyrazine oxidized, dipicolinic acid and pyridin-2,6-dicarboxylic acid (PDC) at different concentrations and the best reaction time. The efficiency of the catalysts was evidenced by the ability to chemically transform the toxic components into less complex molecules and non-toxic. The catalyst of Fe (III) and PDC associated, in concentrations ranging from 0.02 to 0.20 mmol showed the highest efficiency for toxic substance removal of both cakes toxicity as compared to other catalysts tested. From this result, the oxidative process and selected the highest efficiency for the removal of toxic compounds was 0.100 mmol Fe (III) and 0.200 mmol of PDC and 1.76 mmol of hydrogen peroxide. The reaction time was 24 hours for the complete detoxification. The results confirmed the efficiency of the detoxification process using the system with Fe (III) salts and H₂O₂.

Keywords: Detoxification, Jatropha, Castor, Fenton.

1 INTRODUÇÃO

As tortas são um dos coprodutos da cadeia produtiva dos óleos de pinhão-manso e de mamona e contêm quantidades significativas de proteína na constituição do material. No entanto, não podem ser utilizadas diretamente na alimentação animal, devido à presença de componentes tóxicos e antinutricionais (Makkar e Becker, 1999; Evangelista *et al.*, 2007; Anandan *et al.*, 2005; Rakshit *et al.*, 2008). Na torta de pinhão-manso, os problemas são, principalmente, os ésteres de forbol (altamente tóxicos) (Makkar e Becker, 1999). Na mamona, a grande responsável pela toxicidade é a ricina, uma proteína que constitui o principal componente tóxico desse material, (Evangelista *et al.*, 2007).

A toxidez não é empecilho para a utilização do óleo, mas pode comprometer a viabilidade da cadeia produtiva de produtos que o utilizem, tendo em vista que impede o uso das tortas como ração na nutrição animal, principal aplicação mercadológica dos coprodutos de outras oleaginosas, como a soja. A concentração dessas substâncias nas tortas é pequena, porém, com atividade biológica deletéria muito alta.

Até o ano 2020, espera-se que cerca de 7% da produção mundial de biodiesel (11 bilhões de galões) venham de pinhão-manso (OECD-FAO, 2011), por causa da sua adaptabilidade climática e do alto rendimento de óleo em relação à soja (Singh e Singh, 2010; Gübitz *et al.*, 1999). Uma característica também importante está relacionada com o fato de que, ao contrário da soja, o mesmo não ser utilizado para a alimentação humana.

Os ésteres de forbol, presentes na torta de pinhão-manso, estão inseridos na classe de substâncias químicas dos diterpenos. Eles têm ação inflamatória e podem provocar diarreia, falta de ar, desidratação e até levar à morte de animais (Chies, 2013).

Por outro lado, a produção do óleo de mamona foi muito incentivada como forma de desenvolvimento regional, principalmente na região nordeste. Inicialmente, esse óleo seria utilizado para a produção de biodiesel, mas, devido à presença de aproximadamente 90% de ácido ricinoleico em sua composição, o biodiesel de mamona apresentava viscosidade (14,5 cSt) superior aos limites permitidos pela Agência Nacional do Petróleo (2,5 a 5,5 cSt) (Maia *et al.*, 2006; Murugesan *et al.*, 2009).

Por tantos motivos, o óleo da mamona não é utilizado para a produção de biodiesel e os investimentos na produção de óleo de mamona, para fins energéticos, foram drasticamente reduzidos. Contudo, o óleo passou a ser utilizado na produção de outros produtos de diversos segmentos industriais, tais como na fabricação de sabonetes e na produção de poliuretano, dentre outras muitas aplicações (Nelson *et al.*, 2013; Viana, 1997).

O aumento da produção de óleo de pinhão-mansão e de mamona e, conseqüentemente, de coprodutos, justifica o interesse em tratar as tortas e os farelos gerados no processo produtivo envolvendo as duas oleaginosas citadas neste trabalho, uma vez que esses coprodutos são utilizados, atualmente, como adubo e na produção de energia (queima) (Evangelista *et al.*, 2007). Esses dois coprodutos necessitam de tratamento prévio para torná-los detoxificados, possibilitando sua utilização como um componente da dieta animal e tendo como principal vantagem a utilização de um material de baixo custo e com alto valor nutricional.

O sistema de alimentação animal depende de um conjunto de informações necessárias para a elaboração das dietas que supram as exigências nutricionais dos animais para sua manutenção, crescimento e reprodução em diferentes ambientes. A ração para animais ruminantes representa, aproximadamente, 80% do total dos custos da criação desses animais e a mão de obra pode representar de 10% a 30% desses custos. Para reduzir perdas e

aumentar a eficiência na utilização dos alimentos, as dietas devem ser formuladas para melhorar a eficiência alimentar e permitir a maximização do suprimento de nutrientes (Carneiro, 2010).

As tortas de mamona e de pinhão-manso têm, aproximadamente, 34% de proteína bruta (PB) (Makkar *et al.*, 1997; Francis *et al.*, 2001; Martinez-Herrera *et al.*, 2006), 71,5% de nutrientes digestíveis totais (NDT), 93% de matéria orgânica (MO), 55% de fibra em detergente neutro (FDN), 44% de fibra em detergente ácido (FDA), 8% de extrato etéreo (EE), 0,72% de cálcio e 0,84% de fósforo (% MS) (DORISCS, 2004).

O presente estudo foi realizado com o objetivo de desenvolver um processo de detoxificação das tortas de pinhão-manso e de mamona por meio de processos oxidativos avançados (POA), com reação de Fenton, baseado num sistema homogêneo utilizando H_2O_2 como o agente oxidante, na presença de íons de ferro II e III como catalisadores. Esse processo ocorre com a geração do radical hidroxila ($\bullet OH$), que é altamente oxidante e tem baixa seletividade, possibilitando a oxidação de inúmeros compostos orgânicos (Dezotti, 1998; Ramos, 2011; Brito e Silva, 2012). Além disso, avaliar características bromatológicas das tortas de mamona e de pinhão-manso, após terem sido submetidas ao processo de detoxificação, visando utilizá-las na alimentação animal.

O processo Fenton foi uma tentativa que tornou viável a transformação de um coproduto obtido da extração dos óleos de mamona e de pinhão-manso em um produto nobre.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostragem

As tortas de pinhão-manso utilizadas neste trabalho foram fornecidas pela Embrapa Agroenergia de Brasília e pelo Laboratório de Plantas, Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, no Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

As tortas de mamona foram obtidas do Laboratório de Plantas, Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel, no Departamento de Engenharia da Universidade Federal de Lavras.

2.2 Detoxificação das tortas

A detoxificação das tortas de pinhão-manso e de mamona foi feita como apresentado na Figura 1.

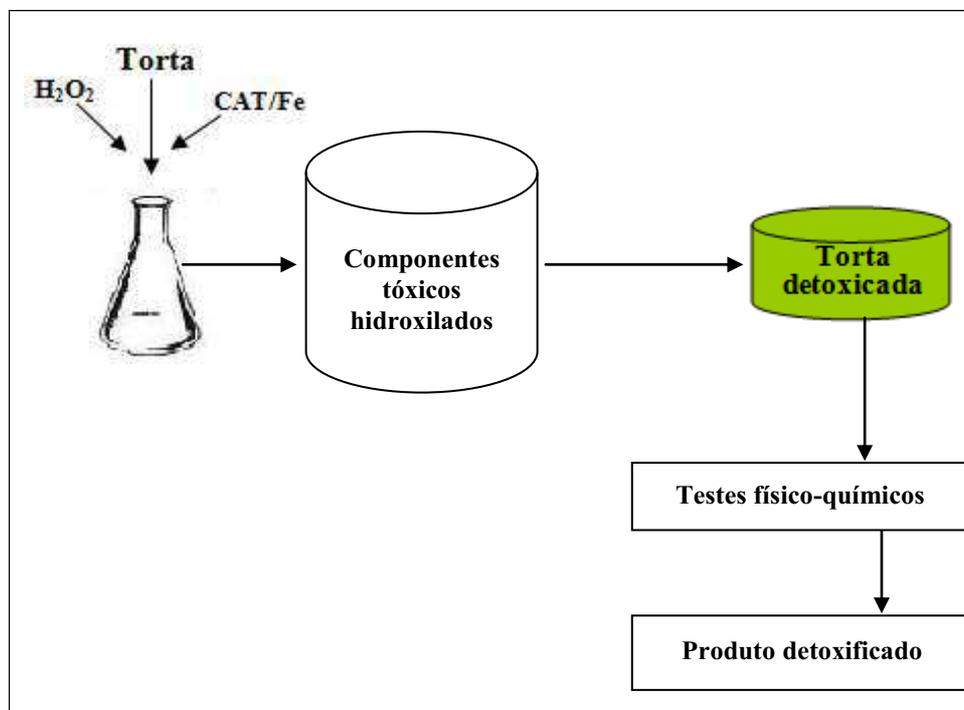


Figura 1 Esquema de detoxificação das tortas de pinhão-mansão e de mamona

As tortas (10 g) foram pesadas em erlenmeyers e, posteriormente, foi adicionado o catalisador (Tabela 1), diluído em 20 mL de água e, por fim, o peróxido de hidrogênio. A mistura foi deixada agitando por 24 horas, no agitador orbital a 120 rpm. Esse processo foi realizado tanto para as tortas de pinhão-mansão quanto para as de mamona. As tortas foram submetidas às análises de eletroforese e HPLC, para a confirmação da detoxificação, MEV e composição centesimal, antes e depois do processo de detoxificação.

2.3 Catalisadores à base de ferro

Os testes catalíticos foram realizados utilizando-se soluções de Fe (III) com diferentes ligantes (Tabela 1). Também foram realizados testes com sal de Fe (II).

A escolha dos catalisadores foi feita a partir do trabalho realizado por Ramos (2011), que propôs mecanismos de reação para a degradação da molécula de azul de metileno por sistema de oxidação do tipo Fenton. A partir daí, foram avaliados diferentes tipos de catalisadores, com a finalidade de definir o composto mais eficiente na decomposição dos ésteres de forbol e da ricina. Os catalisadores utilizados estão descritos na Tabela 1 e o procedimento para detoxificação foi realizado como descrito no item 2.2.

Tabela 1 Materiais empregados como catalisadores no processo oxidativo de detoxificação das tortas de pinhão-manso e mamona

TORTA* (10 g)	Fe (III) (mmol)	Fe (II) (mmol)	PDC* (mmol)	Pz oxidada (mmol)	Ácido picolínico (mmol)	H ₂ O ₂ (mmol)
PM1	0,01	--	--	0,02	--	1,76
PM2	0,01	--	--	--	0,02	1,76
PM3	0,01	--	0,02	--	--	1,76
PM4	--	0,108	--	--	--	1,76
M1	0,01	--	0,02	--	--	1,76
M2	0,01	--	--	--	0,02	1,76
M3	--	0,108	--	--	--	1,76
M4	0,01	--	--	0,02	--	1,76

* PM_n = torta de pinhão-manso; M_n = torta de mamona; Fe (II) = sulfato ferroso (FeSO₄·H₂O); Fe (III) = nitrato férrico (Fe(NO₃)₃·9H₂O); PDC = ácido piridino 2,6-dicarboxílico (C₇H₅NO₄); Pz= pirazina

2.3.1 Variação da concentração do catalisador aplicado nas tortas de pinhão-mansão e de mamona

Foram avaliados dois tipos de sistemas catalíticos (Fe (II) e Fe (III)/PDC), com a finalidade de definir as condições mais eficientes na decomposição dos ésteres de forbol e da ricina, realizados separadamente. Esses sistemas foram escolhidos baseados nos melhores resultados obtidos, considerando a maior redução dos componentes tóxicos presentes em cada uma das tortas.

A quantidade de catalisadores utilizados nos testes está descrita nas Tabelas 2 e 3, e o procedimento para detoxificação ocorreu de acordo com o descrito no item 2.2.

Tabela 2 Variação da concentração dos catalisadores utilizados na detoxificação da torta de pinhão-mansão

Torta (10 g)	Fe (II) (mmol)	Fe (III) (mmol)	PDC (mmol)
*P1	0,0110	--	--
*P2	0,0018	--	--
*P3	0,0036	--	--
*P4	0,1176	--	--
*P5	--	0,0005	0,001
*P6	--	0,001	0,002
*P7	--	0,002	0,004
*P8	--	0,004	0,008
*P9	--	0,005	0,010
*P10	--	0,020	0,040
*P11	--	0,050	0,100
*P12	--	0,100	0,200

* P_n = torta de pinhão-mansão; n= tratamento correspondente. As reações ocorreram em temperatura ambiente (~25°C) e foram deixadas sob agitação por 24 horas

A quantidade de peróxido de hidrogênio utilizada foi fixada em 1,76 mmol, para todos os tratamentos.

Tabela 3 Variação da concentração dos catalisadores utilizados na detoxificação da torta de mamona

Torta* (10 g)	Fe (II) (mmol)	Fe (III) (mmol)	PDC (mmol)
MM1	0,0110	--	--
MM2	0,0018	--	--
MM3	0,0036	--	--
MM4	0,1176	--	--
MM5	--	0,0005	0,001
MM6	--	0,001	0,002
MM7	--	0,002	0,004
MM8	--	0,004	0,008
MM9	--	0,005	0,010

*MM_n = torta de mamona; n= tratamento correspondente. As reações ocorreram em temperatura ambiente (~25 °C) e foram deixadas sob agitação, por 24 horas

2.4 Determinação do teor de ésteres de forbol na torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

2.4.1 Preparo da amostra

As tortas tratadas foram preparadas segundo a metodologia de Makkar e Becker (1997), em que 5 g de tortas tratadas foram triturados com 20 mL de diclorometano. A mistura foi deixada em repouso por 5 minutos e, em seguida, filtrada. Ao coproduto foram adicionados, novamente, 20 mL de diclorometano e deixou-se em repouso. A fase líquida foi novamente coletada e adicionada ao líquido coletado anteriormente. Esse procedimento de extração foi repetido por mais três vezes.

O coproduto foi levado ao ultrassom, por 3 minutos, na presença de 50 mL de diclorometano. Depois, foi filtrado e adicionado ao filtrado inicial.

O filtrado foi seco em estufa a vácuo, a 40 °C e o resíduo seco foi redissolvido em 3 mL de tetra-hidrofurano (THF) e passado num filtro de 0,45

μm . O volume de 20 μL foi injetado em um equipamento de cromatografia líquida (modelo UPLC 2010 Shimadzu).

2.4.2 Condições da análise

Foi utilizada uma coluna de fase reversa C18 Shim-pack CLC-SIL 250X4,6 mm, com uma pré-coluna da mesma fase CLC-G-SIL 10X4,0 mm. Como fase móvel, foram utilizados os seguintes solventes: (A) 1,75 mL ácido o-fosfórico (85%) em 1L de água destilada (filtrados), (B) acetonitrila e (C) tetra-hidrofurano (para limpeza da coluna por 15 minutos). A composição da fase móvel variou em gradiente, em que, inicialmente, utilizaram-se 60% do solvente (A) e 40% de (B), decrescendo para 50% de (A) e 50% de (B), nos próximos 10 minutos; posteriormente, para 25% de (A) e 75% de (B), nos próximos 30 minutos, aumentando para 100% de (B), nos próximos 15 minutos. A vazão foi de 1,3 mL.min⁻¹, à temperatura ambiente e o comprimento de onda avaliado foi de 280 nm., utilizando o phorbol-12-myristate 13-acetate (sigma) como padrão externo.

2.5 Determinação da ricina nas tortas de mamona

Foi realizado um teste qualitativo, utilizando solução alcoólica de 2% (m/v) de ninidrina. Após a realização desse teste, as amostras que apresentassem maior redução de proteína eram submetidas ao teste de eletroforese.

A presença de ricina nas amostras tratadas e *in natura* foi conferida pela técnica de eletroforese capilar com dodecilsulfato de sódio em gel de poli(acrilamida) (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE), no sistema Hoefer de minigéis.

2.6 Determinação da morfologia da torta

Foi realizado teste de microscopia eletrônica de varredura (MEV), no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, no Departamento de Fitopatologia da UFLA, onde a amostra foi, inicialmente, preparada com banho de ouro e, depois, analisada no microscópio.

2.7 Composição nutricional

A análise de matéria seca (MS) seguiu o método da AOAC (1995); o teor de fibra detergente neutra (FDN) e ácida (FDA), pelo método de Van Soest (1994); o extrato etéreo (EE), por meio da extração contínua em Soxhlet, pelo método da AOAC (1995), sendo todas realizadas em laboratórios do Departamento de Química da UFLA. Os teores de macro e micronutrientes foram avaliados no Laboratório de Análise Foliar, no Departamento de Química da UFLA, utilizando metodologia de Malavolta *et al.* (1989). O teor de proteína bruta (PB) é obtido pela quantidade de nitrogênio (N) na proteína (16% em média), que equivale a uma relação de 100/16, ou seja, gera uma constante de 6,25. Essa constante é utilizada para calcular a quantidade de proteína em relação à quantidade de nitrogênio ($N \times 6,25 = \% \text{ de PB}$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Variação do catalisador aplicado nas tortas de pinhão-manso

Os tratamentos apresentaram respostas diferentes de acordo com os catalisadores utilizados. A partir daí foi escolhido o catalisador que apresentou a maior redução do teor de ésteres de forbol.

Os resultados (Figura 2) mostram variação no teor deste componente tóxico entre as amostras analisadas e de acordo com o catalisador utilizado, em que a torta de pinhão-manso submetida ao tratamento contendo Fe (III)/Pz oxidada apresentou maior teor de ésteres ($2,1 \text{ mg.g}^{-1}$) e o material submetido ao tratamento contendo Fe (II), o menor ($0,2 \text{ mg.g}^{-1}$).

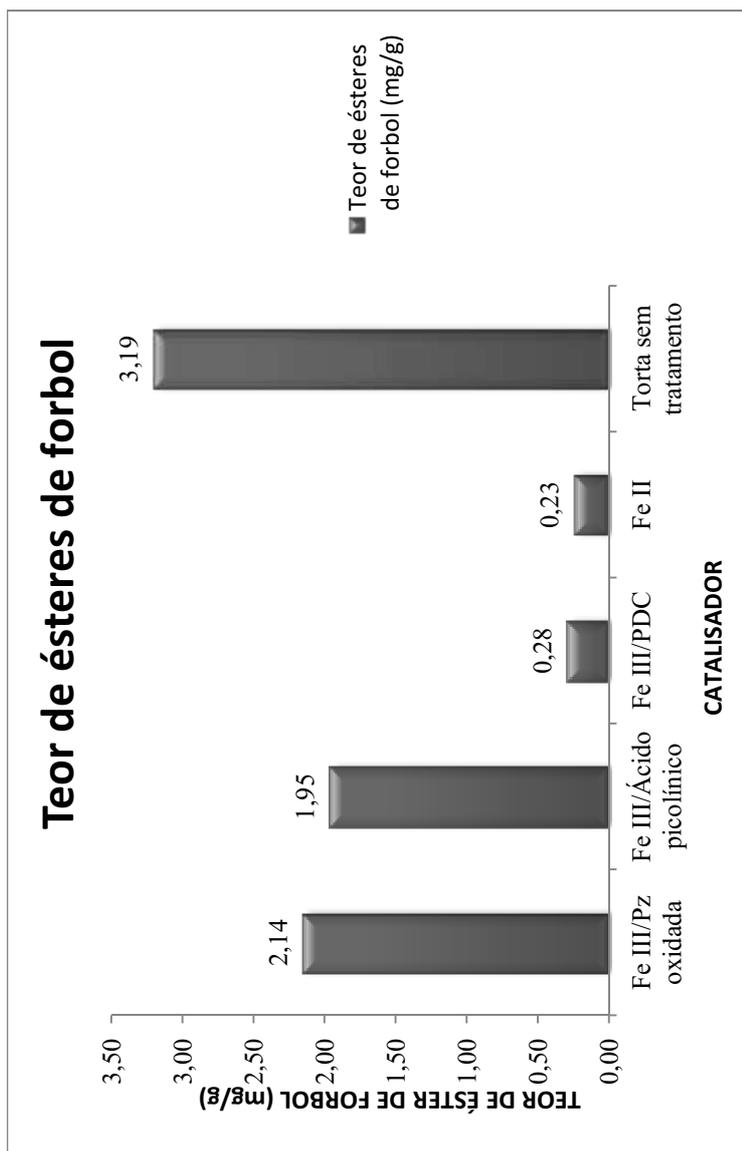


Figura 2 Teste de oxidação na presença do catalisador

As tortas de pinhão-manso submetidas ao tratamento contendo Fe (III)/PDC e Fe (II), respectivamente, apresentaram menores concentrações de ésteres de forbol em suas constituições, quando comparados com os resultados das tortas sem tratamento. Com isso, os catalisadores à base de Fe (III)/PDC e Fe (II) foram escolhidos para a continuação da otimização do processo de detoxificação. Os demais catalisadores foram descartados por terem degradado menos as moléculas de ésteres de forbol.

Como as tortas foram obtidas por meio de prensagem a frio, fica retida uma pequena quantidade de óleo na torta (aproximadamente 8%). E como os ésteres de forbol são lipossolúveis, uma grande quantidade desses componentes tóxicos permanece nas tortas.

Os picos cromatográficos referentes aos ésteres de forbol foram identificados por meio dos espectros de absorção no UV (Figura 3) e comparados com dados descritos na literatura.

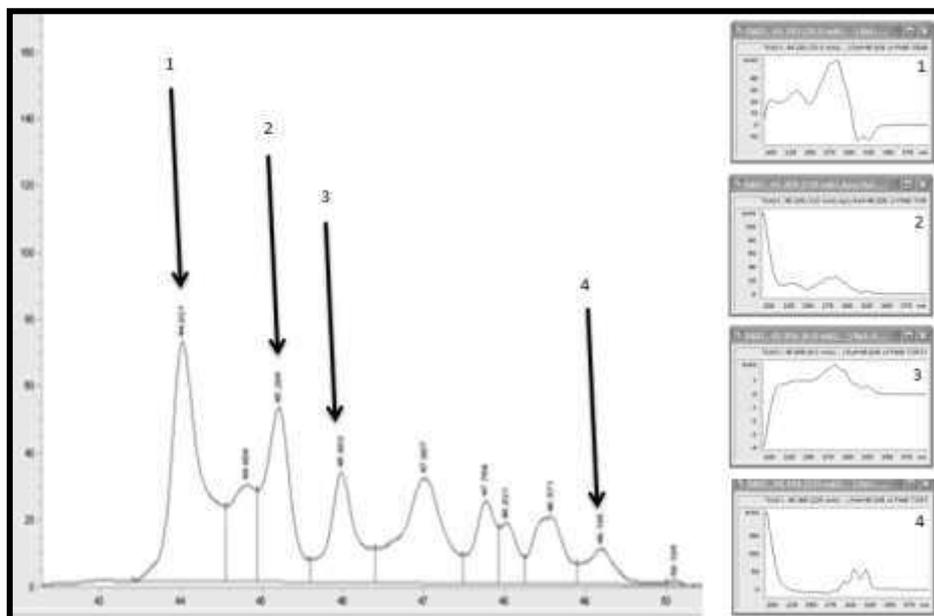


Figura 3 Cromatograma e espectro de absorção da torta de pinhão-mansão não tratada

Os picos referentes aos ésteres de forbol foram identificados por meio dos espectros de UV e comparados com trabalhos realizados por Makkar *et al.* (2009). Após a identificação de cada pico de éster de forbol foi possível quantificá-los, por meio do padrão externo de Forbol 12-miristato-13-acetato e escolher o catalisador mais eficiente para esse processo e dar continuidade à pesquisa.

Na Figura 4 está representada a relação entre quantidade de catalisador e quantidade de éster de forbol remanescente nas tortas de pinhão-mansão, após terem recebido tratamento.

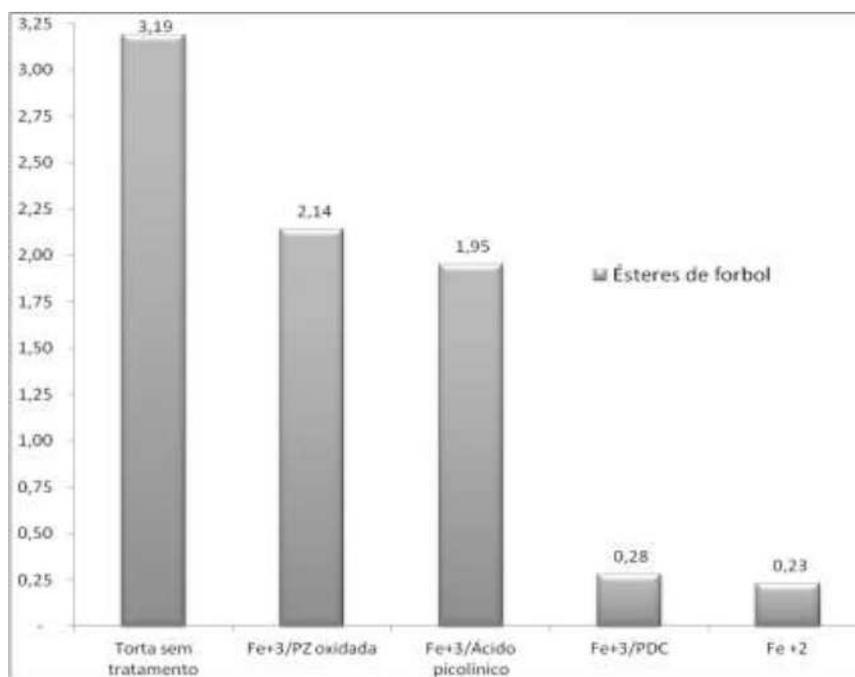


Figura 4 Representação da relação entre quantidade de catalisador e quantidade de éster de ferulol

As quantidades de catalisadores utilizados nas tortas tratadas foram: Fe (III)/Pz oxidada = 0,030 mmol; Fe (III)/ácido picolínico = 0,030 mmol; Fe (III)/PDC = 0,030 mmol; Fe (II) = 0,108 mmol

Considerando a relação quantidade/eficiência dos catalisadores, o tratamento que utilizou Fe (III)/PDC para a degradação dos ésteres de ferulol foi selecionado como o melhor catalisador.

3.3.2 Variação da concentração do catalisador aplicado na torta de pinhão-mansão

As tortas foram tratadas com o catalisador à base de Fe (III) e PDC, cuja quantidade utilizada de cada um variou de 0,0005 a 0,2000 mmol (Figura 5).

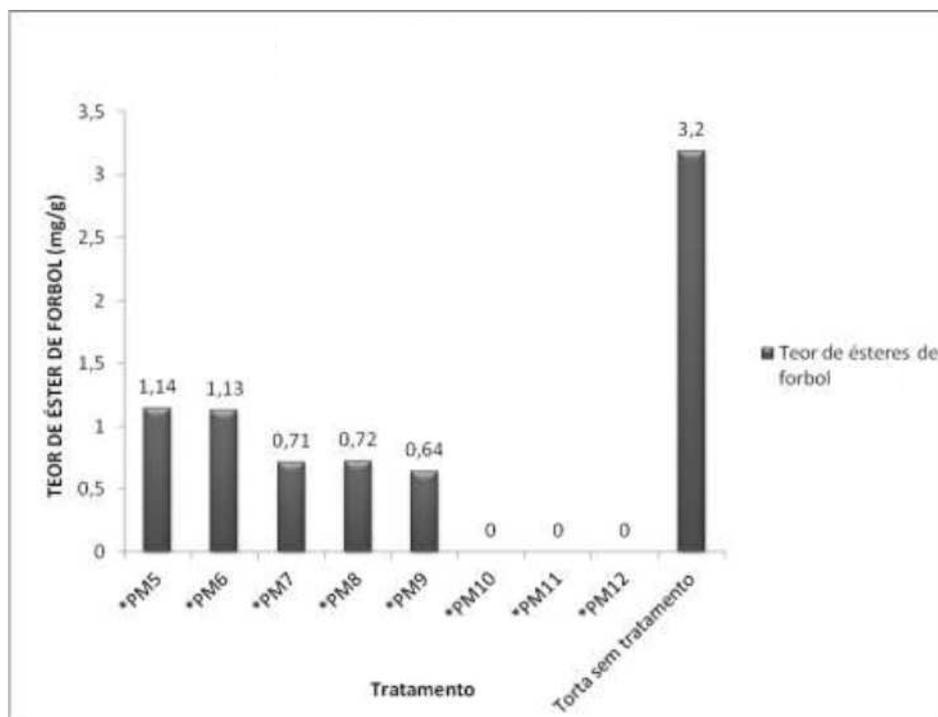


Figura 5 Teor de ésteres de forbol nas amostras tratadas com Fe (III) e PDC e não tratadas

* P_n corresponde à torta de pinhão-manso e n= tratamento correspondente.

As quantidades de catalisadores (Fe (III) + PDC) utilizados para cada tratamento foram: P5= 0,0015 mmol; *P6= 0,0030 mmol; *P7=0,0060 mmol; *P8 = 0,0120 mmol; *P9 = 0,0150 mmol; *PM10= 0,0600 mmol; *P11= 0,1500 mmol; *P12= 0,3000 mmol.

As tortas tratadas que apresentaram teores acima de 0,50 mg.g⁻¹ de ésteres de forbol (limite estabelecido para aumentar a segurança) não foram mais utilizadas, por serem consideradas tóxicas. Isso porque, em estudos feitos por Martinez-Herrera (2006) e Makkar (1997), utilizando tortas de pinhão-manso submetidas a tratamentos físicos e químicos, constatou-se que concentrações a partir de 0,90 mg.g⁻¹ de ésteres inviabilizam sua utilização para alimentação animal. O tratamento PM10 foi considerado o ideal para ser submetido aos demais testes, devido à menor quantidade gasta de catalisador para oxidação total dos ésteres de forbol.

Segundo esses mesmos autores, as tortas podem ser consideradas como não tóxicas quando estiver presente uma concentração máxima de 0,5 mg.g-1 de éster de Forbol. Makkar *et al.* (1998) encontraram 0,11 mg.g-1 de ésteres de forbol em variedades de pinhão-manso provenientes do México e consideraram essas tortas como sendo não tóxicas. Para garantir maior segurança aos animais, foi desenvolvido um processo que garantiu a total eliminação dos ésteres de forbol na constituição do material.

Possivelmente, a destruição das moléculas de ésteres de forbol foi favorecida pelo radical hidroxila (OH•), que pode atuar como eletrófilo ou nucleófilo, atacando moléculas orgânicas pela abstração de hidrogênio ou atacando os carbonos de duplas ligações, hidroxilando-as, inclusive, em posições substituídas, causando reações do tipo desmetoxilação, desalquilação e descarboxilação (Aguiar *et al.*, 2007). As moléculas dos ésteres de forbol podem ter sido atacadas em diversas posições de sua estrutura, principalmente nos carbonos contendo as duplas ligações, nos ciclopropil e no grupo carboxil, formando outros radicais, considerando estes os principais grupos funcionais passíveis de ataque.

As olefinas, que são compostos orgânicos que apresentam em suas estruturas carbonos sp^2 , são responsáveis pela formação de ligações π . A ressonância que acontece nessa ligação favorece a reação da adição e, com isso, um reagente será adicionado integralmente ao substrato (Solomons e Fryhle, 2002). No tratamento proposto, acreditamos que o radical hidroxila gerado tenha participado da reação atacando a molécula de éster de forbol nas duplas ligações, inicialmente como um eletrófilo e, posteriormente, como nucleófilo, porém, hidroxilando as mesmas.

Já nos grupos cíclicos de três carbonos, existe uma forte tensão angular, ou seja, uma forte energia oriunda da distorção do ângulo C-C, causando efetivamente a menor sobreposição dos orbitais atômicos (Wade, 1995) (pode-se

dizer que é uma mistura de hibridizações sp^2 e sp^3). Como essa compressão angular é responsável pela grande energia no anel, permitindo que as ligações sejam fracas, espera-se que o ataque do radical hidroxila também aconteça, tornando possível mais uma modificação na molécula do éster de forbol.

Por fim, espera-se que as moléculas de ésteres de forbol tenham sido clivadas por ataque nucleofílico, ocorrendo a eliminação do grupo -OH, -OCOR' e/ou -OR, ou seja, uma substituição nucleofílica em carbono acíclico ou substituição nucleofílica por adição-eliminação (Wade, 1995).

3.4 Mamona (*Ricinus communis* L.)

Inicialmente, foram realizados testes qualitativos, utilizando ninidrina, com o propósito de verificar, de maneira rápida, a presença ou não da proteína no material tratado. Dessa forma, este teste mostra a necessidade de realização ou não de um novo tratamento de detoxificação, ou seja, a eficiência do processo aplicado.

A coloração azul-escura da solução resultante indicou presença da proteína ricina e, quanto mais clara a solução, menor a quantidade de ricina presente nas tortas. De acordo com esses resultados, foi possível selecionar algumas amostras tratadas para serem submetidas a testes mais específicos para a detecção da proteína ricina. Para a confirmação do resultado obtido com o teste qualitativo, foi utilizada a técnica de eletroforese capilar com em gel de poliacrilamida. A partir daí, foi possível identificar a necessidade de desenvolver outros métodos de detoxificação até a redução total da ricina nas tortas tratadas.

Com isso, os tratamentos considerados eficientes foram o M1 (Fe (III)/PDC) e o M3 (Fe (II)), por apresentarem coloração das soluções levemente amareladas e serem similares ao material detoxificado por tratamento físico e

químico utilizado como referência. As amostras que apresentaram coloração azul-escura, que indicavam a presença de proteína (ricina), foram descartadas.

3.4.1 Variação do catalisador aplicado nas tortas de mamona

Assim como para as tortas de pinhão-manso, o catalisador que apresentou maior redução da ricina e de seus subprodutos da quebra foi os sais contendo Fe (III)/PDC. Esses resultados foram confirmados por meio da eletroforese em gel (SDS – Page).

3.4.2 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A presença de ricina nas amostras M1 a M4 (referente à Tabela 1) foi conferida por eletroforese capilar com dodecilsulfato de sódio em gel de poliacrilamida (*sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) (Figura 6).

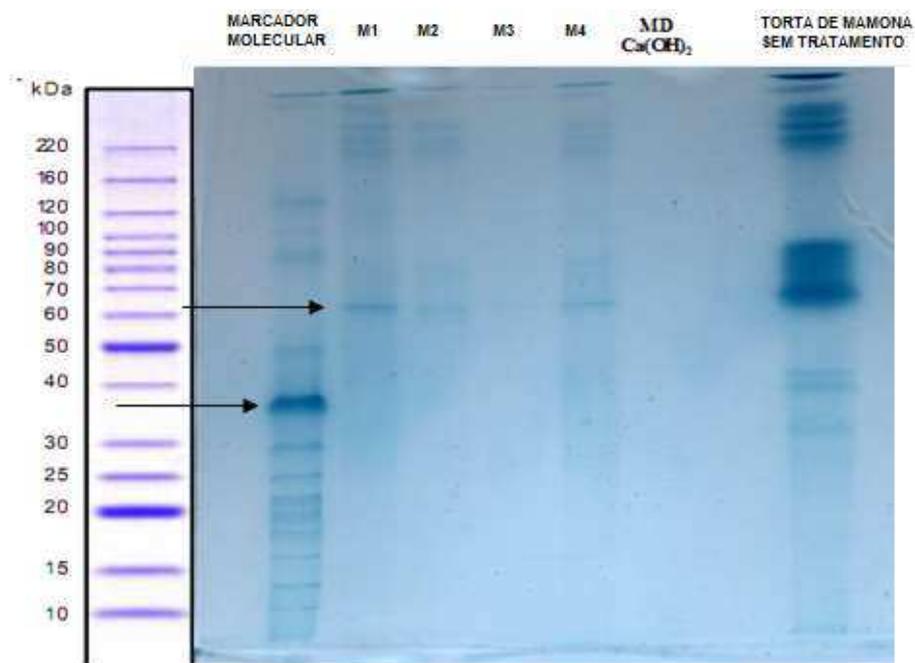


Figura 6 Gel de poliacrilamida *SDS-PAGE*

Na Figura 6 estão representados o gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*SDS-PAGE*) e os diferentes processos de detoxificação (referentes à Tabela 3). O MD Ca(OH)₂ é a torta detoxificada por tratamento físico e químico desenvolvido por Anandan (2005) e esta amostra foi utilizada apenas como parâmetro de comparação para as demais amostras.

A região de 60-65 KDa indica a presença da proteína ricina na amostra analisada. Nas tortas não tratadas, a maior coloração indica maior quantidade de ricina dentre as outras. A MD Ca(OH)₂ apresentou a menor coloração da banda correspondente à ricina, indicando menor quantidade dessa proteína na amostra.

Com o teste de eletroforese foi possível observar que o teor de ricina, em todas as amostras detoxificadas pelo processo proposto neste projeto, foi reduzido com o tratamento, quando comparadas com a torta de mamona não

tratada, porém, o tratamento M3 foi utilizado como base para a realização dos demais testes.

A molécula de ricina presente nas amostras tratadas não foi totalmente degradada. Com a eletroforese também foi possível observar que a ligação de dissulfeto não foi clivada, uma vez que as duas subunidades dessa proteína, a cadeia A e a B, não foram identificadas na análise na região de 30-36 KDa.

Os resultados mostram que o tratamento utilizando Fe (III)/PDC pode ser utilizado para a total desnaturação desta proteína.

3.4.3 Variação da concentração do catalisador aplicado nas tortas de mamona

A concentração do catalisador selecionado, Fe (III)/PDC, variou entre 0,0005 a 0,005 mmol por 10 g de torta.

Dentre todas as concentrações analisadas, a que melhor respondeu ao tratamento foi a M9, conforme mostrado na Tabela 4. A quantidade de catalisador correspondente a esse tratamento foi de 0,005 mmol de sais de Fe (III) e de 0,010 mmol de PDC.

Tabela 4 Variação da concentração dos catalisadores utilizados na detoxificação da torta de mamona

Torta	Ricina
MM1	+++
MM2	++
MM3	++
MM4	+++
MM5	+
MM6	+
MM7	+
MM8	+
MM9	--

*MM_n = torta de mamona; n= tratamento correspondente

Os sinais + e – representam a intensidade da cor da solução. +++ azul intenso. ++ azul com intensidade média. + azul com intensidade baixa. – não foi detectada a coloração azul

O resultado do teste MM9 indica que, analisando-se a região de 60-65 KDa, não foi identificada a presença de ricina na amostra. Também na região de 30-36 KDa não foi identificada a presença das duas subunidades, a cadeia A e a B.

O radical hidroxila (OH•) é muito reativo e por isso atua inativando a proteína ricina. Isso porque a ricina tem uma estrutura tridimensional EM que, na sua conformação nativa, a molécula apresenta as propriedades biológicas naturais. E, quando a conformação de uma proteína é alterada, ocorre a perda da sua atividade biológica (Lehninger *et al.*, 1993; Stryer, 2008).

Segundo Dose (1982), a ponte dissulfeto (-S-S-) apresenta ligação covalente e só pode ser rompida por agentes redutores. Por isso, a ponte dissulfeto não se rompe quando uma proteína desnatura em meio ácido ou por calor. Essa afirmação corrobora o resultado encontrado na análise de eletroforese, quando não é observada a formação das bandas referentes às subunidades A e B da molécula de ricina, que seria referente à quebra da ligação dissulfeto e à separação dessas duas subunidades.

Determinação da morfologia da torta

O processo de detoxificação promoveu modificações químicas na torta e tais modificações foram observadas na estrutura física do material, por meio da análise de microscopia eletrônica de varredura, e estão representadas nas Figuras 7 e 8.

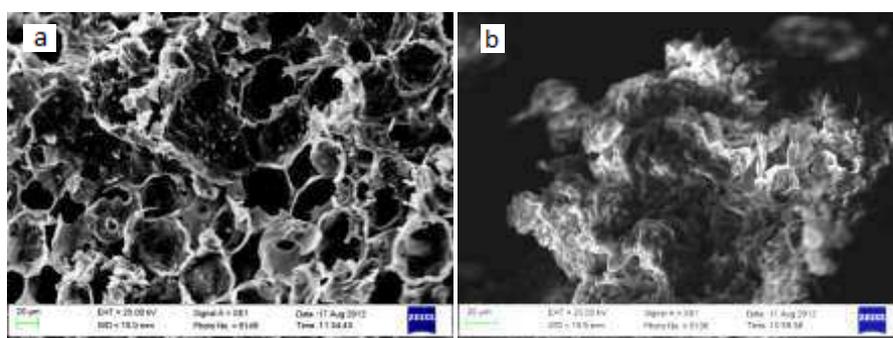


Figura 7 Micrografias da torta de pinhão-mansô tratada (a) e sem tratamento (b)

As micrografias mostraram diferenças significativas na morfologia das tortas, evidenciadas pela formação de poros com tamanhos diversificados na torta de pinhão-mansô detoxificada (Figura 7b) e não observados na amostra sem tratamento (Figura 7a).

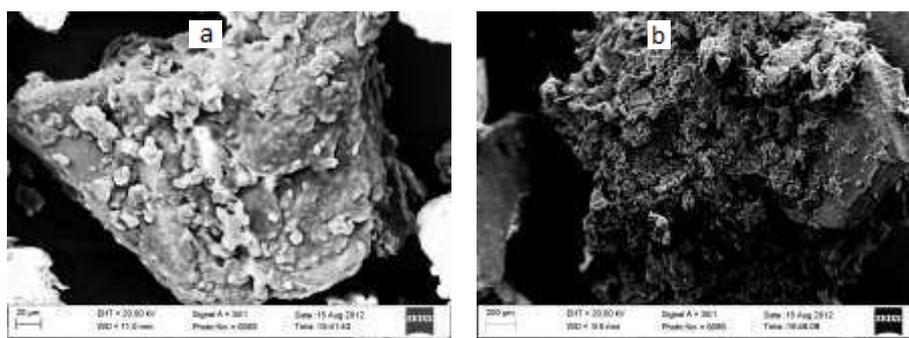


Figura 8 Micrografias da torta de mamona tratada (b) e sem tratamento (a)

Por meio da micrografia foi possível observar placas arredondadas na estrutura física da torta de mamona, antes de sofrer o processo de oxidação (Figura 8a). Na torta de mamona detoxificada (Figura 8b) foi possível observar o desaparecimento dessas placas. Essas diferenças evidenciaram as modificações químicas ocorridas na torta detoxificada.

Composição centesimal

Os resultados das análises bromatológicas da torta de mamona, detoxificada e sem tratamento, estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 Avaliação bromatológica da torta de mamona

TORTA	MS %	PB* %	EE* %	FDN* %	FDA* %	FB* %	HEM* %
Mamona detoxificada	91,77	20,87	5,76	59,35	45,27	23,84	14,06
Mamona sem tratamento	93,06	22,44	6,04	57,42	43,27	34,88	14,15

*MS= matéria seca; PB = proteína bruta; EE= extrato etéreo; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; FB= fibra bruta; HEM= hemiceluloses

Os resultados das análises bromatológicas das tortas de pinhão-manso, detoxificadas e sem tratamento, estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 Avaliação bromatológica da torta de pinhão-manso

TORTA	MS %	PB* %	EE* %	FDN* %	FDA* %	FB* %	HEM* %
Pinhão-manso detoxificado	90,76	16,31	14,65	50,12	42,26	17,02	7,10
Pinhão-manso sem tratamento	91,65	21,93	17,07	53,52	44,17	20,94	7,42

*MS= matéria seca; PB = proteína bruta; EE= extrato etéreo; FDN= fibra detergente neutro; FDA= fibra detergente ácido; FB= fibra bruta; HEM= hemiceluloses

O estado nutricional do animal está diretamente relacionado com a sua saúde e a correta nutrição tem sido associada com a habilidade do animal em combater as doenças. O estudo da composição bromatológica das tortas de pinhão-manso e mamona pode ser uma ferramenta importante para delinear uma nutrição adequada para animais ruminantes, a partir de um material de baixo custo.

A exigência nutricional na dieta de animais ruminantes, considerada para o ganho de peso, varia de acordo com o estado fisiológico do animal, ou seja, com a sua idade (Gonçalves *et al.*, 2006).

A concentração de matéria seca de ambas as tortas tratadas e não tratadas indica um teor muito baixo de umidade em seu conteúdo. Os valores obtidos são próximos aos de outras tortas de diferentes oleaginosas, além de contribuir para a sua conservação. Valadares *et al.* (2006) e Park (1997), analisando as tortas de algodão, girassol e soja, constataram que estas possuem, em média, 90% de MS.

O conteúdo proteico encontrado nas tortas sem tratamento foi relativamente alto. As tortas tratadas apresentaram teor mais baixo, mas essa quantidade ainda sugere sua utilização como fonte de proteína para os animais, pois, de acordo com Gonçalves *et al.* (2006), a quantidade mínima de proteína diária, que deve ser consumida pelos animais ruminantes, deve ser de 9% a 13%, para o ganho de 800 g diárias. O teor mínimo necessário atende aos teores necessários de nitrogênio das bactérias ruminais para o bom funcionamento do rúmen e para a digestão dos alimentos (Magalhães, 2007; Duffield *et al.*, 2003).

O teor de gordura (EE) da torta tratada (5,76%) foi bem próximo ao da não tratada (6,04%). Em ambas as tortas, a quantidade de gordura é relativamente baixa, sendo este um benefício, considerando que a presença de grandes quantidades de óleo na ração pode afetar sua conservação (Rabelo *et al.*, 2001). Além disso, está de acordo com Van Soest (1994), que afirma que o nível

máximo na dieta para ruminantes deve ser de 8% de lipídeos, para não ocasionar efeitos deletérios sobre a digestibilidade da fibra.

O conhecimento da quantidade de gordura também é importante para a formulação da dieta, uma vez que o excesso desse componente provocaria a redução no consumo e na digestão da fibra. Portanto, dietas para bovinos devem conter quantidades entre 3%-5% de extrato etéreo, pois alimentos muito ricos em gordura, como, por exemplo soja, algodão e farelo de arroz, devem ser adicionados à dieta de forma criteriosa (Magalhães, 2007).

A FDN está relacionada com o consumo de alimentos e a disponibilidade de energia nos mesmos. A FDN é a maior preocupação nas dietas para animais ruminantes, sendo necessária uma quantidade mínima para manter a atividade ruminal, visto que a fibra estimula a mastigação e a ruminação, proporcionando um ambiente adequado à atividade das bactérias responsáveis pela digestão e a degradação dos alimentos (Magalhães, 2007).

Os valores encontrados de FDN nas tortas tratadas estão de acordo com os encontrados na literatura (Forbis, 1978; Rabelo *et al.*, 2001; Rabelo *et al.*, 2003; Seal e Reynolds, 1993; Reis, 2000 e Moreira *et al.*, 2003) e com Reis *et al.* (2000) que afirmam que a variação dos valores de FDN é de 48,70% a 80,60%.

A FDA está de acordo com a variação encontrada por Moreira *et al.* (2003); Evangelista *et al.* (2004), Valadares Filho *et al.* (2006), Oliveira *et al.* (2005) e Magalhães *et al.*(2007), de 37,32% a 48,00%, para animais ruminantes.

Os teores de macro e micronutrientes são recomendados na dieta para que a mistura mineral seja de boa qualidade. Estão listados, nas Tabelas 7 e 8, os valores encontrados nas tortas detoxificadas e sem tratamento.

Tabela 7 Avaliação de macro e micronutrientes da torta de mamona

NUTRIENTES	TMD	TMST
	%	
N	3,34	3,59
P	0,22	0,28
K	0,43	1,11
Ca	1,61	1,71
Mg	0,29	0,38
S	0,07	0,05
	mg.kg⁻¹	
B	42,6	43,9
Cu	9,0	13,7
Mn	51,9	51,9
Zn	61,6	88,5
Fe	336,5	334,6

(Valores expressos com base em 100% de matéria seca)

TMD= torta de mamona detoxificada; TMST= torta de mamona sem tratamento

Tabela 8 Avaliação de macro e micronutrientes da torta de pinhão-mansão

NUTRIENTES	TMD	TMST
	%	
N	2,61	3,51
P	0,19	0,26
K	0,89	1,13
Ca	1,85	1,54
Mg	0,30	0,40
S	0,08	0,08
	mg.kg⁻¹	
B	45,4	43,7
Cu	10,1	10,3
Mn	36,5	45,8
Zn	19,6	25,4
Fe	263,7	247,9

(Valores expressos com base em 100% de matéria seca)

TMD= torta de mamona detoxificada; TMST= torta de mamona sem tratamento

Segundo Araújo *et al.* (1998) as exigências de cálcio parecem ser superiores às de fósforo em animais jovens, tornando-se equilibradas em animais adultos. Esses elementos são considerados os mais importantes. De acordo com Gonçalves (2009), os teores mínimos diários necessários para o crescimento padrão, de Ca e P, variam de 0,37% a 0,41% e de 0,18% a 0,8%, respectivamente. Essa variação depende da idade do animal.

Em relação ao potássio, Magalhães (2007) relata que, para esse macronutriente, deve ser considerado um fator preocupante quando a concentração deste é muito alta, porém, os valores encontrados estão dentro da normalidade, de acordo com a CQBAL (2013) (0,34%-1,11%). Segundo Gonçalves (2009), a quantidade mínima diária necessária para o crescimento do animal varia de 0,46% a 0,48% de potássio.

Os resultados obtidos para outros minerais também corroboram os de Gonçalves (2009), que relata que as quantidades mínimas diárias de Cu, Fe, Mn e Zn variam, respectivamente, de 9 a 10; de 13 a 43; de 14 a 22 e de 18 a 32 mg.kg⁻¹.

Os resultados encontrados nas tortas analisadas são maiores do que as mínimas de ingestão diária necessárias para o desenvolvimento do animal, contribuindo para que possam ser sugeridas na alimentação animal, após detoxificadas.

4 CONCLUSÕES

Considerando todos os resultados obtidos, os ésteres de forbol presentes nas tortas de pinhão-manso foram totalmente degradados após o tratamento oxidativo. Esses resultados foram constatados por meio da análise de HPLC, com a identificação de cada pico feita por meio do espectro de UV/visível de cada um deles, e comparando-se com os resultados da torta sem tratamento, e também pela quantificação realizada por meio de padrão externo. Com isso, os resultados obtidos direcionaram para a escolha do melhor tratamento.

Com o teste de eletroforese, foi possível observar que o tratamento proposto considerado mais eficiente desnaturou totalmente a proteína e que não houve quebra na ponte dissulfeto que faz a ligação entre as cadeias A e B, uma vez que não foi possível detectar as duas subunidades A e B, separadamente, no gel obtido.

As tortas de mamona e de pinhão-manso têm potencial produtivo, grande disponibilidade e, de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, têm também significativo valor nutricional.

Essas características constituem, para a torta, uma alternativa para complementação alimentar na dieta de animais ruminantes. Esse material seria de grande importância, principalmente em épocas críticas de disponibilidade de forrageira, na manutenção dos valores nutricionais na alimentação do animal.

No presente trabalho também se observou que o tratamento de detoxificação por meio do Processo Oxidativo Avançado (POA) por reações de Fenton evidenciou, por meio dos resultados obtidos das tortas tratadas, a garantia das características nutricionais dos materiais, podendo, assim ser sugeridas para utilização como complemento alimentar, oferecendo ao animal níveis nutricionais adequados para a sua dieta e sendo um suprimento adequado de energia.

Os resultados mostraram que a utilização do tratamento proposto nas condições atuais sugere a utilização promissora do resíduo tratado oriundo da produção dos óleos de pinhão-manso e mamona na complementação da alimentação de animais.

Contudo, devido à necessidade de desenvolvimento de processos viáveis econômica e tecnicamente de detoxificação das tortas de pinhão-manso e de mamona, o processo proposto pode ser sugerido para ser testado em escala industrial e, principalmente, ser utilizado por pequenos agricultores.

As reações de oxidação com reagentes de Fenton são uma alternativa eficiente para a retirada dos principais componentes tóxicos, os ésteres de forbol e a ricina, presentes nas tortas de pinhão-manso e mamona, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Prospecção em Química do DQI/UFLA, pela disponibilização dos equipamentos necessários para a realização do trabalho. Ao Laboratório de Análise Foliar do DQI/UFLA, pela realização da análise de proteína. Ao Laboratório de Plantas, Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel do DEG/UFLA, pelo fornecimento da torta de mamona utilizada neste estudo. Ao CNPq, à Fapemig, à Finep e à Capes, pela bolsa e apoio financeiro.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, A.; Ferraz, A.; Contreras, D.; Rodríguez, J; *Quím. Nova* **2007**, 30, 623.

Araújo, G. G. L.; Silva, J. F. C.; Valadares Filho, S. C. *Rev. Bras. Zootec.* **1998**, 27, 1023.

Anandan, A.; Kumar, G.K.A.; Ghosh, J.; Ramachandra, K.S.; *Anim. Feed Sci. Tech.* **2005**, 120, 159.

AOAC. Association Of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis. 16.ed. Washington, DC. 1995.

Brito, N. N. e Silva, V. B. M.; *Rev. eletr. de eng. civil*, **2012**. 1(3), 36.

Carneiro, H; Faria, S.B.F. *Panorama do leite Embrapa Gado de Leite*, **2010**, 45.

Chies, V.; *Agroenerg.Rev.* **2013**, 6, 28.

CQBAL. *Composição Química e Bromatológica de Alimentos 3.0*, acessada em dezembro de 2013. <http://cqbal.agropecuaria.ws/webcqbal/index.php>.

Directorate Of Oilseeds Research. *International Seminar On Castor Seed, Castor Oil And Its Value Added Products*. India. 2004.

Dezotti, M.W. *Técnicas de Controle Ambiental em Efluentes Líquidos*, janeiro 1998.

Duffield, T.; Bagg, R.; Kelton, D. *J Dairy Sci.*, **2003**.86, 4161.

Evangelista, A.R.; Lopes, J.; Abreu, J.G. *Resumo do Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia de Biodiesel*, Brasília, Brasil, 2007.

Evangelista, A.R.; Abreu, G.J.; Peron, A.J. *Congresso Brasileiro de Mamona, Energia E Sustentabilidade*, Brasil, 2004.

Francis, G.; Makkar, H.P.S. & Becker, K.; *Aquaculture*. **2001**, 199, 197.

Forbes, J.M. *J. Physiol.*, **1978**. 281, 37.

Gonçalves, L.C.; Borges, I.; Ferreira, P. D. S., *Alimentação de gado de leite*, FEPMVZ: Belo Horizonte, Brasil, 2009.

Lehninger, A.L. *Princípios da Bioquímica*. 4ª Ed.. Sarvier São Paulo, 2006.

Maia, A.C.S.; Teixeira, J.C.; Lima, S.M.; Ferreira, C.V.; Stragevitch, L. *Resumo do Congresso Brasileiro de Mamona*, Aracaju, Brasil, 2006.

Makkar, H. P. S.; Becker, K.; *J. Agric. Sci.* **1997**, 128, 311.

Makkar, H. P. S.; Becker, K.; Spore, F.; Wink, M.; *J. Agric. Food Chem.*, **1997**, 45, 3152.

Makkar, H.P.S.; Aderibigbe, A.O.; Becker, K. *Food Chem.*, **1998**. 62, 207.

Makkar, H.P.S.; Becker, K. *J. Anim. Sci.*, **1999**, 12, 467.

Magalhães, K.A. *Tese de doutorado*. Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2007.

Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A. *Avaliação do estado nutricional das plantas. Princípios e aplicações*. ABPPF: Piracicaba. 1989.

Martinez-Herrera, J.; Siddhuraju, P.; Francis, G.; *Food Chem.* **2006**, 96, 80.

Murugesan, A.; Umarani, C.; Subramanian, R.; Nedunchezian, N. *Renew. Sust. Energ. Re.*, **2009**, 13, 653.

Park, Y. K.. *Series Agronomy*, Brasil. **1997**. 35, 765.

OECDFAO Agricultural Outlook 2011–2020; *Biofuels*. 2011, p. 93 cap. 3.

Oliveira, A.A.G.; Pereira, J.; Alvarenga, T.M.P. *Congresso Brasileiro De Plantas Oleaginosas, Óleo, Gorduras E Biodiesel*, Varginha, Brasil. 2005.

Gübitz, G.M., Mittelbach M., Trabi M.. *Bioresour. Technol.*, **1999**, 67, 73.

Nelson, P. M.; Nascimento, E.M.; Nisgoski, S.; Magalhães, W. L. E., C.; Neto, S. E Azevedo, E. C.; *Polímeros*, **2013**. 23, 201.

Rabelo, E.; Bertics, S.J.; Makovic, J. *J Dairy Sci*, **2001**. 84, 2240.

Rabelo, E.; Rezende, R.L.; Bertics, S.J.; Grummer, R.R. *J Dairy Sci.*, **2003**. 86, 916.

Rakshit K. D.; Sanjay K. R.; Vikas K.; Harinder P.S. M.; Klaus B. *Ecotoxicol. Envir. Safety*. **2013**. 78, 57.

Ramos, P. H. *Tese de doutorado*. Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brasil, 2011.

Reis, C.S. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Viçosa, Brasil, 2000.

Sal, C.J.; Reynolds, C.K. *Nutr. Res. Rev.*, 1993. 6, 185.

Singh, .P. and Singh, D. *Renew. Sustain. Energy Rev.*; **2010**. 14, 200.

Stryer, L. *Bioquímica* 6^a Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008.

Solomons T. W. G. , Fryhle C. B.; *Química Orgânica*; 7^a edição LTC. 2002.

Valadares Filho, S.C.; Magalhães K.A.; Rocha Jr, V.R. *Tabelas brasileiras de composição de alimentos para bovinos*. 2.ed. Viçosa, MG: UFV, 2006. 239p.

Van Soest, Peter J. *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Ithaca: Comstock Publishing. 1994.

Viana, D.L. *Dissertação de Mestrado*. Escola de Engenharia de São Carlos, USP, Brasil. 1997.

Wade Jr. L. G, *Organic Chemistry*, 3th ed., P. Hall, New Jersey, 1995.

ARTIGO 2

**The efficiency of detoxified castor bean cakes in diets of the *Rattus
norvegicus* rats**

Artigo redigido conforme norma da revista Food and Chemistry toxicology
“Versão submetida”

The efficiency of detoxified castor bean cakes in diets of the *Rattus norvegicus*
rats

Authors:

Aline Gomes Dias Pinto Monteiro¹, Rafael Carneiro Costa², Mary Suzan
Varaschin², Raimundo Vicente de Sousa² and Mário César Guerreiro¹.

¹Department of Chemistry, University of Lavras, Lavras, 37200-000 MG, Brazil

²Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras, Lavras,
37200-000 MG, Brazil

ABSTRACT

The oil extraction of the castor beans provides some co-products such as cakes and husks. These residues are often used as fertilizers. In this work, the castor bean cake treated by using Fenton's process in order to add value to this co-product as supplement for animal feed. The efficiency of the process was evaluated by weight gain and growth in an *in vivo* test. In addition, the histopathological and hematological analyses were carried out. *In vivo* tests showed positive results, in particular, no lesion was detected in the animal tissues. The general results confirm that the detoxificate cakes can be safely used as supplement in animal diets.

Keywords: Castor bean, oxy-detoxification, toxicity and food supplement.

1 INTRODUCTION

The cakes and cakes are the major co-product of the extraction process of the castor oil. These residues show great industrial and technological interest due to their high nutritional value. However, the cakes toxicity prevents their use as complement for animal feeding. Among chemical substances responsible for the toxic effects on the castor bean cake, the most important is ricin. Another compound that must be removed from these residues is trypsin inhibitors that have antinutritional effects. Thus, there is a need for detoxification treatment of the castor bean cake for better utilization of its nutritional properties.

Several researchers (Dubois et al., 2013; Jim, 2010; Rakshist et al., 2008; Anandam et al., 2005 and Aregheore et al., 2003) reported technologies to promote detoxification of castor bean cakes (as described by Anandan et al., 2005), where 100% of the existing ricin was eliminated after autoclaving the cake (1bar/60 min) in a calcium hydroxide solution (40 g Ca(OH)₂/kg of cake). All published technologies to detoxify the cake use pressure and heat treatment increasing the cost of the process, which can prevent its implementation..

In this study, we used an advanced oxidation process (AOP) based on the Fenton-like system which oxidize more complex organic molecules into smaller molecules. The Fenton system is based on a homogeneous system using H₂O₂ as the oxidant in the presence of Fenton like system ions (Dezotti, 1998). With this process it was possible to develop a simple, low cost technique as a method to detoxify castor bean cake.

To compare the efficiency of the detoxification process, it was necessary to know and ensure the nutritional value of the castor bean cake after detoxification for being employed as a component of animal feed. Chemical and physical tests were conducted *in vivo* to support the hypothesis that the

detoxified cake could safely be used as a protein source in animal feed formulations.

Thus, the aim of this study was to confirm the efficiency of oxidative method for detoxification for castor bean cake by using the detoxified cake as a feed supplement on the growth of rats.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Detoxified Castor Bean Cake

The detoxified castor bean used in this study was treated according to the process developed by Monteiro et al. (2012) using oxidative Fenton-type reactions.

2.2 Proximate Composition

We determined the dry matter (DM) following the AOAC method (1995), the neutral detergent fiber (NDF) and acid detergent fiber (ADF) contents by the Van Soest method (1994), and the ether extract (EE) by continuous Soxhlet extraction using the AOAC method (1995). All tests were performed in the laboratory of the Center for Analysis and Chemical Prospecting, located in the Department of Chemistry, University of Lavras (UFLA) in Minas Gerais.

NDF represents the sum of the cellulose, hemicelluloses, lignin, nitrogen waste and ash contents, which are associated with the food and fiber content. ADF consists of all the constituents except hemicelluloses. Thus, the amount of hemicelluloses was obtained from the subtracted value of the two (hemicelluloses = NDF - ADF).

The crude protein (CP) was obtained using methodology described by Malavolta (1989) and the result was expressed as crude protein, after using the conversion factor of 5.30 (Greenfield and Southgate, 1992; and Jones, 1931). This constant was used to calculate the amount of protein in relation to the nitrogen content ($\%N \times 6.25 = \%CP$).

2.3 Determination of Trypsin Inhibitor

The trypsin inhibitor activity was determined by comparison of a kinetic assay (at least four time periods) with the activity of untreated trypsin and detoxified castor cake. We used the BApNA substrate concentration of 0.87 mmol.L⁻¹, prepared in 0.1 mol.L⁻¹ glycine-NaOH buffer at the optimum pH of 9.7 (Rossi et al., 2009) and the activity was quantified using methodology proposed by Erlanger, et al. (1961). Control trials, as blank substrate (activity in the absence of enzyme and inhibitor), white enzyme (activity in the absence of substrate and inhibitor), white inhibitor (activity in the absence of substrate and enzyme) and trypsin activity in the extracted castor cake were performed in the same manner as the experimental tubes. The results were expressed as units of inhibited trypsin (TIU), which is the disappearance of the absorption of light corresponding to 1 mmol of p-nitroaniline (product formed during the trypsin activity on BApNA) for 1 min. of reaction time, in 1 g of castor bean. Control tests using bovine trypsin (4 mg in 200 mL of 0.001 mol L⁻¹ HCl) from the manufacturer were performed on Merck 0.1 mol.L⁻¹TRIS/HCl with pH = 7.0.

2.4 Animals

The experiment was conducted in the Department of Veterinary Medicine at UFLA under the approval of the ethics committee, n° 078/2011, Federal University of Lavras, and for 28 days. *In vivo* tests were performed with 24 female albino rats (*Rattus norvegicus*) Wistar, 50 days old and weighing approximately 100 g.

In the pre-experimental period, the animals were kept in groups of six mice per cage at room temperature (25 °C) with light-dark cycles of 12 h, and with access to commercial feed (Nuvilab CR1, Nuvital Nutrients, Ltd.) and water *ad*

libtum. Six days before the start of the experiment, the animals were weighed and randomly distributed in individual metabolic cages and received a diet adaptation, according to AIN-93 (American Institute of Nutrition). After this period, the animals were randomly divided into four groups of six animals in completely randomized design (CRD) and received the experimental diets (29 g) and water *ad libtum* for 28 days.

2.5 Diets

Four experimental diets were formulated according to AIN-93G (Reeves et al., 1993) and modified by the addition of detoxified castor bean. They were distributed in treatments 1, 2, 3 and 4, with the cake in increasing levels of 0, 5, 10 and 15%, respectively. The composition of the diets is shown in Table 1.

Table 1 Diet composition used for animals

DIET (g/100g)	0%	5%	10%	15%
Castor Cake	0.00	5.00	10.00	15.00
Casein	20.00	20.00	20.00	20.00
Sugar	10.00	10.00	10.00	10.00
Choline	0.25	0.25	0.25	0.25
Methionine	0.30	0.30	0.30	0.30
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00
Soybean Oil	7.00	7.00	7.00	7.00
VM ^a	1.00	1.00	1.00	1.00
MM ^b	3.50	3.50	3.50	3.50
B.H.T. ^c	0.05	0.05	0.05	0.05
Vitamin E	0.05	0.05	0.05	0.05
Cornflour	52.85	47.85	42.85	37.85

^aVM = vitamin mixture

^bMM = mineral mixture

^cB.H.T. = 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol

A feed free of castor bean (0%) was considered the control diet. The diet containing the fresh cake (untreated castor bean), led to death by the second day of the experiment when a concentration of 2 g.kg⁻¹ of body weight was consumed. In addition to this, the detoxified cake diets containing higher dosages of 10 to 30 g.kg⁻¹ of body weight was considered to ensure that the material underwent efficient detoxification.

The feed intake was measured and recorded on a daily basis, and weekly weighing and water consumption data were obtained for the animals. At the end of the study period, the data were used to evaluate the average daily intake of food and water, daily weight gain and feed efficiency ratio.

After the experimental period, blood was collected by cardiac puncture. Blood samples were centrifuged for 5 minutes at 11963 g to separate the serum which was then frozen at -20 °C for subsequent analysis.

2.6 Histopathological studies

At the end of the experiment, the animals were fasted for 12 h prior to euthanasia. Thiopental[®] (40 mg.kg⁻¹) was used to anesthetize the animals before euthanasia via cervical dislocation and exsanguination by ventral incision performed by collecting blood from the heart.

After euthanasia, necropsy was performed by removal of the internal organs (kidney, liver, heart, spleen, brain and lungs) and each subjected to a histopathological examination. The organs were cut into small cakeces, fixed in buffered formalin for 24 h and then stored in 70% alcohol. The stored material was processed for inclusion in paraffin blocks and subjected to microtomy, resulting in thin slices of approximately 3µm of the tissue. The sections were stained with hematoxylin and eosin and evaluated microscopically under an optical microscope.

2.7 Hematological studies

Blood samples were taken from the heart of all animals. The samples were taken with EDTA 4 % and then centrifuged for plasma separation.

Blood counts were performed by the Laboratory of Physiology and Pharmacology, Department of Veterinary Medicine, Federal University of Lavras.

2.8 Serum biochemical analysis

Liver function was assessed by means of biochemical serum by using Kit's enzymatic-colorimetric Bioclin[®] and the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (AP).

2.9 Calculation and Statistical Analysis

Statistical analyses of the results were performed with the SISVAR 4.0 software (Ferreira, 2000), analysis of variance (ANOVA) and Tukey's test for comparison of groups, all at 5% probability.

3 RESULTS

The results of the proximate composition of both the detoxified and untreated castor bean cake samples are provided in Table 2.

Table 2 Proximate composition of detoxified and untreated castor bean

CAKE	DM (%)	CP* %	EE* %	NDF* %	ADF* %	CB* %	HEM* %	Enzyme activity UTI*
Detoxified castor	91.77	17.71	5.76	59.35	45.27	23.84	14.08	-0.17
Castor untreated	93.06	19.03	6.043	57.42	43.27	34.88	14.15	24.26

* DM = dry matter; CP = crude protein; EE = ether extract; NDF = neutral detergent fiber; ADF = acid detergent fiber; CB = crude fiber; HEM = hemicelluloses. *UTI = unit trypsin inhibited. ** Conversion factor for nitrogen to protein is 5.30.

Changes in body weight after administration of the detoxified cake are shown in Table 3.

Table 3 CMD, GMD and CEA of rats with experimental trial diets

Diet*	ADI** (g)	ADG** (g)	CEA**	Median daily consumption of water (mL)
0%	18.84 ^a	5.62 ^a	0.036 ^a	2.14 ^a
5%	20.15 ^{ab}	5.77 ^a	0.036 ^a	2.71 ^b
10%	20.70 ^{ab}	5.46 ^a	0.036 ^a	2.85 ^b
15%	21.68 ^b	5.69 ^a	0.036 ^a	3.17 ^b

Different letters in the column indicate that the means differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

*M1, M2 and M3 = diets containing 5, 10 and 15% of detoxified castor bean; Control = standard diet; ADI** = average daily intake; ADG = average daily weight gain and CEA = coefficient of feed efficiency

Figure 1 presents the comparison of weight gain among the species for the control group (C) and those fed diets containing 5%, 10% and 15% detoxified castor bean.

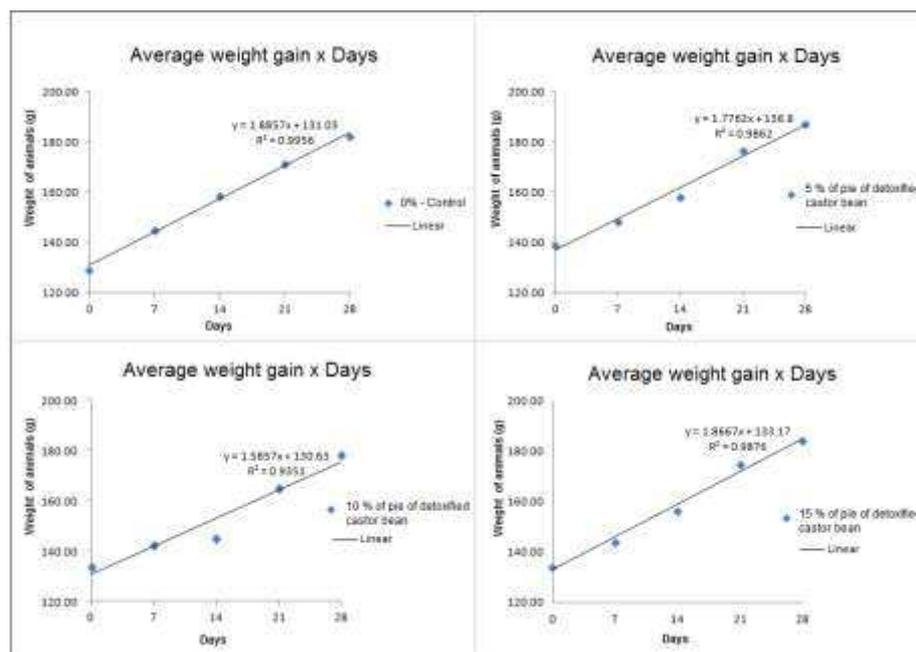


Figure 1 Results of the weight gain of rats during the 28 day experiment: C = control, 0% castor bean; M1 = diet containing 5% castor bean; M2 = diet containing 10% castor bean; M3 = diet containing 15% castor bean

The cell count was performed on each animal through blood smear, using one drop of blood, as shown in Table 4. The results of cell counts revealed no significant differences between the groups.

Table 4 Hemogram of the rats after 28 days of feeding with the experimental diets

HEMOGRAM	0%	5%	10%	15%
Erythrocytes ($6.6-9.0 \times 10^6/\text{mm}^3$)*	8.73±1.31	8.52±0.94	8.26±1.32	7.18±1.13
Hemoglobin (15 g%)*	14.70±0.20	13.02±1.36	14.00±0.46	14.35±0.73
Leukocytes (7300 - 12600/ mm^3)*	3750±1147	3558±1111	3400±294	4641±954
Rod cell (~1%)*	0.75±0.5	1.67±1.03	1.00±0.55	0.67±0.82
Segment (~30%)*	48.25±5.56	34.33±7.20	39.00±5.71	30.17±20.74
Total Lymphocytes (65 - 77%)*	42.50±4.80	57.17±7.25	64.00±6.72	67.33±9.35
Total Protein (5-7 g%)*	7.30±0.35	7.13±0.10	7.40±0.22	7.13±0.21

The results are expressed as the average \pm the standard deviation of each cell type measured in the blood smears with light microscopy and confirmed by automatic analyzer. *Source: Jain, 1993

The activity of enzymes ALP, ALT and AST are shown in Table 5. Only the group fed with 15% detoxified castor bean showed an increase in the levels of AST.

Table 5 Activity of enzymes in the blood serum of animals at the end of the experiment

Diet	ALP* ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	ALT* ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	AST* ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)
0%	2.36 ^a	20.08 ^a	64.46 ^a
5%	2.54 ^a	18.34 ^a	64.17 ^a
10%	1.77 ^a	30.26 ^a	64.46 ^a
15%	0.99 ^a	28.66 ^a	78.72 ^b

Different letters in the column indicate that the means differ by Tukey test ($p \leq 0.05$).

*ALP = alkaline phosphatase; AST = aspartate aminotransferase and ALT = alanine aminotransferase

Enzymatic analyses were performed to inspect for possible hepatocellular damage that may have been caused by the toxic substances naturally present in castor bean cake. The tests did not identify any macro or microscopic lesions in tissues of the necropsied animals from all groups.

4 DISCUSSION

In several studies, detoxification of castor oil involves complicated steps that increase operating costs of the process; such as heat, pressure, use of toxic chemical reagents and complex methods. Beltran (2003) boiled and baked the cake to destroy the ricin. Anandan et al. (2005) studied the efficiency of immersion processing, steaming, boiling, autoclaving and heating for different time intervals, followed by chemical treatments with ammonia, formaldehyde, lime, sodium chloride, tannic acid and sodium hydroxide in different concentrations to detoxify the castor bean cake. Asqueri (2013), used the extrusion process combined with other variables; such as addition of acids, bases, salts and enzymes, or sheared and heated the cake at temperatures ranging from 80–140 °C, under dry, wet or steam conditions with different exposure times to heat. Jim (2010) also developed a method to detoxify the castor cake by using extrusion technology. Finally, Dubois et al. (2013) combined an excess of methanol, sodium hydroxide and heat (120 °C) to detoxify the cake.

The oxy-detoxification method for purifying the castor cake used in this study required small amounts of non-toxic reagents (0.02 mmol of Fe(III), 0.04 mmol of picolinic dicarboxylic acid PDC and 1.76 mmol of H₂O₂) to remove ricin. The reaction proceeded at room temperature (Monteiro, 2012).

Detoxified cake used for the *in vivo* test showed good nutritional values, suggesting its use as an economical source of protein for animals (20.89% protein content) considering that protein is generally the most expensive ingredient in diet compositions (Naufel et al., 1962 and Loureiro, 1962). Also, according to Church (1988) and Garden (2004), the minimal amount of protein indicated for ruminant diets is 7%, since the protein quantity is associated with optimal conditions for microbial fermentation in the rumen of animals. A relatively low fat percentage (EE = 5.76%) (Table 2), is an advantage in the

preservation of the feed (Neiva, 2007) and does not have deleterious effects on the digestibility of the fiber (Van Soest, 1994).

With respect to trypsin inhibitor protein, there is a natural occurrence in castor bean cake. The presence of this protein in the intestinal tract inhibits the action of trypsin (EC 3.4.21.4), which is responsible for digestion of proteins. This inhibition leads to increased enzyme production by the pancreas and organ hypertrophy (Carvalho et al., 2002) which in turn reduces protein digestion of food, which diminishes the weight gain and reduces the animal growth (Miller, 2004). When the treated castor bean cake was used no trypsin inhibitor protein were observed, which indicated that trypsin (EC 3.4.21.4) was active; an advantage for the animal growth.

The *in vivo* test for toxicity of castor bean cake was determined by the possibility of poisoning the rats fed with the treated castor bean cake. Three groups of rats were fed diets containing 5, 10, and 15 g.kg⁻¹ body weight of treated castor bean cake, respectively, for 28 days. These values are in excess compared to studies which have reported that the acute oral toxicity in rats is 2 g of material per kg of body weight (Worbs et al., 2011). The high dosage ensured the efficiency of the detoxification process of the material. Dubois et al. (2013) also studied the process of detoxification of castor bean, and used castor oil in feed amounts ranging from 0.3 to 2 g.kg⁻¹; they observed that animals fed the diet containing the highest dosage of this material experienced 100% mortality rates by the 2nd day.

Feed intake was significantly higher for all doses compared with the control diet ($p < 0.05$). The animals fed the control diet (0% of treated castor oil) gained an average body mass of 18.84 g per day, those fed 5% gained 20.15 g per day, those fed 10% gained 20.70 g and finally, those fed 15% gained 21.68 g per day (Table 3). To summarize, the animals whose diets contained detoxified castor cake gained, on average, more body weight than those fed with the diet

free of castor cake, indicating acceptance and quality of the diet. The weight gain was higher in groups fed diets containing 5 and 15% detoxified castor bean. Additionally, the average daily consumption of water was higher for the three doses, compared to the control diet used.

For all doses used in this study, there were no observed signs of clinical change (diarrhea, weight or hair loss) and no mortality of the animals. During the 28 days, the animals fed with detoxified castor cake showed higher weight gain compared to the growth of the control group. These results demonstrate that there was no impairment in growth and development of the animals that consumed the detoxified castor bean.

The results from the blood (Table 4) test do not indicate any inflammatory processes and also demonstrate that the differences found are not due to the food. All the results are acceptable when the groups fed with detoxified cake are compared with the control group which had a diet free of the castor cake.

Changes in the concentration of the cellular enzyme, alkaline phosphatase, is directly related to biliary obstruction and hepatocellular injury. Alkaline phosphatase (ALP) is predominantly indicative of cholestasis (Table 5). This phenomenon is triggered by an inflammatory process, infection or obstruction that can be seen from the hepatocyte to the terminal portion of the bile ducts, such as infectious hepatitis. In this experiment, the ALP showed no statistically significant difference in the groups fed diets containing detoxified castor bean meal compared to the control feed. This demonstrates that the diet containing the cake did not cause any injuries.

AST values found in the different groups were not statistically different and are within the range found in the literature, from 45.7–80.8 U.mL⁻¹, as is normal, indicating no liver damage. This result was confirmed by histological examinations when there were changes in the tissues. This is because the AST

enzyme exists in large quantities in the myocardium, liver, skeletal muscle, brain and kidneys, so when injuries occur with cellular destruction there is also a significant increase in the activity of this enzyme in the blood (Lima et al., 2001 and Gella, 1994).

ALT levels found in the treated groups did not differ statistically from the control group and are within the normal range reported in the literature; between 26–60 U.mL⁻¹ (Melo *et al.*, 2012). The ALT results therefore also confirmed that there was no liver damage. The study of this enzyme also aids in the diagnosis and prognosis of liver diseases, because in hepatocellular damage, a serious injury predominantly leads to cytoplasm in serum as well as a release of mitochondrial enzyme which elevates the AST/ALT levels. Another factor associated with the elevation of the AST/ALT level is that during serious injury, ALT levels may decline more rapidly because they are launched first, meanwhile, the values of AST in the bloodstream remains high for longer, which leads to the increase in the AST/ALT ratio (Lima et al, 2006).

All results demonstrated that the castor bean was detoxified by the oxidative process, using the homogeneous catalytic system with Fe(III). The process allowed the toxic ricin and plant allergens to be destroyed simultaneously from the castor cake. However, this study was conducted on a pilot scale and further investigations are necessary for producing and marketing large quantities of detoxified castor bean. The oxy-detoxification process also has the potential to be applied to other toxic oilseeds such as jatropha cake while requiring only a few modifications based on the amount of toxic compounds present.

This new detoxification technology is of great importance in the oil production chain of the respective plant because it elevates the value of a co-product of a renewable raw material and provides a cost effective way of supplementing feed. In addition, it can be used to address increasing the

producer's income without increasing production and acreage, as described in the work by Abdalla (2008). Thus, besides adding value to a co-product, this work has been a positive factor in the life cycle of the production of chemicals derived from castor oil.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that no conflicts of interest exist.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank FAPEMIG for funding and CNPq for the scholarship. All analyses were performed at the Center for Analysis and Chemical Prospecting (CAPQ) and LAF at the Departments of Veterinary Medicine of the Federal University of Lavras (UFLA), Lavras – MG, Brazil.

REFERENCES

- Abdalla, A. L.; Son, J. C. S.; Godoi, A. R.; Carmel, C. A.; Eduardo, J. L. P. (2008). Use of byproducts of the biodiesel industry in ruminant feed. *R. Bras. Zootec.*, 37, 260–258 special supplement.
- Anandan, A.; Kumar, G. K. A.; Ghosh, J.; Ramachandra, K. S. (2005). Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. *Animal Feed Sci. and Tech.* 120, 159–168.
- AOAC (1995). Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis. 16.ed. Washington, DC .
- Aregheore, E. M., Becker, K. and Makkar, H. P. S. (2003). Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. *S. Pac. J. Nat. Sci.* 21: 50-56.
- Asqueri, J. L. (2013). The Embrapa want to enable cake castor feed. Embrapa Food. <http://www.agrosoft.org.br/agropag/209184.htm>. Accessed: 12/11/2011.

- Beltran, N. E. M. (2003). Cake Castor (*Ricinus communis* L. L.): Fertilizer and Food. No technical statement. Embrapa 171, January 2003.
http://www.cnpa.embrapa.br/plataforma_mamona/publicacoes/comunicacoes/02.PDF. Accessed: 02/12/2011.
- Carvalho, M. R. B.; Kirschnik, P. G.; Paiva, K. C.; Aiura, F. S. (2002). Evaluation of the activity of trypsin inhibitors after enzymatic digestion in heat-treated soybeans. *Rev. Nutr.*, 15 (3): 267–272.
- Church, D.C. (1988). The ruminant animals digestive physiology and nutrition. New Jersey: Prentice Hall. pp 227-249.
- Dezotti, M.W. (1998). Advanced Oxidation Processes - Part 1. In: Techniques for the Environmental Control in Wastewater.
- Erlanger, B. F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, Orlando, n. 95, v. 2, p. 271–278.
- Greenfield, H.; Southgate, D. A. T. (1992). Food composition data: Production, management and use. London: Chapman and Hall. pp 129 - 131.
- Garden, W. F. (2004) . Advanced Oxidation Processes. Theoretical concepts. Notebook Theme, v. 3, State University of Campinas, Institute of Chemistry-IQ. Laboratory of Environmental Chemistry - LQA.
- Jones, D. B. (1931). Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture. (Circular 183) .
- Lima, J. F. (2006). Optimum plot size, biomass allocation and growth of papaya plants in the greenhouse. 60p. Dissertation (Master in Agricultural Sciences) Center - Agricultural and Environmental Sciences. Federal University of Bahia. Cruz das Almas.
- Loureiro, M. C. (1962). Cake castor seed as feed. *Revista Ceres*, Viçosa, 11, 66, 290–294.
- Malavolta, E.; Vitti, G. C.; Oliveira, S. A. (1989). Assessment of nutritional status of the plants. Principles and applications. Brazilian Association for Research Potash and Phosphate, Piracicaba, Brazil.

Melo, M. G. D.; Doria, GA. A.; Serafini, M. R.; Araujo, A. A. S (2012). Reference values of hematological and biochemical parameters of rats (*Rattus norvegicus* Wistar strain) provenientes the animal colony of the Federal University of Sergipe. *Scientia Full Magazine*, 8, 409–903.

Monteiro, A.G.D.P; Guerreiro, M.C; Souza, R. V. (2012). Detoxification of Cake of oilseeds to use in diet for ruminants. Patente number BR 1020120114607. National Institute of intellectual properties. Brasil. Pp 16.

Naufel, F.; Assisi, F. P.; Rao, M. L. R. (1962). Comparative effects of administration of bran atoxicada castor bean, soybean and cotton in the diet of lactating cows. *Bull. Animal Ind., Nova Odessa*, 20, 47–53.

Neiva Júnior, A.P.; Van Cleef, E.H.C.B.; Pardo, R.M.P.. (2007). Summary of the II Congress of the Brazilian Network of Technology Biodiesel, Brasília, Brasil.

Rakshit, K. D.; Darukeshwara, J.; Raj, K. R.; Narasimhamurthy, K.; Saibaba, P.; Bhagya, S.; (2008). Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3621–3625.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, GC. Jr., (1993). Purified diets for laboratory rodents, Final Report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee and the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition, Philadelphia*, 123, 11, 1939–1951.

Van Soest, P. J. (1994). *Nutritional ecology of the ruminant*. 2nd ed. Ithaca: Comstock Publishing. 476p.

ARTIGO 3

**Efeito da dieta de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar contendo torta de
pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) detoxificada**

Artigo redigido conforme norma da revista Food and Chemistry toxicology
“Versão Preliminar”

Efeito da dieta de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar contendo torta de pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) detoxificada

Aline G. D. P. Monteiro^{a*} e Mario C. Guerreiro^a

^a Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, 37200-000 Lavras - MG, Brasil

RESUMO

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de verificar os efeitos das dietas com torta de pinhão-manso detoxificada sobre o desenvolvimento de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Os ratos receberam dietas contendo doses crescentes de 0% (grupo controle), 5%, 10% e 15% de torta de pinhão-manso detoxificada, durante 28 dias. Após o período da dieta experimental, os animais foram submetidos à eutanásia. O sangue e os órgãos foram coletados para a avaliação dos indicadores metabólicos, endócrinos, hematológicos e histopatológicos. Os resultados demonstraram que, em todos os parâmetros avaliados, houve diferenças significativas entre o grupo controle e os demais. Tais resultados indicam que, apesar de a torta estar isenta de ésteres de forbol, a quantidade de inibidores de tripsina, além de outros possíveis metabolitos ativos formados no processo de oxi-detoxificação, impede a utilização da torta de pinhão-manso detoxificada pela oxidetoxificação na dieta animal, em qualquer dose administrada.

Keywords: Torta de Pinhão-manso, oxi-detoxificação, toxicidade e complemento alimentar.

INTRODUÇÃO

A torta de pinhão-manso é um dos coprodutos resultantes da extração do óleo das sementes de pinhão-manso. É um excelente adubo orgânico, devido às altas concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio em sua constituição (Makkar *et al.*, 1998). Entretanto, a torta ainda apresenta grandes quantidades de proteína (cerca de 50%) que poderiam tornar útil a sua utilização como um potencial complemento proteico e altamente nutritivo para alimentação animal. Além disso, a composição de aminoácidos essenciais da torta de pinhão-manso é similar à do farelo de soja (Oliveira *et al.*, 2010).

Porém, para se utilizar a torta como complemento alimentar, é necessária a retirada dos componentes tóxicos presentes naturalmente em sua constituição.

Atualmente, além de a torta de pinhão-manso ser utilizada como adubo orgânico, ela também é empregada como insumo calorífico, pelo seu não aproveitamento na alimentação animal, atribuído à sua toxicidade (Saturnino *et al.*, 2005).

Diversos autores atribuem o efeito tóxico e antinutricional da torta de pinhão-manso à presença dos ésteres de forbol, além dos inibidores de tripsina (Makkar *et al.*, 1997; Martínez-Herrera *et al.*, 2006; Silva, 2012).

Os ésteres de forbol são os principais compostos responsáveis pela toxicidade da semente, do óleo, do farelo e da torta de pinhão-manso (Herrera *et al.*, 2006). Eles são classificados como ésteres de tigliano diterpenos. O composto tigliane é um diterpeno tetracíclico que, quando hidroxilado em várias posições e ligado com as terminações ácidas, dá origem a diversos outros compostos chamados de ésteres de forbol (Haas e Strerk, 2002).

Os ésteres de forbol têm ação inflamatória e carcinogênica (Azzi *et al.*, 1992 e Aitken, 1986). Também é responsável por levar animais e indivíduos ao óbito.

A tripsina é responsável pela digestão das proteínas. Os inibidores de tripsina reduzem a ação da tripsina do trato intestinal e aumentam a produção de enzimas no pâncreas, ocasionando uma hipertrofia desse órgão, além de reduzir a taxa de crescimento do animal (Cardoso, 2007).

Contudo, se faz necessário avaliar a torta detoxificada quanto às variáveis que comprometem a saúde do animal ruminante. Para tanto, este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o desenvolvimento de ratos Wistar alimentados com diferentes níveis de torta de pinhão-manso detoxificada pelo processo de oxi-detoxificação desenvolvido por Monteiro *et al.* (2012).

MATERIAL E MÉTODOS

Torta de pinhão-manso detoxificada

A torta de pinhão-manso detoxificada, ou seja, isenta de ésteres de forbol, utilizada neste trabalho foi tratada pelo processo desenvolvido por Monteiro *et al.*, 2012, que utilizaram reações oxidativas do tipo Fenton.

Determinação do inibidor de tripsina

A atividade do inibidor de tripsina foi determinada pela comparação entre um ensaio cinético (com, pelo menos, quatro períodos de tempo) da atividade de tripsina da torta de pinhão-manso detoxificada e sem tratamento. Utilizou-se o substrato BApNA na concentração de $0,87 \text{ mmol.L}^{-1}$, preparado em tampão glicina-NaOH $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ no pH ótimo (9,7) (Rossi *et al.*, 2009) e quantificou-se a atividade por meio da metodologia proposta por Erlanger *et al.* (1961). Ensaios-controle, como branco de substrato (atividade na ausência de enzima e inibidor), branco de enzima (atividade na ausência de substrato e inibidor), branco de inibidor (atividade na ausência de substrato e enzima) e atividade de tripsina no extrato de pinhão-manso, foram realizados da mesma maneira que os tubos experimentais. Os resultados foram expressos em unidades de tripsina inibida (UTI), que consiste no desaparecimento da absorção de luz correspondente a 1 mmol de p-nitroanilina (produto formado durante a atividade da tripsina sobre o substrato BapNA), durante 1 minuto de reação, em 1 g de torta de pinhão-manso.

Testes com tripsina bovina ($4 \text{ mg}/200\text{mL HCl } 0,001\text{mol.L}^{-1}$) do fabricante Merck foram realizados em tampão TRIS/HCl $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH=7,0.

Animais

O experimento foi realizado no Biotério do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA, após a autorização do Comitê de Ética da Universidade Federal de Lavras, nº 078/2011, durante 28 dias.

Foram utilizados 24 ratos (*Rattus norvegicus*) albinos, fêmeas, da linhagem Wistar, com 50 dias de idade e pesando em torno de 100 g.

No período pré-experimental, os animais foram mantidos em grupos de seis ratos por gaiola, à temperatura ambiente (cerca de 25 °C), com ciclo claro-escuro, de 12 horas, tendo acesso à ração comercial Nuvilab CR1 (Nuvital Nutrientes, Ltda.) e água *ad libitum*. Durante seis dias antes do início do experimento, os animais foram pesados, distribuídos aleatoriamente em gaiolas metabólicas individuais e receberam uma dieta de adaptação, de acordo com o American Institute of Nutrition, AIN-93. Após esse período, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de seis animais em delineamento inteiramente casualizado (D.I.C) e receberam as dietas experimentais e água *ad libitum* por 28 dias.

Dieta

Foram desenvolvidas quatro dietas experimentais, formuladas de acordo com AIN-93G (Reeves *et al.*, 1993), modificadas pela adição da torta de pinhão-manso detoxificada, em níveis crescentes da torta detoxificada (0%, 5%, 10% e 15%) e descritas na Tabela 1.

Tabela 1 Composição das dietas para os animais

DIETA (g/100g)	TRATAMENTOS			
	0%	5%	10%	15%
Torta de pinhão-manso	0,00	5,00	10,00	15,00
Caseína	20,00	20,00	20,00	20,00
Açúcar	10,00	10,00	10,00	10,00
Colina	0,25	0,25	0,25	0,25
Metionina	0,30	0,30	0,30	0,30
Celulose	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo (soja)	7,00	7,00	7,00	7,00
MV*	1,00	1,00	1,00	1,00
MM*	3,50	3,50	3,50	3,50
B.H.T.*	0,05	0,05	0,05	0,05
Vitamina E	0,05	0,05	0,05	0,05
Amido	52,85	47,85	42,85	37,85

*MV= mistura vitamínica; MM= mistura mineral; B.H.T.= butilato hidroxitolueno (anti-oxidante).

Diariamente, era medido e anotado o consumo de ração. Semanalmente, foi feita a pesagem dos animais e medido o consumo de água. Ao final, esses dados foram utilizados para avaliação do consumo médio diário de ração e água, ganho de peso médio diário e coeficiente de eficiência alimentar.

Após o período experimental, coletou-se o sangue mediante punção cardíaca. O sangue coletado passou por um processo de centrifugação durante cinco minutos, a 11.963 g, a fim de que se separasse o soro. O soro foi, então, congelado, a -20 °C, para posteriores análises.

Desenvolvimento dos animais

O consumo da ração foi verificado diariamente e o consumo de água e o peso dos animais foram acompanhados semanalmente, calculando-se, assim, o consumo diário (CMD), o ganho de peso diário (GMD) e o coeficiente de eficiência alimentar (CEA), este último calculado pela divisão do ganho do peso animal pelo total de alimento ingerido, conforme Pellett e Young (1980).

Ao término do experimento, os animais foram deixados em jejum por cerca de 12 horas e, em seguida, submetidos à exsanguinação, sob anestesia com tiopental sódico (dosagem de 40 mg.kg^{-1} do animal).

Análises bioquímica

Hemograma

Ao final do experimento, os animais foram deixados em jejum por 12 horas antecedentes à eutanásia. Foram utilizados 40 mg.kg^{-1} de Tiopental[®] para anestésiar os animais e, em seguida, submetê-los à eutanásia por deslocamento cervical, incisão ventral. A exsanguinação foi realizada por coleta de sangue do coração.

O hemograma foi realizado pelo Laboratório de Fisiologia e Farmacologia, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Lavras.

Atividades de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina

As atividades de aspartato aminotransferase (AST; ec 2.6.1.1), alanina aminotransferase (ALT; EC 2.6.1.2) e fosfatase alcalina (FA; EC 3.1.3.1) foram medidas utilizando-se um kit comercial Bioclin[®]. O oxalato ou piruvato produzido pela ação das enzimas AST ou ALT reagem com a dinitrofenil-hidrazina e a leitura do composto colorido obtido feita a 505 nm.

A FA presente na amostra hidrolisa a timolftaleína monofosfato, liberando timolftaleína e fosfato inorgânico. A atividade enzimática é proporcional à quantidade de timolftaleína formada que, em meio básico, adquire cor azul, cujo pico de absorbância se dá em 590 nm.

Estudo histopatológico

Depois de os animais serem sacrificados, foi realizada a necropsia, com a retirada dos órgãos internos (rins, fígado, coração, baço, cérebro e pulmão) que foram submetidos a exame histopatológicos.

Os órgãos foram seccionados em pequenos fragmentos, fixados com formalina tamponada por 24 horas e, posteriormente, armazenados em álcool 70%. O material armazenado foi processado para inclusão em blocos de parafina e submetido à microtomia, resultando em cortes com espessura de, aproximadamente, 3 μ m. Os cortes obtidos foram corados com hematoxilina e eosina e colocados em lâminas de vidro, para avaliação histopatológica em microscópio óptico.

Análise estatística

As análises estatísticas dos resultados foram realizadas, utilizando-se o software SISVAR 4.0 (Ferreira, 2000), a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey, para a comparação dos grupos, todos a 5% de probabilidade.

RESULTADOS

Determinação de inibidores de tripsina

A atividade dos inibidores de tripsina presentes na torta de pinhão-manso permaneceu a mesma após o tratamento de oxidetoxificação, conforme mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 Atividade de inibidor de tripsina na torta de pinhão-manso sem tratamento e detoxificada via processo oxidativo avançado

Atividade da enzima	Torta de pinhão-manso sem tratamento	Torta de pinhão-manso oxidetoxificada
(UTI*)	27,49	27,52

* Unidade de tripsina inibida

Desenvolvimento dos animais

Na Figura 1 pode ser observado o perfil de crescimento dos animais tratados com a torta de pinhão-manso oxidetoxificada em doses crescentes e a torta sem tratamento (controle), semanalmente, durante os 28 dias de experimento.

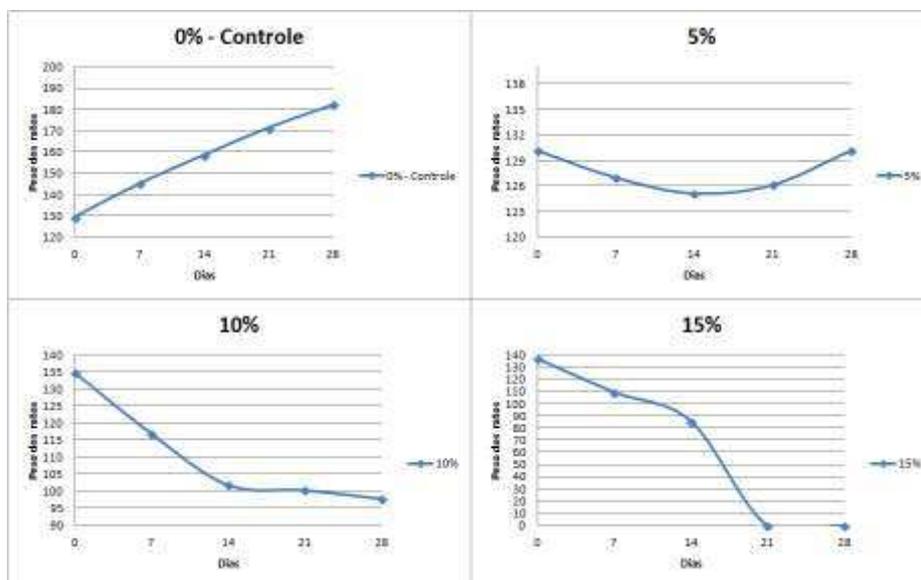


Figura 1 Perfil de crescimento dos ratos durante os 28 dias de experimento de cada tratamento

* Os pontos representam as médias \pm desvio padrão do peso médio dos grupos em cada semana do experimento

Os resultados da avaliação do ganho de peso demonstraram que houve diferença significativa entre o grupo que recebeu a dieta contendo torta tratada e o grupo controle. Esse resultado evidenciou que todas as dosagens da torta de pinhão-mansão tratada afetou o apetite dos animais, levando-os à significativa perda de peso até o óbito.

Os animais do grupo alimentados com 15% da torta foram os mais afetados. Após 14 dias do início da administração das dietas ocorreu o 1º óbito e no 22º dia, a do último animal desse grupo, totalizando 6 animais mortos ao final do experimento. Quanto maior a quantidade de torta na dieta, maior foi o dano causado à saúde dos animais.

Além da perda de peso, também foram observadas queda de pelo, diarreia e mudança na coloração dos olhos.

Na Tabela 3 podem ser observadas as relações de consumo de ração e ganho de peso animal. Os resultados demonstram que, quanto maior a dosagem de torta de pinhão-manso na dieta, maior era a perda do apetite, ou seja, menor o consumo e, por consequência, menor era o ganho de peso.

Tabela 3 CMD, GMD e CEA dos ratos durante o período experimental

Dieta	CMD** (g)	GMD** (g)
0%	18,84 ^a	5,62 ^a
5%	16,05 ^b	4,56 ^b
10%	12,65 ^b	3,94 ^c
15%	5,34 ^c	2,34 ^c

Letras diferentes na coluna indicam que as médias diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Controle= dieta padrão (0%). **CMD= consumo médio diário, GMD= ganho de peso médio diário

Hemograma

A partir de uma gota de sangue de cada animal foi realizado esfregaço sanguíneo para a contagem de células, conforme apresentado na tabela 4.

Tabela 4 Hemograma dos animais após 28 dias com as dietas experimentais

	<i>DIETA</i>			
	0%	5%	10%	15%
Hemácias ($6,6-9,0 \times 10^6/\text{mm}^3$)*	8,73	7,67	7,4	†*
Hemoglobina (15 g%)*	14,7	12,32	13,16	†*
Leucócitos ($7300-12600/\text{mm}^3$)*	3750	5890	3830	†*
Linfócitos totais (65%-77%)*	42,50	44,65	40,8	†*
Proteína total (5-7 g%)*	7,3	6,5	6,28	†*

Letras diferentes na linha indicam que as médias diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). Os resultados estão expressos com as médias \pm desvio padrão de cada tipo celular avaliado em esfregaço sanguíneo com microscópio óptico e confirmado por analisador automático

* Fonte: Jain, 1993

†*Não foi possível a realização do exame nos animais desse grupo.

As variáveis hematológicas não foram afetadas pelo consumo das rações contendo as tortas de pinhão-manso detoxificado nos níveis de 5% e 10%, comparadas com o controle. Os animais alimentados com a dieta contendo 15% de torta detoxificada morreram antes de poderem ser submetidos ao exame hematológico.

Atividades de aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatase alcalina

A atividade das enzimas FA, ALT e AST está demonstrada na Tabela 5.

Tabela 5 Atividade de enzimas no soro dos animais, após 28 dias com as dietas experimentais

<i>(U·mL⁻¹)</i>	<i>DIETA</i>			
	0%	5%	10%	15%
FA*	2,36 ^a	4,85 ^b	1,9 ^a	†*
ALT*	20,08 ^b	31,28 ^b	68,09 ^a	†*
AST*	64,46 ^c	87,01 ^b	125,27 ^a	†*

Letras diferentes na linha indicam que as médias diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)

Controle= dieta padrão (0%). **FA= fosfatase alcalina; AST= aparato aminotransferase e ALT=alanina aminotransferase

†*Não foi possível a realização do exame nos animais desse grupo

Todos os grupos apresentaram diferenças significativas entre si. Para as enzimas ALT e AST, foi observado um aumento nos níveis dos dois grupos em relação ao controle. Essas alterações podem indicar hepatotoxicidade.

Estudo histopatológicos

Na avaliação macroscópica foram observadas alterações significativas dos órgãos analisados (pulmão, intestino, fígado, coração, rim e baço). Para cada órgão/animal/grupo, foi realizada fotomicrografia da área mais afetada.

Nas Figuras 2 e 3 apresentam-se imagens microscópicas obtidas do pulmão e do fígado, pois estes foram os órgãos que apresentaram diferenças mais significativas.

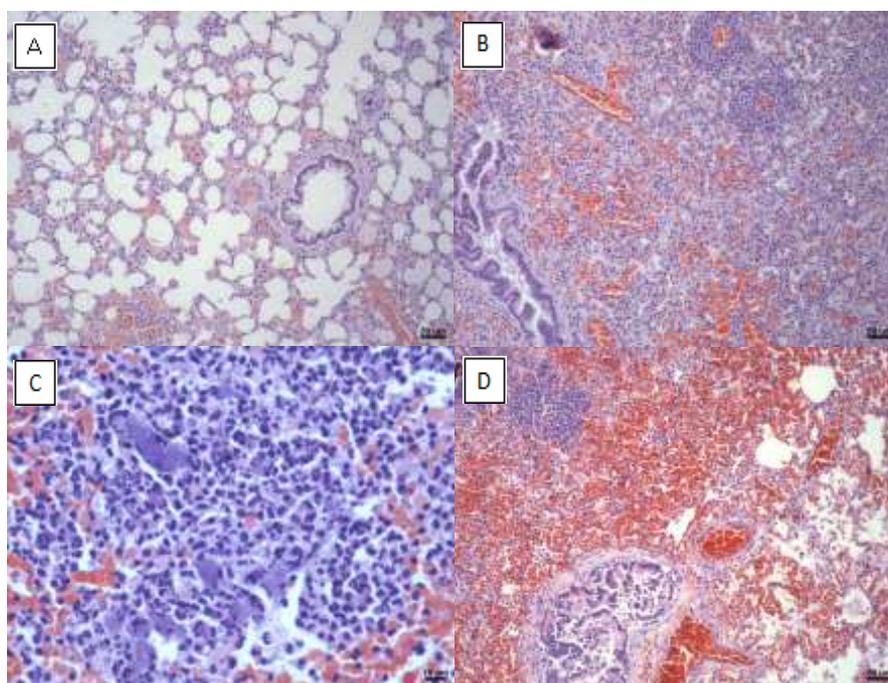


Figura 2 Fotomicrografia do pulmão de um dos ratos alimentados com a dieta controle (A) e alimentados com a torta de pinhão manso detoxificada (B,C e D)

*As letras representam o mesmo órgão de um animal de cada um dos três diferentes grupos e do controle. A= Controle; B= 5%; C= 10% e D= 15%

No grupo dos animais alimentados com dieta contendo 5% de torta de pinhão-manso detoxificada, os ratos apresentaram congestão difusa acentuada,

infiltrado inflamatório mononuclear e pneumonia (Figura 2B). Nos grupos 10% e 15%, foram observados congestão difusa acentuada e infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 2C e D).

Na Figura 3 observa-se a fotomicrografia do fígado do controle (Figura 3A) e do animal alimentado com a dieta contendo 5% (Figura 3B) da torta de pinhão-manso detoxificada.

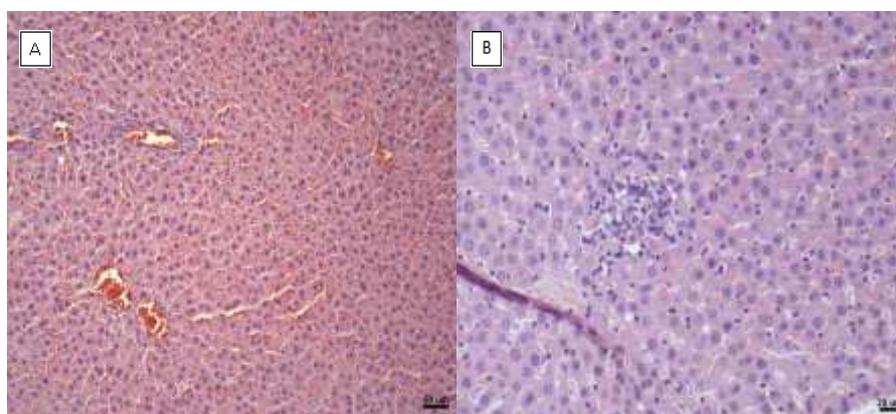


Figura 3 Fotomicrografia do fígado de um dos ratos alimentados com a dieta controle (A) e alimentados com a torta de pinhão manso detoxificada
*As letras representam o mesmo órgão de um animal de cada um dos três diferentes grupos e do controle. A= Controle e B= 5%

No fígado do animal alimentado com a dieta 5% foi identificado um discreto foco de infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 3B).

Nos três grupos foram observados infiltrados eosinofílicos na porção granular do estômago e apenas nos animais do grupo alimentado com 15% de torta detoxificada foram observadas necrose e a presença de colônia bacteriana.

No baço e no rim foram identificadas congestão difusa acentuada, colônia de bactérias, autólise acentuada e características de inflamação.

Os ratos que receberam as diferentes doses da torta de pinhão-mansão detoxificada apresentaram reações de toxicidade graves, principalmente na dose mais elevada (15% da torta de pinhão-mansão detoxificada na dieta).

DISCUSSÃO

Este estudo indicou que a dieta contendo torta de pinhão-mansão detoxificada, pelo processo de oxi-detoxificação, é, ainda, tóxica para os ratos e produz sintomas patológicos graves.

A resistência dos inibidores de tripsina ao tratamento pode estar relacionada com sua estrutura compacta contendo grande quantidade de ligações dissulfídicas na estrutura da molécula. Por consequência da presença dessas ligações, a molécula também apresenta grande resistência à inativação da sua atividade por tratamentos térmicos, que também vai depender diretamente de fatores como o tempo de aquecimento, a temperatura, o tipo de oleaginosa a ser tratada, a umidade e a conformação estrutural do inibidor (Sgarbieri e Whitaker, 1982). Em algumas cultivares de feijão, a atividade dos inibidores é destruída em 10 minutos, a 120 °C, enquanto em outras a atividade ainda pode ser detectada após 60 minutos de tratamento (Sgarbieri e Whitaker, 1982).

A presença dos inibidores de tripsina na torta de pinhão-mansão ou em outras oleaginosas pode contribuir para a redução da digestibilidade das proteínas pelos animais (Liener, 1979). Existem inibidores de tripsina que são resistentes à desnaturação, além de serem capazes de reverter a ação da atividade inibitória. Esses fatores podem estar relacionados com a capacidade do inibidor de reagir com outras substâncias do próprio material, levando-o à inativação ou à retenção da atividade inibitória pelos fragmentos obtidos com a degradação (Sgarbieri, 1979; Carvalho *et al.*, 2002).

Apesar de os animais, visualmente, apresentarem sinais de intoxicação, após se alimentarem com a ração contendo os níveis de 5% e 10% de tortas de pinhão-manso detoxificadas, não houve diferenças, quando comparados com os do grupo controle, no hemograma, para justificar tais reações (Tabela 4). Como os animais alimentados com a dieta contendo 15% de torta detoxificada morreram em horários desconhecidos, não foi possível realizar a coleta de sangue para a realização do exame hematológico.

As enzimas alanina aminotransferase (ALT) e a aspartato aminotransferase (AST) foram detectadas, nos animais alimentados com as dietas contendo 5% e 10% de tortas detoxificadas, em concentrações mais altas do que as dos animais alimentados com a dieta controle. Isso porque, quando ocorre injúria das células hepáticas, essas enzimas são liberadas na circulação e, conseqüentemente, ocorre um aumento de suas concentrações no sangue (Tabela 5). Como a atividade dessas enzimas ocorre no fígado, em baixas quantidades, a elevação na concentração dessas enzimas é um indicador de injúria hepática (Kaneko, 2008). Todas essas alterações indicam nefro e hepatotoxicidade. As alterações nas concentrações das enzimas ALT e AST também foram relatadas por Ahmed e Adam (1979) e Abdel-Gadir et al. (2003), refletindo injúrias hepáticas e renais. Também foram observadas alterações da fosfatase alcalina (FA) nos dois grupos experimentais (5% e 10%). A diminuição dessa enzima pode estar relacionada com a redução de consumo de alimento. Isso porque reduções da enzima também foram encontradas em bovinos com restrição alimentar (Miller *et al.*, 1969).

As lesões macroscópicas e histopatológicas constituem uma característica bastante similar da intoxicação por pinhão-manso *in natura* e, quando associadas aos dados epidemiológicos, permitem o diagnóstico da intoxicação (Makkar e Becker, 1998).

Todos os estudos sobre alimentação com o pinhão-manso *in natura* relatam sintomas clínicos e patológicos graves (Adam 1974, Liberalino *et al.*, 1988; Gandhi *et al.*, 1995; Rakshit *et al.*, 2008).

CONCLUSÃO

As tortas detoxificadas pelo processo de oxidetoxificação não apresentam características nutricionais adequadas para a inclusão na dieta animal, devido à presença de algum metabólito bioativo na torta, mesmo após ter sido tratada. Recomenda-se que sejam desenvolvidas novas versões do processo, pela eficiência na redução dos ésteres de forbol e a simplicidade do processo.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não existem conflitos de interesse.

AGRADECIMENTOS

Ao Laboratório de Prospecção e Análise em Química do DQI/UFLA, pela disponibilização dos equipamentos necessários para a realização do trabalho. Ao Laboratório de Análise Foliar do DQI/UFLA, pela realização da análise de proteína. Ao Laboratório de Plantas, Oleaginosas, Óleos, Gorduras e Biodiesel do DEG/UFLA, pelo fornecimento da torta de mamona utilizada neste estudo. Ao Departamento de Medicina Veterinária da UFLA e ao CNPq, pela bolsa e o apoio financeiro.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Abdel-Gadir, W.S.; Onsa, T.O.; Ali, W.E.M.; El Badwi, S.M.A.; Adam, S.E.I. (2003). Comparative toxicity of *Croton macrostachys*, *Jatropha curcas* and *Piper abyssinica* seeds in Nubian goats. *Small Rum. Res.*, v. 48, pp.61-67.

Adam, S.E.I. (1974). Toxic effects of *Jatropha curcas* in mice. *Toxicology*, 2, pp. 67–76.

Aitken, A. The biochemical mechanism of action of phorbol esters. In: Evans, F.J. (Ed.) (1986). *Naturally Occurring Phorbol Esters*. CRC Press, Boca Raton, p. 271–288.

Ahmed, O.M.M.; Adam, S.E.I. (1979). Toxicity of *Jatropha curcas* in sheep and goats. *Res. Vet.*, v.27, p.89-96.

Azzi, A.; Boscoboinik, D.; Hensey, C. (1992). The protein kinase C family. *European Journal of Biochemistry*, v.208, p.547–557.

Cardoso, L.R. (2007). Atividade de inibidores de proteases em linhagens de soja geneticamente melhoradas. *Alimento e Nutrição*. Araraquara, v. 18, n. 1, p. 19-26.

Carvalho, M. R. B.; Kirschnik, P. G.; Paiva, K. C.; Aiura, F. S. (2002). Evaluation of the activity of trypsin inhibitors after enzymatic digestion in heat-treated soybeans. *Rev. Nutr.*, 15 (3): 267–272.

Erlanger, B. F.; Kokowsky, N.; Cohen, W. (1961). The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. of Biochem. and Biophys.*, Orlando, n. 95, v. 2, p. 271–278.

Gandhi, V.M., Cherian, K.M., Mulky, M.J., 1995. Toxicological studies on Ratanjyot oil. *Food and Chemical Toxicology* 33 (1), 39–42..

Haas, H. Strerk, M. Mittelbach. (2002). Novel 12 deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolates from the seed oil of *Jatropha curcas*. J. Nat. Prod., 65, pp. 1434–1440.

Herrera, J.M.; Siddhuraju, P.; Francis, G. (2006). Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. Food Chemistry, v.96, p.80-89.

Kaneko, J.J.; Harvey, J.W.; Bruss, M.L. (2008). Clinical Biochemistry of Domestic Animals. San Diego: Elsevier. 571-588p.

Liberalino, A.A.A.; Bambirra E.A.; Moraes-Santos, T.; Viera, C.E. (1988). *Jatropha curcas* L. seeds. Chemical analysis and toxicity. Braz. Arch. Biol. Technol., 31, pp. 539–550.

Makkar, H.P.S.; Becker, K.; Sporer, F. (1997). Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, v.45, p.3152-3157.

Makkar, H.P.S., Aderibigbe, A.O., Becker, K., 1998. Comparative evaluation of non-toxic and toxic varieties of *Jatropha curcas* for chemical composition, digestibility, protein degradability and toxic factors. Food Chemistry 62, 207–215.

J. Martínez-Herrera, P. Siddhuraju, G. Francis, G. Dávila-Ortíz, K. Becker. (2006) Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. seeds from Mexico". Food Chemistry 96. 80-89.

Miller, W.J.; Martin, Y.G.; Blackmon, D.M. and Fowler, P.R.(1969). Effects of high protein diets with normal and low energy intake on wound healing, hair growth, hair and serum zinc and serum alkaline phosphatase in dairy heifers. J. Nutr., v.98, p.411-419.

Monteiro, A.G.D.P; Guerreiro, M.C; Souza, R. V. (2012). Detoxification of Cake of oilseeds to use in diet for ruminants. Patente number BR 1020120114607. National Institute of intellectual properties. Brasil. 16p.

Rakshit, K. D.; Darukeshwara, J.; Raj, K. R.; Narasimhamurthy, K.; Saibaba, P.; Bhagya, S.; (2008). Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. *Food Chem. Toxicol.* 46, 3621–3625.

Reeves, P. G.; Nielsen, F. H.; Fahey, GC. Jr., (1993). Purified diets for laboratory rodents, Final Report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing Committee and the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Journal of Nutrition*, Philadelphia, 123, 11, 1939–1951.

Sgarbieri, V.C. (1979). Propriedades físico-químicas e nutricionais de proteínas de feijão (*Phaseolus vulgaris L.*). Var. Rosinha G2. Campinas. 270 p.

Sgarbieri, V.C.; Whitaker, J.R. (1982). Physical and nutritional proprieties of common bean (*Phaseolus*) proteins. *Advance Food Research*, Orlando, v. 28, n.1, p. 93-166.