

Anais do Simpósio Destoxificação e Aproveitamento das Tortas de Pinhão-manso e Mamona



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

Documentos 16

Anais do Simpósio Destoxificação e Aproveitamento das Tortas de Pinhão-manso e Mamona.

*Clenilson Martins Rodrigues
Patrícia Verardi Abdelnur*
Editores Técnicos

Embrapa Agroenergia
Brasília, DF
2013

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroenergia

Parque Estação Biológica, PqEB s/n, Brasília, DF

Fone: (61) 3448-4246

Fax: (61) 3448-1589

www.cnpae.embrapa.br

sac@cnpae.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Secretária-Executiva: *Lorena Costa Garcia*

Membros: *Eduardo Fernandes Formighieri, João Ricardo Moreira de Almeida, Larissa Andreani, Leonardo Fonseca Valadares, Maria Iara Pereira Machado.*

Supervisão editorial: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Revisão de texto: *José Manuel Cabral de Sousa Dias*

Normalização bibliográfica: *Maria Iara Pereira Machado*

Editoração eletrônica: *Maria Goreti Braga dos Santos*

Ilustração da capa: *Maria Goreti Braga dos Santos*

1ª edição

1ª impressão (2013): 500 exemplares

Todos os direitos reservados

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Agroenergia

D 476 Simpósio Destoxificação e aproveitamento das tortas de pinhão-manso e mamona (2012, Brasília, DF)

Simpósio Destoxificação e aproveitamento das tortas de pinhão-manso e mamona: Anais / Clenilson Martins Rodrigues; Patrícia Verardi Abdelnur, editores técnicos. – Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2013.

326 p. : il. Color. – (Documentos / Embrapa Agroenergia, ISSN 2177- 4439; 016)

1. Pinhão-manso – destoxificação – torta. 2. Mamona – destoxificação – torta. 3. Pesquisa. 4. Inovação. I. Rodrigues, Clenilson Martins. II. Abdelnur, Patrícia Verardi. III. Série.

633.85 – CDD 22.

© Embrapa 2013

Autores

Adelia F. Faria-Machado

Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Avenida das Américas, 29501, Guaratiba, CEP. 23020-470. Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Ailton Teixeira do Vale

Professor Associado I. Departamento de Engenharia Florestal. Faculdade de Tecnologia. Universidade de Brasília. CEP. 70910-900, Brasília - DF, Brasil. ailton.vale@gmail.com.

Aisy Botega Baldoni

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - PqEB s/n, Brasília - DF, Brasil.

Alexandre Alonso Alves

Pesquisador da Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/n, CEP. 70770-901, Brasília - DF, Brasil. alexandre.alonso@embrapa.br.

Anandan Samireddypalle

Pesquisador do National Institute of Animal Nutrition and Physiology, Bangalore, 560030. India. anandsrp@yahoo.co.in.

Antonio Silvio do Egito

Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, km 04, Caixa Postal 145, CEP. 62010-970, Sobral - CE, Brasil. antoniosilvio.egito@embrapa.br.

Arturo Melendez Arévalo

Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) Rodovia BR 465, km 7, CEP. 23890-000, Seropédica - RJ, Brasil.

Bruno Galvêas Laviola

Pesquisador da Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/n, CEP. 70770-901, Brasília - DF, Brasil. bruno.laviola@embrapa.br.

Carlos Wanderlei Piler Carvalho

Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Avenida das Américas, 29501, Guaratiba, CEP. 23020-470, Rio de Janeiro - RJ, Brasil. carlos.piler@embrapa.br.

Clenilson Martins Rodrigues

Pesquisador da Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/n, CEP. 70770-901, Brasília - DF, Brasil. clenilson.rodrigues@embrapa.br.

Everaldo Paulo de Medeiros

Pesquisador da Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz, 1143 - Centenário, Caixa Postal 174, CEP. 58428-095, Campina Grande - PB, Brasil.

Francisco José Lima Aragão

Pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Parque Estação Biológica - PqEB s/n, CEP. 70770-917, Brasília - DF, Brasil.
francisco.aragao@embrapa.br.

Frederico de Souza

Docente do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Brasília. Campus Samambaia. CEP. 70.860-100, Brasília - DF, Brasil. frederico.souza@ifb.edu.br.

Harinder Paul Singh Makkar

Pesquisador do Animal Production and Health Division, FAO, Rome, Italy. Harinder.Makkar@fao.org.

Hévila Oliveira Salles

Pesquisadora da Embrapa Caprinos e Ovinos, Estrada Sobral/Groaíras, km 04, Caixa Postal 145, CEP. 62010-970, Sobral - CE, Brasil. hevila.salles@embrapa.br.

Hiário Cuquetto Mantovani

Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário, CEP. 36570-000, Viçosa - MG, Brasil. 5hcm6@ufv.br.

João Luís da Silva Filho

Pesquisador da Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz, 1143 - Centenário, Caixa Postal 174, CEP. 58428-095, Campina Grande - PB, Brasil. joao.silva-filho@embrapa.br.

João Paulo Saraiva Morais

Pesquisador da Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz, 1143 - Centenário, Caixa Postal 174, CEP. 58428-095, Campina Grande - PB, Brasil. joao.morais@embrapa.br.

José Antônio de Aquino Ribeiro

Analista da Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/n, CEP. 70770-901, Brasília - DF, Brasil. jose.ribeiro@embrapa.br.

José Luis Ramírez Ascheri

Pesquisador da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Avenida das Américas, 29501, Guaratiba, CEP. 23020-470, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

José Maria Rodrigues da Luz

Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário, CEP. 36570-000, Viçosa - MG, Brasil. josemarodrigues@yahoo.com.br.

Juan Antônio Ruano Ortiz

Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) Rodovia BR 465, km 7, CEP. 23890-000, Seropédica - RJ, Brasil.

Keysson Vieira Fernandes

Doutorando em Biociências e Biotecnologia na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP). Av. Alberto Lamego, 2000, Horto, CEP. 28013-602, Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil. keysson@gmail.com.

Lisa Presley da Silva Pereira

Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Av. PH Rolfs s/n - Campus Universitário, CEP. 36570-000, Viçosa - MG, Brasil. lisazootecnia@yahoo.com.br.

Liv Soares Severino

Pesquisador da Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz, 1143 - Centenário, Caixa Postal 174, CEP. 58428-095, Campina Grande - PB, Brasil.

Máira Milani

Pesquisadora da Embrapa Algodão, Rua Oswaldo Cruz, 1143 - Centenário, Caixa Postal 174, CEP. 58428-095, Campina Grande - PB, Brasil.

Marcela Regina Siqueira Amorim

Pós-graduanda em Ciência Florestal. Departamento de Engenharia Florestal. Faculdade de Tecnologia. Universidade de Brasília, Brasília - DF, Brasil. marcela.siqueira.amorim@gmail.com.

Marcelo Ferreira Fernandes

Zootecnista da Escola Agrária de Jundiá (EAJ).
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
(UFRN). RN 160, Km 03, Distrito de Jundiá,
Caixa Postal 07, CEP. 59280-000, Macaíba - RN,
Brasil. marceloferreirafernandes@bol.com.br.

Marcelo Teixeira Rodrigues

Docente da Universidade Federal de Viçosa:
Departamento de Zootecnia. Av. PH Rolfs s/n -
Campus Universitário, CEP. 36570-000, Viçosa -
MG, Brasil. mtrodrig@ufv.br.

Maria Catarina Megumi Kasuya

Docente da Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Microbiologia. Av. PH Rolfs s/n
- Campus Universitário, CEP. 36570-000, Viçosa -
MG, Brasil. mkasuya@ufv.br.

Maria Regina de Macêdo Beltrão

Docente da Universidade Aberta do Brasil
(UAB), Instituto Federal de Pernambuco (IFPE).
Av. Prof Luiz Freire, 500, Cidade Universitária,
CEP. 50740-540, Recife - PE, Brasil.
mariareginabeltrao58@gmail.com

**Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão (in
memoriam)**

Pesquisador da Embrapa Algodão, Rua Oswaldo
Cruz, 1143 - Centenário, Caixa Postal 174,
CEP. 58428-095, Campina Grande - PB, Brasil.
napoleao.beltrao@embrapa.br.

Natália Deus-de-Oliveira

Doutoranda em Biociências e Biotecnologia na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP). Av. Alberto Lamego, 2000, Horto, CEP. 28013-602, Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil. deusnaty@yahoo.com.br.

Natália Lima de Sousa

Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas. Departamento de Botânica, Campus Universitário Darcy Ribeiro, CEP. 70910-900, Brasília - DF, Brasil.

Olga Lima Tavares Machado

Docente da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF). Laboratório de Química e Função de Proteínas e Peptídeos (LQFPP). Av. Alberto Lamego, 2000, Horto, CEP. 28013-602, Campos dos Goytacazes - RJ, Brasil. olgauenf@yahoo.com.br.

Patrícia Verardi Abdelnur

Pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/n, CEP. 70770-901, Brasília - DF, Brasil. patricia.abdelnur@embrapa.br.

Rakshit Kodekalra Devappa

Institute for Animal Production in the Tropics and Subtropics (480b), University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.

Rejane Marques Mendes

Engenheira Florestal do Departamento de Engenharia Florestal. Faculdade de Tecnologia. Universidade de Brasília, CEP. 70910-900, Brasília - DF, Brasil. rejaneflorestal@yahoo.com.br.

Rodrigo Barros Rocha

Pesquisador da Embrapa Rondônia, BR 364 - Km 5,5 - Zona Rural, Caixa Postal 127, CEP. 76815-800, Porto Velho - RO, Brasil. rodrigo.rocha@embrapa.br.

Roseli Aparecida Ferrari

Pesquisadora do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciência e Qualidade de Alimentos. Av. Brasil 2880, Caixa Postal 139, CEP: 13070-178, Campinas - SP, Brasil. roseliferrari@ital.sp.gov.br.

Rosemar Antoniassi

Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Avenida das Américas, 29501, Guaratiba, CEP. 23020-470, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Samara de Sousa

Mestranda em Ciências Agrárias pela Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Rua das Baraúnas, 351, Bodocongó, CEP. 58429-500, Campina Grande - PB, Brasil.

Sidinea Cordeiro de Freitas

Pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos. Avenida das Américas, 29501, Guaratiba, CEP. 23020-470, Rio de Janeiro - RJ, Brasil.

Simone Mendonça

Pesquisadora da Embrapa Agroenergia, Parque Estação Biológica - PqEB s/n, CEP. 70770-901, Brasília - DF, Brasil. simone.mendonca@embrapa.br

Williame Farias Ribeiro

Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Departamento de Química, Caixa Postal 5093, CEP. 58051-970, João Pessoa - PB, Brasil.

Apresentação

Em 2012 a Embrapa Agroenergia organizou, em parceria com a Embrapa Algodão, e com o apoio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, o “Simpósio Destoxificação e Aproveitamento das Tortas de Pinhão-manso e Mamona”. Esse simpósio teve como objetivo promover o debate entre a comunidade científica e os representantes dos diversos setores do negócio da Agroenergia com vistas à discussão dos principais avanços científicos nas estratégias de aproveitamento econômico das tortas de pinhão-manso e mamona.

Os anais do Simpósio, que agora apresento, reúne quatorze capítulos que discorrem sobre o problema de toxidez encontrado nestas tortas, sobre as razões para buscar a destoxificação, as diferentes estratégias que estão sendo utilizadas visando a alcançar esse objetivo, os métodos analíticos para determinar a presença dos compostos tóxicos e os distintos produtos que podem ser obtidos a partir das tortas. O objetivo do Simpósio foi plenamente alcançado, e acreditamos que, com este Documento, ampliaremos consideravelmente o alcance da mensagem apresentada pelo grupo de especialistas que palestrou durante aquele evento.

Finalizando, quero fazer um agradecimento ao Dr. Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão (in memoriam), chefe-geral da Embrapa Algodão na época da realização do Simpósio, e que faleceu em 2013. A contribuição do Dr. Napoleão à P&D e TT na Embrapa, como Pesquisador e Gestor, é ampla e notória. A ele, em meu nome e em nome da Embrapa Agroenergia, o nosso muito obrigado!

Manoel Teixeira Souza Júnior
Chefe-Geral da Embrapa Agroenergia

Prefácio

As culturas de pinhão-manso e mamona possuem elevado potencial de rendimento de grãos e óleo, não concorrem diretamente com a agricultura alimentar e, na fase inicial, permitem o cultivo em consórcio com outras culturas. Na cadeia produtiva, o resíduo do processo de extração do óleo das sementes de pinhão-manso e mamona, comumente chamado de "torta", apresenta elevado valor proteico, sendo, portanto, matéria-prima potencial para uso na nutrição animal.

Entretanto, como as tortas apresentam fatores antinutricionais, além de compostos alergênicos e substâncias tóxicas, tais características representam os principais gargalos dessas culturas e inviabilizam a utilização e a agregação de valor aos maiores coprodutos gerados, durante o processo de extração dos óleos vegetais.

Atualmente, as tortas são destinadas à produção de adubos, mas considerando o horizonte de larga produção, esses resíduos poderão ser passivos ambientais e novas alternativas serão necessárias para mitigar os problemas que possam ser ocasionados, principalmente aqueles associados à contaminação do solo ou de corpos hídricos. Desta forma, o uso racional das tortas e a busca pela agregação de valor caracterizam-se como os principais pontos de inovação a serem alcançados a curto e médio prazos para essas culturas.

A viabilização de novos processos de aproveitamento desses coprodutos pode resultar em vários benefícios ao produtor, à sociedade

e ao país, como por exemplo, i) beneficiando o desenvolvimento regional em localidades onde existe carência por matéria-prima para nutrição animal; ii) favorecendo a implantação de biorrefinarias para a produção de combustíveis e químicos renováveis obtidos a partir desse tipo de matéria-prima; iii) utilizando as tortas como fonte energética na forma de carvão vegetal ou na produção de briquetes. Todas essas oportunidades configuram estratégias bastante promissoras para o desenvolvimento econômico, ambiental e social.

Seguindo esta ótica, o Documento contextualiza os principais assuntos apresentados e debatidos durante a realização do “I Simpósio de Destoxificação e Aproveitamento de Tortas de Pinhão-manso e Mamona (SiDAT)” que foi realizado em julho de 2012 pela Embrapa Agroenergia e Embrapa Algodão, com o apoio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

A obra está estruturada em quatro principais temas que trazem as contribuições dos palestrantes na forma de capítulos, sendo esses associados com: i) aspectos agrônômicos e de melhoramento genético das culturas de pinhão-manso e mamona; ii) processos tecnológicos e biotecnológicos de destoxificação das tortas; iii) estratégias para o monitoramento e o controle de qualidade dos processos de destoxificação das tortas; e, por fim, iv) novas alternativas para agregação de valor e aproveitamento das tortas de pinhão-manso e mamona.

O conteúdo desta obra permitirá ao leitor diagnosticar os principais avanços e dificuldades técnico-científicas encontradas atualmente nos processos de destoxificação das tortas de pinhão-manso e mamona, bem como alternativas distintas relacionadas às estratégias de agregação de valor desses coprodutos e às diferentes formas abordadas no controle de qualidade dos inúmeros processos envolvidos nessa temática.

Clenilson M. Rodrigues
Patrícia V. Abdelnur
Editores Técnicos

Sumário

Estratégias agronômicas para aproveitamento da torta de pinhão-manso e melhoramento genético visando ao desenvolvimento de cultivares atóxicas de alto desempenho	23
Estado-da-arte e perspectivas do cultivo de pinhão-manso	26
Aproveitamento da torta de pinhão-manso	29
Conclusões e perspectivas.....	44
Referências	45
A torta da mamona e suas aplicações na agricultura	53
Considerações gerais sobre a planta e a torta de mamona.....	55
Composição molecular da torta de mamona	57
Enriquecimento da torta de mamona como fertilizante.....	63
Considerações finais	65
Referências	65

Engenharia Genética da Mamoneira: Perspectivas para a Destoxificação da Ricina 71

Diversidade em acessos de mamona do banco de germoplasma brasileiro quanto à concentração de ricina nas sementes 77

Estudo do acúmulo de ricina durante o desenvolvimento da semente de mamona 78

Silenciamento do gene que codifica a ricina em mamona (*Ricinus communis* L.) 82

Considerações finais 87

Referências 88

Desafios na destoxificação da torta de pinhão-manso 95

Qual o componente tóxico? 101

Dados analíticos 104

Considerações finais 117

Referências 117

Destoxificação Biológica de Torta de Pinhão-manso 125

Destoxificação biológica da torta de pinhão-manso 129

Utilização da torta de pinhão-manso 134

Considerações finais 138

Referências 138

Destoxificação das Tortas de Pinhão-manso e Mamona pelo Processo de Extrusão Termoplástica 147

Aspectos de segurança considerados no processamento de torta de mamona e de pinhão-manso 157

Processamento das tortas de pinhão-manso 159

Estudo preliminar para destoxificação de torta de mamona..... 160

Análise de ésteres de forbol para a torta extrudada de pinhão-manso..... 161

Referências 164

Recent Developments in Detoxification of Castor Cake-scope and its Limitation 167

Castor production and uses 168

Castor cake toxicity..... 169

Animal studies using castor cake..... 171

Conclusions 177

References..... 177

Destoxificação da Torta e Farelo de Mamona para Uso na Alimentação de Pequenos Ruminantes..... 183

Características da mamona..... 185

Torta e farelo de mamona como fonte de proteína na dieta de ruminantes..... 188

Destoxificação da torta de mamona.....	191
Identificação da ricina após destoxificação	194
Considerações finais	196
Referências	196
Analytical Methods for the Determination of Phorbol Esters in Jatropha Plant Parts and Their Products	203
Chromatographic methods for the analyses of phorbol esters.....	204
Biological assays for phorbol esters	205
References.....	209
Abordagens Eletroanalíticas para Torta e Sementes de Mamona.....	211
Análise <i>screening</i>	213
Determinação eletroquímica da ricina.....	215
Melhoramento genético para redução de toxicidade em mamona	219
Conclusões	221
Referências.....	222
Métodos para Detecção de Toxinas e Alérgenos de Mamona e de Pinhão-manso	227
Compostos tóxicos e alergênicos da mamona.....	228
Toxinas de <i>Jatrophas curcas</i>	244

Alérgenos de mamona e de pinhão-manso	250
Conclusões	255
Referências	256

Opportunities for Utilization of *Jatropha curcas* Products as Livestock Feed and Other Value-Added Products 269

Jatropha products as animal feed	270
Comparative evaluation of toxic and non-toxic jatropha genotypes	270
Bioactive compounds for industrial, agricultural and pharmaceutical applications	273
Jatropha products for energy generation	274
References.....	275

Fracionamento de tortas de pinhão-manso e mamona visando à obtenção de compostos de alto valor agregado 279

Mamona	280
Pinhão-manso	283
Composição centesimal de sementes de mamona e pinhão-manso.....	286
Processamento convencional de mamona e pinhão-manso	287
Fracionamento de pinhão-manso e mamona	290
Considerações finais	294

Referências	295
Potencial Energético do Epicarpo e da Torta de Pinhão-manso (<i>Jatropha curcas</i> L.).....	301
O biodiesel, a cultura do pinhão-manso e o uso energético dos coprodutos	304
Biomassa e carvão vegetal de epicarpo e torta de pinhão-manso.....	307
Briquetagem da torta de pinhão-manso: análise das variáveis do processo	315
Conclusões	321
Referências	322

Estratégias agronômicas para aproveitamento da torta de pinhão-manso e melhoramento genético visando ao desenvolvimento de cultivares atóxicas de alto desempenho

Bruno Galvêas Laviola

Alexandre Alonso Alves

Rodrigo Barros Rocha

Introdução

A demanda mundial por combustíveis e produtos químicos obtidos por fontes renováveis tem se expandido de forma muito rápida nos últimos anos e deverá acelerar-se ainda mais, principalmente em países em fase de desenvolvimento econômico, como o Brasil. O país tem grande potencial na produção de biocombustíveis e de outros derivados de óleos vegetais para atender tanto ao mercado nacional quanto ao mundial. Possui localização privilegiada na região tropical e conta com grandes reservas de terras, o que permite planejar o uso agrícola em bases sustentáveis sem comprometer os grandes biomas terrestres. Além disso, existem no país diversas espécies vegetais que produzem óleo em frutos e grãos, com diferentes potencialidades

e adaptações naturais a condições edafoclimáticas. Nesse cenário o desafio é aproveitar, de maneira racional, potencialidades regionais para produção de biocombustíveis, considerando tanto as culturas tradicionais quanto as novas oleaginosas, como o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) (LAVIOLA; ALVES, 2011).

O pinhão-manso é uma espécie perene, pertencente à família das Euforbiáceas, a mesma da mamona, mandioca e seringueira (DIAS et al., 2007; DHYANI et al., 2011). Embora várias evidências indiquem que o pinhão-manso não é originário do Brasil (ROSADO et al., 2010), a planta vegeta espontaneamente em diversas regiões do país há muito tempo. No passado, o óleo de pinhão-manso foi utilizado para produção de sabão caseiro, para iluminação, em lâmparinas e candeeiros e na iluminação pública de cidades, por ser um óleo sem cheiro e que queima sem fazer fumaça. Historicamente, as plantas de pinhão-manso vêm sendo plantadas visando também ao controle de erosão, à recuperação de áreas degradadas, à contenção de encostas e de dunas, e, quando dispostas ao longo de canais, rodovias, ferrovias, serviam como cerca viva em divisas internas ou nos limites de propriedades rurais (SATURNINO et al., 2005; DURÃES et al., 2011).

O pinhão-manso apresenta potencial de rendimento de grãos superior às oleaginosas tradicionais, bem como, características físico-químicas de óleo favoráveis a produção de biodiesel (DURÃES et al., 2011). Pesquisa com plantas selecionadas têm confirmado o potencial de rendimento na idade adulta superior a 1.500 kg de óleo/ha (DRUMOND et al., 2010; ROCHA et al., 2012). O teor de óleo nos grãos varia entre 30 e 40%, sendo afetado por fatores ambientais e ocorrência de pragas e doenças (FREITAS et al., 2011). A oleaginosa possui, também, outras características interessantes para produção de biodiesel, por ser espécie perene, que não necessita de renovação anual de plantio e uma cultura não alimentar, que não apresenta concorrência direta com a agricultura de alimentos. Os espaçamentos adotados para produção permitem o cultivo de culturas intercalares

na fase inicial de estabelecimento, permitindo o múltiplo uso da terra o que é opção potencialmente interessante para agricultura familiar e para diversificação das atividades agrícolas tradicionais como mais uma alternativa de renda. Devido ao seu vigoroso crescimento e desuniformidade de maturação de frutos, trata-se de uma cultura pouco mecanizável e altamente dependente de mão-de-obra que gera emprego no campo (LAVIOLA et al., 2010; LAVIOLA; ALVES, 2011).

Apesar das potencialidades do cultivo de pinhão-manso, a espécie está atualmente em processo de domesticação. Existem diversos desafios de pesquisa e desenvolvimento a ser superados, como a falta de cultivares comerciais, definição de práticas agrícolas, desuniformidade na maturação dos frutos e uso econômico da torta (DURÃES et al., 2011).

Na indústria de óleos, as tortas e farelos apresentam grande importância na viabilização do processo de comercialização e equacionamento dos custos. Em alguns casos, como na cadeia de produção da soja, o óleo é considerado o subproduto enquanto a torta/farelo é o produto principal para comercialização. No caso do pinhão-manso, não se espera um cenário diferente, sendo o aproveitamento econômico da torta fundamental para garantir viabilidade na exploração comercial do pinhão-manso. Porém, a torta de pinhão-manso é tóxica, o que acarreta desafios científicos e tecnologias que devem ser superados (RUG; RUPPEL, 2000; GOEL et al., 2007; RAKSHIT et al., 2008; GONÇALVES et al., 2009; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009; DEVAPPA et al., 2010b; 2011). Nesse sentido, este capítulo visa discutir diferentes estratégias agronômicas para o aproveitamento econômico da torta de pinhão-manso, incluindo o uso como fertilizante e as estratégias de melhoramento genético para o desenvolvimento de variedades atóxicas.

Estado-da-arte e perspectivas do cultivo de pinhão-manso

O interesse comercial no cultivo de pinhão-manso no Brasil iniciou-se com grande força a partir do ano de 2006, coincidindo com início do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (ROSADO et al., 2010; DURÃES et al., 2011). Na busca por fontes alternativas de matérias-primas o pinhão-manso foi apontado precocemente como uma cultura para atender à produção de óleo em diversas regiões do Brasil, inclusive em regiões semiáridas e/ou de solos de baixa fertilidade (SATURNINO et al., 2005; DIAS et al., 2007; CONAB, 2011). Na ocasião, como havia poucos estudos com a espécie, o potencial de rendimento do pinhão-manso foi estimado a partir de plantas adultas e isoladas, que produziam mais de 20 kg de grãos por árvore, sendo assim superestimado para condições de cultivo adensado. Movido por informações equivocadas de que o cultivo de pinhão-manso prometia alta rentabilidade, houve em diversos países de clima tropical um grande investimento na cultura, chegando no Brasil a se plantar mais de 42.000 ha. Como era esperada, boa parte desses plantios não teve continuidade até que atingissem o estágio adulto e, em levantamentos mais recentes pela CONAB, se verificou uma área remanescente inferior a 25.000 ha plantados com pinhão-manso (CONAB, 2011).

Os abandonos de plantios e os baixos rendimentos computados até agora são resultantes principalmente da mistura de material propagativo, uma vez que se nota alta variação entre plantas do mesmo estande (ROCHA et al., 2012). Somado ao plantio de materiais geneticamente desconhecidos, os plantios iniciais foram implantados sem critérios agronômicos mínimos, carreados por inúmeras notícias na internet de que a oleaginosa era uma planta que não necessitava de práticas culturais e controle de insetos e doenças (LAVIOLA, 2011). Além disso, devido à frustração quanto as safras nos primeiros anos (que é baixa, já que a planta está em

fase de crescimento), muitos produtores abandonaram os plantios comerciais antes que as plantas atingissem a fase adulta (5 a 6 anos).

Para prover conhecimento e domínio tecnológico do cultivo de pinhão-manso, a Embrapa vem desde o ano de 2008 estruturando e coordenando projetos em redes nacionais (DURÃES et al., 2011). Dentre estes projetos, cita-se o intitulado “Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Pinhão-Manso para Produção de Biodiesel”, BRJATROPHA, que é financiado pela FINEP com apoio do CNPq e Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Desse projeto participam 22 instituições (unidades da Embrapa, universidades e instituições de pesquisa estaduais) e mais de 80 pesquisadores de competências multidisciplinares, que estão envolvidos em mais de 130 atividades de pesquisa (Figura 1).

Localização das instituições participantes do projeto BRJATROPHA

1. Embrapa Agroenergia (Coordenadora)
2. Embrapa Cerrados
3. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia
4. Universidade de Brasília
5. Embrapa Agropecuária Oeste
6. Embrapa Clima Temperado
7. Embrapa Florestas
8. Universidade Federal do Paraná
9. Embrapa Informática Agropecuária
10. Embrapa Meio Ambiente
11. Embrapa Agroindústria de Alimentos
12. Embrapa Solos
13. Universidade Estadual do Norte Fluminense
14. Embrapa Gado de Leite
15. Embrapa Milho e Sorgo
16. Universidade Federal de Lavras
17. Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig)
18. Embrapa Semiárido
19. Embrapa Algodão
20. Embrapa Meio Norte
21. Universidade Federal do Tocantins
22. Embrapa Rondônia

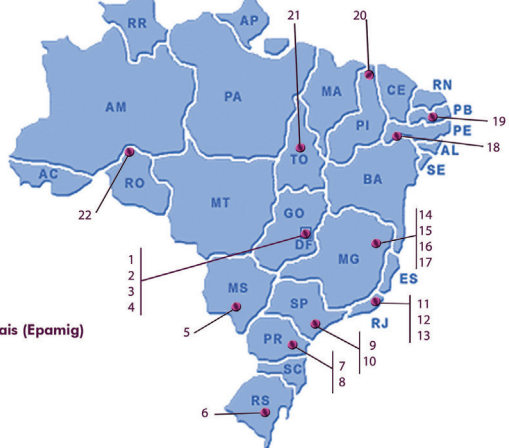


Figura 1. Rede do projeto Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Pinhão-Manso para Produção de Biodiesel (BRJATROPHA).

Resultados recentes confirmam o potencial de rendimento do pinhão-manso para produção de biodiesel, com ampla variação biológica

para produção de grãos e óleo. Em avaliações de campo, tem se encontrado genótipos com rendimentos superiores a 1.500 kg/ha de óleo, o que corresponde a três vezes a produtividade de óleo da soja (Tabela 1) (DRUMOND et al., 2010; ROCHA et al., 2012). Pesquisas para validar sistemas de cultivo de pinhão-manso têm sido desenvolvidas em diversas regiões do Brasil. As ações são embasadas em conhecimentos de ecofisiologia e de fenologia para melhor adequar o cultivo de pinhão-manso às diferentes regiões produtoras. Resultados preliminares têm demonstrado que a simples adoção de práticas agrícolas (ex. adubação, podas, espaçamentos, entre outros) pode contribuir para aumentar a produção de grãos em mais de 300% (LAVIOLA, 2011). Para a colheita de frutos, a pesquisa tem buscado alternativas para concentrar e uniformizar a maturação, bem como, adaptar derrçadeiras costais e máquinas colhedeadas que são comumente utilizadas em outras culturas, como por exemplo, na do café, visando a aumentar rendimento e diminuir custo de colheita.

Tabela 1. Produtividade potencial de pinhão-manso em diferentes condições de manejo e regiões de cultivo.

Produção dos 10 melhores Genótipos (kg/ha de grãos)	Óleo Potencial (kg/ha)	Idade (anos)	Espaçamento (m x m)	Estado	Fonte
3.919 a 9.895	1.300 a 3.400	6	3 x 1	RS	Sergio Delmar dos Anjos e Silva, CFACT
2.550 a 4.519	890 a 1.580	5	3 x 2	RO	Rodrigo Rocha, CPAFRO
2.835 a 4.395	990 a 1.500	5	3 x 2	PE	Marcos Drumond, CPATSA
3.850 a 2.650	1.350 a 900	4,5	4 x 2	DF	Bruno Laviola, CNPAE

No que se refere ao aproveitamento da torta de pinhão-manso, diversos estudos foram desenvolvidos no mundo, tendo gerado um grande volume de informação (MAKKAR et al., 1997; BECKER; MAKKAR, 1998; MAKKAR et al., 1998; RUG; RUPPEL, 2000; GOEL et al., 2007; RAKSHIT et al., 2008; KING et al., 2009; MAKKAR et al., 2009; DEVAPPA et al., 2010b; DE BARROS et al., 2011; JOSHI et al., 2011; OSKOEIAN et al., 2011; SAETAE et al., 2011; SAETAE; SUNTORNSUK, 2011; SUNTORNSUK; SAETAE, 2011; XIAO et al., 2011; ZHANG et al., 2011; KUMAR et al., 2012; PRADHAN et al., 2012). Tais estudos indicam que a torta de pinhão-manso pode ser um excelente adubo orgânico e que, se destoxificada, poderá ser uma fonte proteica para nutrição animal, conforme poderá ser verificado no restante do capítulo.

Com os avanços recentes e outros que estão por vir, a perspectiva é que nos próximos anos se tenha base científica suficiente para dar suporte ao cultivo de pinhão-manso em larga escala e com alta produtividade de grãos em diferentes regiões do Brasil. Porém, é de conhecimento que, esta é uma planta perene e que investimentos constantes em pesquisa nos próximos anos serão importantes para que os avanços tenham continuidade.

Aproveitamento da torta de pinhão-manso

A torta é o produto resultante do tratamento dos grãos de pinhão-manso para a retirada do óleo. A composição da torta pode variar em função do modo de extração (prensa mecânica ou extração por solvente) e do tipo de grãos e teor de óleos nos grãos. Dependendo da eficiência do processo, cerca de 5 a 15% de óleo podem permanecer na torta, o que irá influenciar diretamente

na sua composição. De modo geral, cada tonelada de grãos de pinhão-manso esmagado, rende cerca de 650 a 700 kg de torta.

Estudos sobre a composição da torta de pinhão-manso demonstraram que o coproduto é rico em proteína, podendo chegar a 46%, dependendo do método de extração do óleo. Com alto valor proteico, a torta de pinhão-manso apresenta potencial para uso na nutrição animal. No entanto, até o momento, este uso está impossibilitado devido à presença de fatores tóxicos (GONÇALVES et al., 2009; DURÃES et al., 2011).

A curcina presente nos grãos de pinhão-manso já foi considerada como a molécula responsável pela toxidez do pinhão-manso. É uma proteína capaz de inibir a síntese proteica *in vitro* de forma semelhante à ação da ricina da mamona sendo, porém, 1000 vezes menos tóxica. Isto se deve ao fato de que, diferente da ricina, a porção tóxica da curcina não está ligada a lectina por ligações de dissulfeto, que promovem a entrada na célula necessária ao início da atividade citotóxica (MENDONÇA et al., 2009; BHERING et al., 2011). Muitos trabalhos de pesquisa de 10 a 15 anos buscavam equivocadamente explicar a toxicidade e avaliar processos de destoxificação aferindo a quantidade presente de curcina de forma indireta, por meio de determinação da lectina (DERENZINI et al., 1976; AREGHEORE et al., 1998). Esta é uma das causas de insucesso, no passado, do uso de tortas destoxificadas para curcina em animais (MENDOÇA; LAVIOLA, 2009). Outros componentes considerados antinutricionais (não tóxicos) também estão presentes, como inibidores de tripsina e fitato, sendo que o último não causa problemas para a nutrição de ruminantes.

O principal componente tóxico nos grãos e conseqüentemente na torta de pinhão-manso é o éster do forbol (diterpeno) que, em contato, pode agir de duas formas: aguda (resposta inflamatória intensa) e crônica (indução na formação de tumores) (GOEL et al., 2007). Tamanha é a importância que, quando não presentes nos grãos, os

genótipos são classificados como não tóxicos ou atóxicos (CARELS, 2009; DEVAPPA et al., 2010b; MASTAN et al., 2012). Uma das dificuldades na destoxificação da torta se deve ao fato de que, por ser lipossolúvel, parte do éster de forbol é extraída juntamente com o óleo. Porém uma significativa parte ainda permanece na torta, devido ao processo de extração não retirar todo o óleo, como já mencionado acima. O óleo de pinhão-manso possui grande concentração desse composto e por isso deve ser manipulado com cuidado.

Existem na literatura muitos estudos buscando processos físico-químicos e biológicos para destoxificação da torta de pinhão-manso. Na maioria das vezes porém, eles não foram eficientes na extração total do éster de forbol ou o processo se torna caro a ponto de inviabilizar a destoxificação da torta (RAKSHIT et al., 2008; HARTEK et al., 2011; KUMAR et al., 2011; MAKKAR et al., 2011; SUNTORNSUK; SAETAE, 2011; WANG et al., 2011; XIAO et al., 2011; PRADHAN et al., 2012). Nesse sentido, paralelamente aos processos de destoxificação, torna-se importante trabalhar outros usos para torta de pinhão-manso, como por exemplo, retornar a torta para o plantio como fertilizante, trazendo economia na adubação química ou buscar outras estratégias, inclusive explorando a variabilidade genética da planta.

Implicações do uso da torta tóxica como fertilizante

O pinhão-manso, assim como outras espécies cultivadas, apresenta exigências nutricionais que devem ser supridas por meio da fertilização orgânica ou química. Por ser uma planta caducifólia, parte dos nutrientes contidos nas folhas retorna ao sistema solo-planta ao fim de cada estação de crescimento. Por outro lado, os nutrientes contidos nos frutos colhidos são exportados da área de cultivo e devem ser repostos anualmente pelas adubações. De acordo com Laviola e Dias (2008), para uma produção de 4.000 kg/ha de grãos são exportados da área de cultivo cerca de 145, 65 e 125 kg/ha de nitrogênio, fósforo e potássio (N, P₂O₅ e K₂O), respectivamente. Por estes valores, verifica-se a elevada quantidade de nutrientes extraída

do solo com a colheita dos frutos que, se não adequadamente repostas, pode levar ao empobrecimento do solo ao longo dos anos de cultivo. Somente a estimativa da extração de N pela colheita de frutos corresponde a 3,65 vezes a recomendação de N para a cultura da mamona, mandioca e girassol (RIBEIRO et al., 1999).

Na adubação e reposição dos nutrientes extraídos podem ser usados adubos químicos ou adubos orgânicos. De modo geral, os adubos químicos apresentam a vantagem de serem concentrados e de fácil aquisição, o que facilita a prática de colheita. Os adubos orgânicos embora sejam de baixa concentração apresentam a vantagem de contribuir, não somente com a química, mas também com a física do solo, melhorando a retenção de água, a estrutura e a porosidade do solo. No caso da torta de pinhão-manso, esta se apresenta com um excelente potencial de uso como adubo orgânico, com composição química superior ao esterco bovino e à torta de mamona (Tabela 2, Figura 2).

Tabela 2. Composição química da torta de pinhão-manso comparada ao esterco bovino e à torta de mamona

Adubos Orgânicos	N	P	K
	g kg ⁻¹		
Torta de pinhão-manso	34,5	7,65	17,68
Esterco bovino	22,5	3,59	6,26
Torta de Mamona	22,7	5,44	4,58

Adaptado de Silva et al. (2011).

Considerando a produção de 4.000 kg/ha de grãos e uma taxa de extração de óleo de 30%, para cada hectare plantado de pinhão-manso seria possível produzir cerca de 2.800 kg de torta. Caso toda a torta seja retornada como fertilizante, isto corresponderia à aplicação de 96,6, 21,42 e 49,5 de N, P₂O₅ e K₂O (Tabela 3).



Figura 2. Armazenamento da torta tóxica de pinhão-manso em sacos e ao ar livre para uso na forma de fertilizante orgânico.

Considerando o valor dos principais fertilizantes, a reposição da torta à área de plantio poderá levar a economia de R\$ 1.200 ha/ano em um plantio adulto produzindo 4.000 kg/ha de grãos, o que é um valor significativo, já que a comercialização dos grãos colhidos irá gerar uma receita entre R\$ 2.000,00 a 3.000,00 por ha. É claro que, tendo o processo viável de destoxificação e o comprador de óleo podendo comercializar a torta por preços mais altos, o produtor de grãos poderá receber preços mais altos pelos grãos. Por fim, complementado pela reposição da casca dos frutos, em locais próximos à usina o uso da torta de pinhão-manso poderá contrabalancear o custo da adubação e contribuir para melhoria das condições físicas e biológicas do solo.

Uma questão importante que se deve considerar é o impacto da aplicação da torta tóxica na microbiologia dos solos e qual o período para degradação dos ésteres de forbol. Devappa e colaboradores (2010a) verificaram que os componentes tóxicos presentes na torta de pinhão-manso são completamente degradados no solo entre 9 e 23 dias depois da aplicação dependendo da umidade e temperatura. Embora pelo trabalho citado se verifique que a degradação do éster do forbol no solo seja rápida é recomendado que áreas adubadas com a torta sejam acompanhadas por um período maior de tempo.

É de conhecimento que o valor da torta comercializada no mercado de rações é superior ao valor comercializado como adubação. Como não existe mercado de tortas de pinhão-manso tóxicas e destoxificadas, estimou-se o valor da torta para o mercado de rações considerando a quantidade de proteína fornecida e o preço de 1 kg da proteína de soja, estimando assim, um valor potencial de comercialização da torta de pinhão-manso para rações (Tabela 3).

Tabela 3. Fornecimento de nutrientes e preços potenciais de comercialização de uma tonelada de torta de pinhão-manso como fertilizante e fonte proteica na dieta de animais.

Torta	N	P ₂ O ₅	K ₂ O	PB	Valor Adubo orgânico	Valor nutrição animal
	kg*				R\$	
Torta de pinhão-manso	34,5	17,51	21,21	21,5	430,00**	550,00***

* Estimativa baseada em Silva et al. (2011)

** Preço estimado a partir dos custos dos fertilizantes no mercado local do Distrito Federal em 01/06/2012. Considerou-se o preço do kg de N do sulfato de amônio (R\$ 6,00), do kg de P₂O₅ do superfosfato simples (R\$ 5,80), do kg K₂O do cloreto de potássio (R\$ 3,50) e estimou-se o valor de R\$ 50,00 para quantidade de Ca, Mg, S e micronutrientes contidas na torta.

*** Preço estimado considerando a quantidade de proteína bruta (PB) fornecida pela torta de pinhão-manso multiplicado pelo valor de 1 kg do farelo de soja no mercado do Distrito Federal em consulta realizada em 01/06/2012.

Verifica-se que pela quantidade de proteína apresentada na torta de pinhão-manso considerando o valor da proteína da soja o preço de mercado de 1.000 kg da torta de pinhão-manso poderia ser de R\$ 550,00 reais, sendo R\$ 120,00 reais superior ao valor potencial da torta comercializada como fertilizante, o que é uma margem pequena (menos de 30%). Esses valores podem variar, tendo em vista que na literatura existem relatos de grande variação no teor de proteína bruta na torta de pinhão-manso. Considerando que se tem um custo no processo de destoxificação da torta de pinhão-manso, esta é uma questão que deve ser considerada no

momento de decidir usar o coproduto como fertilizante e fonte proteica. As pesquisas devem buscar não só um método eficiente de destoxificação da torta, mas sim um processo que seja eficiente, mas de baixo custo. Caso contrário, o uso do coproduto como fertilizante passará a ser a alternativa mais interessante.

Melhoramento genético visando o desenvolvimento de cultivares não tóxicas de alto rendimento

Na agricultura moderna torna-se importante não só o desenvolvimento de cultivares que apresentem alto rendimento para o produto fim, mas também que possuam outras características que melhorem a adaptação a diferentes regiões, valorizem o produto fim e/ou agreguem valor à cadeia produtiva. No caso do pinhão-manso o cenário não é diferente. Embora os esforços de melhoramento da cultura sejam recentes, vem se buscando aumentar a produção de grãos e, ao mesmo tempo, introduzir outras características de interesse, a exemplo da resistência a doenças (Antracnose e Oídio) e ausência de toxidez (ésteres do forbol) nos grãos (LAVIOLA et al., 2011). Nesse contexto, cabe destacar que o desenvolvimento de cultivares comerciais atóxicas, ou mesmo apresentando baixa toxidez, pode contribuir para agregar valor à cadeia produtiva da espécie, uma vez que a torta poderá ser usada como fonte direta de proteína em rações de ruminantes e monogástricos, com maior valor agregado.

Os métodos de destoxificação desenvolvidos até o momento apresentam eficiências limitadas ou alto custo ou dificuldades de escalonamento, (GONÇALVES et al., 2009; MENDONÇA; LAVIOLA, 2009; DURÃES et al., 2011; SAETAE; SUNTORNUSUK, 2011; XIAO et al., 2011; AKINLEYE et al., 2012), o que dificulta a aplicação dos mesmos em larga escala. Diante disto, o melhoramento genético é a estratégia de menor custo e segura para a produção de torta de pinhão-manso livre de ésteres de forbol, com alta qualidade e que possa ser usada na suplementação proteica de animais. Para tanto são necessários alguns passos: (i)

identificação de genótipos atóxicos, (ii) determinação da herança da característica (a fim de subsidiar a definição das estratégias de melhoramento), (iii) geração de progênes superiores provenientes do cruzamento entre genótipos superiores tóxicos e atóxicos e (iv) seleção e clonagem de genótipos não tóxicos superiores.

Identificação de genótipos não tóxicos

Genótipos atóxicos ou com baixos teores de ésteres de forbol já foram identificados em diferentes países (DURÃES et al., 2011). O centro de origem dos genótipos atóxicos parece ser o México, em que se observa ampla diversidade genética (OVANDO-MEDINA et al., 2011; PECINA-QUINTERO et al., 2011). Em um estudo da caracterização de áreas agroclimáticas de ocorrência de pinhão-manso no México foi verificado que as variedades não tóxicas ocorrem em uma região específica do país, diferentemente dos genótipos tóxicos (NUNEZ-COLIN; GOYTIA-JIMENEZ, 2009) cuja dispersão é maior. No México, as sementes de genótipos atóxicos presentes nas regiões de Totonacapan em Puebla e Veracruz são usadas tradicionalmente pelas comunidades locais, inclusive na alimentação humana.

A existência de variabilidade genética para ausência de toxidez abre caminho para o melhoramento por técnicas convencionais com a exploração da característica em programas de melhoramento genético. No Brasil, genótipos atóxicos foram identificados no banco de germoplasma de pinhão-manso da Embrapa, que apresenta atualmente mais de 200 procedências de pinhão-manso de diferentes regiões do Brasil (LAVIOLA et al., 2011). Em um estudo de diversidade genética com 192 acessos do banco de germoplasma usando marcadores moleculares, verificou-se que 4 acessos atóxicos são os mais divergentes em relação aos demais acessos do banco de germoplasma, o que suporta a hipótese de que os genótipos atóxicos são originados de introduções mais recentes (ROSADO et al., 2010).

A Tabela 4 apresenta os teores de ésteres de forbol de 11 acessos do banco de germoplasma, incluindo os acessos atóxicos. Além

da concentração de éster de forbol, os acessos atóxicos também apresentam características morfológicas diferentes dos acessos tóxicos, como formato do limbo foliar e dos frutos (Figura 3), o que os diferencia dos demais materiais genéticos. Porém, apesar dessas características serem de fácil reconhecimento e atualmente sejam marcadores morfológicos para os genótipos atóxicos, espera-se que com os cruzamentos as características morfológicas passem a não ser mais associadas à toxidez.

Tabela 4. Análise preliminar de 11 acessos de pinhão-manso quanto a concentração de éster de forbol nos grãos.

Nº do Acesso	Éster de Forbol (mg/g)
CNP AE-1001	3,09
CNP AE-1002	ND
CNP AE-1003	4,01
CNP AE-1004	3,69
CNP AE-1005	3,53
CNP AE-1006	ND
CNP AE-1007	5,41
CNP AE-1008	ND
CNP AE-1009	3,18
CNP AE-1010	ND
CNP AE-1011	4,21



Figura 3. Descritores morfológicos dos acessos atóxicos: formato foliar e dos frutos.

Nas avaliações agronômicas do banco de germoplasma tem-se verificado que os acessos atóxicos apresentam menor vigor que os genótipos tóxicos (Figura 4), sendo também susceptíveis a doenças que não são observadas em genótipos tóxicos (LAVIOLA et al., 2011). A produção de grãos dos genótipos atóxicos também é inferior à da maior parte dos genótipos atóxicos. Na tabela 5 observa-se que a produção de grãos dos genótipos atóxicos é inferior à média do banco de germoplasma aos 42 meses de idade. O menor vigor, a suscetibilidade a doenças e a menor produção indicam que os genótipos atóxicos não devem ser usados diretamente para plantio comercial sem antes passar por ciclos de melhoramento visando contornar os problemas relatados.



Figura 4. Vigor vegetativo de genótipos atóxicos (à esquerda) comparado a genótipos tóxicos (à direita) no banco de germoplasma aos 42 meses.

Tabela 5. Produção de grãos (g/planta) de acessos tóxicos e atóxicos do banco de germoplasma aos 42 meses.

10 melhores genótipos	Média geral (200 acessos)	Genótipo atóxico 01	Genótipo atóxico 02	Genótipo atóxico 03
2039	869	730	242	497

Estratégias de melhoramento visando ausência de toxidez

Ao se estabelecer as estratégias de melhoramento genético de pinhão-manso para ausência de toxidez nos grãos, é fundamental o conhecimento das bases da herança dos ésteres de forbol, ou seja, como a ausência de ésteres de forbol é repassada de uma geração para outra. Dados atuais indicam que a toxidez, em termos de concentração de ésteres de forbol parece ser expressa qualitativamente, i.e. ou os genótipos são tóxicos ou apresentam concentrações não detectáveis de ésteres de forbol nos grãos. Desse modo especula-se que o caráter possa ser regulado por um ou poucos genes. Este cenário, em termos de melhoramento genético, é obviamente interessante, pois indica que a transferência do caráter de interesse (ausência de toxidez) de genótipos pouco produtivos para genótipos altamente produtivos pode ser efetuada com maior facilidade.

Sujatha e colaboradores (2005), no entanto, sugeriram que o caráter pode ter herança maternal, i.e. o fenótipo da progênie é sempre herdado da mãe. Esse modo de herança ainda precisa ser comprovado, mas possíveis explicações são (i) a ocorrência de apoximia (reprodução ocorre sem que haja fertilização), (ii) a existência de genes supressos nos genomas plastídicos (cloroplasto e/ou mitocôndria) cujo produto inibe a via de biossíntese dos ésteres de forbol e (iii) que genes plastídicos estejam envolvidos na referida via de biossíntese e que uma mutação tenha ocorrido neste(s) gene(s). A fim de corroborar essa hipótese (herança materna), cruzamentos recíprocos envolvendo genótipos tóxicos e não tóxicos do banco ativo de germoplasma da Embrapa foram realizados e avaliados.

Os resultados deste trabalho, demonstram que a concentração de ésteres de forbol em cruzamentos que tiveram o genótipo atóxico como genitor masculino (1,95 mg/g) quase não difere da concentração de ésteres de forbol em cruzamentos que tiveram o genótipo não tóxico como genitor feminino (2,05 mg/g) (Figura 5). Desse modo, parece ser improvável que a característica apresente

herança materna. A fim de se elucidar o modo de herança, novos cruzamentos entre genótipos atóxicos e genótipos tóxicos foram realizados em esquema dialélico que permite a avaliação de todas as combinações e dos recíprocos. Além disso, retrocruzamentos dos F1s gerados entre as combinações de genitores masculinos e femininos podem ser usados para se confirmar a herança.

A expectativa é que o caráter tenha controle genético simples, como por exemplo, recessividade de um gene. Essa hipótese fundamenta-se no fato de que genótipos naturalmente não tóxicos ocorrem em apenas uma região mexicana. Tal fato indica que, provavelmente, tenha ocorrido mutação pontual ou poucas mutações em genes envolvidos na rota biossintética dos ésteres de forbol. No entanto, ainda não se pode descartar a possibilidade da herança ocorrer por meio de outros mecanismos a exemplo da oligogenia e poligenia.

Uma vez identificado o modelo de herança, podem ser definidas as estratégias de melhoramento que busquem simultaneamente a

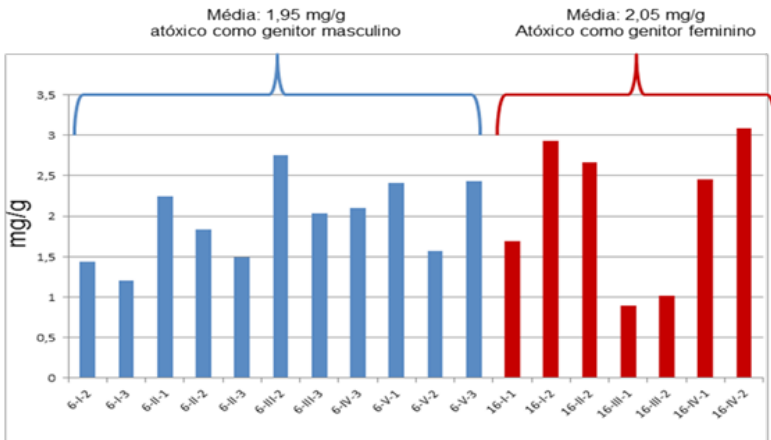


Figura 5. Concentração de ésteres de forbol nos grãos em cruzamentos recíprocos (F1s) de genótipos tóxicos e atóxicos.

obtenção de genótipos superiores em termos de produção de grãos/ óleo e não toxidez. A título de exemplo, na Figura 6 verifica-se um possível plano de cruzamento considerando um modelo de herança simples, onde a ausência de toxidez seja devida a alelos recessivos. O esquema proposto além de buscar a recuperação do caráter ausência de toxidez, visa também nas primeiras gerações à recuperação de 2/3 dos alelos favoráveis dos genótipos tóxicos, a capitalização da heterose entre genótipos tóxicos x atóxicos e também entre genótipos tóxicos. Com a fixação do caráter ausência de toxidez na população sintética, a partir da segunda geração, pode-se seguir o esquema de seleção recorrente intrapopulacional, com foco apenas no aumento de produtividade de grãos e/ou óleo (Figura 6).

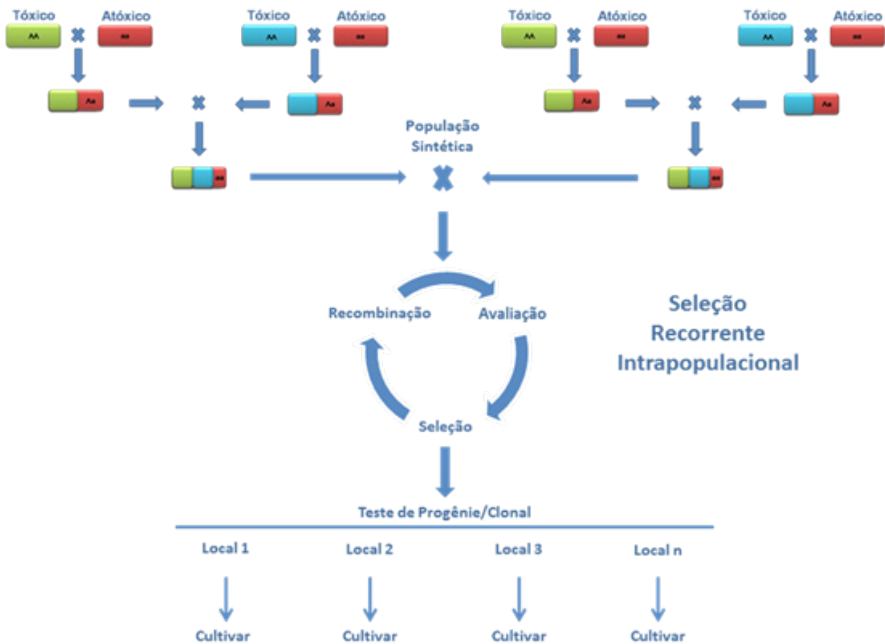


Figura 6. Estratégia de melhoramento genético para ausência de toxidez (herança simples e recessiva) baseada em seleção recorrente intrapopulacional.

Estratégias de melhoramento genômico aplicadas ao desenvolvimento de genótipos superiores atóxicos

Além dos métodos tradicionais de melhoramento anteriormente descritos, o melhoramento de pinhão-manso visando à ausência de toxidez nos grãos pode se beneficiar da aplicação de estratégias baseadas em ferramentas genômicas, p.ex. o uso de marcadores moleculares em esquemas de seleção assistida por marcadores (SAM) (GRATTAPAGLIA; KIRST, 2008) e seleção genômica (GRATTAPAGLIA; RESENDE, 2011). Tendo em vista que baterias robustas de marcadores estão em desenvolvimento para pinhão-manso (SILVA-JUNIOR et al., 2011), poder-se-ia fazer uso das populações de melhoramento para mapear QTLs para toxidez e eventualmente se desenvolver kits diagnósticos que servirão para triagem rápida de genótipos não tóxicos em qualquer grupo/conjunto de plantas. Nesse caso, as progênies devem ser grandes (i.e. > 200 indivíduos cada) e genotipadas com os marcadores em desenvolvimento e fenotipadas para ausência de toxidez. O desenvolvimento de marcadores em forte desequilíbrio de ligação com os QTLs responsáveis pela determinação da toxidez seria extremamente útil para novos ciclos de seleção e outros programas de melhoramento genético da espécie.

Embora essa estratégia tenha o potencial de trazer maior dinamismo ao programa de melhoramento de pinhão-manso, há de se considerar que as plantas não tóxicas superiores deverão ser inter cruzadas entre si para gerar uma população sintética que servirá como base (Figura 6). Dado o notório baixo vigor de plantas não tóxicas, uma etapa inicial de seleção deverá ser realizada nas progênies resultantes. Para que essa seleção seja realizada, as plantas devem ser avaliadas quando adultas e por, no mínimo, três anos consecutivos (LAVIOLA et al., 2012).

Após a recombinação dos genótipos não tóxicos superiores, a seleção em população sintética deverá seguir essas mesmas etapas, ou seja, somente após 6-8 anos plantas superiores poderão ser selecionadas e clonadas para posterior avaliação em testes clonais (que também deve ser avaliado por um período de 6-8 anos). A fim

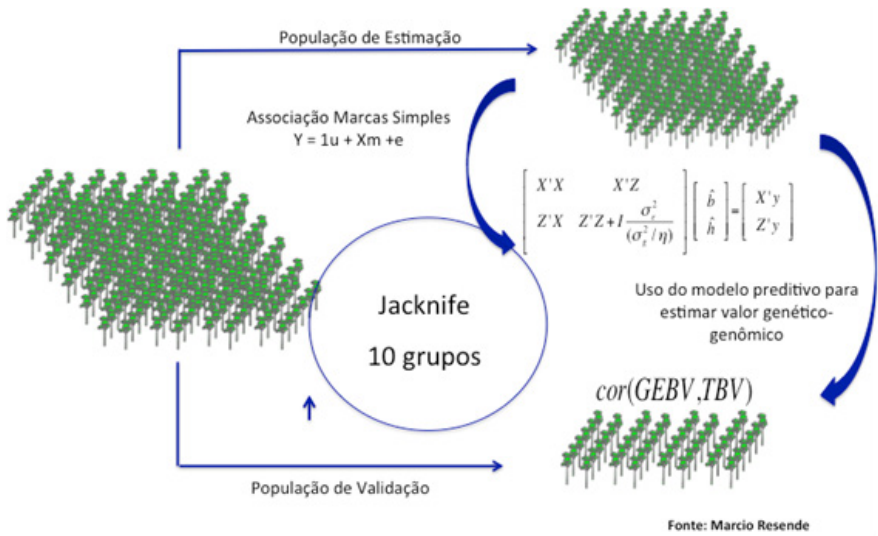


Figura 7. Esquema proposto para estimativa e validação de modelos preditivos de seleção genômica. As populações de estimação e validação, seriam compostas por uma amostra representativa da população sob melhoramento de tamanho efetivo entre (N_e) 20-60. Essas populações devem ser selecionadas quando do inter cruzamento entre genótipos tóxicos e não tóxicos. Essas populações devem ser genotipadas com marcadores moleculares em densidade condizente com o nível de desequilíbrio de ligação da população além de fenotipadas para todas as características de interesse (inclusive ausência de toxidez) para que modelos preditivos do valor genético-genômico dos indivíduos sejam elaborados e validados.

de encurtar os ciclos de melhoramento e de seleção/liberação de clones superiores, algumas estratégias podem ser adotadas, por exemplo, o uso de seleção genômica (Figura 7). Essa metodologia permite que genótipos superiores sejam selecionados em fase ultra-precoce, eliminando assim a necessidade de se avaliar os testes de progênies por 6-8 anos. De posse dos modelos preditivos acurados e validados, a seleção dos melhores genótipos não tóxicos (que serão inter cruzados para formar a população sintética) poderá ser feita com base nos dados genômicos com plantas em fase de mudas. Isso implica em encurtar sensivelmente o ciclo de melhoramento, pois a seleção pode ser realizada em fase precoce. Nos ciclos

seguintes, baseados na população sintética, os modelos de seleção genômica devem permanecer acurados, uma vez que esta população descende daquela em que os modelos foram estimados/validados.

Conclusões e perspectivas

O pinhão-manso é uma oleaginosa que apresenta potencial para produção de biocombustíveis, porém ainda está em fase de domesticação. Dentre os desafios para viabilizar o cultivo comercial o pinhão-manso está o aproveitamento econômico da torta, já que permite agregar valor à cadeia de produção e equacionar custos.

O uso da torta tóxica como fertilizante deve ser considerado como a primeira opção de aproveitamento econômico. A torta de pinhão-manso é rica em nutrientes minerais, sendo considerado um excelente adubo orgânico que pode ser usado na adubação do pinhão-manso e de outras culturas adjacentes às áreas de produção.

O melhoramento genético é a estratégia de menor custo e mais segura para a produção de torta de pinhão-manso livre de ésteres de forbol, com alta qualidade e que possa ser usada na suplementação proteica de monogástricos de ruminantes. Porém, essa não deve ser a única estratégia a ser buscada no momento, tendo em vista que os acessos atóxicos apresentam baixo vigor, o que irá demandar tempo para seleção de materiais genéticos de alta produtividade e livre de ésteres de forbol nos grãos.

Referências

- AKINLEYE, A. O.; KUMAR, V.; MAKKAR, H. P. S.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; BECKER, K. *Jatropha platyphylla* kernel meal as feed ingredient for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.): growth, nutrient utilization and blood parameters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Malden, v. 96, n. 1, p. 119-129, 2012.
- AREGHEORE, E. M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Assessment of lectin activity in a toxic and a non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and haemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, W Sussex, v. 77, n. 3, p. 349-352, 1998.
- BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Effects of phorbol esters in carp (*Cyprinus carpio* L). **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 40, n. 2, p. 82-86, 1998.
- BHERING, L. L.; CRUZ, C. D.; LAVIOLA, B. G. Biometria aplicada ao melhoramento de espécies alternativas para produção de biodiesel. In: CARDOS, D. L.; LUZ, L. N.; PEREIRA, T. N. S. (Ed.). **Estratégias de melhoramento de plantas**. Campos dos Goytacazes: Arka, 2011. v. 1, p. 134.
- CARELS, N. *Jatropha curcas*: a review. **Advances in Botanical Research**, London: Academic Press, 2009. v. 50, p. 39-86.
- CONAB. **Monitoramento das iniciativas com pinhão manso no Brasil**. Brasília, DF: Câmara setorial de oleaginosas e Biodiesel, 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_setoriais/Oleaginosas_e_biodiesel/11RO/App_CONAB.pdf>. Acesso em: 31/05/2012.
- DE BARROS, C. R. M.; FERREIRA, L. M. M.; NUNES, F. M.; BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A.; GUEDES, C. V.; CONE, J. W.; MARQUES, G. S. M.; RODRIGUES, M. A. M. The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 11, n. 1, p. 107-110, 2011.
- DERENZINI, M.; BONETTI, E.; MARINOZZI, V.; STIRPE, F. Toxic effects of ricin - studies on pathogenesis of liver-lesions. **Virchows Archiv B-Cell Pathology Including Molecular Pathology**, New York, v. 20, n. 1, p. 15-28, 1976.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Biodegradation of *Jatropha curcas* phorbol esters in soil. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 90, n. 12, p. 2090-2097, 2010a.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Jatropha Toxicity: a Review. **Journal of Toxicology and Environmental Health-Part B-Critical Reviews**, Washington, DC, v. 13, n. 6, p. 476-507, 2010b.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Jatropha diterpenes: a review. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Stuttgart, v. 88, n. 3, p. 301-322, 2011.

DHYANI, S. K.; KUMAR, R. V.; AHLAWAT, S. P. *Jatropha curcas*: a potential biodiesel crop and its current R&D status. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 81, n. 4, p. 295-308, 2011.

DIAS, L. A. dos S.; LEME, L. P.; LAVIOLA, B. G.; PALLINI, A.; PEREIRA, O. L.; DIAS, D. C. F. S.; CARVALHO, M.; MANFIO, C. E.; SANTOS, A. S. dos; SOUSA, L. C. A. de; OLIVEIRA, T. S. de; PRETTI, L. A. **Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) para produção de óleo combustível**. Viçosa, MG: L. A. S. Dias, 2007. 40 p.

DRUMOND, M. A.; SANTOS, C. A. F.; DE OLIVEIRA, V. R.; MARTINS, J. C.; DOS ANJOS, J. B.; EVANGELISTA, M. R. V. Agronomic performance of different genotypes of physic nut in the semi-arid zone of Pernambuco state. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 1, p. 44-47, 2010.

DURAES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, Sunnyvale, v. 6, n. 43, 2011.

FREITAS, R. G.; MISSIO, R. F.; MATOS, F. S.; RESENDE, M. D. V.; DIAS, L. A. S. Genetic evaluation of *Jatropha curcas*: an important oilseed for biodiesel production. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 1490-1498, 2011.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: Structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, Philadelphia, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

GONCALVES, S. B.; MENDONCA, S.; LAVIOLA, B. G. **Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no pinhão-manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 5 p. il. (Embrapa Agroenergia. Circular técnica, 001)

GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. **New Phytologist**, Malden, v. 179, n. 4, p. 911-929, 2008.

GRATTAPAGLIA, D.; RESENDE, M. D. V. Genomic selection in forest tree breeding. **Tree Genetics and Genomes**, Heidelberg, v. 7, n. 2, p. 241-255, 2011.

HARTER, T.; BUHRKE, F.; KUMAR, V.; FOCKEN, U.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Substitution of fish meal by *Jatropha curcas* kernel meal: Effects on growth performance and body composition of white leg shrimp (*Litopenaeus vannamei*). **Aquaculture Nutrition**, Malden, v. 17, n. 5, p. 542-548, 2011.

JOSHI, C.; MATHUR, P.; KHARE, S. K. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 102, n. 7, p. 4815-4819, 2011.

KING, A. J.; HE, W.; CUEVAS, J. A.; FREUDENBERGER, M.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I. A. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 10, p. 2897-2905, 2009.

KUMAR, V.; AKINLEYE, A. O.; MAKKAR, H. P. S.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; BECKER, K. Growth performance and metabolic efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed on a diet containing *Jatropha platyphylla* kernel meal as a protein source. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Malden, v. 96, n. 1, p. 37-46, 2012.

KUMAR, V.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Detoxified *Jatropha curcas* kernel meal as a dietary protein source: growth performance, nutrient utilization and digestive enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, Hoboken, v. 17, n. 3, p. 313-326, 2011.

LAVIOLA, B. G. Pesquisa, desenvolvimento e inovação em pinhão-manso para produção de biodiesel. Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.cbppm.com.br/pt/congresso-palestras>>. Acesso em: 31/05/2012.

LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Matérias-primas oleaginosas para biorrefinarias. In: VAZ JUNIOR, S. (Ed.). **Biorrefinarias: cenários e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. p. 29-43.

LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A.; GURGEL, F. de L.; ROSADO, T. B.; ROCHA, R. B.; ALBRECHT, J. C. Estimates of genetic parameters for physic nut traits based in the germplasm two years evaluation. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 3, p. 429-435, 2012.

LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; MENDONÇA, S.; ROSADO, T. B.; ALBRECHT, J. C. Morpho-agronomic characterization of the germplasm bank of *Jatropha* young stage. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 27, n. 3, p. 371-379, 2011.

LAVIOLA, B. G.; DIAS, L. A. D. Nutrient concentration in *Jatropha curcas* L. leaves and fruits and estimated extraction at harvest. **Revista Brasileira de Ciencia do Solo**, Viçosa, MG, v. 32, n. 5, p. 1969-1975, 2008.

LAVIOLA, B. G.; ROSADO, T. B.; BHERING, L. L.; KOBAYASHI, A. K.; RESENDE, M. D. V. Genetic parameters and variability in physic nut accessions during early developmental stages. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, DF, v. 45, n. 10, p. 1117-1123, 2010.

MAKKAR, H.; MAES, J.; DE GREYT, W.; BECKER, K. Removal and degradation of phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. **Journal of the American Oil Chemists Society**, New York, v. 86, n. 2, p. 173-181, 2009.

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**, Oxon, v. 62, n. 2, p. 207-215, 1998.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; KUMAR, V.; BECKER, K. Detoxified *Jatropha curcas* kernel meal as a dietary protein source: growth performance, nutrient utilization and digestive enzymes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings. **Aquaculture Nutrition**, Hoboken, v. 17, n. 3, p. 313-326, 2011.

MASTAN, S. G.; SUDHEER, P. D. V. N.; RAHMAN, H.; REDDY, M. P.; CHIKARA, J. Development of SCAR marker specific to non-toxic *Jatropha curcas* L. and designing a novel multiplexing PCR along with nrDNA ITS primers to circumvent the false negative detection. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 50, n. 1, p. 57-61, 2012.

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

MENDONCA, S.; SALDIVA, P. H.; CRUZ, R. J.; AREAS, J. A. G. Amaranth protein presents cholesterol-lowering effect. **Food Chemistry**, Oxon, v. 116, n. 3, p. 738-742, 2009.

NUNEZ-COLIN, C. A.; GOYTIA-JIMENEZ, M. A. Distribution and agroclimatic characterization of potential cultivation regions of physic nut in Mexico. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 9, p. 1078-1085, 2009.

OSKOEIAN, E.; ABDULLAH, N.; SAAD, W. Z.; OMAR, A. R.; BIN PUTEH, M.; HO, Y. W. Anti-Nutritional metabolites and effect of treated *Jatropha curcas* kernel meal on rumen fermentation *in vitro*. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, Faisalabad, v. 10, n. 2, p. 214-220, 2011.

OVANDO-MEDINA, I.; ESPINOSA-GARCIA, F.; NUNEZ-FARFAN, J.; SALVADOR-FIGUEROA, M. Genetic variation in mexican *Jatropha curcas* L. estimated with seed oil fatty acids. **Journal of Oleo Science**, Tokyo, v. 60, n. 6, p. 301-311, 2011.

PECINA-QUINTERO, V.; ANAYA-LOPEZ, J. L.; COLMENERO, A. Z.; GARCIA, N. M.; COLIN, C. A. N.; BONILLA, J. L. S.; AGUILAR-RANGEL, M. R.; LANGARICA, H. R. G.; BUSTAMANTE, D. J. M. Molecular characterisation of *Jatropha curcas* L. genetic resources from Chiapas, Mexico through AFLP markers. **Biomass & Bioenergy**, Oxford, v. 35, n. 5, p. 1897-1905, 2011.

PRADHAN, S.; NAIK, S. N.; KHAN, M. A. I.; SAHOO, P. K. Experimental assessment of toxic phytochemicals in *Jatropha curcas*: oil, cake, bio-diesel and glycerol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Hoboken, v. 92, n. 3, p. 511-519, 2012.

RAKSHIT, K. D.; DARUKESHWARA, J.; RAJ, K. R.; NARASIMHAMURTHY, K.; SAIBABA, P.; BHAGYA, S. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 3621-3625, 2008.

RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**. Viçosa, MG: SBCS, 1999.

ROCHA, R. B.; RAMALHO, A. R.; TEIXEIRA, A. L.; LAVIOLA, B. G.; DA SILVA, F. C. G.; MILITAO, J. S. L. T. Selection efficiency for increasing physic nut oil content. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 47, n. 1, p. 44-50, 2012.

ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; FARIA, D. A.; PAPPAS, M. R.; BHERING, L. L.; QUIRINO, B.; GRATTAPAGLIA, D. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, Madison, v. 50, n. 6, p. 2372-2382, 2010.

RUG, M.; RUPPEL, A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. **Tropical Medicine & International Health**, v. 5, n. 6, p. 423-430, 2000.

SAETAE, D.; KLEEKAYAI, T.; JAYASENA, V.; SUNTORNSUK, W. Functional properties of protein isolate obtained from physic nut (*Jatropha curcas* L.) seed cake. **Food Science and Biotechnology**, New York, v. 20, n. 1, p. 29-37, 2011.

SAETAE, D.; SUNTORNSUK, W. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 1, p. 66-77, 2011.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SILVA-JUNIOR, O. B.; ROSADO, T. B.; LAVIOLA, B. G.; PAPPAS, M. R.; PAPPAS, G. J.; GRATTAPAGLIA, D. Genome-wide SNP discovery from a pooled sample of accessions of the biofuel plant *Jatropha curcas* based on whole-transcriptome Illumina resequencing. **BMC Proceedings**, London, v. 5, suppl. 7, p. P57, 2011.

SILVA, S. D. A. **Desempenho agrônômico de genótipos promissores de pinhão-manso**. Pelotas 2012.

SILVA, T. O.; PRIMO, C. C.; MENEZES, R. S. C.; SILVA, J. O. Crescimento inicial e absorção de nutrientes por mudas de pinhão-manso submetidas à adubação orgânica em solos distintos. **Scientia Plena**, Aracajú, v. 7, n. 8, p. 83-101, 2011.

SUJATHA, M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Shoot bud proliferation from axillary nodes and leaf sections of non-toxic *Jatropha curcas* L. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 47, n. 1, p. 83-90, 2005.

SUNTORNUSUK, W.; SAETAE, D. Toxic compound, anti-nutritional factors and functional properties of protein isolated from detoxified *Jatropha curcas* seed cake. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 12, n. 1, p. 66-77, 2011.

WANG, H. F.; CHEN, Y.; ZHAO, Y. N.; LIU, H. Y.; LIU, J. X.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Effects of replacing soybean meal by detoxified *Jatropha curcas* kernel meal in the diet of growing pigs on their growth, serum biochemical parameters and visceral organs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 170, n. 1-2, p. 141-146, 2011.

XIAO, J. H.; ZHANG, H.; NIU, L.; WANG, X. G.; LU, X. Evaluation of detoxification methods on toxic and antinutritional composition and nutritional quality of proteins in *Jatropha curcas* meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 59, n. 8, p. 4040-4044, 2011.

A torta da mamona e suas aplicações na agricultura

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Samara de Sousa

Maria Regina de Macêdo Beltrão

João Luís da Silva Filho

Introdução

A moderna agricultura, empresarial ou familiar, tem uma grande dependência de insumos, em especial fertilizantes, sejam eles químicos ou orgânicos. No Brasil, a agricultura familiar (definida na Lei nº 11.322, de 24 de julho de 2006) envolve mais de quatro milhões de estabelecimentos, onde mais da metade estão na região Nordeste do Brasil (SOUSA, 2006) e uma boa parte no Bioma Caatinga.

Esse bioma já está com a maior parte dos solos degradados e erodidos, mesmo considerando as limitações hídricas e climáticas que caracterizam a região semiárida do Brasil: irregularidade da estação chuvosa e elevada demanda evaporativa do ar, que é bem superior à precipitação pluvial. Balieiro (2008) alerta para a necessidade de conservação permanente do solo, visando a protegê-lo da erosão.

Uma das formas de se atenuar o processo de degradação e preservar a capacidade produtiva dos solos do Semiárido, em geral rasos, é o uso de fertilizantes orgânicos, tais como esterco de curral bem

curtido e tortas (resíduos da extração de óleos vegetais), a exemplo da mamona (*Ricinus communis* L.). Conforme salienta Beltrão (2003), a torta de mamona (principal coproduto da cadeia da mamona) é excelente tanto para a nutrição da planta quanto para a física do solo.

Com a oficialização do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel no Brasil e a disponibilidade de estudos de zoneamento agrícola para a ricinocultura, abre-se a possibilidade do uso de torta de mamona como elemento potencial para a recuperação dos solos dessa região. De acordo com Beltrão e Melo (2002), poderiam ser cultivados cerca de 4,5 milhões de hectares por ano com mamona no Nordeste, para a produção de 4,4 bilhões de litros de biodiesel e aproximadamente 3,0 milhões de toneladas de torta, que poderiam beneficiar 1,5 milhão de hectares (média de 2,0 toneladas/ha), como fertilizante.

Embora na torta “in natura” estejam presentes proteínas e alcaloides tóxicos ou alergênicos, depois de eliminada a toxidez ela pode ser usada em substituição à do algodão e da soja, em especial em bovinos, podendo ser usada também para pintos com até 12 dias de idade e no limite de 15% da ração (NAUFEL et al., 1962; LOUREIRO, 1962). Ressalte-se que, para uso como fertilizante, a torta de mamona não precisa ser destoxificada.

Nesta publicação são abordados aspectos sobre o uso da torta de mamona como fertilizante orgânico e alimento (em especial para ruminantes).

Considerações gerais sobre a planta e a torta de mamona

A mamoneira (*Ricinus communis* L.) é uma espécie da família Euforbiaceae, de origem tropical, tolerante à seca e heliófila (MOSHKIN, 1986), apresentando metabolismo fotossintético C3, embora tenha a capacidade de abrir os estômatos durante a noite e assim ser beneficiada pelo orvalho. Essa última característica ratifica a importância da altitude em regiões tropicais, como é o caso do Semiárido brasileiro. Apresenta, ainda, fotoperiodismo de dias longos, apesar de estar bem adaptada às condições de clima e solo do nosso País, em especial na região Nordeste (SHARKEY et al., 2007; BARBOUR; BUCKLEY, 2007; BELTRÃO, 2008; BELTRÃO et al., 2011), O cultivo da mamoneira está difundido em praticamente todo o território brasileiro, já tendo ocupado posição de destaque no agronegócio brasileiro. Com exceção de Sergipe e Maranhão, todos os estados do Nordeste têm tradição na exploração dessa cultura, sendo a Bahia o maior produtor, seguida pelo Ceará (ALVES et al., 2004). A industrialização da semente de mamona fornece dois produtos principais: o óleo bruto, impróprio para consumo humano, e a torta. O teor de óleo nas sementes varia de 35% e 55%, o de proteína bruta em torno de 18%, e o de fibras em torno de 12,5% (HEMERLY, 1981), variando com a cultivar e ambiente de cultivo (FREIRE, 2001).

O diferencial da cultura da mamoneira está na versátil aplicabilidade do óleo presente nas sementes, composto por 90% de ácido ricinoleico. Esse ácido graxo tem uma estrutura química singular na natureza, apresentando um grupo hidroxila no carbono 12 e ligação dupla, conferindo-lhe solubilidade em álcool (WEISS, 1983; MOSHKIN, 1986). O grupo hidroxila confere estabilidade ao óleo de mamona, que mantém sua viscosidade em condições de amplitude térmica, ao contrário dos outros óleos vegetais que perdem a viscosidade em altas temperaturas e se solidificam em baixas temperaturas (SAVY FILHO et al., 1999).

Entre as aplicações do ácido ricinoleico destacam-se: lubrificante de turbinas, fabricação de tecidos, adesivos, cosméticos, fios, tubos plásticos, tintas automotivas e de impressoras, além de ser também um componente usado nas telecomunicações e na biomedicina (SILVA, 1996).

A torta é um produto residual da extração de óleo, obtendo-se 1,2 tonelada de torta para cada tonelada de óleo extraída (AZEVEDO et al., 1997). Depois de destoxificada, pode ser usada com fonte de alimento proteico para animais monogástricos e poligástricos; servir de fonte de aminoácidos para os mais variados fins nutricionais (MIRANDA et al., 1957; PERRONE et al., 1966; BOSE; WANDERLEY, 1988).

Como fertilizante, é um dos melhores, pois tem elevado conteúdo de nitrogênio, fósforo, cálcio e fibras quando comparada a outros adubos orgânicos, conforme pode ser observado na Tabela 1 (BAYMA, 1933) e Tabela 2 (ASSIS et al., 1962).

A adição de torta de mamona ao solo, além de ajudar a suprir as necessidades nutricionais das plantas, promove melhoria geral na parte física do solo. Graças à riqueza em fibra (Tabela 2), ao ser processado por bactérias aeróbicas, como *Cytophaga* e *Sporocytophaga*, há produção da cola bacteriana, elemento fundamental para a formação dos grumos e a consequente estabilidade dos agregados nos solos tropicais.

Outro uso da torta sem ser destoxificada é para o controle de nematoides em diversas culturas. Akhtar e Mohmool (1966) testaram diversos produtos no controle de nematoides, sendo um deles a torta de mamona colocada 15 dias antes do plantio na quantidade de 2.700 kg/ha. Verificaram que a torta de mamona, além de fertilizar o solo, auxilia no controle de diversas espécies de nematoides causadores de distúrbios nas raízes de diversas espécies, promovendo

o aumento do *Meloidogyne aquaticus*, que é predador de várias espécies de nematoides causadores de doenças nas plantas.

Tabela 1. Composição de alguns adubos vegetais, em kg/tonelada.

Fonte	Nitrogênio (N)	Fósforo (P)	Potássio (K)	Cálcio (Ca)
Torta de mamona	37,70	16,20	11,20	64,10
Esterco bovino	3,40	1,30	3,50	8,20
Esterco misto	5,00	2,60	0,53	8,13
Torta de algodão	31,30	12,70	11,70	55,70

Fonte: Bayma (1933).

Tabela 2. Composição centesimal de algumas tortas.

	Algodão	Amendoim	Mamona
Umidade	10,46	10,35	7,48
Proteína	37,91	50,87	41,50
Gordura	1,44	1,39	2,62
Fibra	16,60	9,36	32,84
Mat. Mineral	9,82	5,19	7,65
Ext. não nitrogenado	23,77	22,84	7,91

Fonte: Assis et al. (1962).

Composição molecular da torta de mamona

Aminoácidos

De acordo com Beltrão (2003), a torta é rica em proteínas (41,51%), fibras (32,8%), materiais minerais (7,7%) e gorduras (2,6%). A proteína da torta é composta pelo seguinte perfil de aminoácidos:

arginina (11,0%), cistina (3,5 %), fenilalanina (4,2%), histidina (11,0%), isoleucina (5,3%), leucina (7,2%), lisina (3,1%), metionina (1,5%), tirosina (1,0%), treonina (3,6%), triptofano (0,6%) e valina (6,6%). Já Evangelista e colaboradores (2004) encontraram 42,04% de proteína bruta e 5,62% de extrato etéreo para a cultivar Guarany.

Ricina

Em 1888, Herman Stillmark estudou a primeira lectina vegetal: observou que o extrato de sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) continha uma proteína tóxica que aglutinava eritrócitos, a qual chamou de ricina (PEUMANS; VAN DAMME, 1998).

A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, não sendo detectada em nenhuma outra parte da planta. Trata-se de uma toxialbumina com massa molar 60.000 e ponto isoelétrico com pH 5,9; é uma das mais potentes fitotoxinas (GARDNER JUNIOR et al., 1960). É uma proteína inativadora de ribossomo do tipo II (RIP II) por depuração de uma invariante adenina do 28s rRNA, ou seja, há quebra da ligação glicosídica entre a adenina e a ribose, levando à perda desta base, e, conseqüentemente, impossibilitando a síntese proteica, o que implica a morte celular (KNIGHT; DORMAN, 1997; OLSNES, 1987).

É composta por duas subunidades de aproximadamente 32 kDa (Tipo I, apresentando uma cadeia polipeptídica A) e 34 kDa (Tipo II, apresentando uma cadeia polipeptídica B), ligadas por uma ponte dissulfeto, com diferentes funções biológicas (OLSNES; KOZLOV, 2001). A cadeia A tem atividade enzimática, enquanto a cadeia B funciona como um ligante de receptores. Apesar de ambas serem eficientes na inibição da síntese proteica, a ausência da cadeia B, no tipo I, significa que esta não pode se ligar e entrar na célula com alta eficiência e, conseqüentemente, é menos tóxica.

Na cadeia A há predominância do padrão α -hélice (36%), onde a estrutura secundária folha $-\beta$ é a de maior quantidade (37%) na cadeia A, a qual é dividida em dois domínios iguais tridimensionalmente, cada um possuindo dois pares de pontes dissulfeto e resíduos de galactose com ligações 1,4 (Figura 1) (HARTLEY; LORD, 2004). Existem proteínas do tipo I, presentes em produtos largamente ingeridos na alimentação humana, como gérmen de trigo (*Triticum vulgare*) e cevada (*Hordeum vulgare* L.) (DAY et al., 1996; MILLER et al., 2002).

Os principais sintomas de envenenamento por ricina são: paralisia da respiração e sistema vasomotor, cólicas abdominais, diarreia, perda de apetite, aumento do ritmo cardíaco, ausência de coordenação dos movimentos, febre e hemorragia (TÁVORA, 1982). A toxicidade pode ocorrer por diversas formas de administração: inalação, injeções intramuscular, endovenosa e intraperitoneal e por via oral.

Casos de intoxicação por ingestão já foram descritos em animais monogástricos (galinhas, suínos, cavalos, aves silvestres e peixes) (TOKARNIA et al., 1975; KELLERMAN, 1988). A ingestão de

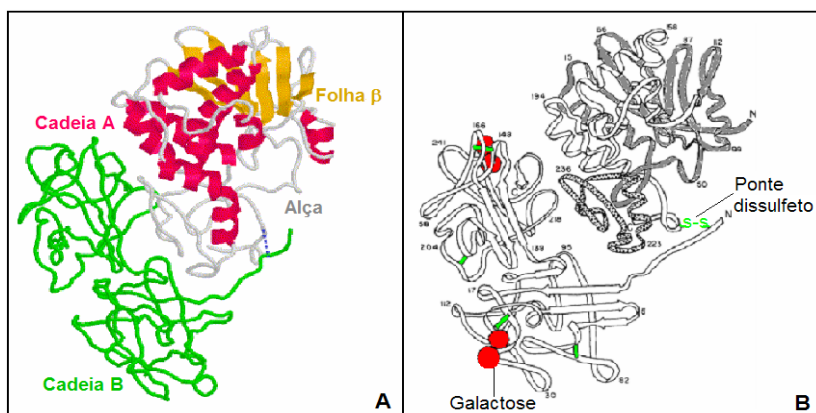


Figura 1. Estrutura tridimensional da ricina. (A) Cadeias polipeptídicas A e B; (B) Pontes de sulfeto e o sítio de ligação à galactose. Adaptada de Day et al., (1996); Miller et al., (2002).

mamona pode ser letal em cães, principalmente se for mastigada (OSWEILER, 1996) e para coelhos na dosagem de 0,5 mg/kg de peso (GARDNER JÚNIOR et al., 1960). A dose letal (LD) para humanos não está bem determinada, mas há trabalhos, com base em modelo animal, em que estimam LD_{50} para humano adulto, na faixa entre 1 mg/kg a 5 mg/kg (SMALLSHAW et al., 2002).

Ricinina

A ricinina, um alcaloide encontrado em todas as partes da planta, é um dos principais componentes tóxicos da torta (Figura 2); possui fórmula molecular $C_8H_8N_2O_2$, com nome químico 3-ciano-4-metoxi-N-metil-2-piridona (LEITE et al., 2005).

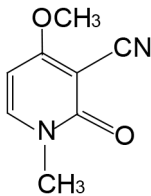


Figura 2. Fórmula estrutural da ricinina.

De acordo com Moshkin (1986), o teor de ricinina varia muito entre partes da planta: 1,3% nas folhas (matéria seca), 2,5% em plântulas estioladas, 0,03% no endosperma da semente e 0,15% na casca da semente. Severino et al. (2006) relatam que a concentração é alta na cápsula do fruto (de 739 mg/100 g a 1.664 mg/100 g), média na casca da semente (de 258 mg/100 g a 431 mg/100 g) e pequena no endosperma (de 31 mg/100 g a 77 mg/100 g).

A temperatura de fusão da ricinina está entre 200 e 201 °C, e a de sublimação é de 152 °C, enquanto a massa molecular é 164 mol/g, e a toxicidade em ratos (LD_{50}) varia de 19 mg/kg a 20 mg/kg.

Os sintomas de envenenamento por ricinina são: vômitos, dores abdominais fortes, sede extrema, diarreia com sangramento, aceleração do batimento cardíaco, convulsões e morte (LEITE et al., 2005).

Complexos alergênicos

Távora (1982) discorreu sobre um complexo de proteínas e polissacarídeos designados CB-1^a ("Albuminas 2S"), presente na semente em torno de 3 a 6%, no pólen e nas partes vegetativas da planta de mamona, sendo responsáveis por reações alérgicas no homem, mas não constatada a ocorrência em animais.

O termo CB-1^a surgiu de *Castor Beans* (semente de mamona, em inglês), e "1^a" corresponde ao processo desenvolvido por Spies e Coulson em 1943 com base na solubilidade em água e insolubilidade em álcool a 75% (TRUGO, 1979). O CB-1^a representa aproximadamente 12,5% da massa da torta, como determinado pelo teste de precipitação de antígenos diluídos (BANDEIRA et al., 2004; GARDNER JUNIOR et al., 1960).

O complexo alergênico CB-1^a é formado por aproximadamente 20 isoformas de proteínas com massa molecular entre 10 e 14 kDa, pertencentes à classe das albuminas 2S (MACHADO et al., 2003). As albuminas 2S possuem altos teores de glutamina, arginina e serina; apresentam distribuição característica de oito cisteínas em um padrão conservado e, geralmente, são compostas de duas cadeias polipeptídicas diferentes de 3 - 5 kDa e de 8 - 10 kDa, ligadas por duas pontes dissulfeto; além de apresentarem duas ligações intracadeias, implicando em proteínas muito estáveis e compactas (FERNANDES et al., 2004).

As albuminas 2S (10.000 - 18.000 Da) são resistentes à desnaturação térmica e química, podendo, mesmo após os tratamentos de destoxificação desencadear alergia por contato ou por inalação (VIEIRA et al., 1998).

Destoxificação da torta de mamona

Existem diversos métodos para a destoxificação e a desalergênização da torta da mamona, citados em Perrone e colaboradores (1966), como por exemplo:

- Cozimento por 1 ou 2 horas.
- Fervura, por curtos períodos de tempo, de uma mistura de torta moída e água, com mudança da água após cada fervura, devendo o material resultante ser filtrado, lavado com água quente e seco.
- Uso do vapor d'água na pressão de 150 a 300 PSI, seguida de descompressão abrupta.
- Autoclavagem a 125 °C a seco, com camadas de torta de 2,5 a 3,0 cm de espessura, durante 15 minutos.

Existem outros métodos para promover a destoxificação da torta de mamona usando dispersão alcalina, HCl a 1,5 N, uso de enzimas proteolíticas e leveduras (fermentação), conforme citações de Perrone e coautores (1966). Para eliminar o complexo alergênico e a ricina, Gardner Júnior e colaboradores (1960) citam ainda: aquecimento da torta a 205 °C; cozimento com soda cáustica (NaOH) a 2% em presença de formaldeído (10%); cozimento com 0,9% de HCl e 3% de formaldeído; cozimento com soda sob pressão de 20 PSI e cozimento com 1% de NaOH; e tratamento com Ca(OH)_2 , por 12 horas, 40 g por quilo de torta, e temperatura de 60 °C.

A torta de mamona destoxificada apresenta a composição descrita na Tabela 3, com uma excelente composição de aminoácidos.

Tabela 3. Composição da torta de mamona destoxificada (%).

Componentes (%)						
M. Seca	Proteínas	Lipídeos	Fibra	Cinza	Cálcio	Fósforo
97,26	41,07	1,34	37,49	4,30	0,35	0,43

Fonte: Waller e Negi (1958), citado por Loureiro (1962).

Enriquecimento da torta de mamona como fertilizante

A torta de mamona, apesar de ser um excelente fertilizante muito rico em nitrogênio e fósforo, é pobre em potássio. Assim, para obtenção de um fertilizante orgânico mais equilibrado, sugere-se a mistura da torta com outro adubo orgânico com bom teor em potássio, como a casca de mamona (exocarpo do fruto).

Silva e colaboradores (2013) realizaram um experimento visando à melhor combinação de torta e casca de mamona que melhor promovesse o crescimento de plantas de mamona, via quantificação de diversas variáveis, tais como fitomassa, área foliar e altura de plantas, entre outras, em condições de casa-de-vegetação.

Os tratamentos foram compostos por misturas de torta de mamona (χ_1) e casca de mamona (χ_2), ambas variando de 0 a 10%, além de terra (χ_3) variando de 80 a 100%, com soma sempre igual a 100% (condição à realização de experimentos com mistura), conforme Tabela 4. Utilizou-se a cultivar BRS Energia, desenvolvida pela Embrapa Algodão, que apresentou 4,5% de potássio na casca.

Tabela 4. Combinações de misturas compostas por terra, torta e casca de mamona.

Tratamentos	Proporção da mistura		
	Torta de mamona (χ_1)	Casca de mamona (χ_2)	Terra (χ_3)
T1	0,0%	0,0%	100,0%
T2	5,0%	5,0%	90,0%
T3	10,0%	10,0%	80,0%
T4	10,0%	0,0%	90,0%
T5	0,0%	10,0%	90,0%

Com relação às proporções de torta e casca de mamona, neste estudo em particular, tem-se a restrição de 10%, pois

dosagens de torta e casca de mamona acima de 10% podem provocar fitotoxidez graças ao excesso de nitrogênio (LIMA et al., 2008). Admitindo-se essas restrições, foi adotado um modelo linear com otimização realizada pelo método simplex.

As plantas foram irrigadas diariamente e, aos 90 dias após a emergência (DAE), a altura e a área foliares foram avaliadas. A área foliar foi calculada pela fórmula $S = 0,2398 \times (L + P)^{1,9259}$, em que L = largura da folha e P = comprimento da nervura principal (SEVERINO et al., 2004). Após a coleta dos dados de altura e área foliar, foram coletadas as folhas, raízes e caules das plantas para análise de matéria seca. Esse material foi acondicionado em sacos de papel e posto para secar em estufa de circulação forçada a 65°C por 72 h e posteriormente pesado.

O peso da matéria seca total (PMST) da planta foi obtido somando-se as médias do peso de matéria seca de folhas (PMSF), peso de matéria seca do caule (PMSC) e peso de matéria seca de raiz (PMSR), da seguinte forma: $PMST = PMSF + PMSC + PMSR$.

Os valores obtidos para cada uma dessas variáveis analisadas são sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5. Variáveis de crescimento obtidas com as combinações de misturas de terra, torta e casca de mamona.

Tratamentos	Proporção da mistura (%)			Altura (cm)	Área foliar (cm ²)	Matéria seca (g/planta)
	χ_1	χ_2	χ_3			
T1 (testemunha)	0,00	0,00	100,00	21,75	235,63	4,07
T2	5,00	5,00	90,00	101,50	3.330,36	86,48
T3	10,00	10,00	80,00	118,25	12.414,30	119,64
T4	10,00	0,00	90,00	102,25	4.354,56	93,81
T5	0,00	10,00	90,00	86,00	827,69	31,57

Ao considerar a cultivar de mamona BRS Energia e as variáveis do crescimento (altura de planta, área foliar e matéria seca total), em condição de ambiente parcialmente controlado (casa-de-vegetação), a melhor mistura que proporcionou o máximo do crescimento foi constituída de 10% de torta de mamona, 10% de casca de mamona e 80% de terra, em relação ao volume da mistura.

Considerações finais

A torta de mamona é um excelente fertilizante, de decomposição moderada, rica em nutrientes minerais, em especial nitrogênio e fósforo, além de ser um alimento muito bom para ruminantes, depois de destoxificada.

Referências

- AKHTAR, M.; MAHMOOD, I. Control of plant-parasitic nematodes with organic and inorganic amendments in agricultural soil. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 243-247, 1996.
- ALVES, M. O.; NARCISO SOBRINHO, J.; CARVALHO, J. M. M. de. **Possibilidades da mamona como fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel no Nordeste brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste, 2004. 42 p. (BNB. Série Documentos do ETENE, 01).
- ASSIS, F. P.; NAUFEL, F.; TUNDISI, A. G. A.; ROCHA, G. L.; BRANCO, T. S.; BECKER, M.; CINTRA, B. 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 da Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 20, n. 1, p. 35-38, 1962.

AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S.; BELTRÃO, N. E. de M.; SOARES, J. J.; VIEIRA, R. M.; MOREIRA, J. de A. N. **Recomendações técnicas para o cultivo da mamoneira (*Ricinus communis* L.) no Nordeste do Brasil**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1997. 52 p. (EMBRAPA-CNPA. Circular técnica, 25).

BALIEIRO, F. de C.; TAVARES, S. R. de L. **Curso de recuperação de áreas degradadas: a visão da ciência do solo no contexto do diagnóstico, manejo, indicadores de monitoramento e estratégias de recuperação**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2008. 228 p. (Embrapa Solos. Documento, 103).

BANDEIRA, D. S.; CARTAXO, W. V.; SEVERINO, L. S.; BELTRÃO, N. E. de M. Resíduo industrial da mamona como fonte alternativa na alimentação animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1, 2004, Campina Grande. **Energia e sustentabilidade: anais...** [Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004]. 1 CD-ROM.

BARBOUR, M.; BUCKLEY, T. N. The stomatal response to evaporative demand persists at night in *Ricinus communis* plants with high nocturnal conductance. **Plant, Cell and Environment**, Oxon, v. 30, n. 6, p. 711-721, 2007.

BAYMA, A. C. **Indústria da mamona**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1933. 29 p.

BELTRÃO, N. E. de M.; LUCENA, A. M. A; BRITO, G. G. de; OLIVEIRA, M. I. P. de; ALBUQUERQUE, F. A. de. Ecofisiologia da mamoneira (*Ricinus communis* L.). In: BELTRÃO, N. E. de M.; OLIVEIRA, M. I. P. de. (Ed.). **Ecofisiologia das culturas de algodão, amendoim, gergelim, mamona, pinhão-manso e sisal**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2011. P. 195-256.

BELTRÃO, N. E. de M. **Informações sobre o biodiesel, em especial feito com o óleo de mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 3p. (Embrapa Algodão. Comunicado Técnico, 177) Disponível em: <http://www.cnpa.embrapa.br/plataforma_mamona/publicacoes/comunicacoes/04.PDF>. Acesso em: 14 dez. 2008.

BELTRÃO, N. E. de M.; SILVA, L. C.; MELO, F. de B. **Cultivo da mamona (*Ricinus communis* L.) consorciada com feijão caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walpi] para o semiárido nordestino, em especial do Piauí**. Campina Grande: Embrapa Algodão / Embrapa CPAMN. 2002. 44 P. (Embrapa Algodão. Documentos, 97)

BELTRÃO, N. E. de M. **Torta de mamona (*Ricinus Communis* L.): fertilizante e alimento**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2002. 6 p. (Comunicado Técnico, 171)

BOSE, M. L. V.; WANDERLEY, R. da C. Digestividade e balanço metabólico da fração nitrogenada do farelo de mamona desintoxicado e de ferro de alfafa em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, DF, v. 17, n. 5, p. 456-464, 1988.

DAY, P. J.; ERNST, S. R.; FRANKEL, A. E.; MONZINGO, A. F.; PASCAL, J. M.; MOLINA-SVINTH, M. C.; ROBERTUS, J. D. Structure and activity of an active site substitution of ricin A chain. **Biochemistry**, Washington, v. 35, n. 34, p. 11098-11103, 1996.

EVANGELISTA, A. R.; ABREU, J. G.; PERON, A. J.; FRAGA, A. C.; NETO, P. C. Avaliação da composição química de tortas de mamona e amendoim obtidas por diferentes métodos de extração de óleo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Energia e sustentabilidade: anais...** [Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004]. 1 CD-ROM.

FERNANDES, K. V.; MACIEL, F. M.; MACHADO, O. L. T. Análise dos níveis de albuminas 2s e de ricina em sementes de diferentes cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Energia e sustentabilidade: anais...** [Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004]. 1 CD-ROM.

FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p295-335.

GARDNER JUNIOR, H. K.; D'AQUIN, E. L.; KOLTUN, S. P.; MCCOURTNEY, E. J.; VIX, H. L. E. Detoxification and deallergenization of castor beans. **The Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, IL, v. 37, n. 3, p. 142-148, 1960.

HARTLEY, M. R.; LORD, J. M. Cytotoxic ribosome-inactivating lectins from plants. **Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v. 1701, n. 1-2, p. 1-14, 2004.

HEMERLY, F. X. **Mamona: comportamento e tendências no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa - DID, 1981. 69 p. (Embrapa-DTC. Documentos, 2).

KELLERMAN, T. S. Gastrointestinal tract. In: KELLERMAN, T. S. **Plant poisonings and mycotoxicoses of livestock in southern Africa**. Cape Town: Oxford University Press, 1988. p. 144-145.

KNIGHT, M. C.; DORMAN, D. C. Selected poisonous plant concerns in small animals. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v. 92, n. 3, p. 260-272, 1997.

LEITE, A. C.; FERNANDES, J. B.; CABRA, E. C.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M F. das G. F. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *Ricinus communis* através de cromatografias em contracorrente. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 983-985, 2005.

LIMA, R. L. S.; SEVERINO, L. S.; ALBUQUERQUE, R. C.; BELTRÃO, N. E. de M.; SAMPAIO, L. R. Casca e torta de mamona avaliados em vasos como fertilizantes orgânicos. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 21, n. 5, p. 102-106, 2008.

LOUREIRO, M. C. Torta de semente da mamoneira na alimentação animal. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 11, n. 66, p. 290-294, 1962.

MACHADO, O. L. T.; MARCONDES, J. A.; SOUZA-SILVA, F. de; HANSEN, E.; RIBEIRO, P. D.; VERÍSSIMO, M.; KANASHIRO, M.; KIPNIS, T. L.; SILVA JUNIOR, J. G. da; SANTOS, M. F. dos; COSTA E SILVA, M. C. Characterization of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. **Allergologie**, Oberhaching, v. 26, p. 45- 51, 2003.

MILLER, D. J.; RAVIKUMAR, K.; SHEN, H.; SUH, J. K.; KERWIN, S. M.; ROBERTUS, J. D. Structure-based design and characterization of novel platforms for ricin and shiga toxin inhibition. **Journal of Medicinal Chemistry**, Washington, DC v. 45, n. 1, p. 90-98, 2002.

MIRANDA, R. M. de; BARREIRA, H. A.; FARIA, E. V.; MACHADO, D. D. **O farelo de mamona desintoxicado na alimentação de novilhas leiteiras**. Rio de Janeiro: Instituto de Zootecnia, 1957. 12 p. (Publicação, 41).

MOSHKIN, V. A. Physiology and biochemistry of castor. In: MOSHKIN, V.A. (Ed.). **Castor**. New Delhi: Amerind Publishing, 1986. p. 65-92.

NAUFEL, F.; ASSIS, F. P.; REZENDE, M. L. R.; ROCHA, G. L.; BECKER, M.; CAIELLI, E. L.; LEÃO, J. F. S.; KALIL, E. B. Efeitos comparativos da administração de farelos de torta de mamona atoxicada, de soja e de algodão na dieta de vacas em lactação. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v. 20, p. 47-53, 1962.

OLSNES, S. Protein toxins - closing in on ricin action. **Nature**, London, v. 328, n. 6130, p. 474-475, 1975.

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

OSWEILER, C. D. Toxicoses Relacionadas com Plantas. In: BUCK, W. B.; OSWEILWER, G. D. **Toxicologia veterinária**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. p. 386-439, capítulo 28.

PERRONE, J. C.; IACHAN, A.; DOMONT, G. B.; DISITZER, L. V.; CASTRO, V. R. O.; ROITMAN, R.; GOMES, S. M. **Contribuição ao estudo da torta de mamona**. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Tecnologia, 1966. 51 p.

PEUMANS, W. J.; VAN DAMME, E. J. M. **Plant lectins**: versatile proteins with important perspectives in biotechnology. Hants: Intercept, 1998. p. 199-227. (Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 15).

SAVY FILHO, A.; BANZATTO, N. V.; BARBOSA, M. Z.; Mamona. In: CATI (Campinas, SP). **Oleaginosas no Estado de São Paulo**: análise e diagnóstico. Campinas, 1999. (CATI. Documentos técnicos, 107). p. 29-39.

SEVERINO, L. S.; CARDOSO, G. D.; VALE, L. S.; SANTOS, J. W. Método para determinação da área foliar da mamoneira. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n. 1, p. 753-752, 2004.

SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **Mamona**: o produtor pergunta, a Embrapa responde. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. 248 p. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

SHARKEY, T.; BERNACCHI, C. J.; FARQUHAR, G. D.; SINGSAAS, E. L. Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C_3 leaves. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 30, n. 9, p. 1035-1040, 2007.

SILVA, W. A.; BELTRÃO, N. E. de ; COSTA, F. B.; SANTOS, J. W.; CARVALHO JUNIOR, G. S. Utilization of mixture methodologies for organic fertilization in castor bean plants. **AGRARIAN**, 2013. (No Prelo).

SILVA, J. G.; MACHADO, O. L.; IZUMI, C.; PADOVAN, J. C.; CHAIT, B. T.; MIRZA, U. A.; GREENE, L. J. Amino acid sequence of a new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of a 29-kDa precursor protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 336, n. 1, p. 10-18, 1996.

SMALLSHAW, J. E., FIRAN, A., FULMER, J. R., RUBACK, S. L., GHETIE, V., VITETTA, E. S. A novel recombinant vaccine which protects mice against ricin intoxication. **Vaccine**, Oxon, v. 20, n. 27-28, p. 3422-3427, 2002.

SOUSA, I. S. F. de (Ed.). **Agricultura familiar na dinâmica da pesquisa agropecuária**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 434 p.

TAVORA, F. J. A. F. **A cultura da mamona**. Fortaleza: EPACE, 1982. 112 p.

TOKARNIA, C. H.; DOBEREINER, J.; CANELA, C. F. C. Intoxicação Experimental em Bovinos pelas Folhas de *Ricinus communis*. F. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Série Veterinária**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 8, p. 1-7. 1975.

TRUGO, N. M. F. **Isolamento e caracterização química e físico-química de alérgenos de mamona**. 1979. 110 p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

VIEIRA, R. M.; LIMA, E. F.; BATISTA, F. A. S. Diagnóstico e perspectivas da mamona no Brasil. In: REUNIÃO TEMÁTICA DE MATÉRIAS-PRIMAS OLEAGINOSAS NO BRASIL, 1., 1997, Campina Grande. **Diagnóstico perspectivas e prioridades de pesquisa: anais...** Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1998. p. 139-150.

WEISS, E. A. Castor. In: WEISS, E. A. (Ed.). **Oilseed crops**. London: Longman, 1983. p. 31-99.

Engenharia Genética da Mamoneira: Perspectivas para a Destoxificação da Ricina

Francisco José Lima Aragão

Natália Lima de Sousa

Aisy Botega Baldoni

Introdução

A mamona é uma oleaginosa que pertence à família *Euphorbiaceae* (SOUZA; LORENZI, 2005). Os primeiros relatos sobre o uso pelo homem foram encontrados no Egito, no ano 4.000 a.C. (SAVY FILHO, 2005). Alguns autores acreditam que a mamona originou-se na Etiópia e veio para o Brasil com os escravos africanos. Outros autores defendem a hipótese de origem asiática (OLSNES; KOZLOV, 2001) e introdução no Brasil pelos portugueses para a utilização de óleo para a iluminação e lubrificação de eixos de carroças (MOREIRA et al., 1996; PINA et al., 2005; SANTOS et al., 2007).

Atualmente a mamona tem grande importância econômica e social. O cultivo comercial das sementes é bastante comum em várias regiões do mundo principalmente devido às propriedades do óleo que compõe cerca de 35 a 55% do peso da semente sendo o seu produto de maior importância (TAMBASCIA;

TEIXEIRA, 1986). Além da mamona ser uma importante opção de renda para o pequeno agricultor, pois é um sistema agrícola que utiliza poucos insumos, necessita de baixo investimento em mecanização e é cultivada em quase todo o país, excluindo apenas alguns ecossistemas específicos, como o Pantanal, a Amazônia e locais muito frios e de baixa altitude (SANTOS et al., 2007).

O óleo extraído das sementes é utilizado para diversos fins, inclusive como insumo industrial. Parte significativa do óleo da mamona é usada na indústria química, na de cosméticos e de lubrificantes, e na composição de tintas, vernizes e plásticos (SANTOS et al., 2007). Pode também gerar diversos tipos de produtos sofisticados como próteses humanas, produtos usados em indústrias farmacêuticas e até na indústria aeronáutica (OLIVEIRA et al., 2005). A mamona também se destaca como importante matéria-prima para a produção do biodiesel, por possuir elevada concentração de óleo nas sementes (RIBEIRO, 2006).

Os ácidos graxos que compõem o óleo da mamona variam de acordo com a cultivar e fatores ambientais diversos. De forma geral, o ácido ricinoleico é o principal componente, chegando a 91% do total de óleo da semente, sendo esta uma importante fonte comercial (FREIRE; SEVERINO, 2006).

A estrutura química do ácido ricinoleico (12-hidroxi oleato) é composta por 18 carbonos com ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 e um grupamento hidroxila ligado ao carbono 12. O grupo hidroxila confere ao composto um maior índice de viscosidade e estabilidade. Dessa forma, o óleo da mamona mantém suas características numa ampla faixa de temperatura, ao contrário de outros óleos vegetais, que perdem a viscosidade em altas temperaturas e se solidificam em baixas. Além disso, outra característica importante do óleo da mamona é ser o único solúvel em álcool em baixas temperaturas, facilitando a produção de biodiesel (BAFOR et al., 1991; SAVY

FILHO, 2005; BELTRÃO; LIMA, 2007). Os derivados do óleo de mamona são sintetizados pela modificação em três sítios de reação da molécula: o grupo hidroxila, a dupla ligação e a ligação éster (SAVY FILHO, 2005). Assim, o ácido ricinoleico é utilizado na composição de tintas, vernizes, lubrificantes, plásticos, cosméticos, ceras, detergentes, material elétrico, produtos biomédicos, entre outros (BAFOR et al., 1991; GODOY et al., 2009), sendo o responsável pelas características físico-químicas do óleo da mamona.

Além do óleo extraído das sementes (produto principal), a cadeia produtiva gera uma série de outros subprodutos, especialmente a torta de mamona, que pode se constituir em outra fonte de renda importante para os produtores rurais (HOFFMANN et al., 2007).

A torta de mamona pode ser definida como o resíduo da extração do óleo das sementes e consiste no mais importante subproduto desta cadeia produtiva. A quantidade de torta produzida por tonelada de óleo depende do teor de óleo da semente e da eficiência do processo de extração (FREIRE; SEVERINO, 2006).

Em todo o mundo, o uso predominante da torta de mamona tem sido como adubo orgânico de boa qualidade, podendo ser usada também para alimentação animal. A utilização da torta de mamona como adubo orgânico é uma fonte de renda adicional ao produtor rural, pois o composto é ricamente nitrogenado e eficiente na recuperação de terras esgotadas (CHIERICE; CLARO NETO, 2007).

O uso da torta de mamona para a alimentação animal ainda é restrito, devido às substâncias alergênicas e tóxicas presentes na mesma. Entretanto, ela possui um alto teor de proteínas e pode ser atraente para a suplementação animal, após ser moída e obtida o farelo (SEVERINO, 2005; CHIERICE; CLARO NETO, 2007).

As toxinas presentes na torta apresentam diversos níveis de toxidez. A ricina, composto tóxico, é considerada uma das

proteínas mais tóxicas conhecidas pelo homem. Já a ricinina, CB-1 e RCA aglutinina, são compostos alergênicos, ou seja, com nível de toxidez menor (CHIERICE; CLARO NETO, 2007).

A ricinina é um alcalóide tóxico conhecido como 1,2-diidro-4-metoxi-1-metil-2-oxo-3-piridinocarbonitrila ($C_8H_9N_2O_2$), encontrado na torta em menor quantidade, apresentando toxidez menor em relação à ricina (CHIERICE; CLARO NETO, 2007). A ricinina pode provocar reações cutâneas e irritações no sistema respiratório de animais, mas como está presente em quantidade muito pequena, não constitui problema de toxicidade, considerando que a torta de mamona seria usada em baixa quantidade na formulação de alimentos para gado (PINA et al., 2005).

A ricina é uma lectina produzida somente na semente da mamona, pertence ao grupo de Proteínas Inativadoras de Ribossomos e é composta de duas subunidades, as cadeias A e B ligadas por ponte dissulfeto (AUDI et al., 2005). Por sua vez, a RCA aglutinina (aglutinina de *R. communis*) é uma proteína tetramérica constituída de dois dímeros tipo ricina, ligados de forma não-covalente. A RCA é menos tóxica que a ricina e causa aglutinação de hemácias em mamíferos (ROBERTS et al., 1992; LORD et al., 1994).

Tanto o gene da ricina, quanto da RCA codificam uma proteína precursora contendo um sinal N-terminal, uma cadeia A, um peptídeo de ligação com 12 aminoácidos e uma cadeia B (YOSHITAKE et al., 1978; FUNATSU et al., 1979; HALLING et al., 1985; LAMB et al., 1985; ROBERTS et al., 1985; TREGGAR; ROBERTS, 1992). A cadeia A da ricina e da RCA difere em apenas 18 aminoácidos (de um total de 267), enquanto a cadeia B dessas proteínas difere em 41 aminoácidos (de um total de 262). Análises de *Northern* e RT-PCR mostraram que tanto o gene da ricina quanto da RCA tem expressão detectável apenas nas sementes entre 26 e 54 dias após a germinação (TREGGAR; ROBERTS, 1992; CHEN et al., 2005).

O gene da ricina não contém íntrons e há evidências que ele seja membro de uma família multigênica. Estima-se que seis genes que codificam a ricina estejam presentes no genoma da mamona (HALLING et al., 1985) e isso dificulta o desenvolvimento de variedades com baixo teor de ricina, que é um dos principais objetivos dos programas de melhoramento, uma vez que é difícil mutagenizar vários desses genes, simultaneamente, sem causar grandes alterações fenotípicas indesejáveis.

A ricina é sintetizada como preproricina (64,1 kDa) no desenvolvimento de sementes de mamona e inserida no lúmen do retículo endoplasmático (RE), quando o sinal peptídico é removido formando a proricina (61,6 kDa). No RE é formada uma ligação dissulfeto intramolecular entre as subunidades A e B, juntando o heterodímero maduro para posterior remoção do propeptídeo por uma protease vacuolar, gerando o dímero maduro de 58,8 kDa (MALTMAN et al., 2007). A ricina que, está presente numa quantidade de 6% a 9% na baga (CHIERICE; CLARO NETO, 2007), funciona como proteína de armazenamento das sementes, fornecendo nutrientes durante a germinação. É um componente proteico de toxidez elevada, também pode agir como proteína de defesa (YOULE; HUANG, 1976; ROBERTS et al., 1992; SHEWRY et al., 1995).

O mecanismo de toxidez da ricina ocorre quando esta entra na célula e impede a produção de proteínas levando a célula à morte. Isso ocorre porque a cadeia B dessa proteína liga-se à galactose na superfície celular, fazendo com que ela penetre na célula e seja transportada de uma célula a outra (SPHYRIS et al., 1995). Uma vez no interior da célula, a ação catalítica da cadeia A inativa a subunidade 60S do ribossomo pela depuração de um resíduo específico de adenina no RNA 28S, inativando a síntese proteica em eucariotos. Essa inativação é tão eficiente que uma única molécula desta proteína é suficiente para matar uma célula (ENDO et al., 1987; AUDI et al., 2005).

De acordo com Olsnes e colaboradores (1975), apenas uma molécula da cadeia A da ricina é capaz de inativar irreversivelmente 2.000 ribossomos/min. Além disso, Eiklid e coautores (1980) concluíram que a penetração de uma única molécula de ricina no citosol é o suficiente para matar uma célula de mamífero. A dose letal de ricina estimada para humanos é de 1 - 10 µg de ricina/kg corporal (AUDI et al., 2005; RAO et al., 2005).

A maioria dos sintomas da intoxicação em animais pela ricina depende da exposição e dose recebida. Os sintomas iniciais causados pela inalação dessa proteína podem ocorrer dentro de oito horas de exposição; já quando ingeridas, ocorrem em menos de seis horas. Os sintomas da intoxicação pela ricina em animais são febre, náuseas, insuficiência respiratória, dentre outros, podendo levar à morte (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2004).

Para uso da torta de mamona na ração animal é necessário o respectivo processamento visando à eliminação das toxinas, a partir do emprego de processos de fervura, autoclavagem ou mistura com carbonato de cálcio. Porém, esses procedimentos não são viáveis a nível industrial, visto que consomem muita energia, além de não existirem métodos de controle de qualidade para confirmar a segurança do produto final. Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de técnicas baratas e confiáveis de destoxificação (SEVERINO; FREIRE, 2006).

Nosso grupo de pesquisa tem estudado a variabilidade genética de um banco de germoplasma quanto à presença de ricina nas sementes, o acúmulo de ricina e aglutinina (RCA) durante o desenvolvimento da semente, bem como sua localização intracelular nos vários tecidos e principalmente, gerar plantas transgênicas de mamona (*Ricinus communis* L.) com redução total ou parcial do teor de ricina nas sementes.

Diversidade em acessos de mamona do banco de germoplasma brasileiro quanto à concentração de ricina nas sementes

Estudo realizado por Baldoni e colaboradores (2011) comparou o conteúdo de ricina em sementes maduras de vinte cultivares de mamona, sendo seis destas cultivares comerciais brasileiras e quatorze acessos do banco de germoplasma da Embrapa Algodão. Os resultados da análise de variância mostraram que os genótipos apresentaram diferenças significativas, a 5% de probabilidade, para a concentração de ricina nas sementes.

O coeficiente de variação (CV) foi elevado (42,73%) e, mesmo assim, a análise mostrou existência de variabilidade entre genótipos (BALDONI et al., 2011). Este resultado pode sugerir a hipótese de existência de variabilidade genética para concentração de ricina dentro do genótipo, já que a mamona possui cruzamento ao acaso e que, para realização desta análise, cada repetição biológica foi representada por duas sementes. O alto coeficiente de variação encontrado nas análises de variância foi observado em outros trabalhos (LOWERY et al., 2007). Ainda, é estimado que seis genes distribuídos no genoma da mamona são responsáveis pela produção de ricina (HALLING et al., 1985). Assim, por se tratar de uma característica quantitativa é esperada maior influência do ambiente sobre esta característica o que normalmente acarreta um maior valor do CV.

O acesso BRA 3271 apresentou a maior concentração de ricina nas sementes (32,18 ng de ricina/ μ g de proteína total), com índice nove vezes maior do que a BRS Paraguaçu, de menor valor (3,53 ng de ricina/ μ g de proteína total (BALDONI et al., 2011). Diante da grande variabilidade para a concentração da ricina nos acessos do banco de germoplasma da Embrapa Algodão, grandes interesses estão em: 1) cultivares com baixos níveis de ricina, visando ao aproveitamento

do resíduo da extração do óleo das sementes na alimentação animal (alta concentração de proteínas) e adubo orgânico (rico em nitrogênio) (SEVERINO, 2005; CHIERICE; CLARO NETO, 2007); e 2) cultivares com alta concentração de ricina, a fim de estudar o potencial para uso na medicina (SANDVIG; VAN DEURS, 2000; AUDI et al., 2005).

Alguns estudos foram realizados visando à quantificação do teor de ricina em outros genótipos. Pinkerton et al. (1999) avaliaram sementes da cultivar Hale, sendo encontrado valor médio de 12,2 mg de ricina e RCA (*R. communis* aglutinina)/g de semente. Sementes dos acessos PI 257654 e PI 258368 apresentaram a média de 1,5 e 2,9 mg de ricina e RCA/g de semente, respectivamente (PINKERTON et al., 1999). Em algumas populações de mamona com polinização aberta foram observados conteúdos de ricina e RCA reduzidos, variando de 0,10 a 5,60 mg de ricina/g de semente, dando a média de 1,86 mg/g (AULD et al., 2003). Um trabalho realizado na coleção de germoplasma de mamona dos Estados Unidos revelou a concentração de ricina + RCA variando de 1,9 a 16 mg de ricina/g de semente, ou seja, o genótipo com a maior concentração da proteína é 8,4 vezes maior que o genótipo com a menor concentração. Dessa forma, a grande variabilidade permite a seleção de acessos de acordo com o interesse dos melhoristas (PINKERTON et al., 1999).

Estudo do acúmulo de ricina durante o desenvolvimento da semente de mamona

Estudo foi conduzido para comparar o conteúdo de ricina em sementes maduras de quatro variedades comerciais brasileiras e investigar o acúmulo dessa proteína durante o desenvolvimento de sementes de 10 a 60 dias após a polinização (DAP). Os resultados mostraram que

as cultivares BRS Paraguaçu e BRS Pioneira apresentaram cerca de 24% do teor de ricina das cultivares BRS Nordestina e BRS Energia. Pode-se observar também, pelos desvios padrões da média, que as cultivares BRS Nordestina e BRS Energia apresentaram estatisticamente valores semelhantes da concentração de ricina nas sementes, bem como a BRS Paraguaçu e a BRS Pioneira. Por ter apresentado o maior valor absoluto para concentração de ricina, a cv. BRS Energia foi escolhida para estudos de localização dessa proteína durante o desenvolvimento de sementes de mamona (BALDONI et al., 2010).

A análise de ELISA revelou que a ricina pode ser detectada nas sementes (cv. BRS Energia), apenas em 30 DAP, sendo sua concentração ainda muito baixa neste estágio. Um aumento significativo foi observado de 30-40 DAP (32,0 vezes), de 40-50 DAP (3,3 vezes) e de 50-60 (2,0 vezes), quando as sementes atingiram seu ponto de maturação fisiológica. O acúmulo da ricina em células do endosperma durante o desenvolvimento da semente também pode ser observado utilizando a microscopia de luz. O material passou pelo procedimento de imunomarcção com anticorpo específico para a ricina e foi observado um crescente aumento na marcação (reação entre a fosfatase alcalina conjugada ao anticorpo secundário e o substrato, resultando em coloração escura) que é pequeno na fase inicial de desenvolvimento (10 DAP) e grande na fase final (60 DAP), onde a semente se encontra madura. Dessa forma, pode-se concluir que o acúmulo dessa proteína aumenta com o desenvolvimento da semente. Podem-se observar também nos cortes semifinos que há modificações na estrutura e composição celular à medida que as células do endosperma da semente se desenvolvem, sendo o acúmulo de reservas mais expressivo (BALDONI et al., 2010).

Greenwood e Bewley (1982) observaram que a cultivar de mamona Hale, nos estágios de 20 - 40 DAP (fases IV a VIII) armazena lipídios, proteínas e fitina nas células do endosperma. Em Baldoni et al. (2010) também foi observado o acúmulo de proteínas, lipídeos e fitinas,

principalmente nas fases finais de desenvolvimento do endosperma. As células do endosperma na fase inicial de desenvolvimento (30 DAP) apresentaram grandes vacúolos e outras organelas, como retículo endoplasmático, núcleo e mitocôndrias. Aos 40 DAP também foram observados vacúolos e, em algumas células, organelas de armazenamento em formação, tais como vacúolos de armazenamento de proteínas e corpos lipídicos. Cavidades globoides de fitina também foram observadas (BALDONI et al., 2010).

Nos estágios de 50 a 60 DAP o citosol não se apresentava evidente e o espaço celular foi basicamente preenchido por vacúolos de armazenamento de proteínas (formado pela matriz e cristalóide) e corpos lipídicos (BALDONI et al., 2010), confirmando os resultados obtidos por Youle e Huang (1976). Aos 50 DAP cristalóides de proteínas foram observados no interior de vacúolos de armazenamento de proteínas, sendo que em 60 DAP os cristalóides foram mais evidentes (BALDONI et al., 2010). Como esperado, essas observações foram consistentes com as informações obtidas por Greenwood et al. (1984) durante o desenvolvimento da semente de mamona.

A microscopia eletrônica foi utilizada para confirmar os resultados das análises de imunomarcacão anteriores. A ricina não foi localizada nas células do endosperma nos estágios iniciais de desenvolvimento (antes dos 20 DAP) e apenas algumas marcações (ouro coloidal) puderam ser observadas aos 30 DAP. Sinal de marcação significativo para a ricina foi observado em 40 DAP, localizado na matriz do vacúolo de armazenamento de proteína. Um aumento significativo da marcação foi observado em 50-60 DAP, sendo a ricina encontrada tanto na matriz quanto nos cristalóides dos vacúolos de armazenamento. Nenhuma marcação foi observada em cortes histológicos representando o controle negativo, os quais foram incubados apenas com o anticorpo secundário. A marcação foi homogênea em todas as células analisadas e não foram observadas marcações inespecíficas na

membrana nuclear e membrana plasmática das células, confirmando a confiabilidade dos resultados (BALDONI et al., 2010).

Em uma análise das proteínas do endosperma, Youle e Huang (1976) mostraram não haver sobreposição de componentes proteicos na matriz e nos cristaloides, sugerindo uma clara compartimentalização das proteínas dentro dos corpos proteicos. Além disso, eles também observaram que os cristaloides são compostos por proteínas de armazenamento do tipo globulina, enquanto a matriz contém proteínas albuminas de não armazenamento, incluindo a ricina e a fitohemaglutinina (TULLY; BEEVERS, 1976; YOULE; HUANG, 1976). Em contrapartida em Baldoni et al. (2010) após 50 DAP a ricina pode ser encontrada também nos cristaloides dos vacúolos de armazenamento e não apenas na matriz, como observado pelos autores acima citados.

O sinal de imunolocalização da ricina nas células endospermáticas foi correlacionado com as fases de desenvolvimento da semente. Foi observado um aumento no acúmulo da proteína à medida que a semente se desenvolvia (BALDONI et al., 2010). Os resultados foram consistentes com os obtidos por Chen et al. (2005) sobre a transcrição do gene da ricina. Usando técnicas de RT-PCR e *Northern blot* esses autores observaram a ausência de mRNA/ cDNA nas fases iniciais do desenvolvimento do endosperma (12 e 19 DAP). No entanto, a expressão desse gene aumentou de forma significativa nas sementes com 26 DAP, e a tendência de crescimento continuou nas fases posteriores, até 54 DAP (BALDONI et al., 2010). Resultados semelhantes foram obtidos por Kermode e Bewley (1989), analisando a expressão do gene da ricina no desenvolvimento do endosperma em 30-60 DAP. Além disso, Lu et al. (2007) mostraram que 1,5% dos ESTs de uma biblioteca de cDNA, feita a partir do endosperma em desenvolvimento corresponde ao gene da ricina. Estes resultados corroboram a observação de que a expressão do gene da ricina é espacialmente e temporalmente regulada.

Silenciamento do gene que codifica a ricina em mamona (*Ricinus communis* L.)

Foi construído um vetor para silenciamento dos genes de codificam para ricina e RCA. O objetivo do nosso grupo é a obtenção de plantas com baixos teores de ricina presentes nos grãos maduros. Essa redução deve ser significativa para que a torta possa ser utilizada com segurança como ração animal. Entretanto, houve a necessidade de adaptar e melhorar os sistemas de transformação genética existentes, que são de baixa eficiência. Para isso, exploramos um novo sistema de seleção dos transformantes baseado no herbicida da classe das imidazolinonas, imazapir.

Para determinar a melhor dosagem do herbicida imazapir na seleção de plantas de mamona, inicialmente foi realizada uma curva de seleção em meio de cultura sólido e outra para meio líquido. O imazapir é um herbicida que se concentra na região do meristema apical da planta. Ele age na inibição da atividade enzimática do ácido acetohidroxi sintase, que catalisa o estágio inicial da biossíntese de isoleucina, leucina e valina. O gene *ahas* foi isolado de *Arabidopsis thaliana* e contém uma mutação na posição 653pb, sendo um agente seletivo de células meristemáticas transgênicas (ARAGÃO et al., 2000; IVO et al., 2008; RECH et al., 2008). A dosagem de imazapir selecionada para ser utilizada nos meios de cultura dos explantes após o bombardeamento foi de 200 nM tanto para meio sólido quanto para meio líquido, uma vez que nesta concentração os embriões sofreram restrições no alongamento, porém não paralisaram seu desenvolvimento.

Antes de iniciar os procedimentos de bombardeamento foram realizados testes para verificar a viabilidade na transformação genética de células por biobalística da região meristemática apical. Em um deles foi observado que de 60 explantes bombardeados com o vetor pBI426 (possuidor do gene *gus*), 42 apresentaram pontos

azuis nas regiões meristemáticas, indicando que as células foram transformadas. Em outra análise com o mesmo vetor (pBI426) um número maior de pontos azuis foi observado. Alguns fatores podem afetar a eficiência do bombardeamento, dentre eles variações ambientais, como a umidade do ar, que provavelmente influenciou no processo, já que os experimentos ocorreram em épocas diferentes.

Para avaliar a eficiência do bombardeamento com o vetor construído para o silenciamento do gene da ricina foram selecionados ao acaso 100 explantes que passaram pelo processo de seleção ao imazapir e depois, pelo biorreator para o alongamento das brotações. Foram realizadas análises de PCR desses explantes com *primers* que amplificam um fragmento do gene AHAS. Dos 100 explantes analisados, 18 amplificaram o fragmento esperado e um fragmento inespecífico (cerca de 700 pb e 1200 pb, respectivamente) e 28 explantes apresentaram apenas a banda esperada. Dessa forma, dos 100 explantes analisados, 46 amplificaram o fragmento transgene, indicando elevada frequência de transformação. Problemas na regeneração não permitiram o desenvolvimento completo desses explantes, levando-os à morte.

Foi estudado o desenvolvimento dos explantes de mamona em cultura de tecidos *in vitro* com diferentes concentrações de fitorreguladores. No início do processo de bombardeamento, os embriões foram retirados da semente e colocados em meio de cultura por quatro dias, no escuro. Nesse período é importante a adição de reguladores de crescimento que favorecem o desenvolvimento das brotações posteriormente. Um teste foi realizado visando comparar os reguladores TDZ (tidiazuron) e BAP (6-benzilaminopurina), adicionados ao meio de cultura separadamente. Foi observado em um período após o bombardeamento, maior número de brotações nos explantes submetidos ao meio com TDZ. Alguns estudos realizados comprovam esses resultados, onde a utilização do TDZ nas fases

iniciais resultou no maior número de brotações, se comparado com outros fitorreguladores (SUJATHA; REDDY, 1998; AHN et al., 2007).

As plantas que passaram pelo processo de transformação por biobalística foram analisadas após um período de quatro meses em contato com o agente seletivo imazapir. Os meios de cultura utilizados foram testados visando à maior eficiência no processo de regeneração dos explantes. Foi constatado que o meio com IBA, AgNO_3 e imazapir foi mais eficiente, já que os explantes apresentaram maior número de brotações e raízes. Nesse caso, o período em que os explantes foram submetidos ao meio de cultura sem o agente seletivo (imazapir) por uma semana propiciou um maior desenvolvimento das brotações, facilitando posteriormente o desenvolvimento dos brotos transgênicos. A adição de nitrato de prata ao meio de cultura, associado à auxina IBA estimulou significativamente o enraizamento dos explantes.

O uso de biorreatores foi uma importante ferramenta visando o alongamento dos explantes de mamona em cultivo líquido, na presença do agente seletivo imazapir. Em plantas onde as brotações não alongavam, o uso de biorreatores promoveu o desenvolvimento da parte aérea em aproximadamente 30 dias. Após esse período, ocorreram problemas de hiperhidricidade do explante, conhecida como vitrificação. A hiperhidricidade é definida como o estado fisiológico que a planta apresenta elevado teor de água no interior das células e tecidos com aspecto translúcido, o que pode ser consequência da difusão passiva de água dentro dos tecidos ou um distúrbio metabólico da planta (SANTOS et al., 2001).

O processo de cultura de tecidos a que foram submetidos os embriões que originaram plantas transformadas está exemplificado na Figura 1. Os embriões foram retirados da semente e colocados em meio de cultura com 1 mg/L de TDZ por quatro dias no escuro (Figura 1A), permitindo o crescimento dos primórdios foliares e facilitando a exposição do meristema apical durante o

bombardeamento. Após o bombardeamento foram observados explantes com muitas brotações (Figura 1B), que foram colocados em meio de cultura com imazapir para a seleção dos brotos transgênicos (Figura 1C). Após um período de seleção, os explantes supostamente transgênicos alongaram (Figura 1D), originando plantas alongadas que passaram por análises moleculares para confirmar a inserção do fragmento transgene no genoma da planta.

Foram realizados 21 bombardeamentos, totalizando 4.280 embriões bombardeados em duas cultivares comerciais, BRS Paraguaçu e BRS Nordestina, havendo, em ambas, a ocorrência de plantas transformadas. Dos 4.280 explantes bombardeados,

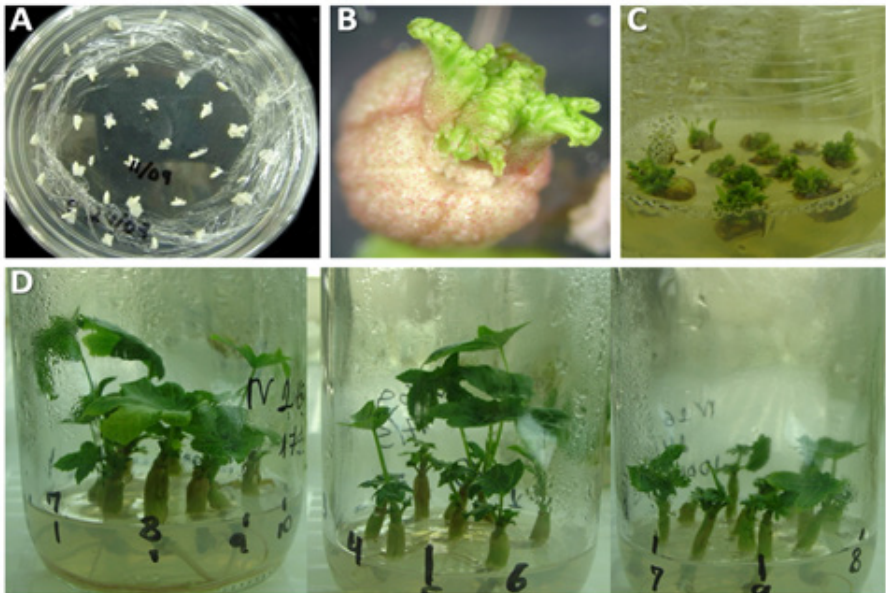


Figura 1. Etapas do processo de cultura de tecidos dos explantes de mamona que passaram pelo processo de bombardeamento. A) embriões retirados das sementes e submetidos ao meio com TDZ 1mg/L, no escuro, por 4 dias; B) explante após o bombardeamento, depois de uma semana no meio de cultura sem regulador de crescimento; C) explantes em meio de cultura com seleção (imazapir); D) explantes com brotações alongadas e raízes.

apenas 86 alongaram, sendo que na maioria iniciou-se o processo de formação de raízes. Dessas 86 plantas alongadas, 34 apresentaram a reação de PCR positiva para o *primer* que amplifica um fragmento do gene *ahas*, o agente seletivo, indicando que o fragmento transgene foi inserido na planta.

As mesmas plantas que foram positivas na reação de PCR para o gene *ahas* foram submetidas à outra análise de PCR com *primers* que amplificam um fragmento entre o promotor 35SCaMV e o fragmento da ricina do cassete de transformação. Das 34 plantas analisadas, apenas dez mostraram amplificação do fragmento esperado na análise de PCR. Essas plantas foram aclimatadas e analisadas por *Southern blot* para identificação do cassete de silenciamento da ricina.

A frequência de transformação foi de 0,35% (baseado no número de plântulas geneticamente modificadas, analisadas por PCR, em relação ao número total de embriões zigóticos bombardeados), valor dentro do encontrado na literatura. Em trabalhos com transformação de mamona mediada por *Agrobacterium tumefaciens* foram encontrados valores de frequência de transformação de 0,08% (baseado em análises de PCR, RT-PCR, PCR-*Southern blot* e análise das progênies para detecção do gene *hpt*) e 0,42% (baseado em análises de *Southern blot* para detecção do gene *gus*) (SUJATHA; SAILAJA, 2005; MALATHI *et al.*, 2006). Sailaja *et al.* (2008) trabalhando com transformação de mamona por biobalística conseguiram valores de eficiência de transformação de 1,4%, baseado em análises de PCR e *Southern blot* para detecção do gene *hpt*.

Sementes das linhagens transgênicas foram analisadas por ELISA para quantificação do teor de ricina. Os dados mostram que 3 linhagens tiveram a quantidade de ricina significativa diminuída quando comparadas com o controle (Figura 2).

Esses resultados são extremamente promissores para o desenvolvimento de linhagens com baixos teores de ricina.

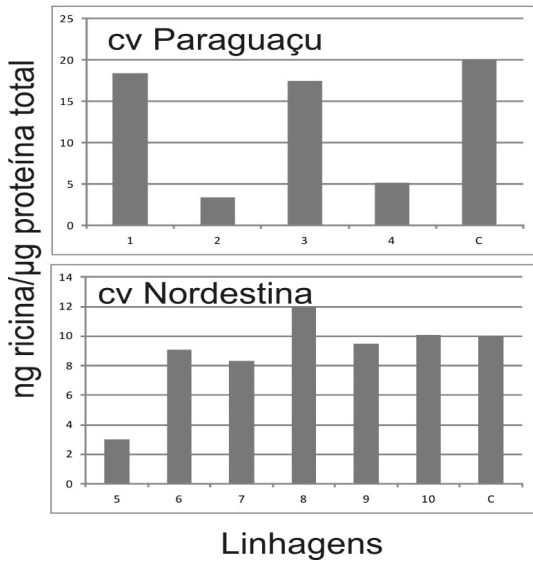


Figura 2. Análise de ELISA para detecção de ricina em sementes de plantas geneticamente modificadas de mamona (1-10) comparadas com o controle (C, plantas não transgênicas), das variedades Paraguaçu e Nordestina.

As gerações devem ser avançadas para que se identifique planta com o transgene Δ -ricina esteja em homozigose. Tem-se observado que o fenômeno de silenciamento é mais marcado em linhagens com os transgenes em homozigose.

Considerações finais

Devido à importância da mamona para a indústria e a possibilidade de utilizar o material residual da extração do óleo como fertilizante ou alimento para animais, há considerável interesse em reduzir o teor de ricina nas sementes usando pesquisas de melhoramento clássico e molecular. No entanto, a compreensão da expressão da proteína a nível celular é fundamental para: (1) o desenvolvimento de: construções com sequências regulatórias envolvendo a adequada expressão temporal e espacial; (2) o desenvolvimento

de um método efetivo de rastreamento individual de mutantes/transformantes com sucesso no bloqueio da expressão do gene da ricina e (3) a análise de biossegurança dos eventos transgênicos.

Dessa forma, o presente trabalho buscou estudar a proteína ricina, permitindo identificar seu acúmulo durante o desenvolvimento da semente de mamona. Além disso, foram obtidas plantas transgênicas com redução no teor da ricina. Essas plantas deverão, em uma próxima etapa, entrar em um programa de desenvolvimento, em que plantas em homozigose devem ser analisadas e ensaios com animais devem ser realizados. As progênes continuaram a ser avaliadas para confirmar a herança do silenciamento. Adicionalmente, cruzamentos com linhagens/variedades com menores teores de ricina/RCA também podem ser úteis para a geração de novas variedades, em associação com as linhagens transgênicas mostrando silenciamento dos genes da ricina/RCA.

Referências

AHN, Y.-J.; VANG, L.; MCKEON, T. A.; CHEN, G. Q. High-frequency plant regeneration through adventitious shoot formation in castor (*Ricinus communis* L.). **Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 43, n. 1, p. 9-15, 2007.

ARAGÃO, F. J. L.; SAROKIN, L.; VIANNA, G. R.; RECH, E. L. Selection of transgenic meristematic cells utilizing a herbicidal molecule results in the recovery of fertile transgenic soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] plants at a high frequency. **Theoretical and Applied Genetics**, New York, v. 101, n. 1-2, p. 1-6, 2000.

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M.; SCHIER, J.; OSTERLOH, J. Ricin poisoning. A comprehensive review. **JAMA**, Chicago, v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.

AULD, D. L.; PINKERTON, S. D.; LOMBARD, K. A.; MURPHY, C. K.; LOWERY, C. C.; KENWORTHY, K. E.; BECKER, W. D.; ROLFE, R. D.; GHETIE, V. Registration of TTU-LRC castor germplasm with reduced levels of ricin and RCA120. **Crop Science**, Madison, 43, n. 2, p. 746-747, 2003.

BAFOR, M.; SMITH, M. A.; JONSSON, L.; STOBART, K.; STYMNE, S. Ricinoleic acid biosynthesis and triacylglycerol assembly in microsomal preparations from developing castor-bean (*Ricinus communis*) endosperm. **Biochemical Journal**, London, v. 280, p. 507-514, parte 2, 1991.

BALDONI, A. B.; ARAUJO, A. C. G.; CARVALHO, M. H.; GOMES, A. C. M. M.; ARAGÃO, F. J. L. Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development. **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 1, n. 2, p. 61-65, 2010.

BALDONI, A. B.; CARVALHO, M. H. de; SOUSA, N. L.; NOBREGA, M. B. de M.; MILANI, M.; ARAGAO, F. J. L. Variability of ricin content in mature seeds of castor bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 46, n. 7, p. 776-779, 2011.

BELTRÃO, N. E. M.; LIMA, R. L. S. Aplicação do óleo de mamona como fonte de energia: biodiesel In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. 2 ed. rev. amp. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 397-416.

CHEN, G. Q.; HE, X.; MCKEON, T. A. A simple and sensitive assay for distinguishing the expression of ricin and *Ricinus communis* agglutinin genes in developing castor seed (*R. communis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 6, p. 2358-2361, 2005.

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. 2 ed. rev. amp. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 419-447.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (USA). 2004. Disponível em: <<http://www.hhs.gov/>>. Acesso em: 10 out. 2006.

EIKLID, K.; OLSNES, S.; PIHL, A. Entry of lethal doses of abrin, ricin and modeccin into the cytosol of HeLa cells. **Experimental Cell Research**, San Diego, v. 126, n. 2, p. 321-326, 1980.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M.; TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes. The site and the characteristics of the modification in 28 S ribosomal RNA caused by the toxins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 262, n. 12, p. 5908-5912, 1987.

FREIRE, R. M. M.; SEVERINO, L. S. Óleo de Mamona. In: SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. p. 210-218.

FUNATSU, G.; KIMURA, M.; FUNATSU, M. Primary structure Ala chain of ricin D. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokyo, v. 43, n. 10, p. 2221-2224, 1979.

GREENWOOD, J. S.; BEEWLEY, J. D. Seed development in *Ricinus communis* (castor bean). 1. Descriptive morphology. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 60, n. 9, p. 1751-1760, 1982.

GREENWOOD, J. S.; GIFFORD, D. J.; BEWLEY, J. D. Seed development in *Ricinus communis* cv. Hale (castor bean). II. Accumulation of phytic acid in the developing endosperm and embryo in relation to the deposition of lipid, protein, and phosphorus. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 62, n. 2, p. 255-261, 1984.

GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; MACIEL, F. M.; FELIX, S. P.; BEVILAQUA, J. V.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, M. G. Use of a low-cost methodology for biodegradation of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 44, n. 5, p. 317-322, 2009.

HALLING, K. C.; HALLING, A. C.; MURRAY, E. E.; LADIN, B. F.; HOUSTON, L. L.; WEAVER, R. F. Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 13, n. 22, p. 8019-8033, 1985.

HOFFMANN, L. V.; DANTAS, A. C. A.; MEDEIROS, E. P. de; SOARES, L. S. **Ricina: um impasse para utilização da torta de mamona e suas aplicações**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. 25 p. (Documentos, 174).

IVO, N. L.; NASCIMENTO, C. P.; VIEIRA, L. S.; CAMPOS, F. A. P.; ARAGÃO, F. J. L. Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 9, p. 1475-1483, 2008.

KERMODE, A. R.; BEWLEY, J. D. Developing seeds of *Ricinus communis* L., when detached and maintained in an atmosphere of high relative humidity, switch to a germinative mode without the requirement for complete desiccation. **Plant Physiology**, Rockville, v. 90, n. 2, p. 702-707, 1989.

LAMB, F. I.; ROBERTS, L. M.; LORD, J. M. Nucleotide sequence of cloned cDNA coding for preproricin. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 148, n. 2, p. 265-270, 1985.

LORD, J. M.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D. Ricin: Structure, mode of action, and some current applications. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 8, n. 2, p. 201-208, 1994.

LOWERY, C. C.; AULD, D. L.; ROLFE, R.; MCKEON, T. A.; GOODRUM, J. Barriers to Commercialization of a Castor Cultivar with Reduced Concentration of Ricin. In: JANICK, J.; WHIPKEY, A. (Ed.). **Issues in new crops and new uses**. Alexandria: ASHS Press, 2007. p. 97-100.

LU, C.; WALLIS, J. G.; BROWSE, J. An analysis of expressed sequence tags of developing castor endosperm using a full-length cDNA library. **BMC Plant Biology**, London, v. 7, article number 42, 2007.

MALATHI, B.; RAMESH, S.; RAO, K. V.; REDDY, V. D. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and production of semilooper resistant transgenic castor (*Ricinus communis* L.). **Euphytica**, Dordrecht, v. 147, n. 3, p. 441-449, 2006.

MALTMAN, D. J.; GADD, S. M.; SIMON, W. J.; SLABAS, A. R. Differential proteomic analysis of the endoplasmic reticulum from developing and germinating seeds of castor (*Ricinus communis*) identifies seed protein precursors as significant components of the endoplasmic reticulum. **Proteomics**, Weinheim, v. 7, n. 9, p. 1513-1528, 2007.

MOREIRA, J. de A. N.; LIMA, E. F.; FARIAS, F. J. C.; AZEVEDO, D. M. P. de. **Melhoramento da mamoneira (*Ricinus communis* L.)**. Campina Grande: EMBRAPA-CNPA, 1996. 30 p. (EMBRAPA-CNPA. Documentos, 44).

OLIVEIRA, I. P. de; SANTOS, K. J. G. dos; BELTRÃO, N. E. de M.; NEVES, B. P. das; ARAÚJO, A. A. de; OLIVEIRA, L. C. Potenciais da mamona (*Ricinus communis* L.) na região Centro-Oeste brasileira. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, São Luís de Montes Belos, v. 1, n. 2, p. 104-130, nov. 2005.

OLSNES, S.; FERNANDEZ-PUENTES, C.; CARRASCO, L.; VAZQUEZ, D. Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymic activity of the toxin A-chains. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, Berlin, v. 60, n. 1, p. 281-288, 1975.

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

PINA, M.; SEVERINO, L.S.; BELTRÃO, N.E.M.; VILLENEUVE, P.; LAGO, R. Novas alternativas de valorização para dinamizar a cultura da mamona no Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 22, n. 2, p. 453-462, 2005.

PINKERTON, S. D.; ROLFE, R.; AULD, D. L.; GHETIE, V.; LAUTERBACH, B. F. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 353-357, 1999.

RAO, P. V.; JAYARAJ, R.; BHASKAR, A. S.; KUMAR, O.; BHATTACHARYA, R.; SAXENA, P.; DASH, P. K.; VIJAYARAGHAVAN, R. Mechanism of ricin-induced apoptosis in human cervical cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 69, n. 5, p. 855-865, 2005.

RECH, E. L.; VIANNA, G. R.; ARAGÃO, F. J. L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants. **Nature Protocols**, London, v. 3, n. 3, p. 410-418, 2008.

RIBEIRO, S. K. Aposta no Biodiesel: Combustível feito à base de grãos pode aliviar a demanda por diesel e diminuir o impacto no efeito estufa. **Scientific American Brasil**, São Paulo, v. 5, n. 53, p. 60, 2006.

ROBERTS, L. M.; LAMB, F. I.; PAPPIN, D. J.; LORD, J. M. The primary sequence of *Ricinus communis* agglutinin. Comparison with ricin. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 260, n. 29, p. 5682-5686, 1985.

ROBERTS, L. M.; TREGGAR, J. W.; LORD, J. M. Molecular cloning of ricin. **Targeted Diagnosis and Therapy**, New York, v. 7, p. 81-97, 1992.

SAILAJA, M.; TARAKESWARI, M.; SUJATHA, M. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via particle gun-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. **Plant Cell Reports**, New York, v. 27, n. 9, p. 1509-1519, 2008.

SANDVIG, K.; VAN DEURS, B. Entry of ricin and *Shiga* toxin into cells: molecular mechanisms and medical perspectives. **EMBO Journal**, Oxford, v. 19, n. 22, p. 5943-5950, 2000.

SANTOS, R. F. dos; KOURI, J.; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; FIRMINO, P. T.; REQUIÃO, L. E. G. Aspectos Econômicos do Agronegócio da Mamona. In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. 2 ed. rev. amp. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 23-41.

SAVY FILHO, A. Melhoramento da Mamona. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. p. 429-452.

SEVERINO, L. S. **O que sabemos sobre a torta da mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 31 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 134).

SEVERINO, L. S.; FREIRE, R. M. M. Subprodutos. In: SEVERINO, L. S.; MILANI, M.; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **Mamona: o produtor pergunta, a Embrapa responde**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica; Campina Grande: Embrapa Algodão, 2006. p. 220-231. (Coleção 500 perguntas, 500 respostas).

SHEWRY, P. R.; NAPIER, J. A.; TATHAM, A. S. Seed storage protein: structure and biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville, v. 7, n. 7, p. 945-956, 1995.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Euphorbiaceae**. In: SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. p. 364-374, 2005.

SPHYRIS, N.; LORD, J. M.; WALES, R.; ROBERTS, L. M. Mutational analysis of the *Ricinus* lectin B-chains. Galactose-binding ability of the 2- γ subdomain of *Ricinus communis* agglutinin B-chain. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 270, n. 35, p. 20292-20297, 1995.

SUJATHA, M.; REDDY, T. P. Differential cytokinin effects on the stimulation of *in vitro* shoot proliferation from meristematic explants of castor (*Ricinus communis* L.). **Plant Cell Reports**, New York, v. 17, n. 6-7, p. 561-566, 1998.

SUJATHA, M.; SAILAJA, M. Stable genetic transformation of castor (*Ricinus communis* L.) via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer using embryo axes from mature seeds. **Plant Cell Reports**, New York, v. 23, n. 12, p. 803-810, 2005.

TAMBASCIA, M. B.; TEIXEIRA, J. P. F. Mamona: determinação quantitativa do teor de óleo. **Bragantia**, Campinas, v. 45, n. 1, p. 23-27, 1986.

TREGEAR, J. W.; ROBERTS, L. M. The lectin gene family of *Ricinus communis*: cloning of a functional ricin gene and three lectin pseudogenes. **Plant Molecular Biology**, The Hague, v. 18, n. 3, p. 515-525, 1992.

TULLY, R. E.; BEEVERS, H. Protein bodies of castor bean endosperm: isolation, fractionation, and the characterization of protein components. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 58, n. 6, p. 710-716, 1976.

YOSHITAKE, S.; FUNATSU, G.; FUNATSU, M. Isolation and sequences of peptic peptides and the complete sequence of Ile chain of ricin D. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 42, p. 1267-1274, 1978.

YOULE, R. J.; HUANG, A. H. C. Protein bodies from the endosperm of castor bean. Subfractionation protein components: lectins, and changes during germination. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 58, n. 6, p. 703-709, 1976.

Desafios na destoxificação da torta de pinhão-manso

Simone Mendonça

José Antônio de Aquino Ribeiro

Introdução

A fim de diversificar a matriz energética brasileira, promover o desenvolvimento regional e a geração de renda, o governo federal estabeleceu a inserção do biodiesel na matriz energética a partir de 2005 com o lançamento do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, sendo a partir de 2008, obrigatória a adição de um percentual de biodiesel ao diesel empregado no setor de transportes. Muitas fontes de óleos vegetais podem ser empregadas a fim de obter biodiesel por transesterificação, e a escolha da matéria-prima deve ser sempre baseada em aspectos técnicos e econômicos de cada cultura, em cada uma das regiões do Brasil.

O Brasil conta com a maior área potencialmente agricultável do mundo, possuindo quase duzentas espécies de plantas oleaginosas e palmáceas aptas para produção de óleo para biodiesel, com destaque para soja, amendoim, girassol, gergelim, nabo-forrageiro, mamona, dendê, macaúba e pinhão-manso entre outras. No momento, apenas a soja é cultivada em escala suficiente e tem logística de processamento para a produção comercial de biodiesel e, por isso, cerca de 80% do biodiesel brasileiro provém dessa leguminosa.

No entanto, a soja possui inconvenientes, como o baixo teor de óleo (aproximadamente 19%) e consequente baixo rendimento de óleo por hectare (300 a 700 kg/hectare). Além disso, esbarra em questões sociais, econômicas e ambientais que giram em torno da produção de um combustível a partir de uma cultura alimentar e de commodities (BELTRÃO, 2008; CARVALHO, 2012).

O pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) é uma Euphorbiacea perene, originária da América Central, mas amplamente distribuída no mundo (OVANDO-MEDINA et al., 2011). É considerada uma das oleaginosas alternativas mais promissoras, pois além da fácil propagação e ampla adaptação a diversas condições de solo, possui um alto teor de óleo (em torno de 37%) e boa produtividade (930 a 1.250 kg de óleo/hectare) para uma planta que ainda está em fase de domesticação e estabelecimento do sistema de produção agrícola (DURAES et al., 2011).

A produção do biodiesel gera alguns subprodutos, os quais devem ser foco de análises mais detalhadas, pois podem ser fator determinante para a viabilidade econômica da produção desse combustível. Ainda são incipientes os estudos acerca do aproveitamento desses subprodutos como elementos de viabilização da cadeia produtiva.

No caso da *Jatropha curcas*, após a extração do óleo da semente por processo de prensagem mecânica, ao resíduo/coproduto formado dá-se o nome de torta de pinhão-manso, que contém ainda um teor residual de óleo que varia de 5 a 14%, dependendo da eficiência da extração. Quando a retirada do óleo é feita pela ação de solventes (hexano), gera-se então o farelo de pinhão-manso, com teor de óleo inferior a 1%, da mesma forma que ocorre para a soja (MANDARINO; ROESSING, 2001). Tanto a torta quanto o farelo são ricos em nitrogênio, fósforo e potássio e matéria orgânica, sendo empregados, por isso, como fertilizante. Além disso, apresentam alto teor de proteína (no mínimo 16%), e por isso podem ser utilizados como ingredientes de rações para animais.

Considerando a mais complexa forma de extração, que seria a com solvente a partir do albúmen, a partir de uma tonelada de grãos, se produziriam 639 kg de albúmen (teor de óleo em 56,7%) e o potencial de produção de óleo seria de 362 kg. Ou seja, para obter uma tonelada de óleo precisaríamos produzir, no mínimo, 2,76 toneladas de farelo (MAKKAR; BECKER, 2009).

Apesar deste expressivo volume gerado e características nutricionais apresentadas, o uso da torta para alimentação animal ainda não é possível devido à presença de compostos bioativos, como fatores antinutricionais (inibidores de tripsina e fitatos), tóxicos (curcuma e ésteres de forbol) e alergênicos (proteínas 2S). Os ésteres de forbol são os principais componentes tóxicos presentes na torta do pinhão-manso, e quando ingeridos podem agir no organismo de forma aguda (resposta inflamatória intensa) ou crônica (indução de tumor). Por ser lipossolúvel, grande parte dos ésteres de forbol é extraída juntamente com o óleo. No entanto, quantidades mínimas que ficam nas tortas, devido à extração mecânica menos eficiente, por exemplo, já são capazes de causar danos a diversas espécies animais (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009; MAKKAR et al., 1997; MARTINEZ-HERRERA et al., 2006).

Composição de torta e farelo

Ao realizar comparações entre diferentes trabalhos da literatura, é importante atentar à composição do material que se está estudando, pois as tortas e farelos de pinhão-manso podem ser muito diferentes. Essa variação é dependente de alguns fatores como: o material genético inicial, o método empregado na extração de óleo (químico ou mecânico) e a utilização de grão descascado ou ainda com o seu tegumento. A distribuição do óleo é desigual nas diferentes partes do grão. Na Tabela 1, está representada a composição das diferentes partes do pinhão-manso. A relação em peso albúmen:casca geralmente, gira em torno de 65:35 (MAKKAR; BECKER, 2009).

Na literatura internacional, são comuns trabalhos que citam rendimento de extração de óleo em pinhão-manso na faixa de 60%. Este valor geralmente está expresso em relação ao peso do albúmen (que é a semente descascada) e em base seca (descontando a umidade do material), com extração com solventes em escala laboratorial (MAKKAR; BECKER, 2009). Com base nestes dados de literatura, muitos produtores criaram expectativas (que foram frustradas) em obter este nível de rendimento na extração industrial aqui no Brasil. No entanto, nacionalmente, a maioria das tortas é produzida sem descascamento da semente, e a extração é feita mecanicamente, o que leva a um rendimento bastante inferior de óleo, e uma torta de composição diversa do farelo produzido a partir da extração com solvente do albúmen, por dois motivos. O primeiro deles é que a extração mecânica não é tão eficiente quanto a extração por solvente, deixando ainda boa parte de óleo da torta (6-14%). Outro motivo é que a casca possui alto teor de fibra, diluindo ainda mais a proteína existente no resíduo. No farelo proveniente do albúmen, em base seca e extração com solventes, não há residual de óleo, água ou fibras oriundas da casca para diluir a proteína existente, por isso alcançam-se níveis de 50 a 60% de proteína nesse material (Figura 1).

Devappa e Swamylingappa (2008) compararam resíduos obtidos a partir do mesmo material, por métodos diferentes. Um deles foi descascado à mão e extraído com solvente em laboratório, e apresentou 60,3% de proteína; ao passo que outro material não descascado foi macerado e posteriormente extraído com solvente, e apresentou 22,1% de teor de proteína. Na Tabela 2 estão apresentadas as composições de algumas tortas farelos de pinhão-manso.

Durante a extração do óleo, os grãos de pinhão-manso passam por cozimento prévio e esmagamento subsequente em prensas tipo "expeller". Por ser lipossolúvel, grande parte dos ésteres de forbol é extraída juntamente com o óleo, mas permanece também na torta devido ao fato da extração mecânica não retirar totalmente o

óleo presente. Pode-se reextrair esta torta com o uso de solventes orgânicos (hexano, etanol, etc). No entanto, no Brasil, por questões econômicas tem predominado o esmagamento mecânico dos grãos.

Quando grandes quantidades de pinhão-manso estiverem disponíveis, a extração com solvente poderia se tornar uma opção economicamente viável, produzindo o farelo (estima-se que seja necessário para isso processar 200 a 500 toneladas/dia) com composição mais apropriada para ração animal. No entanto, mesmo em amostras com baixo teor de óleo (0,6%), obtidas por extração com éter de petróleo por 16 horas em equipamento tipo Soxhlet, encontrou-se concentração de ésteres de forbol de 3,85 mg/g na torta desengordurada (MARTINEZ-HERRERA et al., 2006).



Figura 1. Casca do fruto, grão ainda com o tegumento (casca), torta produzida mecanicamente a partir de grão com casca e óleo de pinhão-manso. (Foto: Daniela Collares).

Tabela 1. Composição química de diferentes partes do pinhão-mansó.

Constituintes	Casca	Albúmen
Cinzas (%)	4,6-6,1	3,6-5,0
Lipídeos (%)	0,7-1,4	53,9-57,8
Proteína (%)	4,3-5,8	22,2-27,7
Fibra Detergente Neutro (%)	83,9-89,6	3,5-4,8
Fibra Detergente Acido (%)	74,6-79,8	2,6-3,0
Lignina (%)	45,1-47,5	0-0,2

Fonte: Makkar et al. (1998a).

Tabela 2. Composição da torta de pinhão-mansó obtida por diferentes processamentos.

	Albúmen/ solvente ^(a)	Com casca/ solvente ^(b)	Albúmen/ solvente ^(b)	Com casca/ mecânica ^(c)	Com casca/ mecânica ^(d)	Com casca/ mecânica + solvente ^(d)
Proteína	60,3	22,1	56,4	24,4	23,6	26,1
Lipídeos	0,6	0,8	1,5	6,0	8,4	0,2
Cinzas	9,0	10,2	9,6	16,7	5,4	6,2
Carboidratos	26,1 *	49,5 *	9,00 **	nd	49,3 **	49,7 **

* calculado por diferença ** fibra detergente neutro nd: não determinado; (a) Devappa e Swamylingappa (2008); (b) Aderibigbe et al. (1997); (c) Makkar et al. (2008); (d) Mendonça (dados não publicados).

Qual o componente tóxico?

Diversos estudos com animais, ruminantes (bovinos e caprinos) e não ruminantes (camundongos, ratos, frangos, peixe, humanos), demonstraram que as sementes são tóxicas, e dependendo da dose podem levar os animais à morte (ADAM, 1974; AHMED; ADAM, 1979; EL BADWI et al., 1992). Em ruminantes foram testadas doses agudas de 2,5 g de sementes/kg de peso do animal/dia e crônicas de 0,025 g de sementes/kg de peso do animal/dia por 14 dias. Ambas as doses levaram todos os animais à morte. O quadro clínico-patológico envolveu desde diarreia, dispneia, desidratação até hemorragia no rúmen, pulmões, rins e coração, congestão e edema pulmonares, associados com alguns achados patológicos. Estes e outros efeitos vêm sendo relacionados à presença nos grãos de dois fatores: a curcina e ésteres de forbol.

A curcina já foi considerada a molécula responsável pela toxicidade do pinhão-mansão, conforme descrito em publicações científicas (CANO-ASSELEIH et al., 1989, ADAM, 1974; AHMED; ADAM, 1979; EL BADWI et al., 1992) e protocolo de atendimento dos Centros de Informação Toxicológica (CIT's) brasileiros. É uma proteína capaz de inibir a síntese proteica ao nível ribossomal (proteína inibidora ribossomal) de forma semelhante à ação da ricina da mamona sendo, porém, 1000 vezes menos tóxica. Isso se deve ao fato de que a porção tóxica da curcina não está ligada por pontes de dissulfeto a uma proteína chamada lectina, que é quem promove a entrada da curcina na célula, necessária ao início da atividade citotóxica (KING et al., 2009).

As publicações de duas décadas atrás buscavam equivocadamente avaliar processos de destoxificação aferindo a quantidade presente de curcina de forma indireta, por meio da determinação da lectina (ADERIBIGBE et al., 1997; AREGHEORE et al., 1998;). Por esse motivo, tortas que pareciam quimicamente destoxificadas, demonstraram-se tóxicas quando administradas a animais

(MAKKAR; BECKER, 1999; BELEWU, 2008 citado por BELEWU et al., 2010). A presença da curcina na semente de pinhão-manso não seria, portanto, uma barreira ao seu uso na nutrição animal.

Os ésteres de forbol são as substâncias mais tóxicas do pinhão manso, por serem indutores da formação de tumores e de resposta inflamatória. O efeito toxicológico dos ésteres de forbol é tão importante que, quando não estão presentes nas sementes, a “variedade” passa a ser chamada de atóxica, embora os outros fatores como a curcina e antinutricionais (inibidores de tripsina, fitato, saponina) continuem presentes (MAKKAR et al., 1997 e 1998a). Além destes compostos, recentemente, foi identificada por um grupo de pesquisas brasileiro uma proteína com potencial alergênico semelhante à albumina 2S da mamona (MACIEL et al., 2009). Até 2009 não havia comprovação da existência de acessos atóxicos no Brasil, havendo registros em algumas regiões do México. Recentemente, o grupo de pesquisa da Embrapa Agroenergia conseguiu identificar três acessos no banco ativo de germoplasma (BAG) (LAVIOLA et al., 2010; LAVIOLA et al., 2011) da Unidade.

Não é possível eliminar o éster de forbol por tratamento térmico, nem tampouco alterar o teor de fitato, mas os componentes proteicos podem ser desnaturados por um tratamento térmico adequado (MAKKAR et al., 1997).

Ésteres de forbol

Os ésteres de forbol são um grupo de substâncias tóxicas encontradas nas sementes do pinhão-manso que agem como cocarcinogênicos, causando efeito celular e bioquímico adverso aos animais. Segundo Goel e colaboradores (2007), os ésteres de forbol imitam a ação do diacilglicerol (DAG), ativador da proteína quinase C, a qual regula diferentes sinais de vias de tradução e outras atividades metabólicas, ocorrendo naturalmente em muitas plantas da família *Euforbiaceae* e *Timelaeaceae* (GANDHI et al.,

1995). A atividade biológica dos ésteres de forbol é altamente específico-estrutural. Eles são encontrados em baixíssimas concentrações, porém, animais que receberam essas substâncias na dieta, manifestaram sinais de intoxicação (GOEL et al., 2007).

Quimicamente, os ésteres de forbol são derivados do diterpeno tigliane, compostos policíclicos nos quais duas hidroxilas em carbonos vizinhos são esterificadas com ácidos graxos. O tetradecanol forbol-13-acetato (TPA) é um éster de forbol biologicamente ativo disponível comercialmente com elevado grau de pureza (Figura 2). O TPA é utilizado como padrão para ensaios de quantificação de ésteres de forbol, embora não seja encontrado naturalmente no pinhão-mansão.

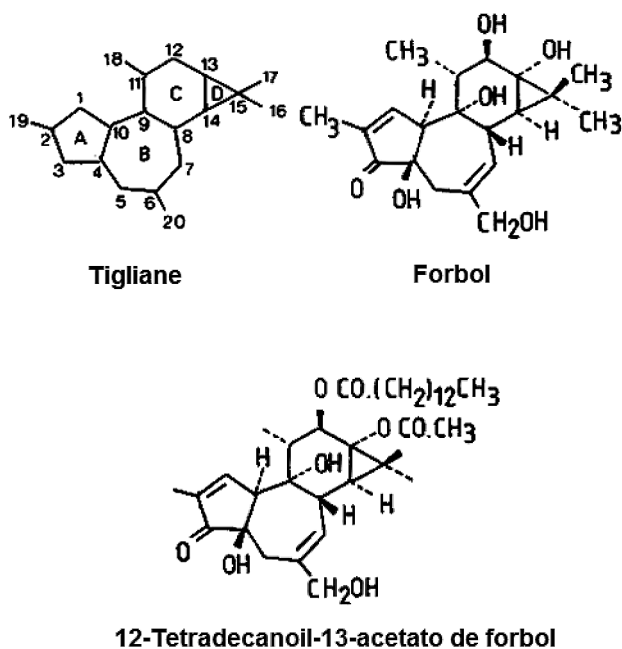


Figura 2. Estruturas químicas do diterpeno tigliane, do núcleo forbol e do TPA. (Fonte: GOEL et al., 2007).

Haas e colaboradores (2002) isolaram, a partir de óleo de semente de pinhão-manso, seis diferentes ésteres diterpênicos que foram identificados como ésteres de forbol (Figura 3). Os seis compostos têm em comum um núcleo 12-desoxi-16-hidroxforbol, e foram descritos pelos autores como fatores *Jatropha* C1 a C6 conforme a distribuição de carbonos nas cadeias laterais. No entanto, não existem dados disponíveis sobre possíveis diferenças de toxicidade entre os fatores *Jatropha* isolados.

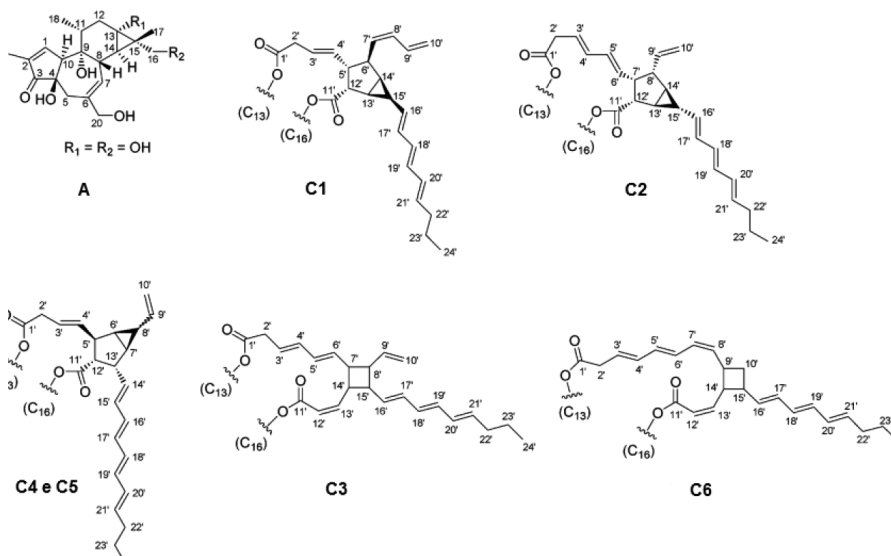


Figura 3. Estruturas químicas do núcleo 12-desoxi-16-hidroxforbol (A) e dos fatores *Jatropha* C1 a C6. (Fonte: HAAS et al., 2002).

Dados analíticos

A metodologia analítica amplamente utilizada para determinação dos teores de ésteres de forbol em amostras de pinhão-manso baseia-se na quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em

fase reversa (octadecilsilano) e detecção na região do ultravioleta (280 nm). O TPA é utilizado como substância de referência, e os teores são expressos como ésteres de forbol totais em equivalente de TPA. Os métodos publicados em diversos trabalhos são derivados do método originalmente publicado por Makkar e colaboradores (1997), com tempo de análise superior a 80 minutos por corrida cromatográfica, tornando-o inviável para uso em uma rotina de controle de processo. O método descrito por Makkar apresenta ainda outras limitações, relacionadas à exatidão e à seletividade, que serão discutidas a seguir.

No que tange à exatidão, a expressão do teor em equivalentes de TPA pode superestimar a quantidade de ésteres de forbol presentes na amostra, uma vez que a absorvidade molar do TPA em 280 nm é significativamente menor que a dos ésteres naturalmente presentes no pinhão-mansão. Na Figura 4 são apresentados espectros de absorção do TPA na região do ultravioleta e de um éster de forbol típico encontrado em amostras de pinhão-mansão. Desta forma, a exatidão no processo de quantificação só poderia ser atingida se cada substância presente no pinhão-mansão fosse isolada, caracterizada, avaliada sobre a real potencialidade tóxica e, assim, usada como verdadeiro padrão de referência.

A estratégia de isolamento dos ésteres de forbol, no entanto, apresenta outro desafio: ao coletar individualmente cada uma das frações contendo ésteres de forbol separadas por cromatografia líquida de alta eficiência, verificou-se rápida degradação das mesmas em poucas horas. Essa instabilidade dos ésteres nas frações cromatográficas isoladas contrasta com os resultados encontrados para os extratos metanólicos brutos obtidos a partir da torta de pinhão-mansão, nos quais os ésteres de forbol levam semanas para se degradar, mesmo em temperatura ambiente (ROACH et al., 2012).

Outra limitação do método disponível para quantificação de ésteres de forbol refere-se à seletividade, especialmente quando se deseja avaliar o efeito de tratamentos químicos ou biológicos em processos

de destoxificação. Os espectros B e C apresentados na Figura 4 são derivados de picos cromatográficos obtidos a partir de extratos de igual concentração de torta de pinhão-manso antes e depois de processo microbiológico de destoxificação. O espectro C corresponde a um pico intenso obtido após o tratamento microbiológico da torta. O pico apresenta tempo de retenção compatível com a região onde eluem os picos de ésteres de forbol, e máximo de absorção na região do ultravioleta em torno de 280 nm, mas apresenta intensidade quatro vezes superior à dos picos observados previamente ao tratamento. Utilizando somente um detector de arranjo de diodos, não é possível distinguir se o referido pico corresponde a um éster de forbol ou a algum metabólito desconhecido do microrganismo empregado, gerando um fator complicador para a avaliação da efetividade do processo.

As limitações do método proposto por Makkar e colaboradores (1997) podem ser superadas utilizando novas técnicas analíticas e diferentes técnicas de detecção. A utilização de novas colunas com tamanho de partícula reduzido e maior eficiência de separação, aliada à cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), oferecem perspectiva para ganho em resolução dos picos de ésteres de forbol e redução do tempo de análise em até 10 vezes, aumentando a produtividade e reduzindo significativamente o consumo de solventes. O acoplamento da cromatografia líquida à espectrometria de massas é uma alternativa racional para contornar o problema da seletividade, permitindo avaliar, com maior segurança, o efeito de processos químicos e microbiológicos de destoxificação de torta de pinhão-manso. Testes preliminares já estão sendo realizados na Central de Análises Químicas e Instrumentais da Embrapa Agroenergia, e os resultados obtidos até o momento são promissores (ABDELNUR et al., 2012).

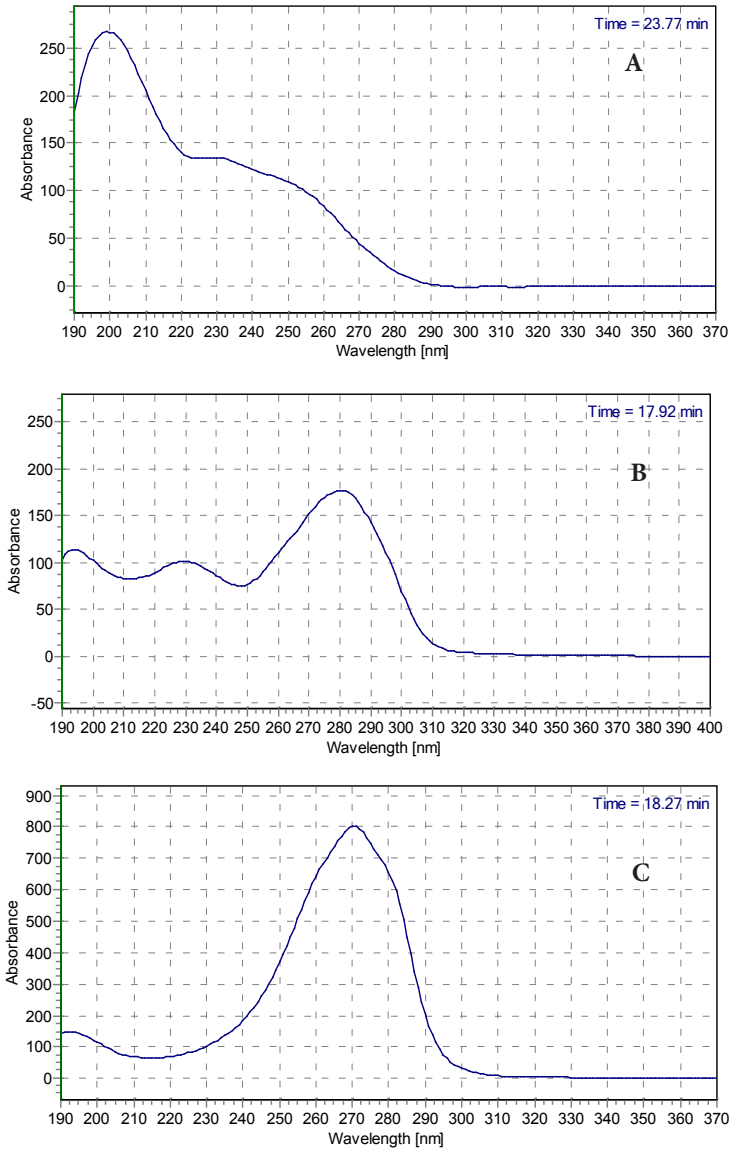


Figura 4. Espectros de absorção no ultravioleta do TPA (A), de éster de forbol típico encontrado em amostra de torta de pinhão-mansó (B) e de composto desconhecido obtido após tratamento microbiológico para destoxificação de torta de pinhão-mansó (C).

Processos de destoxificação da torta

A transformação da torta de pinhão-manso em um produto atóxico (ausência de éster de forbol) que possa ser usado para alimentação animal despertou a atenção de diversos pesquisadores no mundo e alguns avanços tem sido realizados (Tabela 3). No México, onde existe a variedade atóxica, é comum as pessoas torrarem as amêndoas antes de ingeri-las. A torragem afeta apenas os inibidores de tripsina e a atividade da lectina (MAKKAR et al., 1998b), mas os outros componentes não são afetados pelo tratamento térmico (ADERIBIGBE et al., 1997). O calor úmido é mais eficiente em reduzir a atividade da lectina que o calor seco (AREGHEORE et al., 1998). Foi observado por Chivandi e colaboradores (2004) que a extração por solvente dupla (hexano e etanol) associadas com o calor úmido (autoclavagem) foi capaz de inativar totalmente os inibidores de tripsina e lectinas. A extração com solvente dupla (éter de petróleo e etanol) associada ao tratamento com bicarbonato de sódio (0,07%) além de eliminar o efeito das lectinas, reduziu em 95,8% o teor de éster de forbol (MARTINEZ-HERRERA et al., 2006).

Em 1999 Makkar e Becker, na Alemanha, conseguiram produzir torta destoxificada que, ao ser oferecida aos animais, não causou morte ou qualquer outro dano; no entanto este trabalho foi realizado a partir das variedades mexicanas atóxicas. Recentemente, em 2010 foi publicado um novo estudo deste grupo (KUMAR et al., 2010) que alega ter chegado à destoxificação da torta, sendo a mesma testada em carpas. O estudo trata do descascamento do grão, extração com solvente, e o processo envolve tratamento com álcali, seguido de dois tratamentos com álcool de cadeia curta (metanol ou etanol), com aquecimento, filtração e posterior autoclavagem. Em 2011 foi depositado pedido de patente (MAKKAR; BECKER, 2011) de uma estratégia de destoxificação ainda mais complexa, com extração de proteína em pH básico, centrifugação, precipitação no ponto isoelétrico associada à adição de metanol para auxiliar na destoxificação, nova centrifugação, lavagem do precipitado com álcool e posterior autoclavagem. Este

grande número de operações poderia inviabilizar economicamente a produção de ingrediente para aplicação em ração animal.

Tratamentos baseados em fermentação em estado sólido também são empregados (BELEWU et al., 2010; JOSHI et al., 2011; XIAO et al., 2011). A inclusão de microrganismos capazes de degradar as substâncias tóxicas é uma estratégia promissora, e em alguns casos os tratamentos levam a menores teores de ésteres de forbol que aqueles obtidas por tratamento químico (BARROS et al., 2011; XIAO et al., 2011). No entanto, a cinética dos processos fermentativos é mais lenta e para tratamentos em larga escala podem ser necessárias grandes áreas. Além disso, é necessário aprofundar-se no estudo da segurança do produto final, uma vez que estes microrganismos podem secretar substâncias nocivas, tornando o produto semelhante ou pior que as da torta original (SINGH et al., 2010). Nesse sentido, o acompanhamento de cada fase da destoxificação é necessário.

A Embrapa Agroenergia vem desenvolvendo pesquisas em duas estratégias, sempre focando em processos simples e de baixo custo para serem viáveis economicamente para produtores de pequeno e médio porte.

A primeira estratégia refere-se à identificação de materiais genéticos cujos grãos não apresentem toxidez (éster de forbol) e a posterior incorporação desta característica em cultivares comerciais. O éster de forbol é predominante na maioria dos acessos, na faixa de 0,82 a 3,85 mg/g de albúmen (MAKKAR et al., 1998). A Embrapa Agroenergia está constituindo e caracterizando um banco ativo de germoplasma (BAG) de pinhão-manso com acessos do Brasil, e exterior, particularmente da América Central, onde está o provável centro de origem da espécie e variedades consideradas atóxicas. Por meio de caracterização fenotípica, identificaram-se alguns materiais contrastantes, e dentre estes foram identificados três acessos de origem brasileira que podem ser considerados atóxicos (LAVIOLA et

Tabela 3. Estratégias de destoxificação presentes na literatura.

Autor do Estudo (Ano/País)	Estratégias Testadas/Resultados
Makkar et al. (1998b/ Alemanha)	Tostagem inativa inibidores de tripsina, mas não tem efeito sobre ésteres de forbol, saponina ou fitato. Limitação da pesquisa: não validada em testes com animais
Makkar e Becker (1999/ Alemanha)	Variedade não-tóxica submetida a tratamento de 121oC/30min: redução de 83% do inibidor de tripsina e 99% da lectina (forma errônea de avaliar indiretamente a curcina). -Teste em ratos: tratamento térmico foi apenas parcialmente efetivo -Teste em carpas: com torta tratada ou não, houve perda de peso.
Aregheore et al. (2003/ Samoa + Alemanha)	Materiais foram descascados manualmente, moídos e desidratados em soxhlet com éter de petróleo. Vários tratamentos subsequentes foram testados, os melhores (redução de ésteres do forbol) foram: a) Calor úmido 121oC/30min + Lavar 4 vezes c/ metanol (95%) b) Hidróxido de sódio 4% + Hipoclorito de sódio 10% + 121oC/30min (93%) - Substituindo a ração de ratos em 16%: o tratamento (a) foi o melhor.
Chivandi et al. (2006/ Zimbábue)	Tratamento: descascamento mecânico, seguido de maceração com hexano por 8hs, seguida de 3 extrações com hexano a 30oC por 45min/cada; secar a sombra e extração com etanol 95% 35oC; autoclavagem 90oC/30min, seguida da extrusão e finalmente 3 extrações com hexano 45min/30oC, seguida de autoclavagem a 121oC/30min. - Teste em porcos (nível de adição de 1 a 5%): diarreia a partir do 14o dia, anemia e outras alterações sanguíneas - Limitação: alto custo e trabalhoso e baixo desempenho em ensaios animais.

Continua...

Tabela 3. Continuação.

Autor do Estudo (Ano/País)	Estratégias Testadas/Resultados
Martinez-Herrera et al. (2006/ México e Alemanha)	<p>Materiais foram descascados manualmente e desengorduradas em soxhlet com éter de petróleo por 16hs. Vários tratamentos subsequentes foram testados (bicarbonato, autoclavagem, extração com etanol e irradiação. Melhores tratamentos (% redução de ésteres de forbol):</p> <p>a) Extração com Etanol a 90% por 2 horas (96%)</p> <p>b) Extração com Etanol por 2 horas seguida de adição de Bicarbonato e autoclavagem 121oC-25min (98%)</p> <p>- Limitações do estudo: alto custo e não testada em animais</p>
Belewu et al. (2010/Nigéria)	<p>Experimentos com caprinos (50% substituição): Torta tratada com <i>Aspergillus Níger</i> ou <i>Tricoderma longbrachiatum</i></p> <p>- Todos animais alimentados com dietas experimentais tiveram redução na ingesta, e alguns morreram.</p> <p>-Limitação do estudo: não foram quantificados os ésteres de forbol</p>
Kumar et. al. (2010/ Alemanha)	<p>Semente é descascada manualmente, desengordurada com éter de petróleo em soxhlet por 60 minutos, sofre tratamento com solventes por 60 minutos e é submetida à autoclavagem 121oC- 15 minutos</p> <p>- Teor de éster de forbol foi para níveis não detectáveis.</p> <p>- Experimento com carpas, substituição de até 50% da ração: nenhum animal morreu, foi tão eficiente no crescimento das carpas quanto a soja.</p> <p>- Limitação: dificuldades no descascamento</p>

al., 2010). Estes, no entanto, parecem apresentar menor rendimento e maior susceptibilidade a pragas. Atualmente cruzamentos estão sendo realizados para buscar ausência de toxidez e boa produtividade.

A segunda estratégia refere-se ao uso de um dos tratamentos:

a) processos de extrusão termoplástica associada ao uso de aditivos químicos, b) lavagem com solventes ou, c) biotransformação (uso de fungos/leveduras). O objetivo principal dos tratamentos é a destoxificação da torta com foco na retirada ou na modificação da molécula dos ésteres de forbol, de forma que a mesma perca sua atividade tóxica, além da redução da alergenicidade e da atividade antinutricional.

Nos experimentos de bancada para a extração com solventes foram testados diferentes tempos de extração, temperaturas, a sequência dos solventes, e os resultados foram aferidos na forma de teor de óleo e ésteres de forbol extraídos. O tratamento, que usou solventes de diferentes polaridades, em sequência, alcançou o melhor resultado, com redução de aproximadamente 90% do teor de ésteres de forbol. Quando as mesmas condições foram ampliadas para a escala piloto, extraído em bateladas de 25 kg, esta redução foi menos eficiente, mas mesmo assim apresentou importante redução, na casa dos 83%. Este experimento piloto foi repetido em dois anos diferentes, com a mesma eficiência. O teor de ésteres de forbol na torta in natura (torta semi-desengordurada) era de 0,92 mg/g e o material tratado com solvente ficou com 0,16 mg/g de amostra.

No tratamento por extrusão, foram processados dois tipos de torta de pinhão-manso: semidesengordurada e desengordurada, oriundas do tratamento com solventes em escala piloto. As variáveis independentes analisadas foram: temperatura na terceira zona da extrusora ($^{\circ}\text{C}$), umidade das misturas (%U), e porcentual de cal ou de hidróxido de sódio ou peróxido de hidrogênio (%). O efeito combinado das variáveis foi analisado para observar a

incidência nos fatores determinantes. Foi conduzido um experimento estatisticamente delineado em metodologia do tipo central composto rotacional de segunda ordem, com três níveis. O equipamento utilizado na fase inicial, para realizar todos os tratamentos foi uma extrusora Brabender monorosca DSE 20DN (Duisburg, Alemanha).

A adição de cal, peróxido de hidrogênio e hidróxido de sódio nas diferentes condições de processo avaliadas e o tipo de torta de pinhão-manso utilizado (semi-desengordurado e desengordurado) tiveram efeitos significativos na extrusabilidade, nas propriedades tecnológicas e nos fatores antinutricionais e tóxicos das tortas semi-desengorduradas e desengorduradas de pinhão-manso extrusadas (COSTA et al, 2010; FERREIRA et al., 2010; ORTIZ et al., 2010). Neste estudo não houve correlação entre a redução de teor de compostos antinutricionais e dos ésteres de forbol. A redução da ação citotóxica *in vitro* da curcina foi maior nos tratamentos com cal. E dentre os 120 tratamentos estudados, aquele que promoveu maior redução de ésteres de forbol (aproximadamente 98%) foi o que empregou torta desengordurada e adição de aproximadamente 4% de hidróxido de sódio, em determinadas condições de extrusão. Ainda estão sendo testadas formas de fazer *scale up* dessas condições.

No tratamento com microrganismos compararam-se fungos isolados a partir da própria torta de pinhão-manso com outros conhecidamente produtores de esterases. O microrganismo predominante foi isolado e identificado, e com 15 dias de fermentação em estado sólido houve redução de 83% dos ésteres de forbol. Novos testes estão sendo executados e será testada a associação com tratamento com solventes e avaliada se houve ou não a formação de outros metabolitos fúngicos potencialmente perigosos aos animais.

Em experimentos *in vivo* de desempenho de 24 ovinos por 60 dias, comparam-se animais que receberam feno de tifton (*Cynodon dactylon*) *ad libitum* (volumoso) e com a substituição

de 20, 40 e 60% do concentrado com torta de pinhão-manso naturalmente atóxica ou tratada com solvente (redução de 80% dos ésteres de forbol) atingindo sempre 20% de proteína bruta, comparando-se com grupo controle que era de concentrado de soja sem a inclusão da torta (OLIVEIRA et al., 2013).

No experimento com a torta tratada, a ingestão média de concentrado e de volumoso encontrada (782,5 g/dia) foi avaliada como abaixo da recomendação, com exceção do grupo controle (890,30 g/dia), quando comparadas com a recomendação para ovinos com maturidade tardia do National Research Council (2007), de 820 g de matéria seca (MS)/dia para animais de 20 kg de peso vivo e de 1,05 kg de MS/dia para animais com 30 kg de peso vivo. Tanto o consumo total (g/dia), ganho médio diário de peso (GMD) (g/animal/dia) e a conversão alimentar apresentaram redução à medida que a torta destoxificada foi incluída na dieta, representando assim relações lineares negativas. Dessa forma, o consumo de MS total foi menor no grupo que recebeu dieta contendo 60% de pinhão-manso no concentrado (Figura 5), provavelmente ocasionado pela menor aceitabilidade do pinhão-manso descrita por Makkar e colaboradores (1998a), devida à presença dos ésteres de forbol.

Observa-se, assim, que a torta de pinhão-manso destoxificada com solventes não foi bem aceita pelos animais (baixo consumo de concentrado) e que o consumo do volumoso também foi afetado quando comparada a dieta controle. Essa redução no consumo também foi observada por Araújo e colaboradores (2010) que encontraram valores médios de 1444,92, 298,48, 191,45 e 88,68g/dia para a inclusão de 0, 15, 30 e 45% de casca do fruto do pinhão-manso na dieta.

No experimento com o material naturalmente atóxico o GMD variou de 116 a 137 g/animal/dia não havendo diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 4). Esses valores estão próximos daqueles encontrados em ovinos da raça Santa Inês com dieta contendo 60% de volumoso e 40% de concentrado em animais confinados (LOUVANDINI

et al., 2007). Da mesma forma não houve diferença na conversão alimentar ($P < 0,05$), mesmo para o tratamento que recebeu 60% de torta de pinhão-manso atóxica e o controle, o que sugere bom aproveitamento da ração e comprovando que não houve problemas de aceitabilidade da torta de pinhão-manso atóxica. Ou seja, uma vez resolvida a questão da toxidez, nutricionalmente a torta de pinhão-manso é tão vantajosa quanto o concentrado de soja (OLIVEIRA, 2013).

Os dados referentes às pesagens e características das carcaças deste teste de desempenho tais como o peso final, peso em jejum, peso da carcaça quente (PCQ), peso da carcaça fria (PCF), rendimento de carcaça quente (RCQ) e as perdas no resfriamento (PR) foram semelhantes em todos os tratamentos; e o rendimento da carcaça fria (RCF) apresentou regressão linear positiva, com sutil melhora no rendimento com o maior nível de inclusão de torta, que pode ter sido ocasionado pela alta degradabilidade que a torta atóxica apresentou segundo dados descritos nos ensaios *in vitro* (OLIVEIRA, 2013).

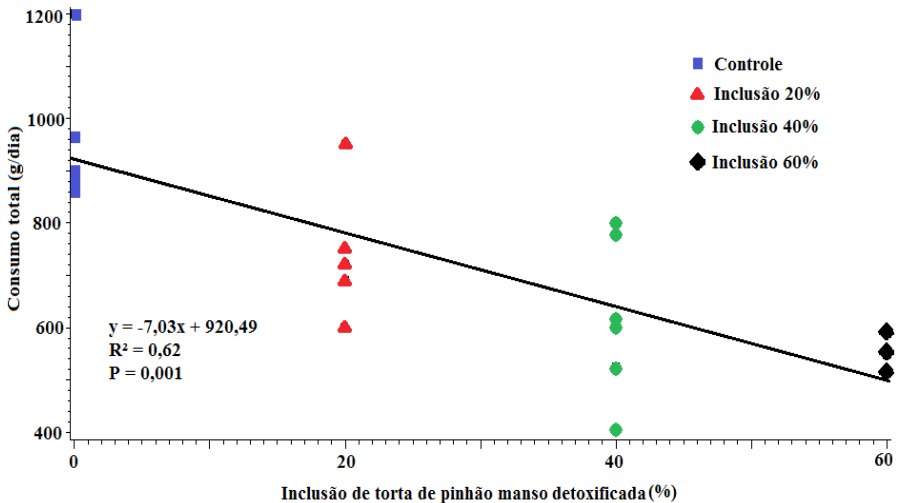


Figura 5. Consumo total (g/dia) em função da inclusão da torta de pinhão-manso detoxificada. (Fonte: OLIVEIRA, 2012)

Os resultados sugerem que o resíduo de pinhão-manso atóxico (não havendo presença do éster de forbol), anteriormente descartado pelas indústrias por não ter valor econômico, pode ser utilizado na nutrição de ruminantes com bons resultados econômicos e de produção.

Tabela 4. Peso inicial, consumo de matéria seca diária e ganho diário de peso (GMD) e conversão alimentar de ovinos alimentados com ou sem torta de pinhão-manso atóxica. (Fonte: OLIVEIRA, 2012)

	CO ¹	20%	40%	60%	CV ² (%)	Regressão	
						Linear	Quadrática
Peso inicial (kg)	19	19	19	18,1	4,9	NS ³	NS
Consumo total (g/dia)	1.053,8	1.002,1	1.013,8	1.010,7	21	NS	NS
GMD (g/animal/dia)	137	122	129	116	17	NS	NS
Conversão alimentar	7,8	7,3	7,6	6,9	15	NS	NS

¹CO: Grupo controle (sem inclusão de torta e pinhão manso); 20%: inclusão de 20% de pinhão manso na PB; 40%: inclusão de 40% de pinhão manso na PB; 60%: inclusão de 60% de pinhão manso na PB;

²CV = coeficiente de variação;

³NS = não significativo.

Considerações finais

Os estudos realizados até o momento demonstram ser viável a utilização da torta de pinhão-manso na dieta de ruminantes desde que completamente isenta de ésteres de forbol. Para melhor controle da eficiência de cada processo é necessário o desenvolvimento de metodologias analíticas mais precisas e rápidas, antes dos bioensaios. Estudos de viabilidade econômica e *scale up* ainda são raros, o que não permite, até o momento, que as tecnologias sejam disponibilizadas para o setor produtivo.

Referências

- ABDELNUR, P. V.; RIBEIRO, J. A. A.; IGLESIAS, A. H.; ROGRIGUES, C. M.; LAVIOLA, B. G.; MENDONÇA, S. Development of an ultra-fast method to detection of phorbol ester in *Jatropha curcas* using UHPLC-MS. In: PRIMER CONGRESO ARGENTINO DE ESPECTROMETRIA DE MASA, 2012, Los Cocos. [Anais...]. Cordoba: Sociedad Argentina de Espectrometria de Masa, 2012.
- ADAM, S. E. I. Toxic effects of *Jatropha curcas* in mice. **Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 67-76, 1974.
- ADERIBIGBE, A. O.; JOHNSON, C.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; FOIDL, N. Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 67, n. 2-3, p. 223-243, 1997.
- AHMED, O. M. M.; ADAM, S. E. I. Effects of *Jatropha curcas* on calves. **Veterinary Pathology**, Lawrence, v. 16, n. 4, p. 476-482, 1979.

ARAÚJO, V. L. BRITO, S. S.; NEIVA, J. N. M.; BARRETO, P. M.; FERREIRA, O. R.; LIMA, F. G.; RAMOS, A. T.; FIORAVANTI, M. C. S.; MARUO, V. M.; FERREIRA, A. C. H. Inclusão de casca de pinhão-manso em dietas de ovinos: consumo voluntário e caracterização de quadro toxicológico. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 62, n. 5, p. 1255-1258, 2010.

AREGHEORE, E. M. MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Assessment of lectin activity in a toxic and a non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and haemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 77, n. 3, p. 349-352, 1998.

AREGHEORE, E. M.; BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. **The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences**, Victoria v. 21, p. 50-56, 2003.

BARROS, C. R. M.; FERREIRA, L. M. M.; BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A.; GUEDES, C. V.; CONE, J. W.; MARQUES, G. S. M.; RODRIGUES, M. A. M. The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v. 11, n. 1, p. 107-110, 2011.

BELEWU, M. A.; BELEWU, K. Y.; OGUNSOLA, F. O. Nutritive value of dietary fungi treated *Jatropha curcas* kernel cake: voluntary intake, growth and digestibility coefficient of goat. **Agriculture and Biology Journal of North America**, Milford, v. 1, n. 2, p. 135, 2010.

BELTRÃO, N. E. M. Considerações gerais sobre o pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas, desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras. 2008. Disponível em: <www.mda.gov.br/saf/arquivos/0705910897.doc>. Acesso em: 14 abr. 2008.

CANO-ASSELEIH, L. M.; PLUMBLY, R. A.; HYLANDS, P. J. Purification and partial characterization of the hemagglutination from seeds of *Jatropha curcas*. **Journal of Food Biochemistry**, Westport, v. 13, n. 1, p. 1-20, 1989.

CARVALHO, P. T. de. **Balanco de emissões de gases de efeito estufa de biodiesel produzido a partir de soja e dendê no Brasil**. 2012. 153 f. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) - Universidade Federal do Rio de Janeiro - COPPE, Rio de Janeiro, RJ.

CHIVANDI, E.; MTIMUNI, J. P.; READ, J. S.; MAKUZA, S. M. Effect of processing method on the phorbol ester concentration, total phenolics, trypsin inhibitor activity and the proximate composition of the Zimbabwean *Jatropha curcas* provenance: a potential live stock feed. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, [Lahore], v. 7, n. 6, p. 1001-1005, 2004.

CHIVANDI, E.; ERLWANGER, K. H.; MAKUZA, S. M.; READ, J. S.; MTIMUNI, J. P. Effect of dietary *Jatropha curcas* meal on percent packed cell volume, serum glucose, cholesterol and triglyceride concentration and alpha-amylase activity of weaned fattening pigs. **Research Journal of Animal and Veterinary Sciences**, Amman, v. 1, n. 1, p. 18-24, 2006.

COSTA, C. V.; ORTIZ, J. A. R.; TAKEITI, C. Y.; ASCHERI, J. L. R.; CARVALHO, C. W. P.; MENDONÇA, S.; CORRÊA, R. F.; ANDRADE, K. C. S. Efeito da adição de cal (CaO) nas propriedades tecnológicas de torta de pinhão manso desengordurada processada por extrusão termoplástica. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD EXTRUSION, 2., 2010, Rio de Janeiro. **Resumos expandidos**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010.

DEVAPPA, R. K.; SWAMYLINGAPPA, B. Biochemical and nutritional evaluation of *Jatropha* protein isolate prepared by steam injection heating for reduction of toxic and antinutritional factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 88, n. 5, p. 911– 919, 2008.

DURAES, F. O. M.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Potential and challenges in making physic nut (*Jatropha curcas* L.) a viable biofuel crop: the Brazilian perspective. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 6, n. 43, p. 1-8, 2011.

EL BADWI, S. M.; MOUSA, H. M.; ADAM, S. E.; HAPKE, H. J. Response of brown hisex chicks to low levels of *Jatropha curcas*, *Ricinus communis* or their mixture. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 34, n. 4, p. 304-306, 1992.

FERREIRA, R. C.; COSTA, C. V.; ORTIZ, J. A. R.; ASCHERI, J. L. R.; TAKEITI, C. Y.; CARVALHO, C. W. P.; MENDONÇA, S.; ANDRADE, K. C. A. Influência dos parâmetros de processamento e adição de NaOH nas propriedades mecânicas e densidade aparente de extrudados de torta de pinhão manso desengordurada. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD EXTRUSION, 2., 2010, Rio de Janeiro. **Resumos expandidos**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010.

GHANDI, V. M.; CHERIAN, K. M.; MULKY, M. J. Toxicological studies on Ratanjyot oil. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 39-42, 1995.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, Philadelphia, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

HAAS, W.; STERK, H.; MITTELBAACH, M. Novel 12-Deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**, Washington, DC, v. 65, n. 10, p. 1434-1440, 2002.

JOSHI, C.; MATHUR, P.; KHARE, S. K. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 102, n. 7, p. 4815-4819, 2011.

KING, A. J.; HE, W.; CUEVAS, J. A.; FREUDENBERGER, M.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I. Potential of *Jatropha curcas* as a source of renewable oil and animal feed. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 10, p. 2897-2905, 2009.

KUMAR, V.; MAKKAR, H. P. S.; AMSELGRUBER, W.; BECKER, K. Physiological, haematological and histopathological responses in common carp (*Cyprinus carpio* L.) fingerlings fed with differently detoxified *Jatropha curcas* kernel meal. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 8-9, p. 2063-2072, 2010.

LAVIOLA, B. G.; MENDONCA, S.; RIBEIRO, J. A. de A. Caracterização de acessos de pinhão-manso quanto a toxidez. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. **Inclusão social e energia: anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010.

LAVIOLA, B. G.; BHERING, L. L.; MENDONÇA, S.; ROSADO, T. B.; ALBRECHT, J. C. Morpho-agronomic characterization of the germplasm bank of *Jatropha* young stage. **Bioscience Journal**, Uberlandia, v. 27, n. 3, p. 371-379, 2011.

LOUVANDINI, H.; NUNES, G. A.; GARCIA, J. A. S.; McMANUS, C.; COSTA, D. M.; ARAÚJO, S. C. Desempenho, características de carcaça e constituintes corporais de ovinos Santa Inês alimentados com farelo de girassol em substituição ao farelo de soja na dieta. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, DF, v. 36, n. 3, p. 603-609, 2007.

MACIEL, F. M.; LABERTY, M. A.; OLIVEIRA, N. D.; FELIX, S. P.; SANTOS SOARES, A. M. VERICIMO, M. A.; TAVARES MACHADO, O. L. A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seed and assessment of its allergenic properties. **Peptides**, New York, v. 30, n. 12, p. 2103-2107, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, 1997.

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

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. **Detoxification of *Jatropha curcas* meal for feeding to farm animal species and fish**. US20110311710 A1, 22 dez. 2011.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added coproducts. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 111, n. 8, p. 773–787, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutritional studies on rats and fish (carp *Cyprinus carpio*) fed diets containing unheated and heated *Jatropha curcas* meal of non-toxic provenance. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 53, n. 3, p. 183-192, 1999.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SCHMOOK, B. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 52, n. 1, p. 31-36, 1998b.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Protein concentrate from *Jatropha curcas* screw-pressed seed cake and toxic and antinutritional factors in protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 88, n. 9, p. 1542-1548, 2008.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. **Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos**. Londrina: Embrapa Soja, 2001. 40 p. (Embrapa Soja. Documentos, 171).

MARTINEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DAVILA-ORTIZ, G.; BECKER, K. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food Chemistry**, Oxon, v. 96, n. 1, p. 80-89, 2006.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (Estados Unidos). Committee on Nutrient Requirements of Small Ruminants. **Nutrient requirements of small ruminants sheep, goats, cervids, and new world camelids**. Washington, D.C.: National Academies Press, c2007. 362 p.

OLIVEIRA, P. B. **Degradabilidade ruminal *in vitro* e desempenho de ovinos suplementados com pinhão manso**. 2012. 73 p. Dissertação de Mestrado - Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Brasília, DF.

OLIVEIRA, P. B.; LIMA, P. M. T.; CAMPECHE, A.; MENDONÇA, S.; LAVIOLA, B. G.; MCMANUS, C.; LOUVANDINI, H. Growth and carcass characteristics of Santa Inês lambs fed diet supplemented with physic nut meal free of phorbol ester. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 114, n. 1, p. 20-25, 2013.

ORTIZ, J. A. R.; FERREIRA, R. C.; COSTA, C. V.; CARVALHO, C. W. P.; MENDONCA, S.; TAKEITI, C. Y.; ASCHERI, J. L.; ANDRADE, K. C. S. Análisis comparativo del efecto de adición de bases, humedad de la mezcla y temperatura en el proceso de optimización de la extrudabilidad de torta desgrasada de piñon manso (*Jatropha curcas* L.). In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD EXTRUSION, 2., 2010, Rio de Janeiro. **Resumos expandidos**. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos, 2010.

OVANDO-MEDINA, I.; ESPINOSA-GARCÍA, F. J.; NÚÑEZ-FARFÁN, J. S.; SALVADOR-FIGUEROA, M. State of the art of genetic diversity research in *Jatropha curcas*. **Scientific Research and Essays**, Lagos v. 6, n. 8, p. 1709-1719, 2011.

RAKSHIT, K. D.; DARUKESHWARA, J.; RAJ, K. R.; NARASIMHAMURTHY, K.; SAIBABA, P.; BHAGYA, S. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 12, p. 3621-3625, 2008.

ROACH, J. S.; DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; Becker, K. Isolation, stability and bioactivity of *Jatropha curcas* phorbol esters. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 83, n. 3, p. 586–592, 2012.

SINGH, M. P.; LEIGHTON, M. M.; BARBIERI, L. R.; ROLL, D. M.; URBANCE, S. E.; HOSHAN, L.; MCDONALD, L. A. Fermentative production of self-toxic fungal metabolites. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Heidelberg, v. 37, n. 4, p. 335-340, 2010.

XIAO, J.; ZHANG, H.; NIU, L.; WANG, X.; LU, X. Evaluation of detoxification methods on toxic and antinutritional composition and nutritional quality of proteins in *Jatropha curcas* meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 59, n. 8, p. 4040-4044, 2011.

Destoxificação Biológica de Torta de Pinhão-manso

Maria Catarina Megumi Kasuya

José Maria Rodrigues da Luz

Lisa Presley da Silva Pereira

Marcelo Teixeira Rodrigues

Híário Cuquetto Mantovani

Introdução

Jatropha curcas Linnaeus (1753) pertence à família Euphorbiaceae, a mesma da mamona (GANDHI et al., 1995). Trata-se de uma espécie nativa da América Tropical e bastante cultivada na África e na Ásia (HAAS et al., 2002). Essa planta vem sendo utilizada para prevenir e, ou controlar erosões, para formar cerca viva, especialmente para conter animais de fazenda (HELLER, 1996) e possui, ainda, um considerável potencial na produção de biodiesel (KUMAR; SHARMA, 2008; LU et al., 2009) e biogás (DHANYA et al., 2009).

O biodiesel é produzido a partir de óleos vegetais, comestíveis e não comestíveis e de gorduras animais, por meio do processo de transesterificação (OPENSHAW et al., 2000). Esse processo utilizando a polpa do fruto de pinhão-manso libera um resíduo sólido denominado de torta (OPENSHAW et al., 2000; PATIL; DENG, 2009). A torta obtida como subproduto da extração do óleo é um material complexo e apresenta composição diversificada contendo celulose, hemicelulose,

lignina, extrativos, água, sais minerais, proteínas (GUBITZ et al., 1999; SRICHAROENCHAikul et al., 2007), ésteres de forbol e fatores antinutricionais (MAKKAR et al., 1997). A torta contém ainda curcina, uma proteína tóxica, similar à ricina oriunda da extração do óleo da mamona, o que a torna imprópria para a alimentação animal (GOEL et al., 2007). Contudo, a destoxificação desses resíduos pode permitir a utilização como suplemento alimentar rico em proteínas na alimentação de aves, suínos, bovinos e peixes (GUBITZ et al., 1999; STAUBMANN et al., 1999). Com isso, o obstáculo crucial no estabelecimento de *J. curcas* como uma cultura comercial seria superado devido à destoxificação das sementes e do próprio óleo (HAAS et al., 2002).

Compostos tóxicos do fruto de pinhão-manso

A toxicidade das sementes de *J. curcas* é atribuída, principalmente, a um grupo de ésteres diterpênicos denominados ésteres de forbol, que estão presentes em variedades tóxicas, mas ausentes ou em quantidades traço em variedades não tóxicas oriundas do México (MAKKAR et al., 1998).

Os ésteres de forbol ativam a proteína quinase C (SILVA et al., 1995; MORAES et al., 1996; SLATER et al., 2002; SARAIVA et al., 2004), uma enzima chave na transdução de sinal em resposta a vários hormônios e a processos de desenvolvimento da maioria das células e tecidos animais. Assim, a ativação de quinase C por interação prolongada com forbol pode levar a resposta mitogênica e, consequentemente, a geração de tumor (ROTENBERG; WEINSTEIN, 1991).

Estudos da composição química de *J. curcas* levaram à suposição de que as sementes dessa oleaginosa contêm até seis tipos de ésteres de forbol (ADOLF et al., 1984; WINK et al., 2000; HAAS et al., 2002).

Os ésteres de forbol não podem ser eliminados pelo tratamento térmico, por serem estáveis e suportarem temperaturas elevadas

(AREGHEORE et al., 2003). No entanto, é possível reduzir a concentração desses compostos por meio de tratamentos químicos (MAKKAR et al., 1997; HAAS; MITTELBACH, 2000) ou associação entre tratamento físico e químico (AREGHEORE et al., 2003). Segundo Aregheore e colaboradores (2003), essa associação parece ser mais benéfica, pois além de reduzir as concentrações dos forbóis, neutraliza também a lectina das sementes de *J. curcas*.

Além dos ésteres de forbol presentes no fruto de pinhão-manso, encontra-se também uma proteína tóxica, denominada curcina. Essa proteína isolada de sementes de *J. curcas*, apresenta duas cadeias polipeptídicas e, em estudos *in vitro*, é capaz de inibir a síntese proteica (STRIPE et al., 1976; KUMAR; SHARMA, 2008). Curcina, também denominada de proteína inativadora de ribossomo, provoca irritação na mucosa gastrointestinal e tem ação hemaglutinante (BARBIERI, 1993).

Fatores antinutricionais presentes no fruto de pinhão-manso

O ácido fítico ou ácido hexafosfórico mio-inositol é um composto encontrado nas sementes de plantas (FRANCIS et al., 2001), formado durante o processo de maturação (TORRE et al., 1991). Esse ácido tem efeito negativo na disponibilidade de alguns minerais, por exemplo, cálcio, ferro, zinco e fósforo (GRAF; EATON, 1984; ULLAH; PHILLIPPY, 1994; LIANG et al., 2009) e na digestão de amido (YOON et al., 1983). Devido à ação quelante, o ácido fítico forma complexos insolúveis com esses minerais (GRAF; EATON, 1984) e também com proteínas e aminoácidos (RAVINDRAN et al., 1999), dificultando a digestão e, conseqüente, absorção desses nutrientes. A semente de *J. curcas* possui alta concentração desse ácido, o qual pode representar até 10% da massa seca (MAKKAR et al., 1997).

Apesar do ácido fítico ser considerado estável ao calor (DESHPANDE; DAMODARAN, 1990), resultados demonstram redução significativa do teor desse fator antinutricional presente em alimentos e/ou ração

animal, pela temperatura de cozimento e de esterilização em autoclave por diferentes períodos de tempo (CARLSON; POULSEN, 2003; PORRES et al., 2004; REHMAN; SHAH, 2005). Por outro lado, na ração animal, principalmente de peixes e aves, tem sido adicionado enzima fitase de origem microbiana para eliminação desse ácido e também para aumentar a disponibilidade de minerais, proteínas e aminoácidos (AHMAD et al., 2000; DENSTADLI et al., 2007). A enzima fitase pertence à família das enzimas histinas fosfatases ácidas, que catalisam a hidrólise do ácido fítico e gera inositol e fosfato inorgânico (ULLAH; PHILLIPPY, 1994). Essa fosfatase tem sido identificada em vários gêneros de fungos (COLLOPY; ROYSE, 2004; RAMACHANDRAN et al.; 2005) e em vegetais (GARCHOW et al., 2006).

Os taninos são polifenóis de origem vegetal solúveis em água e em solventes polares (MAKKAR; BECKER, 1998). O teor desses taninos no fruto de *J. curcas* é considerado baixo, representando apenas 3% da massa seca (MAKKAR et al., 1998). Os taninos também são considerados fator antinutricional por inibir a digestão de proteínas (REHMAN; SHAH, 2005). Em razão da capacidade de precipitar proteínas, a adstringência de alguns frutos e plantas é provocada pela formação de complexo insolúvel com esses nutrientes (REED, 1995).

As concentrações de taninos presentes em alimentos vegetais podem ser reduzidas por tratamento térmico, e temperatura de cozimento (REHMAN; SHAH, 2005; SOMSUB et al., 2008; WANG et al., 2009), ou podem ser degradados por fungos (FAN et al., 2006; ALEMAWOR et al., 2009). Essa degradação biológica deve-se à atividade da enzima tanino-acil-hidrolase, denominada de tanase. Essa enzima hidrolisa a ligação éster em taninos, liberando glicose e ácido gálico (BANERJEE et al., 2005) e pode ser sintetizada por fungos (SHARMA et al., 2008) e bactérias (AGUILAR et al., 2001) na presença de ácido tânico.

Destoxificação biológica da torta de pinhão-manso

A redução dos teores de ésteres de forbol abaixo do nível considerado tóxico é de 95% dos teores de fatores antinutricionais pode ser obtida pela inoculação de *Pleurotus ostreatus* (pedido de patente nº 182 Universidade Federal de Viçosa, 2012, INPI BR 10 2010 002912-0). A remoção dos ésteres de forbol a esse nível ainda não foi conseguido, nem com tratamento térmico nem com tratamento químico aplicado à torta de pinhão-manso (AREGHEORE et al., 2003, HAAS; MITTELBECH, 2000). Em adição, não foi observado nenhum sintoma clínico de intoxicação em cabritos alimentados com a torta de pinhão-manso colonizada por *P. ostreatus* (PEREIRA, 2011). Esses dados confirmam a destoxificação biológica da torta de pinhão-manso.

Os substratos à base da torta de pinhão-manso e resíduos agroindustriais foram preparados, conforme mistura apresentada na Tabela 1, com umidade em 75% da capacidade de retenção. De cada substrato foram pesados 1,5 kg e colocados em sacos de polipropileno com capacidade de 2 kg. Em seguida, os substratos contidos nos sacos foram autoclavados a 121°C por 1 h. Após esterilização e resfriamento, esses substratos foram inoculados com micélio de *P. ostreatus* e incubados a 25°C por 45 dias.

Tabela 1. Composição do substrato e proporção dos resíduos agroindustriais adicionados à torta de pinhão-manso para cultivo de *Pleurotus ostreatus*

Substrato	Componentes da mistura	Substrato (kg)	
		Torta	Resíduo Agroindustrial
To	Torta	20	0
ToSe10	Torta + 10% de serragem de eucalipto	18	2
ToCe10	Torta + 10% de casca de eucalipto	18	2

A composição química dos substratos, antes e depois do tratamento térmico a 121°C, e os principais minerais presentes na torta de pinhão-manso estão apresentados na Tabela 2. A composição dos substratos foi bastante alterada depois do tratamento térmico, e em geral, houve uma significativa redução da composição, principalmente de lignina, celulose, ésteres de forbol e fatores antinutricionais (Tabela 2).

Após 15 dias de inoculação, verificou-se a completa colonização dos substratos contidos nos sacos de polipropileno por *P. ostreatus* PLO 6 (Figura 1).

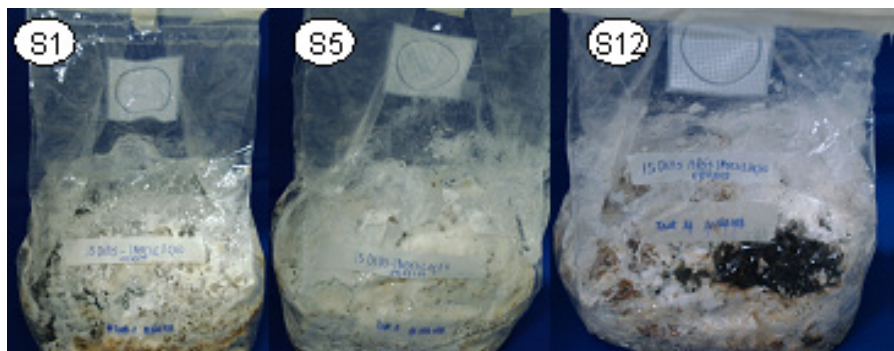


Figura 1. Crescimento micelial de *P. ostreatus* PLO 6 em substratos à base da torta de pinhão-manso ou em mistura com resíduos agroindustriais após 15 dias de incubação. S1 – Torta, S5 - Torta + 10% de serragem de eucalipto e S12 - Torta + 10% de casca de eucalipto.

Degradação de ésteres de forbol

A degradação de ésteres de forbol por *P. ostreatus* PLO 6 foi de até 99%, após 60 dias de incubação. Essa alta percentagem de degradação foi maior que as obtidas em processos químicos de desodorização, desacidificação e branqueamento aplicados ao óleo e à semente de *J. curcas* (HASS; MITTELBACH, 2000; RAKSHIT et al., 2008). Esses mesmos processos químicos, com exceção do branqueamento (AHMED; SALIMON, 2009) e tratamentos com diferentes produtos

químicos (AREGHEORE et al., 2003) aplicados à semente de *J. curcas*, não foram eficientes na redução desses compostos.

Além disso, depois de 45 dias de incubação com *P. ostreatus*, a concentração residual de ésteres de forbol foi em média 2×10^{-4} mg g⁻¹ da massa seca. Esta concentração é menor do que o nível tolerável (0,09 mg g⁻¹, AREGHEORE et al., 2003). Portanto, *P. ostreatus* tem a capacidade de degradar ésteres de forbol oriundos da torta de pinhão-manso, e assim, destoxificar esse resíduo proveniente de matéria-prima usada para a produção do biodiesel.

Degradação de fatores antinutricionais

Independente do substrato, a degradação de taninos por *P. ostreatus* PLO 6 foi crescente em função do tempo de incubação, com maior percentagem de redução (90%) entre 15 e 30 dias de incubação nos substratos com casca de eucalipto (DA LUZ et al., 2013). A alta capacidade de degradação desses compostos foi também mostrada em *Pleurotus* sp cultivado em cascas de café por 60 dias de incubação (FAN et al., 2006), *P. sajor-caju* em resíduos de café (WONG; WANG, 1991) e *P. ostreatus* em casca de cacau (ALEMAWOR et al., 2009). A degradação de taninos pode estar relacionada à atividade de tanase, cuja presença já foi relatada em diferentes gêneros fúngicos, a exemplo de *Aspergillus* (BATRA; SAXENA, 2005; AGUILAR et al., 2001), *Penicillium* (BATRA; SAXENA, 2005; SHARMA et al., 2008) e *Paecilomyces* (BATTESTIN; MACEDO, 2007). Portanto, *P. ostreatus* PLO 6 mostrou-se capaz de degradar taninos presentes na torta de pinhão-manso e também nos outros substratos utilizados.

O ácido fítico presente nos substratos foi degradado pela ação da enzima fitase, liberando inositol e fosfato inorgânico (ULLAH; PHILLIPPY, 1994; DA LUZ et al., 2013). A presença dessa enzima já foi mostrada em diferentes gêneros de fungos, como *Aspergillus* (ULLAH; PHILLIPPY, 1994; WYSS et al.,

Tabela 2. Percentagem de compostos químicos, orgânicos e minerais, presentes na torta de pinhão-mansô pura ou em mistura com resíduos agroindustriais utilizado como substratos para cultivo do fungo *Pleurotus ostreatus* PLO 6

Compostos	Teores nos substratos (mg g ⁻¹)					
	Antes			Depois		
	Autoclavagem					
	To	ToSe10	ToCe10	To	ToSe10	ToCe10
Lignina	37,59 ± 3,76	34,80 ± 4,11	29,28 ± 3,41	30,34 ± 2,56	31,41 ± 1,65	27,12 ± 2,80
Celulose	5,62 ± 1,02	9,47 ± 0,55	12,91 ± 0,95	4,93 ± 0,60	7,99 ± 0,50	8,21 ± 0,38
Monossacarídeos	8,25 ± 1,14	7,51 ± 0,11	6,30 ± 0,67	25,88 ± 5,64	14,96 ± 3,16	17,91 ± 1,49
Taninos*	2,50 ± 0,12	0,95 ± 0,44	3,01 ± 0,70	1,24 ± 0,34	0,56 ± 0,09	1,49 ± 0,11
Ácido fítico	3,08 ± 0,28	2,31 ± 0,02	2,33 ± 0,17	1,08 ± 0,007	0,77 ± 0,009	0,77 ± 0,001
Fósforo	4,57 ± 0,44	2,66 ± 0,35	3,30 ± 0,44	8,93 ± 1,66	9,49 ± 0,56	10,54 ± 0,59
Ésteres de forbol	1,07 ± 0,02	0,63 ± 0,01	0,72 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,56 ± 0,001
Proteína solúvel	0,51 ± 0,07	0,64 ± 0,13	0,74 ± 0,13	0,22 ± 0,02	0,57 ± 0,02	0,56 ± 0,02
Proteína Total	21,50	nd	nd	nd	nd	nd
Nitrogênio	3,44	nd	nd	nd	nd	nd
Manganês	0,044	nd	nd	nd	nd	nd
Ferro	0,35	nd	nd	nd	nd	nd
Cobre	0,022	nd	nd	nd	nd	nd

Tabela 2. Continuação.

Compostos	Teores nos substratos (mg g ⁻¹)				
	Autoclavagem				
	Antes		Depois		
	To	ToCe10	To	ToSe10	ToCe10
Zinco	0,036	nd	nd	nd	nd

*Teor equivalente a ácido tânico.

nd – não determinado. To – Torta de pinhão-mansó, ToSe10 – Torta de pinhão-mansó + 10% de serragem de eucalipto e ToCe10 – Torta de pinhão-mansó + 10% de casca de eucalipto, conforme descrito na Tabela 1.

1999), *Agaricus*, *Lentinula*, *Pleurotus* (COLLOPY; ROYSE, 2004) e *Rhizopus* (RAMACHANDRAN et al., 2005).

A atividade de fitase foi capaz de reduzir em 95% a concentração de ácido fítico (DA LUZ et al., 2013). O alto nível de degradação desse fator antinutricional pela atividade de fitase microbiana foi também mostrado em meio de cultura com adição de resíduos de colza (EI-BATA; KAREM, 2001) e também em diferentes alimentos (CARLSON; POULSEN, 2003, LIANG et al., 2009). Além da redução de ácido fítico, a adição de fitase em rações animais, objetiva a maior disponibilidade de minerais, tais como fósforo, cálcio, zinco e ferro (AHMAD et al., 2000; LIANG et al., 2009), pois esse ácido forma complexos insolúveis com cátions di e polivalentes, comprometendo a biodisponibilidade desses minerais (LIANG et al., 2009).

Pode-se concluir que *P. ostreatus* PLO 6 tem a capacidade de degradar fatores antinutricionais, como taninos e ácido fítico, presentes na torta de pinhão-manso e nos outros substratos, possibilitando a utilização desses resíduos na ração animal. Além disso, a possibilidade da produção e da extração da enzima fitase para ser utilizada em alimentos ou como suplemento em ração animal é promissora.

Utilização da torta de pinhão-manso

Alimentação animal com torta bio-destoxificada

A alimentação corresponde de 55 a 75% dos custos de produção de ruminantes, dependendo da atividade e tipo de exploração (HADJIPANAYIOTOU, 1987). A utilização de alimentos alternativos, como os resíduos e subprodutos agrícolas, representa uma forma de minimizar os gastos com alimentação.

Dentre os resíduos da cadeia de produção do biodiesel a partir do pinhão-manso, a torta apresenta potencial de uso como alimento proteico na dieta de ruminantes. Porém, a presença de compostos tóxicos tem limitado essa alternativa, havendo necessidade de submetê-la a um processo de destoxificação.

Em experimento conduzido no Setor de Caprinocultura do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, em Viçosa – MG, utilizando 24 fêmeas caprinas da raça Alpina, com idade média de cinco meses e $20 \pm 1,5$ kg de massa corporal, foram avaliados os efeitos da inclusão de diferentes níveis de torta de pinhão-manso bio-destoxificada na dieta. O ensaio experimental teve duração de 72 dias, sendo 12 dias de adaptação às dietas e 60 dias para coleta de dados. Os níveis de inclusão estudados foram: 0, 7, 14 e 20% na matéria seca da dieta (PEREIRA, 2011). A inclusão da torta de pinhão-manso às dietas promoveu aumento no consumo de matéria seca, e não foi observado nenhum sintoma clínico de intoxicação ou alterações nos padrões hematológicos e bioquímicos no sangue dos animais utilizados. Portanto, a torta de pinhão-manso bio-destoxificada pode ser utilizada com segurança, em até 20% da matéria seca na dieta de caprinos como alimento alternativo, como sugere o estudo realizado.

Produção de enzimas

A colonização fúngica da torta de pinhão-manso, além de destoxificar esse resíduo do biodiesel, produz diversas enzimas de interesse industriais, como por exemplo, as enzimas ligninocelulolíticas (lacase, manganês peroxidase, celulasas e xilanases), tanases e fitases. A produção dessas enzimas para diversas aplicações na indústria têxtil, vinícola, alimentícia e em processos de biorremediação de poluentes industriais, pode ser obtida após a fermentação semissólida da torta de pinhão-manso com fungos da podridão branca.

Em trabalho realizado utilizando a torta de pinhão-manso no Laboratório de Associação Biológica Micorrízicas/UFV foi observada

a produção e atividade das enzimas descritas por *P. ostreatus* e outros fungos da podridão branca (DA LUZ, 2009). O grupo está na etapa de purificação e aplicação dessas enzimas para eliminar compostos tóxicos e fatores antinutricionais da torta de pinhão-manso sem a necessidade de incubação com o fungo.

Produção de cogumelos

Os cogumelos *P. ostreatus* possuem alto valor nutricional e são fontes de proteínas, carboidratos, vitaminas B₁, B₂ e B₃ e minerais (DUNDAR et al., 2009). A produção desse alimento utilizando a torta de pinhão-manso é uma alternativa interessante, mas requer outros estudos, pois foi observado que os cogumelos podem absorver os ésteres de forbol do substrato.

Os substratos foram preparados conforme Tabela 1. Os sacos de polipropileno contendo os substratos com crescimento micelial (Figura 1), após 28, 43 e 58 dias de incubação, foram colocados na câmara fria a 10°C por 48 h ou mergulhados em água fria pelo mesmo tempo. A frutificação dos cogumelos foi realizada em ambiente refrigerado com temperatura controlada em 18°C (Figura 2). A colheita foi realizada com o chapéu fechado, por ter mais valor comercial.

Independente do substrato, observou-se alta produtividade de cogumelos durante 60 dias de incubação, com maior produção nos substratos com serragem e casca de eucalipto (Tabela 3).



Figura 2. Cogumelos produzidos pelo de *P. ostreatus* PLO6 crescidos em substratos à base da torta de pinhão-manso ou em mistura com diferentes resíduos agroindustriais.

Foi evidenciada a presença de ésteres de forbol nos cogumelos de *P. ostreatus*, o qual foi influenciado de forma decrescente em função do tempo de incubação (DA LUZ et al., 2013). Essa concentração de ésteres de forbol absorvida pelos cogumelos, independentemente do tempo de incubação, foi 1000 vezes menor que a concentração desses compostos encontrada em variedade de *J. curcas*, não tóxicas do México (MAKKAR et al., 1998, DA LUZ et al., 2013). A variedade de *J. curcas* cultivada no México apresentou concentração de 0,11 mg g⁻¹ de ésteres de forbol, e não foi tóxica para peixes, ratos e frangos (MAKKAR; BECKER, 1998). Segundo esses autores, as sementes dessas variedades não tóxicas são consumidas por humanos e frangos. Porém, concentrações iguais ou maiores a 0,8 mg g⁻¹ ocasionaram diarreia em suínos (CHIVANDI et al., 2006); redução do apetite e da atividade motora em ratos (RAKSHIT et al., 2008), como também, irritação e necrose na pele de ratos, coelhos e camundongos (GANDHI et al., 1995). A alta concentração desse composto causa também inibição da proteína quinase C em ratos (MORAES et al., 1996) e em células do fibroblasto (SLATER et al., 2002). Portanto, os cogumelos *P. ostreatus* produzidos na torta de pinhão-mansó devem ser utilizados em experimentos com animais para comprovar a ausência de toxicidade.

Tabela 3. Produtividade de cogumelo *P. ostreatus* PLO 6 incubado durante 60 dias em substrato à base da torta de pinhão-mansó.

Tempo de incubação (dia)	Produtividade (g kg ⁻¹ da massa seca dia ⁻¹)		
	Substrato		
	To	ToSe10	ToCe10
33	9,491	21,456	27,121
45	1,545	7,838	5,438
60	0	0,433	0
Total	11,036	29,727	32,559

Considerações finais

O resíduo de pinhão-manso tende a aumentar com a produção de biodiesel e devido a essa abundância é preciso dar um destino adequado ao mesmo. Ao longo deste capítulo apresentamos o desenvolvimento de nova tecnologia para destoxificar a torta de pinhão-manso, bem como suas aplicações, com intuito de adicionar valor econômico e minimizar possíveis danos ambientais causados pelo descarte inadequado desse resíduo. Sabemos da necessidade de mais estudos para consolidação do uso do pinhão-manso na cadeia produtiva do biodiesel. No entanto, por enquanto, podemos concluir que:

- *P. ostreatus* tem capacidade de degradar ésteres de forbol, ácido fítico, taninos e compostos lignocelulósicos encontrado na torta de pinhão-manso;
- Torta de pinhão-manso destoxificada com *P. ostreatus* apresenta alto potencial para ser utilizada na alimentação de caprinos, em até 20% na matéria seca total da dieta.
- A torta de pinhão-manso apresenta potencial para ser utilizado como substrato para produção de cogumelos, um alimento com alto valor nutritivo. No entanto, mais estudos devem ser realizados quanto à inexistência de atividade tóxica e, assim, garantir a segurança alimentar.

Referências

ADOLF, W.; OPFERKUCH, H. J.; HECKER, E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**, New York, v. 23, n. 1, p. 129-132, 1984.

AGUILAR, C. N.; AUGUR, C.; FAVELA-TORRES, E.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. Induction and repression patterns of fungal tannase in solid-state and submerged cultures. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 36, n. 6, p. 565–570, 2001.

AHMAD, T.; RASOOL, S.; SARWAR, M.; HAQ, A-UL.; HASAN, Z-UL. Effect of microbial phytase produced from a fungus *Aspergillus niger* on bioavailability of phosphorus and calcium in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 83, n. 2, p. 103-114, 2000.

AHMED, W. A.; SALIMON, J. Phorbol ester as toxic constituents of tropical *Jatropha curcas* seed oil. **European Journal of Scientific Research**, Victoria, v. 31, n. 3, p. 429-436, 2009.

ALEMAWOR, F.; DZOGBEFIA, V. P.; ODDOYE, E. O. K.; OLDHAM, J. H. Effect of *Pleurotus ostreatus* fermentation on cocoa pod husk composition: Influence of fermentation period and Mn²⁺ supplementation on the fermentation process. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 8, n. 9, p. 1950-1958, 2009.

AREGHEORE, E. M.; BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Detoxification of a toxic variety of *Jatropha curcas* using heat and chemical treatments, and preliminary nutritional evaluation with rats. **South Pacific Journal of Natural Science**, Fiji, v. 21, n. 1, p. 50-56, 2003.

BANERJEE, R.; MUKHERJEE, G.; PATRA, K. C. Microbial transformation of tannin-rich to gallic acid through co-culture method. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 96, n. 8, p. 949–953, 2005.

BARBIERI, L.; BATTELLI, M. G.; STIRPE F. Ribosome-inactivating protein from plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1154, n. 3-4, p. 237-282, 1993.

BATRA, A.; SAXENA, R. K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 40, n. 5, p. 1553-1557, 2005.

BATTESTIN, V.; MACEDO, G. A. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 98, n. 9, p. 1832–1837, 2007.

CARLSON, D.; POULSEN, H. D. Phytate degradation in soaked and fermented liquid feed—effect of diet, time of soaking, heat treatment, phytase activity, pH and temperature. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 103, n. 1-4, p. 141–154, 2003.

CHIVANDI, E.; ERLWANGER, K. H.; MAKUZA, S. M.; READ, J. S.; MTIMUNI, J. P. Effects of dietary *Jatropha curcas* meal on percent packed cell volume, serum glucose, cholesterol and triglyceride concentration and alpha-amylase activity of weaned fattening pigs. **Research Journal of Animal and Veterinary Sciences**, Amman, v.1, n. 1, p. 18-24, 2006.

COLLOPY, P. D.; ROYSE, D. J. Characterization of phytase activity from cultivated edible mushrooms and their production substrates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 52, n. 25, p. 7518-7524, 2004.

DA LUZ, J. M. R. **Degradação de compostos tóxicos e de fatores antinutricionais da torta de pinhão manso por *Pleurotus ostreatus***. Universidade Federal de Viçosa, 2009.

DA LUZ, J. M. R.; PAES, S. A.; TORRES, D. P.; SILVA, J. S.; MANTOVANI, H. C.; KASUYA, M. C. M. Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in jatropha biodiesel residues. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 50, N. 2, p. 575-580, 2013.

DENSTADLI, V.; STOREBAKKEN, T.; SVIHUS, B.; SKREDE, A. A comparison of online phytase pre-treatment of vegetable feed ingredients and phytase coating in diets for *Atlantic salmon* (*Salmo salar* L.) reared in cold water. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 269, n. 1-4, p. 414–426, 2007.

DESHPANDE, S. S.; DAMODARAN, S. Food legumes: chemistry and technology. **Advances in Cereal Science and Technology**, Minnesota, v. 10, p. 147-241, 1990.

DHANYA, M. S.; GUPTA, N.; JOSHI, H. C.; LATA. Biogas potentiality of agro-wastes *Jatropha* fruit coat. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENERGY AND ENVIRONMENT TECHNOLOGY, 3., 2009, Guilin, China. **Proceedings...** [S.l.]: IEEE, 2009.

DUNDAR, A.; ACAY, H.; YILDIZ, A. Effect of using different lignocellulosic wastes for cultivation of *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. on mushroom yield, chemical composition and nutritional value. **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 8, n. 4, p. 662-666, 2009.

EL-BATAL, A. I.; H. KAREM, A. Phytase production and phytic acid reduction in rapeseed meal by *Aspergillus niger* during solid state fermentation. **Food Research International**, Amsterdam, v. 34, n. 8, p. 715–720, 2001.

FAN, L.; SOCCOL, A. T.; PANDEY, A.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Effect of caffeine and tannins on cultivation and fructification of *Pleurotus* on coffee husks. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, n. 4, p. 420-424, 2006.

FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Antinutritional factors present in plant-derived alternate fish feed ingredients and their effects in fish. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 199, n. 3-4, p. 197–227, 2001.

GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M.; MULKY, M. J. Toxicological studies on Ratanjyot oil. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 39-42, 1995.

GARCHOW, B. G.; JOG, S. P.; MEHTA, B. D.; MONOSSO, J. M.; MURTHY, P. P. N. Alkaline phytase from *Lilium longiflorum*: purification and structural characterization. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 46, n. 2, p. 221–232, 2006.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, Philadelphia, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

GRAF, E.; EATON, W. Effects of phytate on mineral bioavailability in mice. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 114, n. 7, p. 1092-1198, 1984.

GUBITZ, G. M.; MITTELBECH, M.; TRABI, M. Exploitation of tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 67, n. 1, p. 73-82, 1999.

HAAS, W.; MITTELBACH, M. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 111-118, 2000.

HAAS, W.; STERK, H.; MITTELBACH, M. Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**, Washington, DC, v. 65, n. 10, p. 1434-1440, 2002.

HADJIPANAYIOTOU, M. Studies on the response of lactating Damascus goats to dietary protein. **Journal Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 57, n. 1, p. 41-52, 1987.

HELLER, J. **Physic nut. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops**. Rome: Bioversity International, 1996. v. 1.

KUMAR, A.; SHARMA, S. An evaluation of multipurpose oil seed crop for industrial uses (*Jatropha curcas* L.): a review. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 28, n. 1, p. 1-10, 2008.

LIANG, J. F.; HAN, B. Z.; NOUT, M. J. R.; HAMER, R. J. Effect of soaking and phytase treatment on phytic acid, calcium, iron and zinc in rice fractions. **Food Chemistry**, Oxon, v. 115, n. 3, p. 789–794, 2009.

LU, H.; LIU, Y.; ZHOU, H.; YANG, Y.; CHEN, M.; LIANG, B. Production of biodiesel from *Jatropha curcas* L. oil. **Computers and Chemical Engineering**, Oxford, v. 33, n. 5, p. 1091–1096, 2009.

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**, Oxon, v. 62, n. 2, p. 207-215, 1998.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Do tannins in leaves of trees and shrubs from Africa and Himalayan regions differ in level and activity. **Agroforestry Systems**, Dordrecht, v. 40, n. 1, p. 59-68, 1998.

MORAES, V. L. G.; RUMJANEK, V. M.; CALIXTO, J. B. Jatrophone and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate antagonism of stimulation of natural killer activity and lymphocyte proliferation. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 312, n. 3, p. 333-339, 1996.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2000.

PATIL, P. D.; DENG, S. Optimization of biodiesel production from edible and non-edible vegetable oils. **Fuel**, Oxon, v. 88, n. 7, p. 1302–1306, 2009.

PEREIRA, L. P. S. **Valor nutritivo da torta destoxificada de pinhão manso para caprinos**. Universidade Federal de Viçosa, 2011.

PORRES, J. M.; LÓPEZ-JURADO, M.; ARANDA, P.; URBANO, G. Bioavailability of phytic acid–phosphorus and magnesium from Lentils (*Lens culinaris* M.) in growing rats: influence of thermal treatment and vitamin-mineral supplementation. **Nutrition**, New York, v. 20, n. 9, p. 794–799, 2004.

RAKSHIT, K. D.; DARUKESHWARA, J.; RAJ, K. R.; NARASIMHAMURTHY, K.; SAIBABA, P.; BHAGYA, S. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 3621–3625, 2008.

RAMACHANDRAN, S.; ROOPESH, K.; NAMPOOTHIRI, K M.; SZAKACS, G.; PANDEY, A. Mixed substrate fermentation for the production of phytase by *Rhizopus* spp. using oilcakes as substrates. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 40, n. 5, p. 1749–1754, 2005.

RAVINDRAN, V.; CABAHUG, S.; RAVINDRAN, G.; BRYDEN, W. L. Influence of microbial phytase on apparent ileal amino acid digestibility of feedstuffs for broilers. **Poultry Science**, Savoy, v. 78, n. 5, p. 699-706, 1999.

REED, J. D. Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 73, n. 5, p. 1516-1528, 1995.

REHMAN, Z.; SHAH, W. H. Thermal heat processing effects on antinutrients, protein and starch digestibility of food legumes. **Food Chemistry**, v. 91, n. 2, p. 327–331, 2005.

ROTENBERG, S. A.; WEINSTEIN, I. B. Two polychlorinated hydrocarbons cause phospholipid-dependent protein kinase C activation *in vitro* in the absence of calcium. **Molecular Carcinogenesis**, New York, v. 4, n. 6, p. 477- 481, 1991.

SARAIVA, L.; FRESCO, P.; PINTO, E.; GONÇALVES, J. Characterization of phorbol esters activity on individual mammalian protein kinase C isoforms, using the yeast phenotypic assay. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 491, n. 2-3, p. 101-110, 2004.

SHARMA, S.; AGARWAL, L.; SAXENA, R. K. Purification, immobilization and characterization of tannase from *Penicillium variable*. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 99, n. 7, p. 2544–2551, 2008.

SILVA, A. M.; BRUM, R. L.; CALIXTO, J. B. The relaxant action of jatrophone in rat portal vein. A comparison with protein kinase C inhibitors. **Life Sciences**, Oxford, v. 57, n. 9, p. 863-871, 1995.

SLATER, S. J.; HO, C.; STUBBS, C. D. The use of fluorescent phorbol esters in studies of protein kinase C–membrane interactions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 116, n. 1-2, p. 75–91, 2002.

SOMSUB, W.; KONGKACHUICHA, R.; SUNGPUAG, P.; CHAROENSIRI, R. Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 21, n. 2, p. 187–197, 2008.

SRICHAROENCHAIKUL, V.; MARUKATAT, C.; ATONG, D. Fuel production from physic nut (*Jatropha curcas* L.) waste by fixed-bed pyrolysis process. **ThaiScience**, Bangkok, p. 23-25, 2007.

STAUBMANN, R.; NCUBE, I.; GÜBITZ, G. M.; STEINER, W.; READ, J. S. Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. seeds. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 75, n. 2-3, p. 117-126, 1999.

STRIPE, F.; PESSION-BRIZZI, A.; LORENZONI, E.; STROCCHI, P.; MONTANARO, L.; SPERTI, S. Studies on the proteins from the seeds of *Croton tiglium* and of *Jatropha curcas*. **Biochemical Journal**, London, v. 156, n. 1, p. 1-6, 1976.

TORRE, M.; RODRIGUEZ, A. R.; SAURACALIXTO, F. Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 30, n. 1, p. 1-22, 1991.

ULLAH, A. H. J.; PHILLIPPY, B. Q. Substrate selectivity in *Aspergillus ficuum* phytase and acid phosphatases using myo-inositol phosphates. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, n. 2, p. 423–425, 1994.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **Destoxificação biológica da torta de pinhão manso e a utilização da mesma como ração**. Instituto Nacional da propriedade Industrial, BR 10 2010 002912-0, 2012. Patente submetida e ainda não disponível online.

WANG, N.; HATCHER, D. W.; TOEWS, R.; GAWALKO, E. J. Influence of cooking and dehulling on nutritional composition of several varieties of lentils (*Lens culinaris*). **Food Science and Technology**, London, v. 42, n. 4, p. 842–848, 2009.

WINK, M.; GRIMM, C.; KOSCHMIEDER, C.; SPORER, F.; BERGEOT, O. Sequestration of phorbol esters by the aposematically coloured bug *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **Chemoecology**, Basel, v. 10, n. 4, p. 179-184, 2000.

WONG, Y. S.; WANG, X. Degradation of tannins in spent coffee grounds by *Pleurotus sajor-caju*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, London, v. 7, n. 5, p. 573-574, 1991.

WYSS, M.; BRUGGER, R.; KRONENBERGER, A.; RÉMY, R.; FIMBEL, R.; OESTERHELT, G.; LEHMANN, M.; LOON, A. P. G. M. Biochemical Characterization of Fungal Phytases (myo-Inositol Hexakisphosphate Phosphohydrolases): Catalytic Properties. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 65, n. 2, p. 367–373, 1999.

YOON, J. H.; THOMPSON, L. U.; JENKINS, D. J. The effect of phytic acid on *in vitro* rate of starch digestibility and blood glucose response. **Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 38, n. 6, p. 835-842, 1983.

Destoxificação das Tortas de Pinhão-manso e Mamona pelo Processo de Extrusão Termoplástica

Juan Antônio Ruano Ortiz

Arturo Melendez Arévalo

José Luis Ramírez Ascheri

Carlos Wanderlei Piler Carvalho

Rosemar Antoniassi

Adelia F. Faria-Machado

Sidinea Cordeiro de Freitas

Introdução

A partir do estímulo do governo brasileiro à adição de biodiesel derivado de óleos vegetais ao diesel, a produção brasileira desse biocombustível deve aumentar ano a ano. É consenso mundial a necessidade de diversificação de fontes energéticas em detrimento ao petróleo, bem como a de matérias-primas para uso no programa de biodiesel com a utilização de oleaginosas regionais, no intuito de estimular a agricultura familiar, incorporar o homem ao campo, aumentar a renda familiar, entre outros objetivos.

O governo brasileiro tem estimulado projetos de pesquisa que viabilizem o cultivo e utilização de oleaginosas não só em áreas já cultivadas, mas

também em regiões mais carentes como no Nordeste do país. Neste escopo, a Embrapa elegeu várias oleaginosas para estudo, entre elas, a mamona (*Ricinus communis* L.) e o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.).

A produção de biodiesel derivado de qualquer planta oleaginosa gera coprodutos como as tortas parcialmente desengorduradas ou farelos (livres de óleo), que podem apresentar fatores antinutricionais, que podem ser altamente tóxicas e alergênicas. Em particular, tanto a torta de mamona, como a de pinhão-manso apresentam compostos tóxicos e alergênicos.

Por outro lado, as tortas dessas espécies oleaginosas apresentam considerável teor de proteína, de forma que a utilização das mesmas na alimentação animal é uma interessante alternativa ao uso convencional como fertilizante orgânico, o qual se deve aos altos teores de nitrogênio, fósforo, potássio, bem como micronutrientes, porém de baixo valor agregado. Isso implica na necessidade de se estudar processos que tornem seguro o uso dessas tortas, como a destoxificação e desalergênização para posterior uso na indústria de ração animal.

A torta de mamona apresenta em sua composição ricina (proteína tóxica), ricinina (alcalóide) e complexos alergênicos. Enquanto que no caso do pinhão-manso, as tortas apresentam curcina (proteína tóxica), ésteres diterpenos (ésteres de forbol) e uma proteína com potencial alergênico semelhante à albumina 2S da mamona (MACIEL et al., 2009; MARTINEZ-HERRERA et al., 2006).

Existem diversos métodos para promover a destoxificação e desalergênização das tortas e entre eles, os métodos físicos empregam tratamentos térmicos e alta pressão. São relatados na literatura (FURTADO et al., 2012, KATOLE et al., 2011, CAI et al., 2005) experimentos realizados em autoclave na faixa de temperatura entre 60 a 205°C e pressões de até 103 kPa (15 psi). Dentre os métodos

mistos, ou seja, químicos e físicos, a adição de ácidos (H_2SO_4), sais ($NaCl$, $NaOCl$), óxidos (CaO) e bases ($NaOH$, $CaOH$) tem sido relatados.

Quando se associa agentes químicos a um processo físico, por exemplo, pode-se usar o sistema do tipo batelada: autoclavagem e/ou cozimento convencional e o sistema do tipo contínuo de processamento: extrusão termoplástica. A vantagem do segundo é permitir, em menor espaço, um aumento da capacidade produtiva, o que será apresentado neste trabalho.

Conhecendo o sistema de extrusão termoplástica

A extrusão é um processo de tratamento térmico que associa alta temperatura e curto tempo. Esse processo promove mudanças irreversíveis nos alimentos promovendo a quebra dos grânulos de amido e a desnaturação das proteínas.

Segundo Baruffaldi e Oliveira (1998), as extrusoras dividem-se em três grupos: autógenos, isotérmicos e politrópicos. As extrusoras autógenas (aproximadamente adiabáticas) são aquelas em que a transferência de calor dentro da extrusora resulta da dissipação viscosa da energia mecânica e pouco ou nenhum calor deve ser trocado com o cilindro. As extrusoras isotérmicas são aqueles onde a temperatura do processo é mantida constante por camisas de água que removem o calor produzido. As extrusoras politrópicas são aquelas onde o calor é adicionado ou retirado da extrusora.

A extrusora consiste de um ou dois parafusos de Arquimedes que giram dentro de um cilindro estacionário conduzindo o material, em condições de alta temperatura, pressão e de forças de cisalhamento até à saída da matriz que confere juntamente com a ação das facas de corte, o formato final do produto (BARUFFALDI; OLIVEIRA, 1998).

Os parafusos ou roscas podem ser divididos em três zonas ou seções: a zona de alimentação, a zona de mistura e a zona

de fusão da massa (HARPER, 1992). A zona de alimentação recebe e transporta a massa para a zona de mistura e, por fim para a zona de maior cisalhamento, onde ocorre a fusão da massa, a qual está mais próximas à saída ou da matriz.

Ao longo destas zonas, o material é compactado pelo aumento da compressão e grande parte da energia mecânica é dissipada na forma de calor, causando aumento rápido da temperatura e a transformação da massa da forma granular para uma forma plástica contínua e liquefeita. As relações da energia mecânica (atrito) e temperatura, bem como da mistura dos componentes da massa definem o comportamento reológico.

Por fim, na zona de fusão da massa, as variáveis: temperatura, pressão e taxa de cisalhamento, atingem o máximo, e o comportamento da massa é ditado pelas relações reológicas (viscosidade). Em roscas de perfil afilado-reto, estas três zonas são facilmente identificáveis pela geometria da rosca, apesar da transição das características da massa não ser tão abrupta.

O parafuso ou rosca é considerado uma das partes mais importante de uma extrusora, pois ajuda a regular o grau de cozimento observado pela desnaturação de proteínas, quebra da estrutura granular do amido, definindo a qualidade final do produto. A mistura contínua do material e sua condução pelo cilindro causa a geração de fricção mecânica e de calor, que ajuda a fundir a massa no interior do cilindro da extrusora (GUY; HORNE, 1988).

Ao girar, sob controlada velocidade de rotação por minuto (rpm), o parafuso conduz o material em direção à matriz. A matriz apresenta configurações variadas e, além de moldar o produto na forma desejada, funciona restringindo o fluxo, mantendo a pressão na zona de cozimento/fusão (GUY; HORNE, 1988). O parafuso revira e pressiona o material contra as paredes do cilindro, promovendo o

cisalhamento e transformação em uma massa uniforme. A mistura dentro do canhão absorve calor por dissipação de energia mecânica aplicada ao parafuso. O aumento da temperatura da mistura é obtido também por transferência de calor através de uma camisa de vapor ao redor do cilindro ou por aquecimento elétrico. O cilindro de uma extrusora pode ser constituído de seções, para que a desmontagem seja facilitada, ou de uma única peça. O controle da temperatura em cada uma das zonas pode ser feito por meio de serpentinas de ar comprimido ou camisas de água fria. Muitos cilindros são equipados com sensores de pressão e temperatura para controle do processo.

O mecanismo de corte do material extrudado pode ser acoplado à porção final da extrusora, sendo constituído por lâminas horizontais ou verticais que, de acordo com a velocidade de giro, determinam o comprimento do extrudado. Maior velocidade origina produtos mais curtos. O mecanismo deve prover o corte em comprimento uniforme e com superfícies perfeitas (GUY; HORNE, 1988).

Segundo EL-Dash (1982) o processo de extrusão compreende as etapas de pré-extrusão, extrusão e pós-extrusão. A pré-extrusão inclui a preparação dos ingredientes e sua mistura em proporção adequada. Após a mistura, o material é transportado para ser condicionado a um conteúdo apropriado de umidade. Na etapa de extrusão, a matéria-prima é introduzida no equipamento através do alimentador, sendo impulsionada pelo(s) parafuso(s) em direção à matriz. À medida que o produto atravessa as diferentes zonas de extrusão (de alimentação, de transição e de alta pressão), ocorre aumento gradativo do atrito mecânico, provocado por modificações da geometria do parafuso e abertura da matriz. Em consequência, a pressão e a temperatura também aumentam, ocorrendo o cozimento da torta ou farelo.

Quando os alimentos são processados por extrusão, a fração amilácea sofre considerável quebra na matriz, bem como ocorre desnaturação e reorientação das proteínas. Dessa forma, durante o processo de

extrusão, a fração proteica presente tanto na torta de mamona (ricina) como na torta de pinhão-manso (curcina) é desestruturada perdendo a ação tóxica. Ocorre ainda a inativação enzimática e a formação de uma nova estrutura ou textura que pode ser alterada conforme o hábito do animal que será alimentado. Há relatos de redução da carga microbiana, o que pode favorecer aspectos de segurança alimentar particularmente interessante na fabricação de ração.

Outras vantagens desse tipo de processamento:

- Versatilidade: os aspectos de textura que influenciam a aceitação do alimento pelo animal podem ser alterados com a modificação de alguns parâmetros de processo, como por exemplo, a velocidade de rotação do parafuso, configuração dos elementos do parafuso, taxa de alimentação, teor de umidade da mistura e perfil de temperatura.
- Menor gasto de energia e espaço: a extrusão é um processo contínuo que pode ser automatizado e requer reduzido espaço para produção.
- Processo automático com grande capacidade de produção, sendo capaz de produzir até 5 ton/h/máquina.

Sobre os fatores que interferem no processamento de extrusão, a composição química da matéria-prima é fundamental. Alto teor de fibra insolúvel, por exemplo, pode causar entupimentos frequentes na extrusora e comprometer o sucesso do processo. A distribuição granulométrica também pode interferir no processamento e deve ser ajustado conforme o tipo de máquina. Por exemplo, partículas finas ($< 600 \mu\text{m}$) são mais apropriadas para extrusoras de duplo parafuso, enquanto para as extrusoras de um único parafuso partículas de maior tamanho são desejáveis ($> 600 \mu\text{m}$).

A aparência de uma farinha obtida da moagem da torta de pinhão-manso é apresentada na Figura 1. A moagem ocorreu em um moinho de martelo da marca TREU (Rio de Janeiro, Brasil), equipado

com um peneira de 1 mm de abertura. Essa farinha foi processada (Figura 2) em uma extrusora de rosca simples de laboratório modelo 19/20 DN, acoplada a um reômetro de torque Brabender DCE 330 (Duisburg, Alemanha), equipada com um parafuso de taxa de compressão 3:1 e matriz com furo circular de 4 mm.

No processamento por extrusão, os parâmetros como temperatura, umidade, rotação do parafuso, velocidade de alimentação, diâmetros da matriz, tempo e temperatura de secagem, entre outros fatores são aspectos importantes que devem ser monitorados cuidadosamente para se obter produtos de alta qualidade, garantindo primordialmente a segurança das tortas destoxificadas.

A transformação do material durante o processo de extrusão ocorre em três etapas: a plastificação, onde o farelo ou torta em qualquer estado nativo (grânulo ou pó), torna-se um líquido homogêneo pela fusão, como processo físico principal; a modelagem do material em estado fundido pela passagem através da matriz; e por fim, o cozimento e a texturização do produto (COLONNA et al., 1989).



Figura 1. Farinha de torta de pinhão-manso com 12% de umidade.



Figura 2. Extrudados obtidos com uma extrusora de parafuso único de farinha de pinhão-manso.

Duas extrusoras são apresentadas nas Figuras 3 e 4. Na Figura 3, é disposta uma extrusora de parafuso único modelo 19/20

DN Brabender (Duisburg, Alemanha) em operação, a qual está equipada com um sistema de corte. Na Figura 4 é apresentada uma extrusora modelo Evolum HT 25 (Clextal, Firminy, França) de duplo parafuso com 10 zonas de aquecimento, equipada com sistema de alimentação de líquidos (bomba de pistão) e um sistema de alimentação gravimétrico de sólidos (farinhas) em formato de funil. Ambas extrusoras equipam o laboratório de extrusão de alimentos da Embrapa Agroindústria de Alimentos e que foram usadas no processamento de torta de mamona e de pinhão-manso.



Figura 3. Sistema de extrusão monorosca 19/20DN acoplado ao reômetro de torque Do-corder DCE 330 (Duisburg, Alemanha).



Figura 4. Sistema de extrusão dupla rosca Clextal Evolum HT25 (Firminy, França)

No caso específico da extrusora de laboratório usada no processamento das tortas, estão disponíveis cinco tipos de parafusos cuja taxa de compressão varia ao longo do parafuso. Na Figura 5, são apresentados os parafusos. Nota-se que a altura da estria do parafuso é variável, por exemplo, o parafuso de compressão 1:1 apresenta a mesma altura do centro do eixo ao final da estria em toda a extensão do parafuso, enquanto nas demais é variável. Em extrusoras de parafuso duplo a possibilidade de alteração da configuração é muito maior, pois se podem alterar os elementos adicionados ao eixo central, conforme a taxa de cisalhamento desejada. No caso do presente trabalho, adotou-se a configuração dos parafusos de 1 m de comprimento

com 10 zonas de aquecimento e resfriamento da extrusora Evolum HT 25 (Cleextral Firminy, França). Os detalhes da configuração dos parafusos desta extrusora estão dispostos na Figura 6.

Durante o pré-condicionamento, ocorre mistura, adição de bases ou agentes ácidos, hidratação, pré-aquecimento dos materiais componentes da formulação. Em alguns casos, pode ser necessária a adição de vapor na torta durante o condicionamento da matéria-prima a ser extrudada.

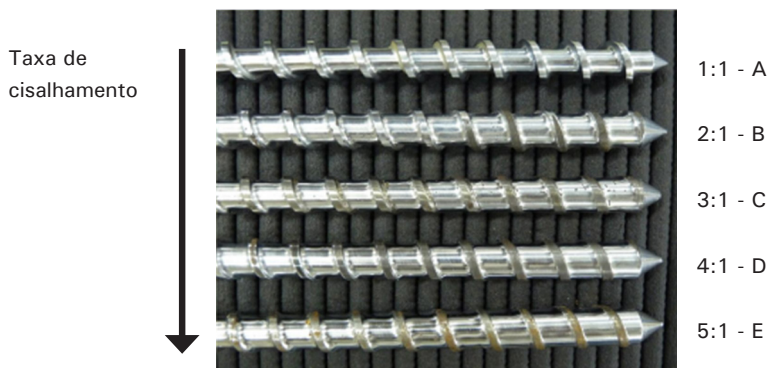


Figura 5. Conjunto de parafusos com diferentes taxa de compressão: 1:1 (A); 2:1 (B); 3:1 (C); 4:1 (D); 5:1 (E) e comprimento para sistema de extrusão Brabender 19/20DN acoplado ao reômetro de torque Do-Corder DCE 330 (Duisburg, Alemanha).

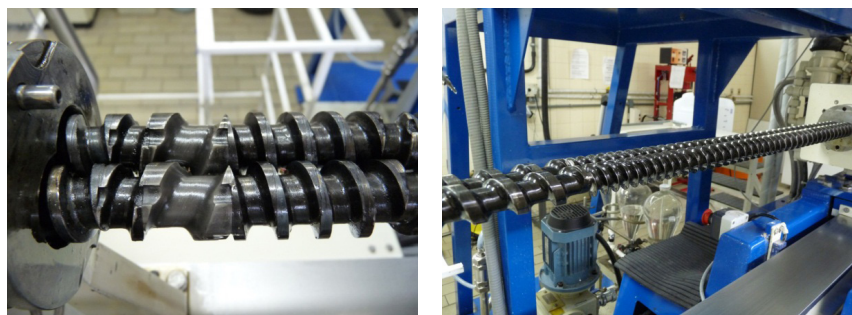


Figura 6. Detalhe da configuração do parafuso da extrusora Evolum 25HT (Cleextral, Firminy, França) usada no processamento da torta de pinhão-manso.

A matriz tem a função de regular o fluxo interno, aumentando ou diminuindo, a velocidade do material no interior da extrusora conhecido como tempo de retenção, bem como formatar o produto final (Figura 7). Para o trabalho de processamento da torta de pinhão-manso para ração animal, foi escolhida a matriz circular de quatro furos de maior diâmetro de abertura, 3,8 mm, pois devido ao alto teor de fibra insolúvel da torta de pinhão-manso, recomenda-se uma matriz com maior abertura para facilitar a saída do material. As demais condições do processo foram: perfil de temperatura (10 zonas), velocidade de rotação dos parafusos (400 rpm), temperatura do material próximo à matriz (89°C), taxa de alimentação de água (7 L/h), taxa de alimentação de sólido (7,6 kg/h), velocidade do sistema e faca de corte (244 rpm) podem ser visualizadas.

Os testes preliminares indicaram que a modificação nesta matriz seria desejável, uma vez que um maior diâmetro facilitaria o fluxo e evitaria o entupimento, o que ocorreu diversas vezes. Recomenda-se no processamento de pinhão-manso, por conter alto teor de fibra detergente neutro, o uso de matriz com maior diâmetro de abertura, cerca de 20% do tamanho da área do cilindro interno da extrusora. Outro aspecto que deve ser considerado na fabricação da matriz é evitar que a mesma possua cavidades restritivas de fluxo, pois isso pode provocar acúmulo de material fibroso.

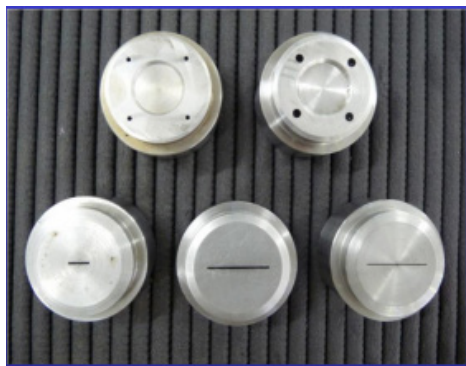


Figura 7. Diferentes matrizes para sistema de extrusão dupla rosca Clextral Evolum HT25 (Firminy, França).

Aspectos de segurança considerados no processamento de torta de mamona e de pinhão-manso

Do ponto de vista da saúde do trabalhador e dos indivíduos que têm contato com materiais tóxicos, uma série de estudos para obtenção de maiores e melhores informações toxicológicas têm sido conduzidos para o entendimento das complexas relações entre produtos tóxicos e os organismos vivos. Os aspectos de segurança envolvidos nesse processo são provenientes dos riscos existentes ao manusear o equipamento e o material. No que se refere às tortas de mamona e pinhão-manso, a matéria prima é tóxica, portanto, mais cuidados devem ser tomados. O uso de óculos de proteção, máscara para material particulado, botas, além de jaleco apropriado são algumas das boas práticas laboratoriais aplicadas na Unidade da Embrapa.

A torta de mamona possui ricina e ricinina que são, respectivamente, uma proteína e um alcalóide de reconhecida ação tóxica. O uso de máscara é importante, uma vez que no processo de moagem e de extrusão, são gerados pós-finos que podem ser inalados. Além disso, é importante que as demais partes do corpo sejam cobertas para que se evite o contato do pó com a pele. Assim, devem ser usados jaleco de mangas compridas e luvas, para evitar o desenvolvimento de reações alérgicas no operador.

A torta de pinhão-manso apresenta curcina e ésteres de forbol e os cuidados devem ser semelhantes aos da mamona. Já os ésteres de forbol podem estar presentes no aerossol ou nas partículas e podem ser liberados junto ao vapor na saída da matriz durante o processo. Logo, o uso de máscara apropriada deve ser reforçado (GONÇALVES et al., 2009) (Figura 8).

No Brasil, as empresas privadas e públicas, além de outros órgãos públicos que possuem empregados regidos pela Consolidação das Leis do Trabalho (CLT), seguem as normas regulamentadoras relativas à segurança e medicina do trabalho. Além destas, devem ser obedecidas também disposições que sejam incluídas em códigos de obras ou regulamentos sanitários dos Estados ou Municípios e outras, oriundas de convenções e acordos coletivos de trabalho. A Norma de Regulamentação (NR) 06 estabelece como sendo o Equipamento de Proteção Individual (EPI), todo dispositivo ou produto, de uso individual utilizado pelo trabalhador, destinado à proteção de riscos suscetíveis de ameaçar a segurança e a saúde no trabalho. Os principais EPI's recomendados no processamento de materiais tóxicos estão apresentados na Tabela 1 (BRASIL, 1984).



Figura 8. Uso de equipamento de proteção individual (EPI) recomendado para o processamento das tortas de mamona e de pinhão-manso.

Tabela 1. Principais EPI's recomendados pela NR 6 para uso durante o processo de extrusão termoplástica de material tóxico

Código do EPI	Local de proteção	Nome do equipamento
B.1 a	Olhos	Óculos para proteção contra impactos de partículas volantes
C.1 a	Ouvidos	Protetor auditivo circum-auricular para proteção contra níveis de pressão sonora
D.1d (P3)	Vias respiratórias	Peça um quarto facial, semifacial ou facial inteira com filtros para material particulado P3 (proteção contra poeiras, névoas, fumos e radionuclídeos)
F.1 e	Membros superiores	Luvas para proteção de mãos contra agentes biológicos
G. 1g	Membros inferiores	Calçado para proteção dos pés e pernas contra respingos de produtos químicos

Processamento das tortas de pinhão-manso

As tortas foram trituradas em um moinho de faca martelo TREU (Rio de Janeiro), equipado com uma peneira de 1 mm de abertura e foram obtidas as farinhas.

Foram realizados três experimentos na extrusora de rosca simples de laboratório 19/20DN acoplada ao reômetro de torque DCE 330 Brabender (Duisburg, Alemanha), o qual possui três zonas de aquecimento e equipado com uma matriz circular com 4 mm de diâmetro. Foram estudados os efeitos de três variáveis independentes: concentração do agente químico, temperatura da última zona de aquecimento e umidade da mistura.

Os três agentes químicos usados e sua respectiva faixa de concentração foram hidróxido de sódio (NaOH) de 0,3 a 3,7%, óxido de cálcio (CaO) de 6 a 8,4% e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de 1,5 a 4,5%.

O perfil de temperatura estabelecido nas duas primeiras zonas de aquecimento foi mantido constante a 60 e 80°C, sendo a de menor temperatura relativo à primeira zona onde a extrusora é alimentada e a segunda de temperatura intermediária. Por fim, a terceira zona de aquecimento variou de 120 a 173°C, conforme o delineamento experimental.

Estudo preliminar para destoxificação de torta de mamona

Em um estudo preliminar, realizado em uma extrusora de rosca simples comercial de parafuso curto (200 mm) Inbra RX 50 (Ribeirão Preto, SP) e descrito no trabalho de Ascheri e colaboradores (2007) concluiu-se que a extrusão reativa utilizando como reagente químico CaO na concentração de 1 e 2% foram eficientes na destoxificação da torta de mamona semi-desengordurada obtida por esmagamento mecânico.

Quanto à alergenicidade, na concentração de 2% de CaO, houve redução dos níveis de alergenicidade quando comparado ao nível de CaO de menor concentração. É importante notar que este processamento específico, apesar de apresentar êxito quanto à destoxificação das tortas, não foi estável e após certo período de processamento houve entupimento na saída da matriz. Isso ocorre normalmente em função do acúmulo de material fibroso nos furos da matriz que não fundem facilmente sob o efeito combinado da temperatura (cerca de 120°C) e do cisalhamento. Este tipo de

extrusora foi projetada para processamento de grits de milho e, portanto, o seu uso é limitado para outros materiais. Como resultado deste teste preliminar, um segundo teste em escala industrial foi realizado em uma extrusora de dupla rosca comercial, sendo possível o processamento nesta extrusora da torta de mamona em presença de 20% de grits de milho, com os mesmos resultados de destoxificação apresentados no respectivo trabalho (ASCHERI et al., 2007).

Análise de ésteres de forbol para a torta extrudada de pinhão-manso

Os ésteres de forbol são derivados diterpênicos considerados como as substâncias mais tóxicas do pinhão-manso, por serem indutores da formação de tumores e de resposta inflamatória, não sendo possível destruí-los apenas com tratamento térmico (MAKKAR et al., 1997). Devido à característica de lipossolubilidade, grande parte dos ésteres de forbol é extraída juntamente com o óleo. No entanto, mesmo em amostras de torta com baixo teor de óleo (0,6%) a concentração de éster de forbol encontrada foi de 3,85 mg/g torta desengordurada (MARTINEZ-HERRERA et al., 2006).

Para avaliar o efeito dos processos de extrusão acompanhados de diferentes tratamentos químicos sobre o conteúdo de ésteres de forbol de amostras de torta de pinhão-manso, foi utilizada cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD), utilizando coluna de fase reversa de C_{18} (150 × 4,6 mm, 5 μm) e como fase móvel gradiente de acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico a 0,4%, de acordo com o método descrito por Pires e colaboradores (2011; 2012), a partir do método proposto por Makkar et al. (1998). Os picos cromatográficos referentes aos ésteres de forbol foram identificados por meio dos espectros de absorção no ultravioleta

(UV), considerando dados da literatura (HASS et al., 2002; HASS; MITTELBAACH, 2000; MAKKAR et al., 1998; RAKSHIT et al., 2008).

Foram conduzidos ensaios com torta desengordurada (por solvente) e parcialmente desengordurada (por prensagem) adicionados de hidróxido de sódio (NaOH) para avaliar a redução da concentração de ésteres de forbol presentes nas tortas. Três variáveis do processo foram avaliadas, conforme apresentado na Tabela 2, com as respectivas faixas de variação obtidas para a de redução no conteúdo do principal isômero de éster de forbol das amostras avaliadas.

Tabela 2. Variáveis do processo estudadas para destoxificação de torta de pinhão-manso com adição de NaOH e seu efeito na redução do principal isômero de éster de forbol (PE) das amostras.

	Velocidade do parafuso (rpm)	Umidade (%)	Teor de NaOH adicionado (%)	Redução do principal PE (%)
Torta parcialmente desengordurada	106 a 173	14 a 21	0,3 a 3,68	20 a 99
Torta desengordurada	106 a 173	20,5 a 25,5	0,3 a 3,68	10 a 96

Dos 20 ensaios realizados, avaliando as combinações das variáveis mostradas na Tabela 2, destaca-se o efeito da adição de NaOH em concentrações de 0,3 e 3,7% em comparação às outras variáveis. Os tratamentos com essas concentrações apresentaram percentuais de redução maiores que 97% no conteúdo do principal isômero de éster de forbol, em relação à torta parcialmente desengordurada não processada. Os ensaios com as 20 combinações das variáveis também foram realizados para a torta desengordurada, sendo que resultados promissores foram encontrados nas mesmas concentrações de NaOH, diferindo na umidade inicial da mistura, que teve que ser aumentada em função da extrudabilidade, pois a redução de gordura nesta torta dificulta o processo ao reduzir a extrudabilidade do material.

Nas condições cromatográficas utilizadas, os picos dos ésteres de forbol das amostras de pinhão-manso eluem entre 27 e 31 minutos

(PIRES et al., 2011; 2012). Convém mencionar que, após o tratamento com NaOH seguido de extrusão, o pico com tempo de retenção em 30,6 min apresentou um incremento após o tratamento e teve seu espectro de absorção no UV alterado, deslocando o comprimento de onda de máxima absorção ($\lambda_{\text{máx.}}$) de 280 nm (região de absorção característica do éster de forbol que elui nesse tempo) para 323 nm. Essas características indicam a formação de artefatos e/ou produtos de degradação durante o tratamento, com consequente co-eluição desses compostos com os ésteres de forbol. Esses produtos gerados com o tratamento podem ou não apresentar toxidez, sendo que a confirmação da presença de núcleo forbol nesses compostos está sendo estudada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS). Para efeito de avaliação dos processos optou-se pelo cálculo de redução baseado no pico de éster de forbol principal, que é a substância de maior contribuição para o cálculo de éster de forbol total.

Buscando efeitos semelhantes ao NaOH, outros ensaios com torta de pinhão-manso, desengordurada e parcialmente desengordurada, adicionadas de cal (CaO), foram conduzidos para avaliar a redução da concentração de ésteres de forbol presentes nas tortas. De maneira similar ao processamento com NaOH, três variáveis do processo foram avaliadas, conforme mostrado na Tabela 3, onde também são apresentadas as faixas de variação obtidas para a porcentagem de redução no conteúdo do principal éster de forbol das amostras avaliadas.

Tabela 3. Variáveis do processo estudadas para destoxificação de torta de pinhão-manso com adição de CaO e seu efeito na redução do principal éster de forbol (PE) das amostras.

	Velocidade do parafuso (rpm)	Umidade (%)	Teor de NaOH adicionado (%)	Redução do principal PE (%)
Torta parcialmente desengordurada	106 a 173	14 a 21	1,6 a 8,3	10 a 21
Torta desengordurada	106 a 173	14 a 21	1,6 a 8,3	21 a 59

Dos 20 ensaios realizados, avaliando as combinações das variáveis mostradas na Tabela 3 destaca-se o efeito da adição de CaO nas concentrações de 5 e 7% em comparação às outras variáveis. Os tratamentos com essas concentrações apresentaram percentuais de redução baixos, de 26 a 29% no conteúdo do principal éster de forbol para a torta parcialmente desengordurada extrudada, em relação à respectiva matéria-prima não processada. Por outro lado, para a torta desengordurada, resultados promissores foram encontrados em concentrações de 7 a 8% de CaO, diminuindo as concentrações iniciais do principal éster de forbol em até 59%.

Referências

ASCHERI, J. L. R.; MACIEL, F. M.; CARVALHO, C. W. P.; FREITAS, S. C.; MACHADO, O. L. T. Detoxificação de torta de mamona por extrusão termoplástica: estudo preliminar. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2007.

BARUFFALDI, R.; OLIVEIRA, M. N. **Fundamentos de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu Editora, 1998. v. 3. 317 p.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria MTB nº 3.214, de 08 de junho de 1978. Aprova as Normas Regulamentadoras - NR - do Capítulo V, Título II, da Consolidação das Leis do Trabalho, relativas a Segurança e Medicina do Trabalho. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 jun. 1984. Disponível em: <<http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C812D36A2800001388130953C1EFB/NR-06%20%28atualizada%29%202011.pdf>>. Acesso em: 21 ago. 2012.

CAI, X.; LUO, L.; XUE, M.; WU, X.; ZHAN, W. Growth performance, body composition and phosphorus availability of juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) as affected by diet processing and replacement of fishmeal by detoxified castor bean meal. **Aquaculture Nutrition**, Oxon, v. 11, n. 4, p. 293-299, 2005.

COLONNA, P.; TAYEB, J.; MERCIER, C. Extrusion cooking of starch and starchy products. In: MERCIER, C.; LINKO, P.; HARPER, J. M. (Ed.). **Extrusion cooking**. St. Paul: American Association Cereal Chemistry, 1989. p. 247-319.

EL-DASH, A. A. **Thermoplastic extrusion of food, theory and techniques**. Campinas: UNICAMP, 1982. 81p.

FURTADO, R. N.; CARNEIRO, M. S. S.; CANDIDO, M. J. D.; GOMES, F. H. T.; PEREIRA, E. S.; POMPEU, R.; SOMBRA, W. A. Nutritive value of feeds containing castor bean cake subjected to alternative methods of detoxification for sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 1, p. 155-162, 2012.

GONCALVES, S. B.; MENDONCA, S.; LAVIOLA, B. G. **Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no pinhão-manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 5 p. il. (Embrapa Agroenergia. Circular técnica, 001).

GUY, R. C. E.; HORNE, A. W. Extrusion and coextrusion of cereals. In: BLANSHARD, J. M. V.; MITCHELL, J. V. (Ed.). **Food structure: its creation and evaluation**. London: Butterworths, 1988. p. 331-349.

HARPER, J. M. A comparative analysis of single and twin-screw extruders. In: KOKINI, J. L.; HO, C.-T.; KARWE, M. V. (Ed.). **Food extrusion science and technology**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1992. p. 139-148.

HAAS, W., MITTELBAACH, M. Detoxification experiments with the seed oil from *Jatropha curcas* L. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 111-118, 2000.

HAAS, W.; STERK, H.; MITTELBAACH, M. Novel 12-deoxy-16-hydroxyphorbol diesters isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**, Washington, DC, v. 65, n. 10, p. 1434-1440, 2002.

KATOLE, S.; SAHA, S. K.; SASTRY, V. R. B.; LADE, M. H.; PRAKASH, B. Intake, blood metabolites and hormonal profile in sheep fed processed *Jatropha* (*Jatropha curcas*) meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 170, n. 1-2, p. 21-26, 2011.

MACIEL, F. M.; LABERTY, M. A.; OLIVEIRA, N. D.; FELIX, S. P.; SOARES, A. M. S.; VERICIMO, M. A.; MACHADO, O. L. T. A new 2S albumin from *Jatropha Curcas* L., seeds and assessment of its allergenic properties. **Peptides**, New York, v. 30, n. 12, p. 2103-2107, 2009.

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**, Oxon, v. 62, n. 2, p. 207–215, 1998.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 45, n. 8, p. 3152–3157, 1997.

MARTINEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DAVILA-ORTIZ, G.; BECKER, K. 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, p. 80-89, 2006.

PIRES, J. M. F.; FRAUCHES, C.; SOUZA, R. S. C.; MACHADO, A. F. F.; MENDONCA, S.; ANTONIASSI, R. Éster de forbol em sementes e tortas de pinhão manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011.

PIRES, J. M. F.; BACK, G. R.; MACHADO, A. F. de F.; BIZZO, H. R.; ANTONIASSI, R.; LAVIOLA, B. G. Conteúdo de éster de forbol vs. produção de grãos de pinhão-manso. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 5.; CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 8., 2012, Salvador. **Biodiesel, inovação e desenvolvimento regional: anais...** Trabalhos científicos. Lavras: UFLA, 2012. v. 2 p. 803-804.

RAKSHIT, K. D.; DARUKESHWARA, J.; RAJ, K. R.; NARASIMHAMURTHY, K.; SAIBABA, P.; BHAGYA, S. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 3621–3625, 2008.

Recent Developments in Detoxification of Castor Cake-scope and its Limitation

Anandan Samireddypalle

Introduction

Growing demand for livestock products brought by the rapid increase in the population and urbanization has resulted in an increased demand for feed resources to fulfill the demand. The existing protein supplements are not sufficient to cater to the growing demand of the livestock sector and also the high costs of the conventional protein supplements has necessitated the options for exploring unconventional protein supplements. Most of them have one or other limitation and there is a need to evolve suitable processing methods that not only takes care of the toxic or incriminating factors effectively, but they are economical enough to be adopted by the industry/end users for its inclusion in the livestock rations. Among the various unconventional oil cakes, castor cake is one of the important resources that can be potentially applied as feed resource provided it is detoxified as it is highly toxic.

Castor production and uses

Globally the area under castor production is around 1.5 million hectares and the total production is around 1.8 million tons for the year 2010 as per the statistical reports of FAO. India is the single largest producer of castor seeds accounting for 59 and 77% of the global area and production, respectively. China and Brazil are the other major producer of castor seeds accounting for 10 and 5% of the global production, respectively. The oil content of castor seed on an average varies from 46-55% by weight (OGUNNIYI, 2006). The residual castor cake obtained after oil extraction would be half of the seed approximately. The protein content of residual cake would vary from 29 to 60% depending upon whether decorticated or corticated seeds are used for extraction (MOTTOLA et al., 1968; OKORIE; ANUGWA, 1987; ANANDAN et al., 2005).

In terms of the protein quality, the castor protein is deficient in lysine, methionine and tryptophan and these amino acids have to be supplemented in monogastric diets for obtaining optimum performance (VILHJÁLMSDÓTTIR; FISHER, 1971; SOUZA 1979). In India, the castor seeds are not dehulled and the whole seeds are used for oil extraction. The hulls constitute 29-31% of the whole seeds and are rich in fiber and lignin, which adversely affect the quality of cake especially in monogastric like poultry and pigs that have limited ability to digest fibrous feeds. The dehulling can improve the oil extraction capacity by 15-20% besides improving the oil quality (SHASHIKALA; SINGH, 1992). Due to its toxicity, it is not used for feeding livestock in India, and is currently being used as organic fertilizer due to high N, P and K content (PARNERKAR et al., 2001). Use of castor cake as livestock feed would improve the economical value of cake and help the castor producers, processing industry and the biofuel value chain substantially.

Castor cake toxicity

The seed contains highly toxic and allergenic compounds, which severely limit or prevent its use as feed after oil extraction (THORPE et al., 1988; AUDI et al., 2005) and none of these toxicants are found in oil. The toxic factors in castor cake comprises of i) highly toxic heat labile protein called ricin, ii) a toxic alkaloid ricinine and iii) a powerful and very stable allergen known as Castor bean 1 allergen (CB-1A) (COULSON et al., 1960; HORTON; WILLIAMS, 1989).

The ricin is heat labile and reported to vary widely from 3.5 to 32.3 g/kg of the seed and the accessions with low ricin contents have been used to develop low ricin content cultivar - Brigham (AULD et al., 2009). During solvent extraction process, part of the ricin gets inactivated due to the heating that follows the extraction. The ricinine presents no problem in animal feeds provided the feeds do not contain high levels of castor meal and it is present at very low levels, 0.23% of cake (HINKSON et al., 1972).

Ricinine is also reported to have goitrogenic activity (PAHUJA et al., 1979), but ricinine or its hydrolysates even up to 100 mg/kg body weight were found to be harmless (RAO, 1970). The castor bean allergen is a nontoxic unusually stable protein that exhibits an extraordinary capacity to sensitize individuals exposed to small concentrations of the dust from castor beans or the castor cake. Castor bean allergen-1A is the principal allergen of the castor bean and is a polysaccharidic protein factor. The allergen contents of decorticated defatted castor beans ranged from 6.1 to 9.0 % while the commercial castor cake contained 0.09 – 4.2 % of the same (COULSON et al., 1960). The allergen CB-1A requires a special processing step to deactivate it.

Ricin is a 62-66 kDa protein consisting of two polypeptide chains A & B, approximately 32 kDa and 34 kDa in size, linked by a disulfide bond

(AUDI et al., 2005). Ricin (RCA60) is a class II ribosome-inactivating protein: a heterodimeric protein. The A-chain is the effective toxin and it works by depurinating specific residues on the rRNA of the 28 s subunit of the ribosome, halting translation (ENDO et al., 1987). The B-chain is responsible for cell entry. The disulfide link between the chains is not essential for the enzymatic activity of the A-chain, but it is necessary for toxicity since the A-chain cannot enter the cell without the B-chain (HARLEY; BEEVERS, 1982; LORD et al., 2003).

The allergen consists of ricin agglutinin (RCA120), a potentially harmful allergen. Ricin and ricin agglutinin share around 90% homology within the A-chain of the proteins, meaning that detection of the ricin A-chain is directly linked to detection of the agglutinin when using A-chain specific antibodies (PINKERTON et al., 1999). The allergens set is composed of albumins 2S, formed by heavy and light subunits with molecular mass of 9 and 4 kDa, respectively (THOYTS et al., 1996). Biochemical and immunological data relative of nine different fractions of albumins 2S, resulted in identification of seven fractions exhibiting allergenic potential (MACHADO, 2003).

Any effective processing method should be able to inactivate the toxin ricin that is toxic to livestock and deallergenate the cake for the safety of the handlers although the animals are not affected by the allergens (UNITED NATIONAL INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION, 1989). Allergens are an important concern for all the people handling castor seed or meal in storage and oil extraction facilities and can lead to health problems such as conjunctivitis, rhinitis, and urticaria (GARCIA-GONZALEZ et al., 1999).

Animal studies using castor cake

A number of studies have been carried out using different processing methods for detoxification of castor cake with varying results. While some studies have assessed the efficacy of detoxification based on the post treatment toxin reduction some studies have evaluated the efficacy based on the animal response to detoxification approaches. Animal response studies are always a better method of determining the efficacy of detoxification, but even in animals studies a number of factors have to be considered in arriving at the most effective detoxification method.

The efficacy of detoxification is influenced by a number of factors like species, age of the animal, level of incorporation, duration of the study, and the parameters used for assessing efficacy. The detoxification methods adopted by different workers can be broadly classified into physical, chemical, biological and a combination of two or more methods. Besides these approaches, plant breeders are exploring the possibility of breeding plants with low toxin levels or use modern tools of biotechnology to knock down the genes responsible for ricin production. Animal response to differently processed castor cake in different species is summarized in the Table 1.

Based on the results of Table 1, certain generalizations can be drawn:

i) Monogastrics cannot tolerate higher levels due to fibrous content of the cake; ii) With proper detoxification methods, there is scope of utilizing the cake in livestock rations without compromising the production performance and iii) In addition to effective detoxification methods there are methods to effectively deallergenate the cake.

Table 1. Effect of different processing methods on animal performance.

Species	Processing method	Animal response	Reference
		Physical treatments	
Moist heat	Autoclaving 125°C for 15 minutes or 60 psi for 20 minutes	Cake beyond 1/3 of diet N replacement of peanut resulted in sub optimal performance in sheep	Purushotham et al. (1986)
Dry heat	Heating at 150°C for 3 h	Ineffective in toxin reduction and resulted in rat mortality	Ambekar; Dole (1957)
Boiling or autoclaving	Boiling or autoclaving seeds for 20 minutes before solvent extraction	Prominent reduction in chain A (antibody detection).	Daniel et al. (2009)
Hot press	Heating meal to 130°C	No ricin reactivity detected by antibody	Daniel et al. (2009)
Hot water extraction 4 times for 10 minutes each (1:5 times water)	Broiler chicks	Hot-water-extracted cake was satisfactory, while supplementing with lysine and tryptophan gave comparable results to soybean protein in terms of growth and feed conversion ratio.	Vilhjalmsdóttir; Fisher (1971)
Boiled castor meal	Growing rabbits	Daily gain and feed conversion ratio was comparable up to 15% inclusion level. Animals in 10 and 15% groups had 33% mortality	Adedeji et al. (2006)
Two-stage cooking: Cooking at 100°C for 50 minutes	Broiler finisher bird	Birds fed 10% cake had similar feed intake and weight gain as control, At higher levels there was depression in feed intake and weight gain	Ani; Okorie (2009)

Continua...

Table 1. Continuação.

Species	Processing method	Animal response	Reference
Roasting of seeds at 140°C for 20 minutes	Broiler birds	Inclusion of cake reduced the feed intake and weight gains at all levels.	Okoye et al. (1987)
Roasting of seeds at 140°C for 20 minutes	Ducks	Reduced feed intake and weight gain in ducks when fed at 10% of the diet	Okoye et al. (1987)
Chemical methods			
(i) Solvent extracted	Adult sheep	No effect on body weight changes, nutrient digestibility, rumen fermentation pattern and histopathology of visceral organs compared with control group fed soybean meal.	Gowda et al. (2009)
(ii) Lime treatment (feed grade lime, 4% of cake, soaked overnight and dried)			
CaO treatment at 6% of cake (soaking cake in CaO solution followed by drying)	Crossbred cattle	Did not affect the digestive and physiological variables at different levels and treated cake can partially or totally replace soybean meal	Diniz et al. (2010)
Expeller cake, (ii)	Sheep	There were no changes in blood enzyme profile with treated and untreated cakes.	Oliveira et al. (2010)
Solvent extracted cake (i) and (ii) treated with 4% lime		Lime treatment improved the efficiency of microbial protein synthesis.	
Biological treatments			
Solid state fermentation	SSF fungus - <i>Penicillium simplicissimum</i>	Ricin reduction to undetectable levels and 16% reduction in allergenicity	Godoy et al. (2009)

Continua...

Table 1. Continuação.

Species	Processing method	Animal response	Reference
Fermented cake. Water soaked (1:4 ratio) and fermented for 5 days in airtight conditions	Broiler chicks	No deleterious effect on growth response, nutrient digestibility, blood cell counts, serum enzymes and carcass yield in 5% fed groups. Depression at higher levels.	Oso et al. (2011)
Boiled castor bean meal supplemented with β -xylanase	Broiler finisher bird	Weight gains up to 15% level were comparable to control. At higher levels weight gain reduced	Babalola et al. (2006)
Physicochemical treatments			
Thermoplastic extrusion with 2 and 1% Cao	Treatment followed by extrusion	2% more effective than 1% in Detoxification and dellaeragenation	Ascheri et al. (2007)
Alkali treatment (4% lime treatment – technical grade) followed by extrusion	Growing sheep	Feed intake and weight gain were not affected. Animals were healthy throughout the experiment and there were no pathological changes in visceral organs.	National Agricultural Technology Programme (2004)

Continua...

Table 1. Continuação.

Species	Processing method	Animal response	Reference
Alkali treatment (4% lime treatment – technical grade) followed by extrusion	Milking buffaloes	Feed intake, nutrient utilization, milk yield and composition were comparable to control group, and the castor-fed group gave greater profit.	National Agricultural Technology Programme (2004)
Alkali treatment followed by extrusion (UNIDO process)	Growing pigs	Detoxified deallergenicized castor meal (DDCM) could be included up to 12% of the diets safely without effecting the weight gain and feed conversion efficiency	Kasidit; Chainarong (1997)
1.5% alkali, extruded at 135°C (3 tons/h)	cattle, pigs, ducks & chickens,	CB1A 30-50 ppm No allergic reaction. Hens showed equal to or better weight gains fed Detoxified Deallergenicated castor meal Maximum inclusion level is 12-15% of diet due to fiber content	Naughton (1998)

Continua...

Table 1. Continuação.

Species	Processing method	Animal response	Reference
Solvent extracted meal treated with alkali (CaO, Ca(OH) ₂ , quick lime). Moisture adjusted to 20-24% and mixed for 30 minutes	Extruding the mixture at 140-160 °C, dried and stored	At 3% alkali and extrusion temperature of 150° C CB1A gets totally destroyed	Rhee (1986)

Conclusions

Although a lot of research has been carried out by different workers with positive results and the existing of patented technology approved by the United Nations Industrial Development Organization for commercialization of the technology for production of detoxified and deallergenated castor cake, the technology has not been very successful and widely adapted. This is evident from the fact that, in India the largest castor producer with a large livestock population and huge demand for cheaper protein supplements, the cake continues to be used as organic fertilizer and none of it is being used as feed. In the present scenario of shortage and high costs of feed resources, diminishing profit margins in livestock sector it becomes inevitable to promote the use of alternate feed resources that are available in abundance locally and priced lower. This is so relevant when we have proven technologies for effective detoxification which can be very well integrated into the existing processing facilities allowing the use of detoxified castor cake. This can be made feasible by an integrated approach involving the castor processing industries, researchers, feed industry and livestock producers by pooling their resources and experience in successfully up-scaling the process, ensuring safety of the products and large scale animal trials demonstrating the value of detoxified cake as valuable feed resource.

References

ADEDEJI, J. A.; APATA, D. F.; ADERINOLA, O. A.; RAFIU, T. A.; AMAO, S. R. Performance and haematological/serum characteristics of rabbits fed boiled castor seed cake-based diet. *World Journal of Zoology*, v. 1, n. 2, p. 91-93, 2006.

AMBEKAR, V. R.; DOLE, K. K. Detoxification of castor cake. **Indian Journal of Dairy Science**, New Delhi, v. 10, p. 107-122, 1957.

ANANDAN, S.; ANIL KUMAR, G. K.; RAMACHANDRA, K. S. Effect of physical processing methods on chemical composition and *in vitro* digestibility of castor cake (*Ricinus communis*). **Animal Nutrition and Feed Technology**, Izatnagar, v. 5, n. 1, p. 47-52, 2005.

ANI, A. O.; OKORIE, A. U. Response of broiler finishers to diets containing graded levels of processed castor oil bean (*Ricinus communis* L) meal. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 93, n. 2, p. 157-164, 2009.

ASCHERI, J. L. R.; MACIEL, F. M.; CARVALHO, C. W. P.; FREITAS, S. C.; MACHADO, O. L. T. Detoxificação da torta de mamona por extrusão termoplástica: Estudo preliminar. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2007.

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M.; SHIER, J.; OSTERLOH, J. Ricin poisoning: a comprehensive review. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.

AULD, D. L.; ZANOTTO, M. D.; MCKEON, T.; MORRIS, J. B. Castor In: VOLLMANN, J.; RAJCAN, I. **Oil Crops**. New York: Springer, 2009. v. 4, p. 317-322.

BABALOLA, T. O. O.; APATA, D. F.; ATTEH, J. O. Effect of b-xylanase supplementation of boiled castor seed meal-based diets on the performance, nutrient absorbability and some blood constituents of pullet chicks. **Tropical Science**, London, v. 46, n. 4, p. 216-223, 2006.

COULSON, E. J.; SPIES, J. R.; STEVENS, H. The allergen content of castor beans and castor pomace. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 37, n. 12, p. 657-661, 1960.

DANIEL, J.; BARNES, B. S.; BALDWIN, D. A.; BRAASCH, N. Degradation of ricin in castor seed meal by temperature and chemical treatment. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 29, n. 2-3, p. 509-515, 2009.

DINIZ, L. L.; VALADARES FILHO, S. C.; CAMPOS, J. M. S.; VALADARES, R. F. D.; DA SILVA, L. D.; MONNERAT, J. P. I. S.; BENEDETI, S. B.; DE OLIVEIRA, A. S.; PINA, D. S. Effects of castor meal on the growth performance and carcass characteristics of beef cattle. **Asian-Australasian Journal of Animal Science**, Seoul, v. 23, n. 10, p. 1308-1318, 2010.

ENDO, Y.; MITSUI, K.; MOTIZUKI, M.; TSURUGI, K. The mechanism of action of ricin and related toxic lectins on eukaryotic ribosomes – The site and the characteristics of the modification in 28-S ribosomal-RNA caused by the toxins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 262, n. 12, p. 5908-5912, 1987.

GARCIA-GONZALEZ, J. J.; BARTOLOME-ZAVALA, B.; TRIGO-PEREZ, M. D.; BARCELO-MUNOZ, ; S. FERNANDEZ-MELENDEZ, J. M.; NEGRO-CARRASCO, M. A.; CARMONA-BUENO, M. J.; VEGA-CHICOTE, J. M.; MUNOZ-ROMAN, C.; PALACIOS-PERLAEZ, R.; CABEZUDO-ARTERO, B.; MARTINEZ-QUESADA, J. Pollinosis to *Ricinus communis* (castor): An aerobiological, clinical and immunochemical study. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxon, v. 29, n. 9, p. 1265-1275, 1999.

GODOY, M. G.; GUTARRA, M. L. E.; MACIEL, F. M. Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 44, n. 5, p. 317-322, 2009.

GOWDA, N. K. S.; PAL, D. T.; BELLUR, S. R.; BHARADWAJ, U.; SRIDHAR, M.; SATYANARAYANA, M. L.; PRASAD, C. S.; RAMACHANDRA, K. S.; SAMPATH, K. T. Evaluation of castor (*Ricinus communis*) seed cake in the total mixed ration for sheep. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 89, n. 2, p. 216-220, 2009.

HARLEY, S. M.; BEEVERS, H. Ricin inhibition of *in vitro* protein synthesis by plant ribosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 79, n. 19, p. 5935-5938, 1982.

HINKSON, J. W.; ELLINGER, C. A.; FULLER, G. The effect of ammoniation upon ricinine in castor meal. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 49, p. 196-199, 1972.

HORTON, J.; WILLIAMS, M. A. A cooker-extruder for de-allergenation of castor bean meal. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 66, n. 2, p. 227-231, 1989.

KASISIDIT, U.; CHAINARONG, K. Effects of various levels of detoxified and deallergenized castor meal ration on growth performance and carcass characteristics of fattening swine. **Thammasat International Journal of Science and Technology**, Pathum-Thani, v. 2, n. 1, p. 56-60, 1997.

LORD, M. J.; JOLLIFFE, N. A.; MARSDEN, C. J.; PATEMAN, C. S. C.; SMITH, D. C.; SPOONER, R. A.; WATSON, P. D.; ROBERTS, L. M. Ricin: mechanisms of cytotoxicity. **Toxicological Reviews**, Auckland, v. 22, n. 1, p. 53-64, 2003.

MACHADO, O. L. T.; MARCONDES, J. A.; DE SOUZA-SILVA, F.; HANSEN, E.; RIBEIRO, P. D.; VERICIMO, M.; KANASHIRO, M.; KIPNIS, T. L.; DA SILVA, J. G.; DOS SANTOS, M. F.; COSTA-E-SILVA, M. C. Characterization of allergenic 2S albumin isoforms from *Ricinus communis* seeds. **Allergologie**, Oberhaching, v. 26, n. 2, p. 45-51, 2003.

MOTTOLA, A. C.; HENDRICKSON, A. P.; O'CONNELL, D. E.; RHODE, P.; KOHLER, G. O. Pilot plant deactivation of castor meal antigen: lime process. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 16, n. 5, p. 725-729, 1968.

NATIONAL AGRICULTURAL TECHNOLOGY PROGRAMME (India). **Developing suitable technology to make use of sunflower heads and castor cake as animal feed. 2003-2004**: annual report. Bangalore: National Institute of Animal Nutrition and Physiology, 2004.

NAUGHTON, F. **Processing of castor meal for detoxification and deallergenation**. Columbia: ICOA, 1998.

OGUNNIYI, D. S. Castor oil: A vital industrial raw material. **Bioresource Technology**, Castor oil: a vital industrial raw material. Review paper v. 97, n. 9, p. 1086-1091, 2006. Review paper.

OKORIE, A. U.; ANUGWA, F. O. I. The feeding value of roasted castor oil bean (*Ricinus communis*) to growing chicks. **Qualitas Plantarum-Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 37, n. 2, p. 97-102, 1987.

OKOYE, J. O. A.; ENUNWAONYE, C. A.; OKORIE, A. U.; ANUGWA, F. O. I. Pathological effects of feeding roasted castor bean meal (*Ricinus communis*) to chicks. **Avian Pathology**, Abingdon, v. 16, n. 2, p. 283-290, 1987.

OLIVEIRA, A. S. de; CAMPOS, J. M. S.; OLIVEIRA, M. R. C.; BRITO, A. F.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E.; VALADARES, R. F. D.; SOUZA, S. M. de; MACHADO, O. L. T. Nutrient digestibility, nitrogen metabolism and hepatic function of sheep fed diets containing solvent or expeller castor seed meal treated with calcium hydroxide. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, n. 1-2, p. 15-28, 2010.

OSO, A. O.; OLAYEMI, W. A.; BAMGBOSE, A. M.; FOWOYO, O. F. Utilization of fermented castor oil seed (*Ricinus communis* L) meal in diets for cockerel chicks. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 60, n. 229, p. 75-82, 2011.

PAHUJA, D. N.; GAVNEKAR, S. V.; SHAN, D. H.; JATHAR, V. S.; KULKARNI, P. R.; GANATRA, R. D. Goitrogenic principle from castor seeds. **Biochemical Pharmacology**, Kidlington, v. 28, n. 5, p. 641-643, 1979.

PARNERKAR S.; CHIRAG, R. B.; BHAGAT, S. R.; DESAI, M. C. Availability and utilization pattern of castor byproducts as animal feeds in North Gujarat region. In: ANIMAL NUTRITION CONFERENCE, 10., 2001, Karnal, India. **Proceedings...** Karnal: Animal Nutrition Society of India, 2002.

PINKERTON, S. D.; ROLFE, R.; AULD, D. L.; GHETIE, V.; LAUTERBACH, B. F. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 353-357, 1999.

PURUSHOTHAM, N. P.; RAO, M. S.; RAGHAVAN, G. V. Utilization of castor-bean meal in the concentrate mixture of sheep. **Indian Journal of Animal Sciences**, New Delhi, v. 56, n. 10, p. 1090-1093, 1986.

RAO, H. K. Toxic factors and their detoxification in castor. **Journal of Food Science and Technology**, Mysore, v. 7, p. 77-83, 1970.

RHEE, K. C. **Final report on development of castor meal detoxification and deallergenation technology, Phase III operations**. Vienna: United Nations Industrial Development Organization. 1986.

SHASHIKALA, P.; SINGH, N. Dehulling of castor seeds. **Journal of the Oil Technologists Association of India**, Hyderabad, v. 31, p. 149-151, 1992.

SOUZA, R. M. **Efeito do farelo de mamona destoxicado sobre os valores hematológicos de suínos**. 1979. 43 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

THORPE, S. C.; KEMENY, D. M.; PANZANI, R. C.; MCGURL, B.; LORD, M. Allergy to castor bean. II. Identification of the major allergens in castor bean-seeds. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 82, n. 1, p. 67-72, 1988.

THOYTS, P. J. E.; NAPIER, J. A.; MILLICHIP, M.; STOBART, A. K.; GRIFFITHS, W. T.; TATHAM, A. S.; SHEWRY, P. R. Characterisation of a sunflower seed albumin which associates with oil bodies. **Plant Science**, Clare, v. 118, n. 2, p. 119-126, 1996.

UNITED NATIONAL INDUSTRIAL DEVELOPMENT ORGANIZATION. **The production of non toxic castor bean meal free of allergen**. [S.l.]: United Nations, 1987.

VILHJÁLMSDÓTTIR, L.; FISHER, H. Castor bean meal as a protein source for chickens: detoxification and determination of limiting amino acids. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v. 101, n. 9, p. 1185-1192, 1971.

Destoxificação da Torta e Farelo de Mamona para Uso na Alimentação de Pequenos Ruminantes

Antonio Silvio do Egito

Hévilá Oliveira Salles

Marcelo Ferreira Fernandes

Introdução

A alta crescente no preço de matérias-primas de combustíveis, como o petróleo, identificada no início deste século, aliada ao aumento na preocupação com o meio ambiente, provocada, muitas vezes, pela emissão de gases oriundos da queima de combustíveis fósseis, desencadeou um forte interesse por fontes alternativas de energia renováveis.

Dentre essas, pode-se destacar a utilização dos biocombustíveis, que se faz presente nas matrizes energéticas de países de todo o mundo. A geração de energia renovável é considerada uma prioridade do governo brasileiro. Desde o ano de 2008, se tornou obrigatória a adição de 2% de biodiesel ao diesel mineral. Em breve, esse percentual será elevado para 7 a 8% e, conseqüentemente, acarretará em maiores necessidades de pesquisas e investimentos na produção de biocombustíveis e de seus subprodutos.

Ao biodiesel, foi dada uma atenção especial, pelo seu potencial de produção de energia, como também pela possibilidade de geração de emprego e renda para pequenos agricultores necessitados de atividades rentáveis. Estes benefícios não estão ligados somente à agricultura, mas também à pecuária, que pode se beneficiar com os subprodutos resultantes do processamento da matéria-prima em especial no semiárido brasileiro.

Grande parte do território semiárido apresenta limitações para o desenvolvimento da agricultura. Encontra-se nessa região, a maior população de caprinos do Brasil, altamente dependente da importação de fontes proteicas de outras regiões. Tal aspecto, em muitos casos, acaba por inviabilizar a atividade pecuária regional.

O projeto de implantação do biodiesel no Brasil tem como base a utilização de oleaginosas como fonte de matéria-prima. Dentre elas, destacam-se a soja na região centro-sul, o dendê e o babaçu na região norte e a mamona na região nordeste. Esta última merece maior ênfase, uma vez que sua produção está adaptada a regiões semiáridas, como o Nordeste brasileiro.

A mamona é abundante em climas tropicais e vem sendo largamente produzida. Grande interesse tem sido despertado frente à sua semente, para a extração do óleo, posteriormente utilizado nas indústrias de alimentação, têxtil, papéis, plásticos, borrachas, farmácia, perfumaria, tintas, lubrificantes, entre outros. Após a extração do óleo, a mamona gera como subprodutos a torta e o farelo de mamona. São compostos ricos em nitrogênio e utilizados, principalmente, como fertilizantes para a agricultura. Apesar do alto valor em proteína, os subprodutos da mamona possuem uma proteína tóxica, a ricina, que necessita passar por processo de destoxificação, para possibilitar a utilização na dieta animal. Tal processo pode se tornar dispendioso e, então, dificultar o seu uso como fonte de alimento para os ruminantes.

Existe uma grande demanda quanto à necessidade de se obter uma técnica que inative a ricina e permita a utilização dos subprodutos da mamona na nutrição animal, de forma a não onerar os custos de produção. A disponibilização de fontes alternativas de proteína para a alimentação animal se faz necessária, em virtude da ascensão na utilização dos produtos provenientes da soja para a alimentação humana.

Desta forma, este trabalho tem como proposta abordar os aspectos relacionados ao processo de destoxificação da torta de mamona, com tecnologias acessíveis para a produção em pequena e grande escala.

Características da mamona

A mamona (*Ricinus communis* L.) é uma planta da família das euforbiáceas, de origem asiática, introduzida no Brasil pelos portugueses (BELTRÃO et al., 2003; ROCHA et al., 2003; COSTA et al., 2004; PINA et al., 2005). Devido à grande adaptabilidade a temperaturas compreendidas entre 20°C e 30°C e forte insolação, é encontrada em grande parte do território brasileiro. Nas regiões semiáridas do Brasil, esse vegetal ocupa um lugar especial entre as oleaginosas, sobretudo pela tolerância à seca e facilidade de manejo, vantagem importante quando se trata de agricultura em exploração familiar (PINA et al., 2005).

O objetivo principal da produção de mamona é o beneficiamento das sementes para a extração do óleo, usado, principalmente, em lubrificantes utilizados na engenharia, em automóveis de alta velocidade, máquinas industriais (BRUGSCH, 1960) e atualmente como biodiesel.

A semente de mamona contém duas lectinas: a hemaglutinina (RCA I ou RCA 120) e a ricina (RCA II ou RCA 60). Ambas lectinas são glicoproteínas e têm afinidade por galactosídeos (NICOLSON; BLAUSTEIN, 1972; OLSNES; PIHL, 1972).

A ricina é uma proteína heterodimérica com massa molecular de 65 kDa. Composta por duas subunidades distintas: cadeias A e B (FULTON et al., 1986). A cadeia A é uma cadeia polipeptídica com 267 aminoácidos e massa molecular de 32 kDa, enquanto a cadeia B é um polipeptídeo de 262 aminoácidos e massa molecular de 33 kDa. Ambas as subunidades são glicosiladas e a heterogeneidade de glicosilação da cadeia A pode variar a estrutura da ricina entre plantas de diferentes variedades de mamona, bem como entre plantas da mesma variedade (FOXWELL et al., 1985). Em um levantamento realizado no banco de germoplasma dos Estados Unidos, foram detectados níveis de ricina nas sementes de mamona que variavam de 1,5 a 9,7 mg/g (PINKERTON et al., 1999). As diferentes formas e quantidade de ricina podem resultar em diferentes níveis de toxicidade.

As subunidades A e B da ricina são unidas por uma ligação dissulfídica entre a cisteína₂₅₉ da cadeia A e a cisteína₄ da cadeia B (MONTFORT et al., 1987). Essas cadeias possuem papéis específicos que culminam em efeitos tóxicos. A cadeia B da ricina contém dois sítios de ligação com alta afinidade por resíduos de galactose, os quais se ligam a glicoproteínas e glicolipídios na parede das células eucarióticas. Facilitada pelo receptor, a ricina entra na célula eucariótica e, a partir daí, a cadeia B se dissocia da cadeia A. A cadeia A não é capaz de entrar na célula eucariótica sozinha (KIM et al., 2006). O papel da cadeia B consiste em conseguir entrar nas células eucarióticas, enquanto o da cadeia A, em virtude de sua atividade RNA N-glicosidase, é que exerce a ação tóxica real.

A cadeia A inativa os ribossomos que participam do mecanismo de síntese de proteína no interior da célula. Uma única molécula

de ricina A que entra no citosol pode inativar, aproximadamente, 1,7 milhões de ribossomos por minuto, provocando a morte celular (ENDO; TSURUG, 1988). Em adição à inibição da síntese proteica e à apoptose, outros mecanismos também são percebidos, como alteração na estrutura e função da membrana celular e liberação de mediadores de citocinas (DAY et al., 2002; MORLON-GUYOT et al., 2003).

A outra lectina glicoproteica da mamona, a aglutinina, diferentemente da ricina, não é diretamente citotóxica, mas tem afinidade por células vermelhas do sangue, levando à aglutinação e, posteriormente, à hemólise. A aglutinina não é significativamente absorvida no intestino, mas causa problemas clínicos de hemólise, quando administrada por via endovenosa (HEGDE; PODDER, 1992).

A ricinina é um alcaloide tóxico encontrado nas folhas e no pericarpo da mamona. Ainda que pequenas quantidades de ricinina sejam encontradas na planta da mamona e que esta possa ser coextraída junto com a ricina, não existem casos de envenenamento humano por ricinina (DARBY et al., 2001).

O teor de ricinina é bastante variável entre as partes da planta: 1,3% nas folhas, 0,03% no endosperma da semente e 0,15% na casca da semente. O teor de alcaloides nas sementes é influenciado tanto por características genéticas, como por estresse ambiental, estando correlacionado negativamente com o teor de ricina nas sementes (MOSHKIN, 1986).

Em modelos experimentais com ratos, a ricinina foi responsável pela ocorrência de convulsão e morte subsequente. O mecanismo de ação é hipotético, mas pode estar relacionado com o aumento do glutamato e a inibição da pós-sinapse do receptor de ácido amino-butírico no cérebro (WALLER et al., 1965).

Torta e farelo de mamona como fonte de proteína na dieta de ruminantes

A torta de mamona é definida como o resíduo da extração mecânica do óleo das sementes da mamoneira, por meio do processo de prensagem. Possui elevado teor de proteína e para cada 1 tonelada de óleo produzida. É gerada aproximadamente 1,2 tonelada de torta, correspondendo a cerca de 55% do peso total das sementes. Este valor pode oscilar em virtude da variedade de mamona, bem como do processo industrial utilizado para a extração do óleo (AZEVEDO; LIMA, 2001).

Quando a extração do óleo da mamona é realizada por meio de solvente, o produto obtido é o farelo de mamona. A principal diferença entre o farelo e a torta de mamona está relacionada à quantidade de extrato etéreo no composto (Tabela 1). Esse último é maior na torta de mamona, devido à extração do óleo por meio de solvente ser um processo mais eficiente.

Tabela 1. Composição química do farelo e torta de mamona

Itens	Mamona	
	Farelo	Torta
Matéria seca (MS, %)	88,09	89,00
Extrato etéreo (% da MS)	3,14	7,98
Proteína bruta (PB, % da MS)	37,32	33,70
Nitrogênio não proteico (% do NT)	22,27	29,61
Nitrogênio insolúvel em detergente neutro (% do NT)	17,60	12,49
Nitrogênio insolúvel em detergente ácido (% do NT)	4,85	6,77
FDNcp (% da MS)	46,50	48,30
Cutina (% da MS)	25,26	27,39
Lignina (% da MS)	4,52	4,29
Cinzas (% da MS)	9,82	6,92
Cálcio (% da MS)	0,78	0,72
Fósforo (% da MS)	0,68	0,84

Fonte: Oliveira et al. (2010).

A torta é predominantemente utilizada como fertilizante orgânico na restauração de terras esgotadas (ANANDAN et al., 2005), podendo ainda ser empregada como matéria-prima para a produção de aminoácidos, plásticos biodegradáveis, colas, inseticidas, entre outros produtos (COSTA et al., 2004).

Mesmo com baixos teores de triptofano e de lisina, o elevado teor de proteína total na torta de mamona torna o uso da mesma na alimentação de ruminantes uma alternativa bastante atraente, já que esses animais pouco dependem do balanço aminoacídico da ração. Por possuírem microrganismos ruminais, que participam do processo digestivo, são capazes de sintetizar os aminoácidos essenciais (SEVERINO, 2005).

Robb et al. (1974) avaliaram a inclusão de farelo de mamona na dieta de vacas em lactação e mesmo concluindo que esse ingrediente pode ser utilizado como fonte de proteína na dieta dos animais, detectaram pequenas quantidades de ricina no leite. Diante disso, os autores ressaltaram a necessidade da realização de maiores estudos para garantir a segurança do produto frente ao consumo humano.

Wanderley e Bose (1988) avaliaram a adição do farelo de mamona destoxificado ao feno de alfafa na dieta de ovinos e concluíram que a adição de farelo de mamona aumentou a digestibilidade da proteína sem qualquer relato de problemas com intoxicação dos animais.

Menezes et al. (2009) fizeram a substituição parcial do farelo de soja pela torta de mamona na dieta de ovinos e avaliaram os coeficientes de digestibilidade dos nutrientes. Os valores de substituição foram 0; 15; 30 e 45% e os resultados dos coeficientes de digestibilidade dos nutrientes não apresentaram efeito da substituição parcial. Assim, os autores sugeriram que o farelo de soja pode ser substituído pela torta de mamona, nas percentagens avaliadas.

Vieira et al. (2010) avaliaram o efeito da inclusão de farelo de mamona destoxificado nas rações de ovinos mestiços da raça Morada Nova, sobre as características de carcaça. Os animais foram mantidos confinados por 70 dias e, ao final do experimento, não foram observadas diferenças entre os tratamentos para as variáveis de peso vivo ao abate, peso de carcaça quente, peso de carcaça fria, comprimento de carcaça e grau de conformação. Como conclusão, os autores recomendaram a substituição de até 40% do farelo de soja pelo farelo de mamona na dieta.

Avaliando a substituição de 100% do farelo de soja pelo farelo de mamona, tratado com cal (fonte de hidróxido de cálcio) e não tratado, Oliveira et al. (2010) não verificaram diferença no consumo e na digestibilidade dos nutrientes. Ocorreu, na verdade, um maior aproveitamento do farelo de mamona tratado, em função da hidrólise alcalina pelo hidróxido de cálcio.

Pompeu et al. (2012) avaliaram a influência de quatro níveis de substituição em rações (0; 33; 67 e 100%) do farelo de soja pela torta de mamona destoxificada pelo método da autoclavagem sobre o desempenho produtivo e as características de carcaça de ovinos mestiços de Morada Nova. Os autores observaram uma redução no ganho de peso médio diário com o aumento da substituição do farelo de soja pela torta de mamona, recomendando que a torta de mamona destoxificada possa ser adicionada até níveis de 67% de substituição ao farelo de soja, de forma a não influenciar as características das carcaças de ovinos.

Baseado nos trabalhos relatados, a viabilidade de utilização do farelo e da torta de mamona na alimentação de ruminantes está diretamente relacionada com a destoxificação desses materiais por meio de métodos rápidos, baratos e suficientemente eficazes.

Apesar de alguns trabalhos terem demonstrado que a torta sem tratamento não ocasionou morte dos animais (FURTADO et al., 2011; 2012), é vasta a literatura sobre o potencial tóxico da ricina nesse material. Dessa forma, a destoxificação torna-se necessária já que não há garantia de que esse material seja de fato seguro, uma vez que não foram realizados experimentos a longo prazo seguidos de acompanhamentos clínicos e avaliação patológica após abate dos animais.

Destoxificação da torta de mamona

Como os teores de ricina na mamona estão diretamente relacionados às variáveis genéticas das plantas, seria interessante que os estudos de melhoramento genético dessas espécies visassem à produção de genótipos com teores reduzidos ou nulos de ricina, mas esse não é um objetivo de seleção na mamona no momento. Dessa forma, a redução ou a eliminação da ricina está mais dependente dos tratamentos de destoxificação dos subprodutos do que da produção de materiais com baixa concentração ou ausência da toxina.

Os tratamentos testados para destoxificação da ricina incluem desnaturação térmica, extrusão, efeito do armazenamento e tratamentos químicos, biológicos e enzimáticos (MACHADO, 2008).

Várias alternativas já foram testadas para destoxificar a mamona. A autoclavagem, associação de pressão e temperatura, foi uma das primeiras propostas tida como eficaz para a destoxificação. Após a realização desses testes, foram propostos métodos utilizando NaOH, KOH, Ca(OH)_2 , NH_3 , ureia, permanganato de potássio e a fermentação aeróbica (GARDNER et al., 1960).

Diversos trabalhos foram realizados na tentativa de transformar a torta de mamona em um produto atóxico para que pudesse ser utilizado na nutrição animal. No entanto, os processos desenvolvidos geralmente são onerosos e comprometem, conseqüentemente, o sistema de produção. Na tentativa de destoxificação, podem ser destacados os trabalhos realizados por Gardner et al. (1960), Perrone et al. (1966) e Freitas (1974), revisados por Severino (2005), Hinkson et al. (1972), Frénoy (1986), Gandhi et al. (1994), Mackinnon e Alderton (2000) e Anandan et al. (2005). Nesse último trabalho, resultados positivos foram obtidos com a autoclavagem (100% de destoxificação), cloreto de sódio (91% de destoxificação) e fervura por 30 minutos (90% de destoxificação). Esses resultados de destoxificação, apesar de parecerem satisfatórios, ainda exigem maior detalhamento para que seja comprovada a sua eficácia e seu potencial para utilização como fonte de proteína na alimentação animal.

Além da utilização de métodos individuais de destoxificação, a associação de mais de um método como, por exemplo, a extrusão e uso de alcalinizantes, parece desencadear bons resultados.

A utilização de extrusoras no processo de destoxificação aparenta ser uma alternativa eficiente e necessária para a produção em escala comercial. No entanto, a utilização de métodos mais acessíveis à agricultura em pequena escala é necessária para viabilização da cadeia produtiva da mamona. A Embrapa Caprinos e Ovinos em colaboração com instituições como a Universidade Federal do Ceará, Universidade Federal da Paraíba, Embrapa Agroindústria de Alimentos, Embrapa Agroindústria Tropical e Embrapa Algodão tem gerado esforço em desenvolver tecnologias viáveis para obter metodologias de destoxificação através de agentes alcalinizante e acidificantes, extrusão associada a tratamentos químicos e enzimáticos. Além da identificação de metodologias para determinar a inocuidade da torta de mamona e estudar a influência desse resíduo na nutrição de pequenos ruminantes.

Baseado nessa necessidade, recentemente foi identificada e patenteada pela Embrapa Caprinos e Ovinos uma metodologia para destoxificar o farelo utilizando NaOH, podendo ser utilizada tanto de forma artesanal como industrial. O “resíduo tratado” mostrou grande potencial para alimentação de cabras leiteiras, uma vez que não afetou a produção, bem como a qualidade do leite dos animais submetidos à dieta (FERNANDES, 2011).

Novas alternativas para destoxificação da torta de mamona proveniente da extração de óleos para a produção de biodiesel estão sendo avaliadas no Laboratório de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Embrapa Caprinos e Ovinos, dentre elas o uso de extratos enzimáticos de vegetais da biodiversidade brasileira. Na Figura 1 é apresentado um *screening* de vários extratos enzimáticos vegetais sobre o perfil proteico da torta de mamona, mostrando os extratos 2 e 9 capacidade de hidrolisar a ricina. Esses resultados são bastante promissores, uma vez que a torta poderia ser destoxificada na fazenda sem os cuidados e precauções que demandam a manipulação com agentes alcalinizantes.

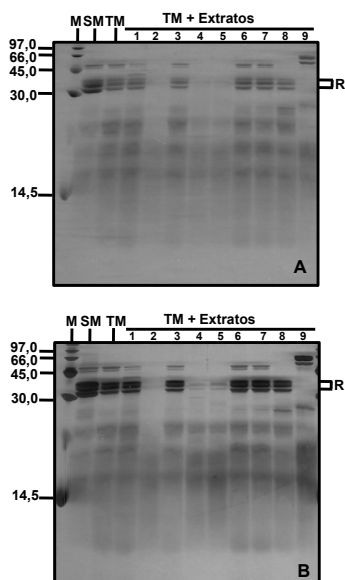


Figura 1. Caracterização eletroforética das proteínas de sementes e torta da mamona (A) Coloração com azul de Coomassie, (B) Revelação com Prata. M: Marcador de massa molecular (KDa), SM: Sementes de mamona, TM: Torta de mamona, TM + Extratos: Torta de mamona adicionada de extratos enzimáticos após 24 h (1 a 9 = diferentes extratos enzimáticos), R: Ricina

Identificação da ricina após destoxificação

A presença da ricina pode ser detectada por métodos como eletroforese, western-blotting, elisa, cromatografias, radioimunoensaios, biosensores (CRESPO NETO; MACHADO, 2010; LUBELLI et al., 2006). A metodologia mais utilizada é a de eletroforese desnaturante em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) onde se identificam as duas bandas correspondentes às cadeias A e B da ricina baseada na massa molecular, após coloração com azul de Coomassie. No entanto, em experimentos realizados na Embrapa Caprinos e Ovinos verificou-se que a coloração de Coomassie pode ocasionar resultados falsos uma vez que a ausência da proteína (ricina) no gel pode ser identificada após coloração de prata (FERNADES, 2011). Portanto, a não detecção da proteína por Coomassie necessita da confirmação por revelação com prata. Na Figura 1A, observa-se fracamente a presença de ricina nas amostras 4 e 5 após coloração com o azul de Coomassie, sendo esta proteína melhor evidenciada quando o gel foi submetido à revelação com prata conforme observado na Figura 1B.

Este método não radioativo (prata) chega a ser 100 vezes mais sensível, se comparado à utilização de azul de Coomassie, já que o mesmo consegue detectar nanogramas de proteínas (RABILLOUD, 1990; RABILLOUD et al., 1994; CANDIANO et al., 2004). A utilização dessa metodologia na detecção de proteínas tóxicas pode ser uma ferramenta valiosa quando se trabalha com alimentos que poderão ser utilizados tanto na alimentação animal quanto na humana, devido à segurança dos resultados.

Como se pode perceber, as técnicas de detecção e quantificação de ricina na torta de mamona são técnicas sofisticadas, que necessitam de equipamentos e materiais de consumo de preço elevado e pessoal técnico especializado.

No entanto, detectar a presença de ricina na torta de mamona após destoxificação, assim como quantificá-la, não indicam que a torta seja ou não tóxica, pois a proteína detectada pode estar em quantidade passível de metabolização pelo animal, não chegando a desencadear intoxicação, ou mesmo em uma quantidade expressiva, a proteína pode estar inativa. Dessa forma, é necessário determinar se a proteína continua ativa após os tratamentos. É através dos ensaios biológicos que se chega a essa informação de presença de toxicidade.

Os ensaios biológicos podem ser realizados *in vivo*, mas diante do alto custo e tempo despendido para os mesmos, a melhor alternativa é fazer uso dos ensaios de toxicidade *in vitro*. Esses ensaios devem ser utilizados para controle de qualidade do processamento, bem como para avaliar a eficiência de novos métodos de destoxificação.

Dentre as técnicas disponíveis, ou seja, já testadas para esse fim, é relatado o uso de células Vero em ensaio de citotoxicidade capaz de detectar até 10 ng de ricina/mL (FERNANDES et al., 2010). Entretanto, ainda é um ensaio caro, necessitando de equipamentos sofisticados e ambiente controlado para evitar contaminações. Demant (2008) propôs um ensaio mais acessível utilizando como modelo para o teste de toxicidade de sementes o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*.

Recentemente, na Embrapa Caprinos e Ovinos, em projeto financiado pelo Banco do Nordeste, trabalhando com extratos de semente de mamona como fonte de moléculas ativas para o controle da fase de vida livre de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes, se observou a alta sensibilidade das larvas L₁ aos extratos obtidos com o diluente a base de NaCl 150 mM. O bioensaio proposto foi capaz de detectar toxicidade em até 1 µg de proteína de extratos brutos de mamona (NASCIMENTO et al. 2012), podendo-se elevar essa acurácia ao se testar a ricina pura.

Diante da facilidade de se obter larvas de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes nas várias regiões do Brasil, em especial no Nordeste, região onde se concentra a cultura da mamona, a técnica utilizando essas larvas constitui uma nova alternativa de metodologia para se verificar a toxicidade de extratos de mamona e não simplesmente a presença ou ausência de determinado componente na amostra, tendo como vantagem a simplicidade e o baixo custo.

Considerações finais

Os estudos realizados até o momento demonstram ser viável a utilização da torta de mamona na dieta de ruminantes, desde que destoxificada, por exemplo, pelo método de destoxificação com NaOH patenteado pela Embrapa Caprinos e Ovinos. É necessário, antes de ofertar a torta aos animais, associar o processo de destoxificação à utilização de um bioensaio rápido e de baixo custo para controle de qualidade da torta destoxificada.

Referências

ANANDAN, A.; KUMAR, G. K. A.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K. S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**. Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 159-168, 2005.

AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília: Embrapa Informacao Tecnologia, 2001. 350 p.

BELTRÃO, N. E. de M.; MELO, F. de B.; CARDOSO, G. D.; SEVERINO, L. S. **Mamona: árvore do conhecimento e sistemas de produção para o semi-árido brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2003. 19 p. (Embrapa Algodão. Circular Técnica, 70).

BRUGSCH, H. G. Toxic hazards: the castor bean. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 262, p. 1039-1040, 1960.

CANDIANO, G.; RUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G.. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 25, n. 9, p. 1327-1333, 2004.

COSTA, F. X.; SEVERINO, L. S.; BELTRÃO, N. E. M.; FREIRE, R. M. M.; LUCENA, A. M. A.; GUIMARÃES, M. M. B. Composição química da torta de mamona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Energia e sustentabilidade: palestras**. [Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004].

CRESPO NETO, H. A.; MACHADO, O. L. T. Avaliação dos teores de ricina e de proteases durante o armazenamento de torta de mamona (*Ricinus communis* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. **Inclusão social e energia: anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 1801-1806.

DARBY, S. M.; MILLER, M. L.; ALLEN, R. O. Forensic determination of ricin and the alkaloid marker ricinine from castor bean extracts. **Journal of Forensic Sciences**, W Conshohocken, v. 46, n. 5, p. 1033-1042, 2001.

DAY, P. J.; PINHEIRO, T. J.; ROBERTS, L. M.; LORD, J. M. Binding of ricin A-chain to negatively charged phospholipid vesicles leads to protein structural changes and destabilizes the lipid bilayer. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 41, n. 8, p. 2836-2843, 2002.

DEMANT, C. A. R. **Metodologia para quantificar ricina em sementes de mamona com o uso de *Caenorhabditis elegans***. 2008. 48 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - UNESP, Botucatu, SP.

ENDO, Y.; TSURUGI, K. The RNA N-glycosidase activity of ricin A-chain. The characteristics of the enzymatic activity of ricin A-chain with ribosomes and with rRNA. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 263, n. 18, p. 8735-8739, 1988.

FERNANDES, K. V.; MELO, E. J. T.; GODOY, M. G.; GUIMARÃES, Z.; ASCHERI, J. L.; MACHADO, O. L. T. Desenvolvimento de um bioensaio para detecção de ricina na torta de mamona submetida a processos de destoxificação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 4.; SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1., 2010, João Pessoa. **Inclusão social e energia: anais...** Campina Grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 1866-1871.

FERNANDES, M. F. **Farelo de mamona destoxificado na dieta de cabras leiteiras**. 2011. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Federal da Paraíba, Universidade Federal Rural do Pernambuco e Universidade Federal do Ceará, Areia, PB.

FOXWELL, B. M. J.; DONOVAN, T. A.; THORPE, P. E.; WILSON, G. The Removal of Carbohydrates from Ricin with Endoglycosidases H, F, and D and alpha- mannosidase. **Biochimica Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 840, n. 2, p. 193-203, 1985.

FRÉNOY, J. P. Effect of physical environment on the conformation of ricin: influence of low pH. **Biochemistry Journal**, London, v. 240, n. 1, p. 221-226, 1986.

FULTON, R. J.; BLAKEY, D. C.; KNOWLES, P. P.; UHR, J. W.; THORPE, P. E.; VITETTA, E. S. Purification of ricin A1, A2, and B chains and characterization of their toxicity. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 261, n. 12, p. 5314-5319, 1986.

FURTADO, R. F.; GUEDES, M. I. F.; ALVES, C. R.; MOREIRA, A. C. O. M.; FELIX, W. P.; DUTRA, R. A. F. Produção de anticorpos policlonais anti-ricina. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 124-130, 2011.

FURTADO, R. N.; CARNEIRO, M. S. S.; CÂNDIDO, M. J. D.; GOMES, F. H. T.; PEREIRA, E. S.; POMPEU, R. C. F. F.; SOMBRA, W. A. Valor nutritivo de dietas contendo torta de mamona submetida a métodos alternativos de destoxificação para ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 64, n. 1, p. 155-162, 2012.

GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M.; MULKY, M. J. Detoxification of castor seed meal by interaction with sal seed meal. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Bombay, v. 71, n. 8, p. 827-831, 1994.

GARDNER, H. K.; D'AQUIM, E. L.; KOLTUN, S. P. MCCOURTNEY, E. J.; VIX, H. L. E.; GASTROCK, E. A. Detoxification and deallergenization of castor beans. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Champaign, v. 37, n. 3, p. 142-148, 1960.

HEGDE, R.; PODDER, S. K. Studies on the variants of the protein toxins ricin and abrin. **European Journal of Biochemistry**, New York, v. 204, n. 1, p. 155-164, 1992.

HINKSON, J. W.; ELLIGER, C. A.; FULLER, G. The effect of ammoniation upon ricinine in castor meal. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 49, p. 196-199, 1972.

KIM, S. K.; HANCOCK, D. K.; WANG, L.; COLE, K.; REDDY, P. Methods to characterize ricin for the development of reference materials. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, Washington, DC, v. 111, n. 4, p. 313-324, 2006.

LUBELLI, C.; CHATGILIALOGLU, A.; BOLOGNESI, A.; STROCCHI, P.; COLOMBATTI, M.; STIRPE, F. Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immunopolymerase chain reaction assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 355, n. 1, p. 102-109, 2006.

MACHADO, O. L. T. Torta de mamona: avanços no aproveitamento como alimento animal e seu manuseio seguro. Painel 1. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. **Energia e ricinoquímica: resumos**. Salvador: SEAGRI: Embrapa Algodão, 2008.

MACKINNON, P. J.; ALDERTON, M. R. An investigation of the degradation of the plant toxin, ricin, by sodium hypochlorite. **Toxicon**, Oxford, v. 38, n. 2, p. 287-291, 2000.

MENEZES, D. R.; COSTA, R. G.; ARAÚJO, G. G. L. de; PEREIRA, L. G. R.; VOLTOLINI, T. V.; OLIVEIRA, P. T. L. de; TOSTO, M. S. L. Coeficientes de digestibilidade de nutrientes em dietas contendo torta de mamona para ovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46., 2009, Maringá. **Inovação científica e tecnológica em zootecnia: anais dos resumos**. Maringá: SBZ: UEM, 2009.

MONTFORT, W.; VILAFRANCA, J. E.; MONZINGO, A. F.; ERNST, S. R.; KATZIN, B.; RUTENBER, E.; XUONG, N. H.; HMALIN, R.; ROBERTUS, J. D. The three-dimensional structure of ricin at 2.8 Å. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 11, p. 5398-5403, 1987.

MORLON-GUYOT, J.; HELMY, M.; LOMBARD-FRASCA, S.; PIGNOL, D.; PIÉRONI, G.; BEAUMELLE, B. Identification of the ricin lipase site and implication in cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 19, p. 17006-17011, 2003.

MOSHKIN, V. A. (Ed.). **Castor**. New Delhi: Amerind Publishing, 1986. 315 p.

NASCIMENTO, M. T. S. C.; CAVALCANTE, A. C. R.; VIEIRA, L. S.; ANDRADE, L. B. S.; SALLES, H. O. Larvas de nematoides gastrintestinais de caprinos como bioindicador de atividade tóxica em extratos de mamona. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 5.; CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 8., 2012, Salvador. **Biodiesel, inovação e desenvolvimento regional**: anais... Trabalhos científicos. Lavras: UFLA, 2012.

NICOLSON, G. L.; BLAUSTEIN, J. The interation of *Ricinus Communis* agglutinin with normal and tumor cells surface. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 266, n. 2, p. 543-547, 1972.

OLIVEIRA, A. S.; CAMPOS, J. M. S.; OLIVEIRA, M. R. C; BRITO, A. F.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMAN, E.; VALADARES, R. F. D.; SOUZA, S. M de.; MACHADO, O. L. T. Nutrient digestibility, nitrogen metabolism and hepatic function of sheep fed diets containing solvent or expeller castor seed meal treated with calcium hydroxide. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, n. 1-2, p. 15-28, 2010.

OLSNES, S.; PIHL, A. Ricin: a potent inhibitor of protein synthesis. **FEBS letters**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 327-329, 1972.

PINA, M.; SEVERINO, L. S.; BELTRAO, N. E. de M.; VILLENEUVE, P.; LAGO, R. Novas alternativas de valorização para dinamizar a cultura da mamona no Brasil. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, DF, v. 22., n. 2, p. 453-462, 2005.

PINKERTON, S. D.; ROLFE, R.; AULD, D. L.; GHETIE, V.; LAUTERBACH, B. F.; Selection of castor with divergent concentration of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 353-357, 1999.

POMPEU, R. C. F. F.; Cândido, M. J. D.; Pereira, E. S.; BOMFIM, M. A. D.; CARNEIRO, M. S. M.; ROGÉRIO, M. C. P.; SOMBRA, W. A.; LOPES, M. N. Desempenho produtivo e características de carcaça de ovinos em confinamento alimentados com rações contendo torta de mamona destoxificada em substituição ao farelo de soja. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, DF, v. 41, n. 3, p. 726-733, 2012.

RABILLOUD, T. Mechanisms of protein silver staining in polyacrilamide gels: a 10-year synthesis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 11, n. 10, p. 785-794, 1990.

RABILLOUD, T.; VUILLARD, L.; GILLY, C.; LAWRENCE, J. J. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview. **Cellular and Molecular Biology**, Noisy-le-Grand, v. 40, n. 1, p. 57-75, 1994.

ROBB, J. G.; LABEN, R. C.; WALKER, H. G.; HERRING, V. Castor Meal in Dairy Rations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 57, n. 4, p. 443-450, 1974.

ROCHA, M. S.; OLIVEIRA, K. S.; COSTA, M. N.; CUNHA, A. O.; CARVALHO, J. M. F. C.; SANTOS, J. W. dos. Métodos de regeneração in vitro da mamoneira a partir de diferentes tipos de explantes. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 7, p. 647-652, 2003.

SEVERINO, L. S. **O que sabemos sobre a torta da mamona**. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2005. 31 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 134).

VIEIRA, M. M. M; CANDIDO, M. J. D.; BOMFIM, M. A.D.; SEVERINO, L. S.; ZAPATA, J. F. F.; BESERRA, L. T.; MENESES, A. J. G.; FERNANDES, J. P. B. Características da carcaça e dos componentes não carcaça em ovinos alimentados com rações a base de farelo de mamona. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 11, n. 1, p. 140-149, 2010.

WALLER, G. R.; TANG, M. S.; SCOTT, M. R.; GOLDBERG, F. J.; MAYES, J. S.; AUDA, H. Metabolism of ricinine in the castor plant. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 40, n. 5, p. 803-807, 1965.

WANDERLEY, R. C.; BOSE, M. L. V. Digestibilidade e balanço metabólico da fração nitrogenada do farelo de mamona desintoxicado e de feno de alfafa em ovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, DF, v. 17, n. 5, p. 456-463, 1988.

Analytical Methods for the Determination of Phorbol Esters in *Jatropha* Plant Parts and Their Products

Rakshit Kodekalra Devappa
Harinder Paul Singh Makkar

Introduction

Biofuel plays a key role in future energy supply. Recently, *Jatropha curcas* has gained considerable interest for its high quality seed oil for biodiesel production. The *Jatropha* seed oil (27 - 40%) can be transesterified into high quality biodiesel meeting European and American biodiesel standards. The global biodiesel production is projected to grow at a rate of ~ 6%/annum by 2020 (OECD, 2011). During the past two decades, there has been interest in commercial cultivation of *J. curcas* plant in many tropical and subtropical countries. Among the many *Jatropha* species, *J. curcas* is the most studied one as a biodiesel feedstock. This plant belongs to *Euphorbiaceae* family. All parts of *J. curcas* have been used in traditional human medicine and for veterinary purposes for a long time. Several attempts are also being made to use biodiesel byproducts/co-products (e.g., cake or meal, acid gum and glycerol) as livestock feed.

The seeds contain anti-nutritional factors (tannin, phytate, saponin, curcumin and trypsin inhibitor) and toxic phytochemicals (phorbol esters; PEs). The extracts / oil / seeds / leaves are toxic to many animal species including rat, mice, fish, chicken, goats, sheep and cattle. The toxicity is attributed to the presence of PEs. In *J. curcas*, six PEs have been reported (DEVAPPA, 2012a). Due to environment and human health issues, there is a need to detect and quantify the PEs present in *Jatropha* based products. In the following sections, analytical methods and bioassays used to detect and quantify PEs are presented.

Chromatographic methods for the analyses of phorbol esters

Phorbol esters from *Jatropha* oil / seed or other matrices can be easily extracted in methanol using a ball mill or a homogenizer, followed by ultra-sonication and centrifugation to collect oily methanol extract containing *Jatropha* PEs. The methanol extract can be analyzed for PEs both by qualitative and quantitative methods (MAKKAR et al., 2007).

Thin layer chromatography (TLC) and UV-spectrophotometric methods offer a simple tool for the determination of PEs. In the TLC method, 65% ethyl acetate in pentane is used as a solvent and detection is done at 254 nm. The *Jatropha* PEs (factor C₁ to factor C₆) have retention factors (R_f) values ranging from 0.4 to 0.5 while that of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) is 0.55. In the UV-spectrophotometric method the methanol extract is passed through a solid phase extraction (SPE) column and the resulting eluate is analyzed for PEs at 280 nm. For raw kernels, SPE eluates with absorbance ≥ 0.056 are considered as toxic and those with absorbance ≤ 0.032 as non-toxic. For defatted kernel meals, SPE

eluates with absorbance ≥ 0.059 are considered as toxic and those with absorbance ≤ 0.043 as non-toxic (DEVAPPA et al., 2012b).

The HPLC based method offers accurate determination of PEs. In the HPLC system, C_{18} reverse phase column is used. Test sample is eluted with acetonitrile and water containing 0.175% ortho-phosphoric acid. The *Jatropha* PEs (sum of 4 peaks) appears between 25 and 31 min. The sensitivity of the method is $3 \mu\text{g}$. The concentrations are expressed equivalent to PMA or factor C_1 equivalent (MAKKAR et al., 1997; MAKKAR et al., 2007; ROACH et al., 2012). The PEs are further confirmed by observing absorption spectrum (200 to 400 nm) for 4 peaks of *Jatropha* PEs. The PEs are present in *Jatropha* seed cake (0.5–1.5 mg/g), kernel meal (1–3 mg/g), oil (3–7 mg/g), kernels (3–6 mg/g), roots (0.55 mg/g), bark (outer brown skin) (0.39 mg/g), bark (inner green skin) (3.08 mg/g), wood (0.09 mg/g), stems (0.78 – 0.99 mg/g), leaves (1.83–2.75 mg/g), buds (1.18–2.10 mg/g), flowers (1.39–1.83 mg/g) and kernels (2.0–6.0 mg/g). However, PEs are not present in the latex (MAKKAR; BECKER, 2009).

Biological assays for phorbol esters

The biological test systems/bioassays provide useful and rapid screening methods for measuring potency or biological activities of toxic phytochemicals either in purified form or in mixture/extracts. In the *Artemia salina* bioassay, approximately 10 nauplii (48 h) are placed in each well (96 well plate) containing test sample. The mortality (EC_{50}) is observed after 24 h. In the snail (*Physa fontinalis*) bioassay, 10 snails are placed in a beaker containing water dissolved with test sample. After 24 h, the treated snails are transferred to fresh water and mortality (EC_{50}) is recorded after 48 h. In the *Daphnia magna* bioassay, 20 animals (24 h age) are placed in reconstituted

water containing test sample. The mortality (EC_{50}) is measured after 24 h and 48 h. In all the bioassays tested, increase in concentration of PEs increased mortality with an EC_{50} (48 h) of 0.33, 26.48 and 0.95 mg/L PEs for snail, *Artemia* and *Daphnia*, respectively (DEVAPPA et al., 2012c). Microorganisms are also considered to be an option for bench-top bioassay. Among the many bacterial species, *Streptococcus pyogenes* and *Proteus mirabilis* are highly susceptible to PEs present in methanol extract with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 215 ppm PEs; and *Pseudomonas putida* is sensitive with an MIC of 251 ppm PEs. Similarly, *Fusarium* species of fungi has an EC_{50} of 58 ppm PEs, while *Aspergillus niger* and *Curvularia lunata* has EC_{50} of 70 ppm (DEVAPPA et al., 2012c).

Insect larvae such as *Spodoptera frugiperda* (third instar larvae), a common pest in corn field across the tropical and subtropical areas, can be used as bioassay models to screen PEs. Insecticidal activity or contact toxicity (24 h) can be assessed after topical application of methanol extract (dissolved in acetone) to the dorsal region of the thorax of larvae. The methanol extract exhibits contact toxicity with an LC_{50} of 0.83 mg/mL (w/v). Antifeedant bioassay (no choice leaf disc method) measures insect development and survival. Larvae are placed in a Petri dish and fed on corn leaves treated with different concentrations of PEs ($n = 10$). Antifeedant activity is measured after 24 h for 10 days. Corn leaves treated with methanol extract declined the food consumption (33%), relative growth (42%) and food conversion efficiency (38%) at a concentration of 0.25 mg/mL (w/v). Higher reduction (39% and 45%) in the relative consumption rate was observed at 0.625 and 0.125 mg PEs/mL (w/v) of the methanol extract (DEVAPPA et al., 2012d).

In vivo models, such as mice model offers predictive toxicity for PEs. Purified PEs (or methanol extract) are administered intra gastrically to Swiss Hauschka mice and acute toxicity is measured. The LD_{50} and 95% confidence limits for male mice was 27.34 mg/kg body

mass; and the LD₅ and LD₉₅ were 18.87 and 39.62 mg/kg body mass, respectively. Prominent lesions were mainly found in lung and kidney, with diffused hemorrhages in lung, and glomerular sclerosis and atrophy in kidney at doses ≥ 32.40 g/kg body mass. At 36.0 mg/kg body mass, multiple abruption of cardiac muscle fibers and anachromasis of cortical neurons was observed (LI et al., 2010).

The biological activity of PEs can also be determined *in vitro* using reconstituted human epithelium (RHE) and human corneal epithelium (HCE). The assay involves topical application of PEs or methanol extract to surface of the epidermis and subsequent assessment of their effects on histology and inflammatory substances. The *Jatropha* oil and methanol extract containing 2.42 ng of PEs (*Jatropha* factor C₁ equivalent) or purified individual PEs: factor C₁ (1.3 ng), factor C₂ (0.5 ng), factor C_{3mixture} (0.4 ng) and factor C₄ + C₅ (0.25 ng) (these are the amounts of individual PEs in 2.42 ng of a mixture of PEs as present in the oil) exhibited severe cellular alterations such as marked edema, presence of less viable cell layers, necrosis and/or partial tissue disintegration in epithelium and expression of inflammatory response (interleukin-1 α and prostaglandin E2 release) by several fold both in RHE and HCE (DEVAPPA, 2012a).

Phorbol esters (e.g., *Jatropha* factor C₁ to C₆) are considered to be potent tumor promoters. The tumor promotion properties can be assessed using Bhas 42 cells. The advantage of using this assay is that it does not require initiator treatment like other assays (e.g. SHE and Balbct3 cells) and it involves two stage carcinogenesis steps (initiation and promotion) as in the *in vivo* models. The assay involves application of *Jatropha* PEs to wells containing cultured Bhas 42 cells (SAKAI et al., 2010). The endpoint measures cell viability and formation of transformed foci (dense multi layering of cells, spindle-shaped cells different from the contact-inhibited monolayer cells and dense multi layering of cells and invasive growth into the monolayer of surrounding contact-inhibited cells). The foci in each well is counted

and statistically evaluated for the increase in transformed foci as affected by different concentrations of PEs. The concentration of Jatropha PEs in this study is expressed equivalent to factor C_1 . In this assay, similar to PMA, the methanol extract (0.00005 – 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and individual purified Jatropha PEs (factor C_1 , factor C_2 , factor C_3 mixture and factor ($C_4 + C_5$); 0.0005 – 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ factor C_1 equivalent) exhibited tumor promoting properties. The order of transformed foci/well formation was: PMA > methanol extract > factor ($C_4 + C_5$) > factor $C_{3\text{mixture}}$ > factor C_1 > factor C_2 . However, none of the Jatropha PEs exhibited tumor initiation properties (DEVAPPA, 2012a).

Phorbol esters (analogue of diacylglycerol) are potent activators of protein kinase C. Activation of protein kinase C can be assessed using nonradioactive peptag assay (Promega). The assay uses brightly pink colored fluorescent peptide (P-L-S-R-T-L-S-V-A-A-K), which are highly specific for protein kinase C (PKC). The phosphorylation by PKC alters the peptides charge (+1 to -1), which can be separated by horizontal agarose gel electrophoresis. The phosphorylated species migrate towards the positive electrode, while the non-phosphorylated substrate migrates toward the negative electrode. The presence of activators such as PEs, activates PKC which in turn phosphorylates the peptide. In the assay, phosphorylated fluorescent peptide obtained as an enzymatic reaction product indicates the PKC activity. The presence of PKC activators increases the PKC activity. In this assay, positive control (cAMP as a PKC activator), PMA (1 μg), methanol extract (2 μg), factor C_1 (1 μg), factor C_2 (1 μg), factor $C_{3\text{mixture}}$ (1 μg) and factor ($C_4 + C_5$) (1 μg) induce phosphorylation of fluorescent peptide, which is visualized in an agarose gel indicating the PKC activity (DEVAPPA, 2012a).

The aforementioned analytical methods and bioassays can be applied in (a) evaluation of the PEs concentration in Jatropha samples (seeds, kernels, kernel meal, seedcake, seed meal or different parts of Jatropha plant) aimed at animal feed applications, especially following detoxification, (b) differentiating toxic and

non-toxic genotypes (free of PEs) of *J. curcas* seeds, (c) agronomical and eco-toxicological studies, (d) screening PE contamination in biological/food samples, (e) evaluation of the occupational exposure towards toxic oil used for biodiesel production, and (f) evaluation and development of material data safety sheet.

References

DEVAPPA, R. K. **Isolation, characterization and potential agro-pharmaceutical applications of phorbol esters from *Jatropha curcas* oil.** 2012a. 217 p. Dissertation (Ph.D. in Agricultural Sciences) - University of Hohenheim, Institute for Animal Production in the Tropics and Subtropics Stuttgart, Germany.

DEVAPPA, R. K.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Potential of using phorbol esters as an insecticide in agricultural applications. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 38, p. 50-53, 2012d.

DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Localisation of antinutrients and qualitative identification of toxic components in *Jatropha curcas* seed. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Malden, v. 92, n. 7, p. 1519-1525, 2012b.

DEVAPPA, R. K.; SANJAY, K. R.; KUMAR, V.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Activities of *Jatropha curcas* phorbol esters in various bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 78, p. 57-62, 2012c.

LI, C. Y.; DEVAPPA, R. K.; LIU, J. X.; LV, J. M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 620-625, 2010.

MAKKAR, H. P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Phorbol esters. In: MAKKAR, H. P. S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. **Plant secondary metabolites.** New Jersey: Humana Press, 2007. Cap. 17. p. 101-105.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. *Jatropha curcas*, a promising crop for the generation of biodiesel and value-added co-products. **European Journal of Lipid Science and Technology**, Weinheim, v. 111, n. 8, p. 773-787, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, D.C, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, 1997.

OECD. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2011 – 2020**. Rome: FAO, 2011. Chapter 3: Biofuels, p. 93. Available at: <<http://www.agri-outlook.org/dataoecd/23/56/48178823.pdf>>. Accessed on: 07 jul. 2012.

ROACH, J.; DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Isolation, characterization, stability and bioactivity of *Jatropha curcas* phorbol esters. **Fitoterapia**, Milano, v. 83, n. 3, p. 586-592, 2012.

SAKAI, A.; SASAKI, K.; MURAMATSU, D.; ARAI, S.; ENDOU, N.; KURODA, S.; HAYASHI, K.; LIM, Y.M.; YAMAZAKI, S.; UMEDA, M.; TANAKA, N. Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 702, n. 1, p. 100-122, 2010.

Abordagens Eletroanalíticas para Torta e Sementes de Mamona

João Paulo Saraiva Moraes

Everaldo Paulo de Medeiros

Williame Farias Ribeiro

Liv Soares Severino

Máira Milani

Napoleão Esberard de Macêdo Beltrão

Introdução

O óleo de mamona é um produto para uso industrial com excelentes propriedades químicas que o faz único, principalmente por ser composto de um ácido graxo hidroxilado. Este óleo vem sendo usado pela humanidade há pelo menos 6.000 anos como medicamento e para iluminação (BARNES et al., 2009; SANTOS et al., 2001).

O principal coproduto gerado a partir da extração de óleo de mamona é a torta. Esse produto tem elevado teor de proteínas e por isso é muito atraente para a composição de alimento animal. Na produção de 1 kg de óleo de mamona, é produzido aproximadamente 1,2 kg de torta de mamona. A produção mundial de torta de mamona é estimada em torno de 730 mil toneladas por ano (SEVERINO et al., 2012). A torta possui aproximadamente 42% de

proteínas, compostas por 60% de globulinas, 16% de albuminas, 4% de proteoses e 20% de glutelinas (SEVERINO, 2005).

A maior parte da torta de mamona produzida no mundo está sendo utilizada como fertilizante orgânico, aproveitando-se as propriedades de rápida disponibilização de nitrogênio às plantas, aliadas à capacidade de controlar nematoides parasitas (SEVERINO et al., 2012). Essa torta teria um valor muito maior se usada como alimento animal, mas essa opção não está sendo adequadamente explorada por causa da presença da ricina, que é uma proteína muito tóxica encontrada na semente de mamona e que permanece na torta após a extração do óleo.

A destoxificação da torta de mamona não é um processo difícil, e existem diversos métodos comprovados para destoxificação, tais como autoclavagem e adição de calcário. No entanto, o que mais dificulta o avanço desse processo é a carência de métodos para medição dessa proteína. Esses métodos precisam ser confiáveis, rápidos e com baixos custos.

Durante o processo de extração do óleo, a torta é submetida a altas temperaturas e pressão, que causam inativação da maior parte da ricina. No entanto, essa destoxificação não é completa, e o uso desse produto na alimentação animal só poderá ser feito em larga escala se a toxicidade da torta puder ser monitorada em todas as etapas de produção: pela indústria que produz a torta, pelas pessoas que farão o comércio e pelos criadores que fornecerão a torta para seus animais. Diversas metodologias disponíveis no momento dependem do uso de laboratórios bem equipados e de pessoal adequadamente qualificado, o que inviabiliza seu uso pelos atores da cadeia produtiva.

Neste capítulo, são propostas algumas técnicas eletroanalíticas que podem atender às demandas acima citadas e, assim, agregar valor a esse importante coproduto da cadeia produtiva da mamona.

Análise *screening*

A análise *screening* é um procedimento qualitativo baseado em respostas binárias, como positivo/negativo ou sim/não. Este método é utilizado na tomada de decisões ou na classificação de amostras quando se trabalha com grande número de medições. Na análise *screening*, o resultado é obtido estabelecendo-se um limite, ou um ponto de corte que facilite a decisão. Somente em um momento posterior, utiliza-se um procedimento analítico quantitativo mais detalhado que analisará a amostra em detalhes (Figura 1). Esse processo minimiza os custos e agiliza as respostas analíticas (GAIÃO et al., 2008).

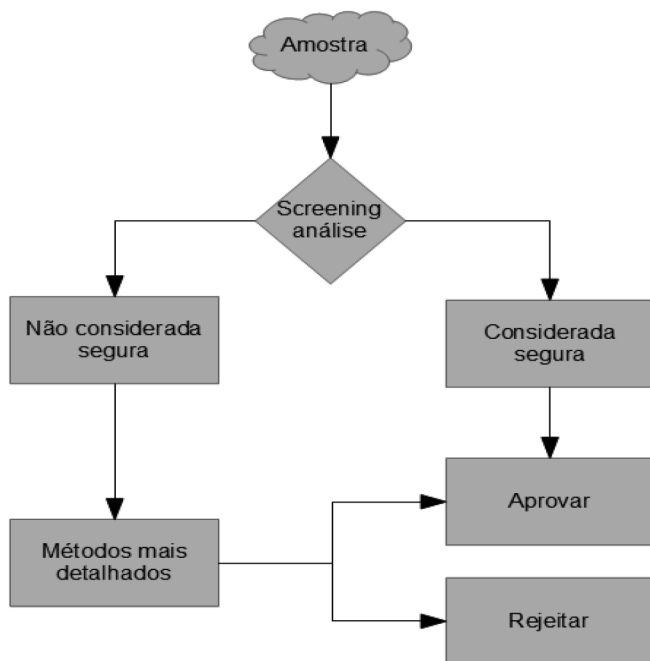


Figura 1. Fluxograma de decisões em uma análise *screening*.

Apesar dos efeitos de interação serem importantes, as análises dos efeitos principais podem, geralmente, fornecer informações valiosas sobre um determinado modelo. Ou seja, não é necessário o conhecimento individual de cada elemento presente em uma análise de composição, nem em cada interação realizada por esses elementos entre si. Assim, existem vários modelos matemáticos que possibilitam o cálculo rápido dos parâmetros globais, por meio de agregações (representações simplificadas dos sistemas reais) e exclusões (omissão de partes não consideradas importantes) de dados (FREY; PATIL, 2002; MATOTT, 2012).

O método de *screening* possui número reduzido de passos e pouca manipulação da amostra, mas o resultado apenas compara a amostra a um valor pré-determinado (PONTES et al., 2011). Outra vantagem da análise *screening* é que um resultado preliminar pode ser obtido rapidamente, reduzindo-se os erros que acontecem quando as amostras demoram muito tempo para serem analisadas, como erros provocados por alterações químicas no próprio material (NASCIMENTO et al., 2010; PONTES et al., 2011).

A análise *screening* geralmente utiliza modelos simples que auxiliam a tomada de decisões de rotina com efeito de escala. No entanto, por ser rápida e simples, essa análise não é apropriada para situações em que um resultado preciso é crítico para o processo. Nesses casos, a análise deve ser feita por métodos de referência oficiais ou validados, os quais são mais caros e demorados, mas fornecem resultados precisos e confiáveis. A análise do tipo *screening* não substitui os métodos de referência, mas é uma pré-seleção para escolha das amostras que devem ser submetidas à análise refinada. Como descrito na Tabela 1, há duas formas de erros em resultados de análises: o falso negativo e o falso positivo. Os métodos de referência devem possuir taxas baixas de ambos os tipos de erro.

Tabela 1. Exemplo de resultados possíveis para uma determinada análise com uma amostra negativa e uma amostra positiva.

	Amostra Negativa	Amostra Positiva
Resultado analítico positivo	Falso positivo	Análise correta
Resultado analítico negativo	Análise correta	Falso negativo

Um método para análise *screening* seria muito útil no controle de qualidade das tortas de mamona e pinhão-manso. Um procedimento rápido, simples e de baixo custo pode servir de base para o processamento industrial, comercialização e uso desses produtos em larga escala. Embora esse procedimento não seja uma comprovação da segurança do produto, ele poderá ser empregado em grande número de amostras, o que aumenta a possibilidade de detecção dos casos em que uma análise detalhada seja necessária.

Determinação eletroquímica da ricina

A ricina é uma proteína tóxica presente no endosperma das sementes da mamona, considerada uma das substâncias mais tóxicas extraídas da natureza, é solúvel em meio aquoso (AUDI et al., 2005; CHAKRAVARTULA; GUTTARLA, 2008; HOFFMAN et al., 2007). Os principais métodos analíticos para a detecção dessa proteína com o maior equilíbrio entre confiabilidade, praticidade e sensibilidade são aqueles que empregam separações cromatográficas e eletroforéticas, biossensores e ensaios imunológicos, sobretudo as análises *screening* (ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (HOFFMAN et al., 2007). Esses métodos apresentam alguns inconvenientes: são laboriosos, dispendiosos,

requerem mão-de-obra especializada, envolvem diversas etapas e provas bioquímicas, além de equipamentos sofisticados.

As técnicas eletroanalíticas estão sendo utilizadas para estudos que englobam as diversas áreas do conhecimento como medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química objetivando-se a obtenção de informações fundamentais sobre propriedades intrínsecas das substâncias (SOUZA et al., 2003). Uma grande vantagem dessas técnicas consiste na possibilidade da medição ser realizada diretamente na amostra sem necessidade de etapas de pré-purificações ou de separações prévias, além de tornar possível a análise de materiais coloridos ou amostras contendo partículas sólidas dispersas. Essas vantagens, aliadas ao curto tempo para realização das análises, ao baixo custo da instrumentação e dos materiais utilizados e à alta imunidade em relação à presença de interferentes, fazem com que sejam cada vez mais utilizadas, quando comparadas às demais técnicas citadas inicialmente.

Um método eletroanalítico que utiliza a oxidação eletroquímica foi proposto por Ribeiro (2012). Nesse método, a ricina foi oxidada sobre um eletrodo de carbono vítreo (CV) em uma ampla faixa de pH, usando-se voltametria de pulso diferencial (VPD) e voltametria de onda quadrada (VOQ). Essas técnicas são rápidas, de baixo custo e apresentam alta sensibilidade analítica. As amostras de ricina foram extraídas de três cultivares distintas de mamoneira (BRS Paraguaçu, BRS Nordestina e BRS Energia) desenvolvidas pela Embrapa Algodão.

As condições operacionais foram: amplitude de pulso 50 mV, tempo de modulação do pulso 70 ms e velocidade de varredura 5 mV s⁻¹ (VPD) e frequência de aplicação de pulso 50 Hz, incremento de potencial 2 mV e amplitude de pulso 50 mV (VOQ). Antes de cada medição eletroquímica, o CV foi submetido à limpeza mecânica e eletroquímica (RIBEIRO, 2012). Para os estudos eletroquímicos apresentados a seguir, utilizou-se a ricina extraída da cultivar BRS

Paraguaçu, sendo registrados também voltamogramas comparativos em VOQ para as demais cultivares. Essa técnica voltamétrica faz a medição especificamente de alguns aminoácidos que estão presentes na molécula da ricina, principalmente a cisteína (presente na ponte dissulfeto ligando as cadeias A e B), a metionina (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011a) e o triptofano (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011b). Esses aminoácidos sofrem oxidação eletroquímica sobre eletrodo de carbono vítreo. Os resultados obtidos são a média da oxidação de 18 aminoácidos presentes nas duas cadeias da ricina.

A eletroatividade de uma solução $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ricina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) foi confirmada por VOQ em diferentes eletrodos de trabalho: ouro ($\phi = 2 \text{ mm}$), CV ($\phi = 2 \text{ mm}$), pasta de carbono ($\phi = 3 \text{ mm}$) e platina ($\phi = 2 \text{ mm}$). Os eletrodos testados apresentam variabilidade considerável para corrente de fundo, sendo o eletrodo de CV melhor com relação a esse parâmetro. Além disso, ele tem um bom equilíbrio entre sensibilidade e seletividade. Dois processos de oxidação foram identificados como potenciais: os picos $E_{p,1} = + 0,367 \text{ V}$ e $E_{p,2} = + 0,751 \text{ V}$ (Figura 2A) cujos centros eletroativos advêm possivelmente dos aminoácidos cisteína (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011a) e triptofano (ENACHE; OLIVEIRA-BRETT, 2011b).

Por apresentarem os componentes de corrente direta e reversa, os picos indicaram que a reação eletródica corresponde a um processo quase reversível (Figura 2A). A redução da área superficial do eletrodo de CV para varreduras sucessivas, provavelmente decorrente de processos de adsorção de ricina e/ou de seus produtos de oxidação (eletroativos ou não) na superfície do CV, impôs uma etapa de polimento do eletrodo antes do registro de cada voltamograma.

A influência do pH sobre a oxidação eletroquímica da ricina foi estudada por VPD variando o pH de 2,0 a 12,0 (Figura 2A). Para valores de pH entre 2,0 e 10,0, os potenciais $E_{p,1}$ e $E_{p,2}$ tiveram relação linear

com o pH, resultando nas equações $E_{p1}(V) = 0,689 - 0,052 \times \text{pH}$ e $E_{p2}(V) = 1,133 - 0,062 \times \text{pH}$. A relação linear (E_p vs. pH) revelou uma inclinação de -52 mV/pH para o P_1 e -61 mV/pH para o P_2 , apontando um mecanismo de reação quase-reversível, envolvendo o mesmo número de prótons e elétrons para ambos os processos, já que esses valores aproximam-se do valor de referência de 60 mV (SMITH, 2006).

Levando-se em consideração que a largura do pico a meia altura ($W_{1/2}$) é $57,3 \text{ mV}$ e $104,6 \text{ mV}$, o processo de oxidação envolve a transferência de $2\text{H}^+ / 2\text{e}^-$ (P_1) e $1\text{H}^+ / 1\text{e}^-$ (P_2), (BRETT; BRETT, 1996). Para $\text{pH} \geq 10,0$, $E_{p,1}$ e $E_{p,2}$ independem do pH, indicando que nessa faixa de pH o mecanismo de reação envolveria a transferência de 2e^- (P_1) e 1e^- (P_2), e seus produtos de oxidação poderiam sofrer desprotonação química em meio alcalino. Assim, um valor de $\text{pKa} \approx 10,0$ foi determinado para ambos os picos de oxidação da proteína alergênica RCA 60. Um terceiro pico de oxidação da RCA 60, $E_{p3} = +1,204 \text{ V}$, somente foi identificado em pH ácido ($2,2 \leq \text{pH} \leq 5,4$) e diminuiu com o aumento do pH.

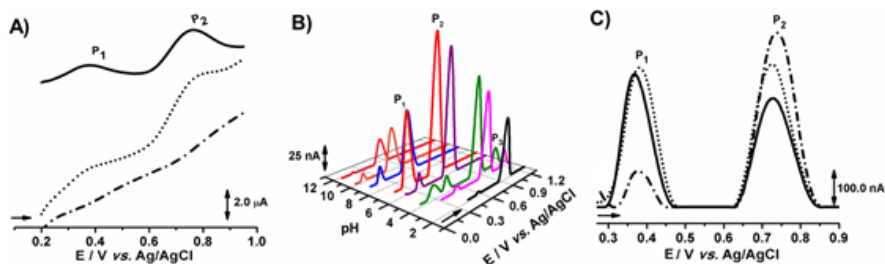


Figura 2. (A) Voltamogramas de onda quadrada de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ricina em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,0: (—) corrente total, (•••) corrente direta e (---) corrente reversa. (B) Voltamogramas de pulso diferencial com linha de base corrigida de $100 \mu\text{mol/L}$ de ricina em diferentes eletrólitos $0,1 \text{ mol/L}$ (HCl/KCl; HAc/NaAc; $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$; NaOH/KCl e bórax/NaOH) em função do pH. (C) Voltamogramas de onda quadrada com linha de base corrigida em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0): Ricina extraída de: (—) BRS Paraguai ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$), (•••) BRS Nordeste ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$) e (---) BRS Energia ($200 \mu\text{mol L}^{-1}$).

Apesar da complexidade da molécula, comportamento eletroquímico similar foi observado ao registrar VOQ em tampão fosfato (pH 7,0) para amostras de ricina extraídas das cultivares de mamoneira (BRS Paraguaçu, BRS Nordestina e BRS Energia) (Figura 2C), o que aponta a possibilidade para a implementação de um método voltamétrico para medição de ricina em amostras oriundas de diferentes cultivares, sobretudo, em amostras contendo baixas concentrações do composto, como em análises ambientais ou de contaminação de alimentos, rações e bebidas.

Além do suporte para comercialização da torta de mamona, esse método será uma ferramenta importante para o desenvolvimento de cultivares de mamona com menor teor de ricina. Atualmente, os programas de melhoramento genético de mamona têm muita dificuldade em medir o teor de ricina em uma grande quantidade de acessos, porque os métodos disponíveis são caros, complicados e as respostas são demoradas.

Melhoramento genético para redução de toxicidade em mamona

A ricina é encontrada somente no endosperma das sementes de mamona. O óleo de mamona não contém ricina, porque ela é insolúvel em óleo, e qualquer resíduo é eliminado no processo de refino. O conteúdo de ricina na torta de mamona varia de 1% a 5% do peso após a extração do óleo (GREENFIELD et al., 2002).

O gene que codifica a ricina não contém íntrons, e o mesmo faz parte de uma família multigênica. Estima-se que seis cópias do gene codificado da ricina estão presentes no genoma da mamona (HALLING et al., 1985). O conteúdo de ricina varia entre genótipos. Em uma

avaliação feita em acessos do Banco de Germoplasma do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), Pinkerton e colaboradores (1999) verificaram que o conteúdo de ricina variou de $1,9 \text{ g kg}^{-1}$ a 16 g kg^{-1} entre 263 acessos; enquanto Auld e colaboradores (2003), estudando uma população de mamoneira, encontraram concentrações de ricina variando entre $0,10 \text{ g kg}^{-1}$ a $5,60 \text{ g kg}^{-1}$ de ricina por semente.

Baldoni e colaboradores (2011) avaliaram a concentração de ricina em sementes de mamona de 20 acessos do Banco de Germoplasma de Mamona da Embrapa, por meio de ensaio imunoabsorvente de ligação de enzimas. Esses autores verificaram diferenças significativas entre os acessos. O acesso BRA 3271 apresentou a maior concentração de ricina nas sementes ($32,18 \text{ g kg}^{-1}$), e a cultivar BRS Paraguaçu, a menor ($3,53 \text{ g kg}^{-1}$).

Muitos métodos, variando em precisão e facilidade de uso, podem ser utilizados para detectar e quantificar a ricina (GARBER et al., 2005; LUBELLI et al., 2006). O método mais comum para detectar a ricina é por meio de sorologia, com uso do teste ELISA, o qual pode detectar uma proteína misturada em preparações de outras proteínas, em preparações cruas ou semipurificadas. É uma metodologia sensível e capaz de gerar resultados com boa reprodutibilidade. Sabendo-se que há variação de conteúdo de ricina entre diferentes genótipos, há possibilidade de se realizar a seleção de genótipos com baixo conteúdo de ricina, os quais poderão ser utilizados dependendo do interesse dos programas de melhoramento. Por meio de melhoramento convencional, foi desenvolvida a cultivar BRIGHAM (1967), um genótipo com baixo nível de ricina (AULD et al., 2001; AULD et al., 2003; PINKERTON et al., 1999). Os mesmo autores verificaram que materiais com baixos níveis de ricina também não são mais suscetíveis ao ataque de pragas e doenças, visto que a ricina é um metabólito secundário responsável pela defesa da semente.

Realizar a seleção para menores conteúdos de ricina é possível desde que seja feita a devida caracterização dos genótipos iniciais quanto ao conteúdo da mesma. Essa é uma linha de pesquisa que está sendo agregada ao escopo do programa de melhoramento da Embrapa, na qual se pretende avaliar o comportamento de produção de ricina em vários materiais genéticos e sob diferentes condições ambientais, sujeitas a diferentes estresses bióticos e abióticos, e que pode ser beneficiada por métodos mais rápidos, que permitam a análise *screening*, por exemplo, de um banco ativo de germoplasma.

Além disso, tendo-se em vista que os melhoristas buscam variedades com menores níveis de ricina, as abordagens eletroanalíticas devem caminhar em paralelo a esse desenvolvimento, para que os métodos que hoje são eficientes em determinar as diferenças entre materiais com alto teor de ricina e materiais destoxificados continuem detectando as diferenças entre os materiais com baixo teor de ricina e seus equivalentes destoxificados.

Conclusões

Um novo método está sendo proposto para a medição do teor de ricina. A técnica se baseia em voltametria, na qual a proteína é submetida à corrente elétrica na presença de um eletrodo que, sob determinadas condições, resulta em um sinal elétrico específico para essa proteína. O método poderá ser utilizado para outras proteínas tóxicas, como a curcina, que é encontrada nas sementes de pinhão-manso e é similar à ricina.

Esse método analítico pode ser executado de forma simples, com custo muito baixo e resultado instantâneo. Por essa razão, acredita-se que ele poderá ser utilizado em programas de melhoramento

genético e na cadeia produtiva da torta de mamona (indústria, comerciantes, usuários e órgãos de fiscalização), os quais disporão de uma ferramenta simples para monitorar a qualidade desse produto.

O método voltamétrico proposto será uma análise rápida em comparação aos métodos tradicionais (cromatografias, imunoensaios, bioensaios), já que o tempo entre o preparo da amostra e a obtenção do resultado dessa voltametria pode ser conseguido em até 1 hora, enquanto na cromatografia de exclusão molecular, podem ser necessárias até 4 horas. Além disso, a instrumentação eletroanalítica pode ser facilmente miniaturizada, ao contrário de ensaios animais ou por cromatografias.

Referências

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M.; SCHIER, J.; OSTERLOH, J. Ricin poisoning: a comprehensive review. **Journal of the American Medical Association**, Chicago, v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.

AULD, D. L.; ROLFE, R. D.; MCKEON, T. A. Development of castor with reduced toxicity. **Journal of New Seeds**, United Kingdom, v. 3, n. 3, p. 61-69, 2001.

AULD, D. L.; PINKERTON, S. D.; BORODA, E.; LOMBARD, K. A.; MURPHY, C. K.; LOWERY, C. C.; KENWORTH Y, K. E.; BECKER, W. D.; ROLFE, R. D.; GHETIE, V. Registration of TTU-LRC castor germplasm with reduced levels of ricin and RCA120. **Crop Science**, Madison, v. 43, n. 2, p. 746-747, 2003.

BALDONI, A. B.; CARVALHO, M. H.; SOUSA, N. L.; NOBREGA, M. B. M.; MILANI, M.; ARAGÃO, F. J. L. Variability of ricin content in mature seeds of castor bean. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 46, n. 7, p. 776-779, 2011.

BALDONI, A. B.; ARAÚJO, A. C. G.; CARVALHO, M. H. de; GOMES, A. C. M. M.; ARAGÃO, F. J. L. Immunolocalization of ricin accumulation during castor bean (*Ricinus communis* L.) seed development. **International Journal of Plant Biology**, Pavia, v. 1, n. 2, p. 61-65, 2010.

BARNES, D. J.; BALDWIN, B. S. BRAASCH, D. A. Degradation of ricin in castor seed meal by temperature and chemical treatment. **Industrial Crops and Products**. v. 29, n. 2-3, p. 509-515, 2009.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Eletroquímica princípios, métodos, e aplicações**. Coimbra: Livraria Almedina, 1996.

BRIGHAM, R. D. Natural outcrossing in dwarf-internode castor *Ricinus communis* L. **Crop Science**, Madison, v. 7, n. 4, p. 353-355, 1967.

CHAKRAVARTULA, S. V. S.; GUTTARLA, N. Amino acids of ricin and its polypeptides. **Natural Product Research**, Oxon, v. 22, n. 3, p. 258-263, 2008.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Boron doped diamond and glassy carbon electrodes comparative study of the oxidation behaviour of cysteine and methionine. **Bioelectrochemistry**, Lausanne, v. 81, n. 1, p. 46-52, 2011a.

ENACHE, T. A.; OLIVEIRA-BRETT, A. M. Pathways of electrochemical oxidation of indolic compounds. **Electroanalysis**, Malden, v. 23, n. 6, p. 1337-1344, 2011b.

FREY, H. C.; PATIL, S. R. Identification and review of sensitivity analysis methods. **Risk Analysis**, Malden, v. 22, n. 3, p. 553-578, 2002.

GAIÃO, E. N.; SANTOS, S. R. B.; SANTOS, V. B.; NASCIMENTO, E. C. L.; LIMA, R. S.; ARAÚJO, M. C. U. An inexpensive, portable and microcontrolled near infrared LED-photometer for screening analysis of gasoline. **Talanta**, Oxford, v. 75, n. 3, p.792-796, 2008.

GARBER, E. A. E.; EPPLEY, R. M.; STACK, M. E.; MCLAUGHLIN, M. A.; PARK, D. L. Feasibility of immunodiagnostic devices for the detection of ricin, amanitin, and T-2 toxin in food. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 68, n. 6, p. 1294-1301, 2005.

GREENFILED, R. A.; BROWN, B. R.; HUTCHINGS, J. B.; IANDOLO, J. J.; JACKSON, R.; SLATER, L. N.; BRONZE, M. S. Microbiological, biological, and chemical weapons of warfare and terrorism. **American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 323, n. 6, p. 326-340, 2002.

HALLING, K. C.; HALLING, A. C.; MURRAY, E. E.; LADIN, B. F.; HOUSTON, L. L.; WEAVER, R. F. Genomic cloning and characterization of a ricin gene from *Ricinus communis*. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 13, n. 22, p. 8019-8033, 1985.

HOFFMANN, L. V.; DANTAS, A. C. A.; MEDEIROS, E. P. de; SOARES, L. S. **Ricina: um impasse para utilização da torta de mamona e suas aplicações**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2007. 25 p. (Documentos, 174).

LUBELLI, C.; CHATGILIALOGLU, A.; BOLOGNESI, A.; STROCCHI, P.; COLOMBATTI, M.; STIRPE, F. Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immunopolymerase chain reaction assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 355, n. 1, p. 102-109, 2006.

MATOTT, L. S. Screening-level sensitivity analysis for the design of pump-and-treat systems. **Ground Water Monitoring and Remediation**, Hoboken, v. 32, n. 2, p. 66-80, 2012.

NASCIMENTO, J. A.; DIONÍSIO, A. G. G.; NASCIMENTO, E. C. L.; FREITAS, S. K. B.; ARAÚJO, M. C. U. Análise screening de vinhos empregando um analisador fluxo-batelada, espectroscopia UV-VIS e quimiometria. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 2, p. 351-357, 2010.

PINKERTON, S. D.; ROLFE, R.; AULD, D. L.; GHETIE, V.; LAUTERBACH, B. F. Selection of castor for divergent concentrations of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 353-357, 1999.

PONTES, M. J. C.; PEREIRAS, C. F.; PIMENTEL, M. F.; VASCONCELOS, F. V. C.; SILVA, A. G. B. Screening analysis to detect adulteration in diesel/biodiesel blends using near infrared spectrometry and multivariate classification. **Talanta**, Oxford, v. 85, n. 4, p. 2159-2165, 2011.

RIBEIRO, W. F. **Determinação voltamétrica de ricina em mamona usando carbono vítreo e diamante dopado com boro**. 2012. 112 f. Tese (Doutorado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB.

SANTOS, R. F. dos; BARROS, M. A. L.; MARQUES, F. M.; REQUIÃO, L. E. G. Análise econômica. In: AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 17-35.

SEVERINO, L. S. **O que sabemos sobre a torta de mamona**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2005. 31 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 134).

SEVERINO, L. S.; AULD, D. L.; BALDANZI, M. J. D.; CÂNDIDO, G.; CHEN, W. C.; TAN, D.; X. HE; LAKSHMAMMA, P.; LAVANYA, C.; MACHADO, O. L. T.; MIELKE, T.; MILANI, M.; MILLER, T. D.; MORRIS, J. B.; MORSE, S. A.; NAVAS, A. A. A.; SOARES, D. J.; SOFIATTI, V.; WANG, M. L.; ZANOTTO, M. D.; ZIELER, H. A review on the challenges for increased production of castor. **Agronomy Journal**, Madison, v. 104, n. 4, p. 853-880, 2012.

SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 81-89, 2003.

SMITH, E. T. Examination of $n=2$ reaction mechanisms that reproduce pH-dependent reduction potentials. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 572, n. 2, p. 259-264, 2006.

Métodos para Detecção de Toxinas e Alérgenos de Mamona e de Pinhão-manso

Olga Lima Tavares Machado

Keysson Vieira Fernandes

Natália Deus-de-Oliveira

Introdução

A torta é o principal produto da cadeia produtiva da mamona e do pinhão-manso, corresponde até 55% de peso das sementes, valor que pode variar de acordo com o teor de óleo da semente e do processo industrial de extração do óleo. Tanto a torta de mamona, quanto a de pinhão-manso, são utilizadas como fertilizantes por serem excelentes fontes de nitrogênio e apresentarem propriedades inseticidas e nematicidas (KONNUR; SUBBARÃO, 2004). Além disso, a torta pode ser usada como matéria-prima para a produção de aminoácidos, plásticos, em especial os biodegradáveis, colas e outros produtos (CHIERICE; NETO, 2007). Este material por apresentar alto teor de proteínas também poderia ser empregado para a alimentação animal, porém fatores tóxicos e alergênicos impedem essa ampla aplicação.

De acordo com a importância econômica apresentada acima, a compreensão dos mecanismos de ação e possíveis tecnologias para inativação de toxinas e alérgenos presentes nessas oleaginosas se

faz necessário. Esta revisão se propõe a apresentar esses compostos e as metodologias envolvidas na detecção de toxinas e alérgenos de acordo com as pesquisas científicas desenvolvidas na área.

Primeiramente, as toxinas e os alérgenos encontrados nas sementes de mamona e de pinhão-manso são apresentados, com destaque para suas estruturas e funções biológicas. Posteriormente, estão descritos os principais métodos atualmente disponíveis para detecção de cada toxina, destacando os pontos positivos e negativos de cada um deles. Ao final desta revisão estão apresentados os alérgenos encontrados em mamona e em pinhão-manso, além de uma metodologia eficaz para avaliar a atividade biológica, por meio de ensaio de desgranulação de mastócitos e resultados positivos observados em tratamentos para inativação desses alérgenos.

Compostos tóxicos e alérgicos da mamona

Os compostos tóxicos encontrados nas sementes de mamona e, também encontrados na torta, referem-se a proteína ricina (toxoalbumina) e ao alcalóide volátil ricinina, e, aos componentes alérgicos constituindo-se de uma fração alérgica que se trata de um conjunto de glicoproteínas denominado CB-1A - Castor-bean allergen (BEWLEY; BLACK, 1994).

Ricina

A ricina é uma proteína encontrada exclusivamente no endosperma das sementes de mamona, não sendo detectada em outras partes da planta, como raízes, folhas ou caules. Representa de 1,5 a 4,0% do conteúdo proteico total da semente (FERNANDES, 2008). Ela é a principal responsável pela toxidez da torta de mamona e

está entre as proteínas de maior toxidez conhecida pelo homem (MOSHKIN, 1986). A ricina é o principal empecilho para uso alimentar da torta da mamona para animais (NA et al., 2004).

A ricina é uma proteína heterodimérica com massa molecular de aproximadamente 66 kDa. Ela consiste de uma cadeia A, de 32 kDa (RTA) que exibe atividade catalítica unida por uma única ponte dissulfeto a uma cadeia B, de 34 kDa (RTB). Esta proteína é capaz de inibir a síntese de proteínas, sendo classificada como RIP (Proteína Inativa Ribossomos) do tipo II por apresentar as duas cadeias descritas anteriormente.

A cadeia B da ricina pode se ligar à superfície de glicoproteínas contendo resíduos de galactose e N-acetil-galactosamina, uma atividade similar a algumas lectinas e, dessa forma, permite a internalização da cadeia A (BRANDT et al., 2001). Tal atividade lectina permite que a cadeia B ligada à cadeia A interaja com glicoproteínas e glicolípidos presentes na superfície da célula e do citosol, permitindo, desta forma, a internalização e translocação intracelular da cadeia A (YOULE et al., 1981; STIRPE; BATELLI, 2006).

Dentro da célula, a cadeia A exibe atividade enzimática do tipo N-glicosidase pela remoção de uma adenina específica (depurinação), o resíduo A_{4324'} a partir de uma região do RNA ribossômico (rRNA) conhecido como o loop α -sarcina/ricina (SRL) (Figura 1).

A ausência desse resíduo de adenina no rRNA impede a ligação do fator de alongamento inibindo, assim, a síntese de proteínas. A ricina é muito eficiente, e uma única molécula pode inativar 2.000 ribossomos por minuto (OLSNES et al., 1975). Devido a essa alta toxicidade, a ricina poderia ser usada como um agente de bioterrorismo (ATLAS, 2002).

A dose letal da ricina por inalação ou por injeção intramuscular ou venosa, segundo Bradberry e colaboradores (2003) é de

aproximadamente 5–10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, o que corresponde a 350–700 μg para um indivíduo adulto de 70 kg. A morte ocorre em poucas horas.

O estabelecimento de uma correlação entre a quantidade de semente ingerida de forma acidental e a morte de um animal não é tão simples de ser estabelecida. O teor de ricina por semente varia entre cultivares. Além disso, Sehgal e coautores (2010) demonstraram que existem isoformas de ricina, com diferentes níveis de toxicidades, em uma mesma cultivar.

Métodos de detecção da ricina

A escolha do método de identificação e quantificação da ricina deve levar em conta o que se pretende: avaliar a presença do componente tóxico como prevenção de atentados bioterroristas ou avaliar processos de destoxificação da torta para a inclusão desta em rações animais.

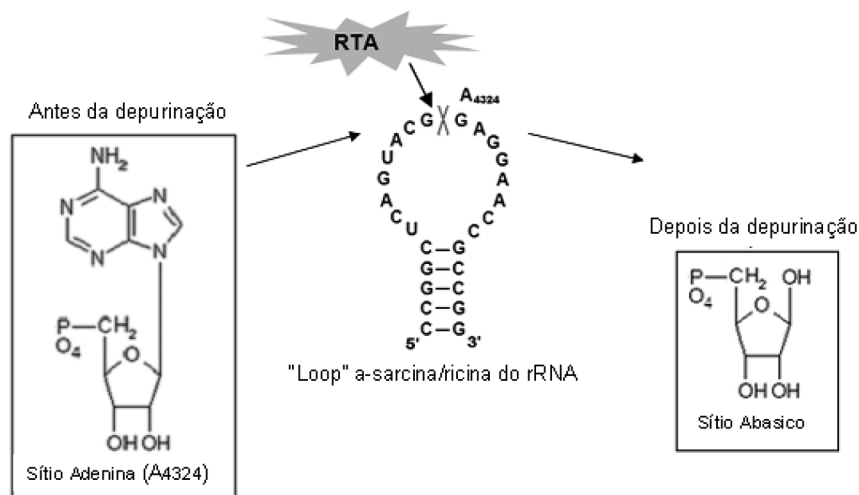


Figura 1. O 'loop' α -sarcin/ricina e o ponto de depurinação pela atividade N-glicosidase da RTA. O sítio A₄₃₂₄, antes da depurinação por RTA é mostrado à esquerda, onde as sequências de nucleotídeos intactas estão presentes. À direita, o sítio de depurinação sem a adenina é mostrado.

Existem diversos processos para inativar a toxina presente na torta ou farelo de mamona. No entanto é cada vez mais necessária a definição de qual método deverá ser empregado, como padrão e, como técnica universal para ser aceito para avaliar os processos de destoxificação para a inclusão desse coproduto em rações.

Com o objetivo de direcionar o leitor, serão apresentados diversos métodos, físicos, químicos ou imunoquímicos, que detectam a presença da proteína. Em geral, estes métodos são muito sensíveis, mas não avaliam a atividade tóxica, portanto métodos biológicos que avaliam, com segurança, essa atividade também serão abordados.

Detecção da ricina por eletroforese

Anandan e colaboradores (2005) utilizaram diferentes tratamentos físicos e químicos para destoxificar a torta de mamona, e o conteúdo de ricina foi determinado com base na análise eletroforética, presença ou ausência da banda correspondente a ricina.

Os métodos de destoxificação/detecção propostos por Anandan vêm sendo empregados por diversos pesquisadores devido à simplicidade e rapidez. A detecção da ricina por eletroforese serve como rastreamento preliminar para investigar a presença de ricina e a possível degradação por diversos processos de destoxificação. A Figura 2 exemplifica o perfil eletroforético de tortas de mamona submetidas a diferentes tratamentos para inativação da ricina.

Ressalta-se que o emprego desta técnica de detecção da ricina somente através de eletroforese deve levar em conta que alguns processos de destoxificação empregados implicam na formação de agregados protéicos, que **não eliminam a ricina**, mas que impedem que esta entre e percorra o gel. Assim, uma torta **tóxica**, pode ser considerada adequada para a inclusão em rações, pela ausência de visualização das bandas de ricina, que por terem formado agregados, não teriam entrado no gel.

Por outro lado, após processos de destoxificação que modifiquem quimicamente a ricina, seria observada a banda de ricina em local similar àquele antes da destoxificação. Assim, essa torta, quimicamente modificada e adequada para a alimentação animal, poderia ser considerada, por este ensaio, uma torta ainda tóxica, resultado falso positivo. Na Figura 2 somente a torta *in natura* e a torta autoclavada por 10 minutos seriam tóxicas. Estes dados **não** foram corroborados pelos ensaios biológicos de viabilidade das células Vero. Estes ensaios serão posteriormente descritos neste capítulo.

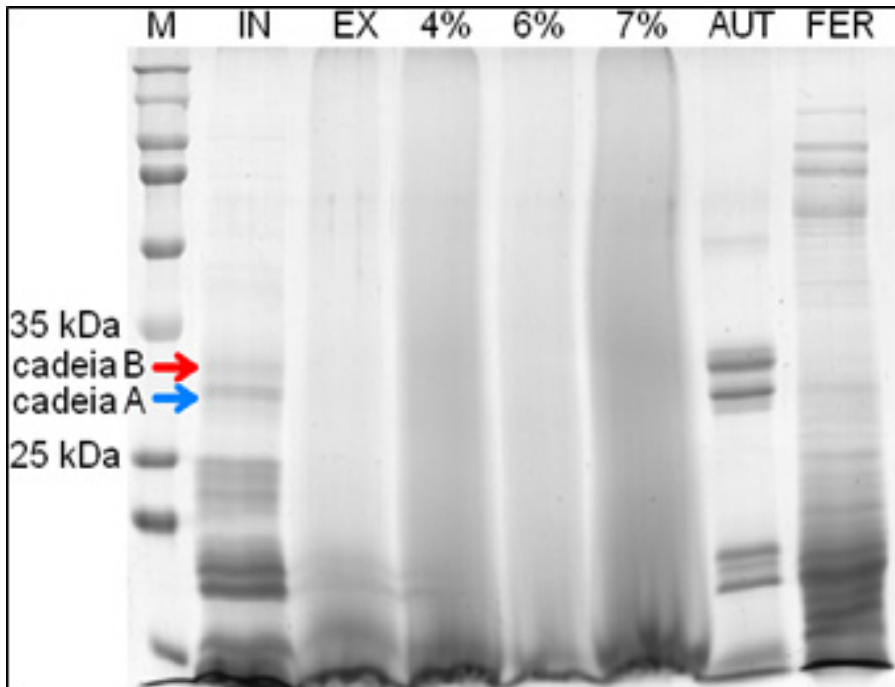


Figura 2. Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE) para o extrato proteico de torta e rejeito de mamona, submetidos a diferentes tipos de tratamentos. As setas indicam as duas cadeias da ricina (Cadeia A e Cadeia B). M – Marcador; IN – Torta *in natura*; EX – Torta Extrusada; 4%, 6%, 7% – Torta Extrusada com 4%, 6% ou 7% de CaO; AUT – Torta Autoclavada; FER – Torta Fermentada por 72 horas. (FERNANDES, 2010).

Detecção da ricina por eletroforese capilar

A Eletroforese capilar (CE) pode ser uma alternativa viável para os imunoenaios tradicionais, quando acopladas a sistemas com detecção de fluorescência induzida por laser.

Haes e coautores (2006) demonstraram que a eletroforese capilar pode ser usada para detectar a ricina, monitorando a interação da mesma com um aptâmero fluorescentemente marcado sob condições de não-equilíbrio. A resposta quantitativa revelou um limite de detecção tão baixo como 14 ng/mL. Esse estudo também revelou que a presença de nucleases na amostra acarreta na degradação dos aptâmeros diminuindo a capacidade para detectar a ricina. No entanto, ainda é possível detectar a toxina em concentrações muito baixas.

As vantagens deste ensaio descrito por Haes e colaboradores (2006) são que o mesmo pode ser realizado em menos de 10 minutos, consome quantidades mínimas de material, e gera baixa quantidade de resíduos.

Detecção da ricina por Espectrometria de Massas

A detecção da ricina por espectrometria de massas vem sendo amplamente estudada nos últimos anos. Comumente essa metodologia utiliza uma das duas abordagens: detecção de ricina intacta, por identificação de picos com massa molecular referente às bandas A ou B; ou por mapeamento dos peptídeos tríplicos (*fingerprinting*) associado com a determinação da sequência de alguns peptídeos selecionados (sequenciamento “de novo”).

Um problema apontado para o uso da espectrometria de massas, como método de confirmação da presença de ricina, foi a relativa falta de sensibilidade dessa técnica em comparação com os ensaios biológicos. Para resolver este problema, Craig e coautores melhoraram o preparo da amostra permitindo que os limites de detecção fossem diminuídos. Na metodologia proposta, 0,01% do detergente Tween

80 é adicionado durante o processo de extração de proteínas da semente. De um modo geral, o sinal da ricina é mascarado pela presença de oligômeros de proteínas de reserva presentes na semente. Os autores afirmam que, a adição do detergente Tween 80 reduz esta interferência, intensificando o sinal da ricina. Usando este processo de extração e obtendo espectros MALDI-TOF/TOF foi possível detectar com confiança, 31 fmol de ricina, ou seja, 4 µg de ricina/mL de extrato.

Para melhorar a detecção da ricina em soluções diluídas, um método que combina a imunocaptura da ricina, usando anticorpos monoclonais, seguido da análise por MALDI-TOF foi descrita (DURIEZ et al., 2008). Nesse ensaio, esferas magnéticas revestidas com um anticorpo anticadeia B da ricina foram preparadas. Estas esferas foram colocadas em contato com soluções diluídas de ricina. Após imunocaptura, as amostras foram digeridas com tripsina na presença de acetonitrila para acelerar a hidrólise. Após eluição ácida, três dos 20 peptídeos obtidos foram utilizados para a detecção de ricina por MALDI-TOF.

A imunocaptura associada à análise por MALDI-TOF descrita anteriormente permitiu o limite de detecção da ricina de 50 ng/mL. O resultado pôde ser obtido em cerca de 5 horas. Essa metodologia de ensaio foi ajustada para a detecção não só da ricina, mas de outras toxinas que poderiam estar presentes em uma mesma solução. Para tanto, anticorpos contra diversas toxinas foram imobilizadas na mesma esfera (KULL et al., 2010). As toxinas foram subsequentemente identificadas por sequenciamento dos peptídeos trópticos eluídos das imuno-esferas, por MALDI-TOF. A ricina pôde ser detectada em matrizes complexas, tais como leite e sucos (FREDRIKSSON et al., 2005).

Ensaio imunoenzimático (ELISA)

Um dos métodos mais antigos que foi empregado para a detecção da ricina foi o ensaio imunoenzimático denominado ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) (KOJA et al., 1980). Nesse ensaio,

anticorpos (IgG) e fragmentos Fab anti-ricina, produzidos em coelho e conjugados com β -D-galactosidase foram usados. Dessa forma, foi possível detectar concentrações baixas de ricina, próximas a 4 ng/mL.

Na busca de ensaios mais sensíveis, o radioimunoensaio foi empregado e o limite de detecção foi de 50-100 pg para RTA e 500 pg para RTB (GODAL et al., 1981). No entanto, a sensibilidade foi reduzida para a ricina intacta. Limitações deste ensaio incluíam as dificuldades em trabalhar com radioisótopos e longo período de incubação. Tais inconvenientes tornaram este ensaio menos preferível que ELISA.

Em 1994, Poli e colaboradores desenvolveram um imunoensaio ELISA-quimioluminescente para detectar a ricina em fluidos biológicos. Nesse ensaio, anticorpos policlonais (pAb) produzidos em cabra foram utilizados em um sistema ELISA-sanduíche empregando a detecção avidina-fosfatase alcalina. Para esse ensaio, o limite de detecção de ricina foi de 100 pg/mL em tampão fosfato salino (PBS), em urina humana e em soro humano.

Ocorreram muito desenvolvimento na área de detecção da toxina ricina e, desta forma, kits comerciais de ELISA para dosagem de ricina foram apresentados no mercado. No entanto, esses testes têm várias desvantagens que impedem que ele seja o melhor método para detectar ricina: consomem muito tempo, necessitam de pessoal especializado, apresentam rendimento limitado e podem subestimar o conteúdo real de ricina em situações onde as concentrações de antígenos são elevadas. Além disto, não avaliam a atividade biológica tóxica.

Imunoensaio usando um sensor de fibra óptica

Para reduzir o tempo necessário para ensaio de detecção da ricina, um método baseado em um sensor de fibra óptica foi desenvolvido (OGERT et al., 1992; OGERT et al., 1993; NARANG et al., 1997). Ogert e coautores (1992) descrevem um imunoensaio em sanduíche, no qual o anticorpo IgG anti-ricina foi imobilizado sobre

a superfície de uma fibra óptica. O limite de detecção para a ricina por fluorescência induzida por laser, em uma solução tampão, foi de 100 pg/mL. O ensaio completo pode ser realizado em 20 minutos.

Imunoensaio acoplado com Reação em Cadeia de Polimerase (Imuno-PCR)

Ensaio utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) permitem aumentar imensamente as quantidades de uma molécula específica de DNA presente numa mistura complexa até quantidades detectáveis por métodos simples como a coloração com brometo de etídeo em gel de agarose.

Sano e colaboradores (1992) desenvolveram um método para detectar antígenos combinando a especificidade da análise imunológica com a amplificação exponencial de PCR (IPCR ou Imuno PCR). A ligação entre essas duas técnicas ocorre mediante a formação de um complexo anticorpo-biotina-estreptavidina-DNA, que vincula o antígeno à detecção com uma molécula de DNA utilizada como substrato da PCR *in situ*. A interação biotina-estreptavidina desempenha o papel de ponte entre o anticorpo secundário e o DNA repórter, que é amplificado pela PCR. Uma representação esquemática do presente método é mostrada na Figura 3.

O limite de detecção para ricina dissolvida em diferentes concentrações em PBS foi de 10 fg/mL e para a ricina dissolvida em soro humano foi de 0,5 fg/mL (LUBELLI et al., 2006). Este método foi 8 milhões de vezes mais sensível do que ELISA convencional, sendo considerado, até o momento, o método mais sensível para a detecção de ricina, principalmente, em processos pós-intoxicação.

As análises por Imuno PCR, em ratos alimentados com a ricina, mostraram que esta toxina foi rapidamente isolada a partir do soro (30 min.) e o tempo necessário para completar o processo de IPCR foi de 9 horas. Comparado com os métodos convencionais

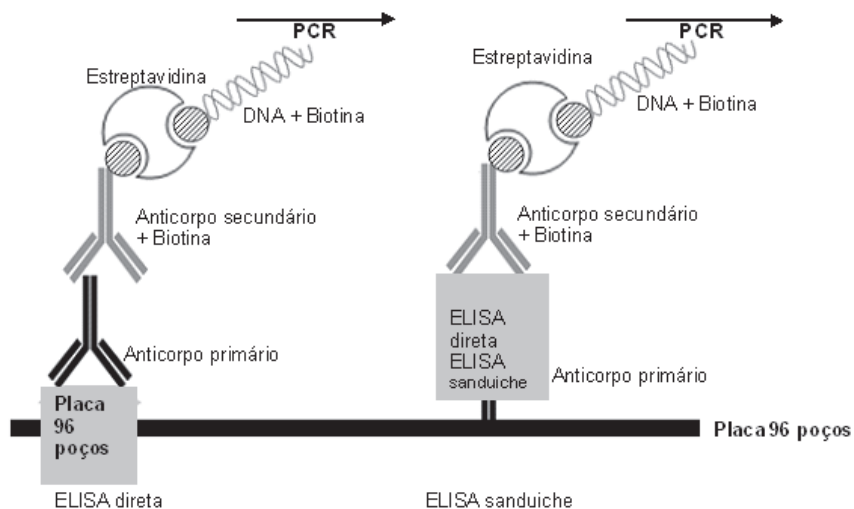


Figura 3. Representação esquemática da detecção de ricina por IPCR utilizando ELISA direto e sanduíche, para capturar e reportar a toxina.

imunológicos, o IPCR requer mais tempo por causa da PCR em si e da análise pós-PCR. Além disso, a utilização de reagentes dispendiosos torna essa técnica menos atraente para reações de rotina do que os métodos imunológicos convencionais. No entanto, tais limitações são compensadas pela maior sensibilidade do método.

Métodos para detecção da atividade da ricina

O primeiro método para a detecção de atividade biológica da ricina baseou-se na medida da inibição da síntese proteica em lisado de reticulócitos de coelho (LUGNIER et al., 1974). Há relatos, que semelhante à proteína nativa, alguns peptídeos derivados da ricina são tóxicos e poderiam inibir a síntese proteica em lisados celulares. Esta informação reforça a necessidade de avaliar a atividade biológica da ricina depois de submeter a torta de mamona aos processos de destoxificação.

A capacidade das proteínas inibidoras de ribossomos (RIP) em inibir a síntese de proteínas pode ser monitorada em ensaios de tradução *in vitro* utilizando o sistema de lisado de reticulócitos de coelho (BARBIERI et al., 1989; MEI et al., 2006). Uma desvantagem desse ensaio é a utilização de um procedimento de múltiplos passos para determinar a atividade da RIP pela medição da incorporação de aminoácidos radioativos, após a adição de mRNA ou polissomas no sistema. Para contornar essa dificuldade, um ensaio *in vitro* tradução, baseado na detecção da luciferase por bioluminescência foi descrito por Mei e colaboradores (2006).

Mei e colaboradores (2006) utilizaram um lisado celular, que fornece ribossomos e outros componentes necessários para a síntese protéica, associando as reações de tradução em dois passos acoplados: (1) uma sequência de DNA para luciferase é transcrita em RNA mensageiro, e (2) o RNA é então traduzido em luciferase. Quando a luciferase é sintetizada, a fluorescência atua como um indicador de síntese de proteínas, e a ausência de fluorescência indica que a síntese de proteína foi inibida (Figura 4).

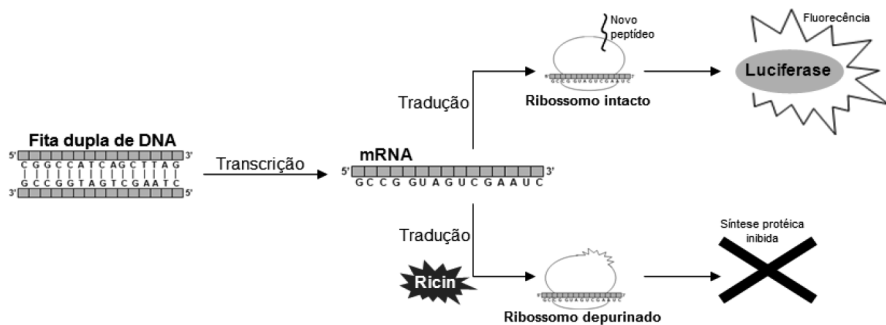


Figura 4. Representação do ensaio de inibição da tradução. Na ausência da ricina ocorre síntese proteica, e esta pode ser medida facilmente no caso de proteínas que emitem fluorescência, como a luciferase. A ricina inibe a síntese da proteína, e a falta ou diminuição da fluorescência serve como indicador da presença da toxina.

A inibição da síntese de luciferase por ricina foi alcançada quando a toxina foi utilizada em concentração mínima de 30,2 pM (~ 800 pg/mL). A especificidade RIP no presente ensaio descrito por Mei e colaboradores (2006) foi provada usando formicina 5'-monofosfato (FMP) como um inibidor específico da atividade de RIP. O limite de detecção é comparável aos obtidos com outras metodologias, e o ensaio também comprovou a atividade tóxica da ricina.

Detecção da atividade enzimática - Depuração

Como mencionado anteriormente, a ricina catalisa reações de depuração, ou seja, a remoção de um resíduo de adenina no *loop* α -*sarcina/ricina* do RNA ribossomal. Existem diversos trabalhos que associam a depuração com a inibição da síntese protéica, tendo como consequência a morte celular. Assim, a determinação da atividade enzimática poderia refletir a atividade tóxica da ricina.

Como substrato para a ricina, aptâmeros (fragmentos de RNA ou de DNA) foram construídos. Esses aptâmeros foram isolados a partir de bibliotecas complexas de ácidos nucleicos sintéticos por um processo iterativo de adsorção, recuperação e reamplificação. Um exemplo de um aptâmero, mimetizando o *loop* onde a cadeia A da ricina (RTA) atua, é apresentado na Figura 5.

A atividade enzimática de depuração pode então ser medida pelo decréscimo na concentração do aptâmero ou pela quantificação da adenina liberada. Com uma primeira estratégia para dosar a adenina liberada, Heisler e coautores (2002) desenvolveram um ensaio colorimétrico no qual acoplaram reações de fosforilação. Assim, a base liberada reagiria com fosfato formando adenina-fosfato, o qual pela ação de uma fosfatase liberaria este fosfato, que em contato com o para-nitro-fenol, formaria para-nitro-fenol-fosfato. Esse último composto pode ser quantificado por colorimetria.

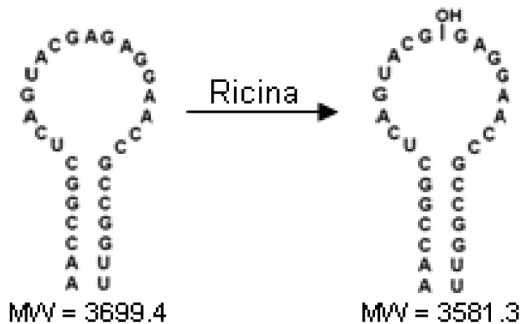


Figura 5. Exemplo de um aptâmero derivado de RNA. A Figura ilustra a perda da base Adenina pela ação da ricina.

Em 2004, Hines e colaboradores introduziram um ensaio, onde a adenina liberada poderia ser diretamente quantificada após cromatografia líquida de fase reversa, usando sistema Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (RP-HPLC), e com software adequado. O limite de detecção da adenina neste ensaio foi de $0.02 \mu\text{M}$ (2.4 ng/mL). Com o objetivo de aumentar a sensibilidade do método, Becher e coautores (2007), ainda usando a cromatografia para detectar adenina, propuseram uma concentração prévia da ricina empregando um sistema de imunocaptura, onde a ricina seria sequestrada por esferas magnéticas previamente acopladas com anticorpos antirricina, conforme proposto na Figura 6.

Um avanço para detecção da atividade enzimática da ricina foi proposto por Antoine e colaboradores (2011). Nesse ensaio, o qual denominou “espectrometria de massas biológica”, há um acoplamento de três estratégias para detecção da ricina: i) concentração da ricina, usando imunocaptura; ii) uso de aptâmeros de RNA como substrato para a ricina; iii) quantificação da redução do aptâmero contendo adenina e a formação do aptâmero após depurinação, ambos por determinação da massa molecular por espectrometria de massas. Um esquema desta abordagem experimental é apresentado na Figura 7.

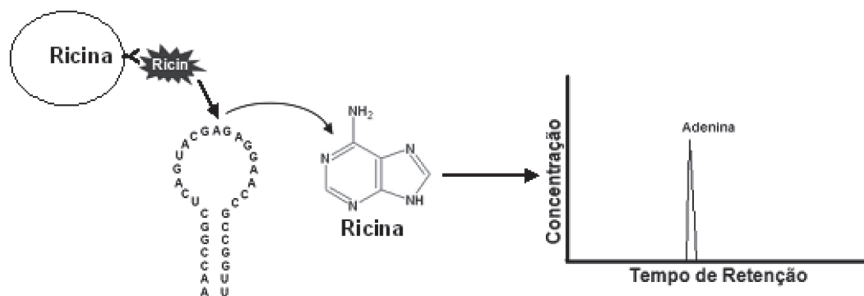


Figura 6. Imunocaptura da ricina por esferas magnéticas acopladas com anticorpo Anti-RTB e detecção da Adenina liberada por Cromatografia.

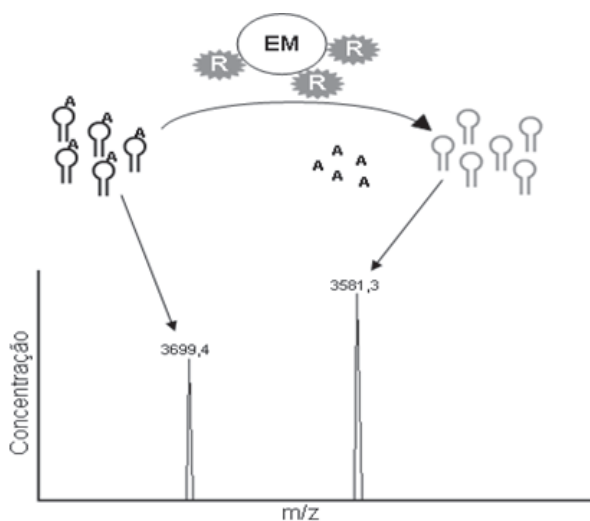


Figura 7. Esquema mostrando o acoplamento da espectrometria de massas com ensaio enzimático proposto por Antoine e colaboradores (2011). A atividade da ricina (R) imobilizada por meio de anticorpos específicos em esferas magnéticas (EM) é medida pela diferença de massa entre aptâmeros intactos (à esquerda) e depurinados (à direita).

Detecção da atividade biológica da ricina

Os métodos empregados para a determinação da atividade biológica descritos anteriormente são focados na determinação da atividade enzimática (depurinação) ou na inibição da síntese protéica em lisados celulares. Estas determinações podem não refletir a total atividade da ricina, ou seja, a internalização da ricina pela célula e a sua posterior ação tóxica.

Em 2005, Audi e colaboradores escreveram uma revisão sobre o envenenamento provocado pela ricina. Os autores associaram a ação tóxica exclusivamente à atividade de depuração. Assim, a medida da atividade enzimática permitiria uma correlação direta ao processo de toxicidade. Em 2007, Li e coautores demonstraram que a depuração do ribossomo não é suficiente para avaliar a atividade tóxica. Os autores desenharam uma molécula de ricina, contendo mutações que conservam a atividade enzimática, ou seja, a depuração, mas que não são tóxicas para *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, entende-se a necessidade de desenvolver um ensaio que avalie a toxicidade por completo, ou seja, a internalização da toxina e a sua posterior atividade enzimática, seguida da morte celular.

A fim de aprimorar os métodos de detecção da atividade biológica da ricina Fernandes e colaboradores (2012) propuseram o uso de células Vero, uma linhagem celular derivada de rins de macaco (*Chlorocebus sabaues*), com algumas características de células epiteliais para avaliar a toxicidade provocada pela ricina. Nesse ensaio, os autores avaliaram a morfologia das células antes e após a incubação com ricina, e a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) citoplasmática, liberada para o meio extracelular em função da morte celular. A sensibilidade desse método é de 10 ng/mL (FERNANDES et al., 2012). O esquema dessa abordagem é mostrado na Figura 8.

A Tabela 1 mostra um estudo comparativo entre a avaliação de toxicidade empregando as técnicas SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), proposto por Anandan e colaboradores em 2005 (Figura 2); e o ensaio de viabilidade usando células Vero, descrito por Fernandes e coautores em 2012. Como pode ser verificado a partir da observação da tabela, caso a análise fosse feita usando somente a técnica eletroforética, as tortas extrusadas na ausência ou na presença de CaO 4 e 6% seriam liberadas para a ração animal. O que só é possível após a inclusão de CaO a 7%, resultado referente ao ensaio de citotoxicidade.

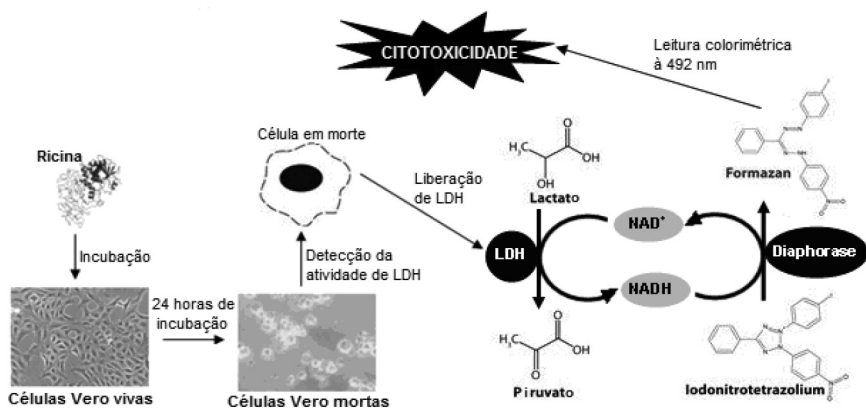


Figura 8. Ensaio de citotoxicidade utilizando células Vero. A monocamada de células numa placa de 24 poços foi incubada com a ricina durante 24 horas. Uma alíquota de cada poço foi removida e misturada com a solução de ensaio para determinação da atividade da LDH. O formazano forma um sal que causa a coloração vermelha. A citotoxicidade é medida com base na intensidade da presente coloração.

Tabela 1. Comparativo entre os diferentes métodos utilizados para detecção da ricina na torta e no rejeito de mamona. (FERNANDES, 2010)

Amostra	SDS-PAGE	Citotoxicidade
Torta <i>in natura</i>	+	+
Torta extrusada	-	+
Torta extrusada + 4% CaO	-	+
Torta extrusada + 6% CaO	-	+
Torta extrusada + 7% CaO	-	-
Rejeito autoclavado	+	+
Rejeito fermentado 72h	-	-

+ Presença de ricina

- Ausência de ricina

Toxinas de *Jatrophas curcas*

Os dois principais componentes tóxicos que estão presentes em pinhão-manso são a proteína inibidora de ribossomos, curcina, e os ésteres de forbol. Os ésteres de forbol são os componentes tóxicos mais perigosos e limitam a utilização da torta de pinhão-manso na alimentação animal.

Curcina

A curcina (28,2 kDa) é tóxica por inibir a síntese de proteínas, assim como a ricina, porém, ela possui somente a cadeia responsável pela atividade enzimática, sendo, desta forma, classificada como RIP (Proteína Inativadora de Ribossomos) do tipo I, sendo encontrada em sementes e folhas de pinhão-manso (STIRPE et al., 1976; QIN et al., 2005). A curcina é uma proteína monomérica com atividade N-glicosidase, mas não possui a cadeia lectina (LIN et al., 2003). Portanto, essa proteína é muito menos citotóxica do que a ricina (RIP II) porque não pode entrar nas células por meio da ligação aos resíduos de açúcar.

Apesar do fato de a curcina ser menos tóxica do que os ésteres de forbol, existem relatos da toxicidade da curcina para alguns animais, incluindo ovelhas, cabras, galinhas e bezerros e também para os seres humanos (AHMED; ADAM, 1979; ABDU-AGUYE et al., 1986; EL BADWI et al., 1992; EL BADWI et al., 1995). Devido à baixa toxicidade da curcina, não existem muitos métodos de detecção específicos para essa toxina. Os métodos de detecção mais comuns são a inibição da síntese proteica (tradução) em lisados de reticulócitos de coelho e a medição da atividade N-glicosidase (LIN et al., 2003). Embora existam poucas publicações que descrevam os diferentes métodos para detectá-la, muitos dos métodos já descritos para a ricina poderiam ser aplicados a outras RIPs, incluindo a curcina.

Ésteres de forbol

Ésteres de forbol (EF) são compostos policíclicos nos quais dois grupos hidroxila em carbonos vizinhos são esterificados a ácidos graxos. Estas substâncias estão presentes em muitas plantas diferentes, incluindo *Jatropha curcas* (BEUTLER et al., 1989). As moléculas de EF são derivadas de uma estrutura carbônica “diterpeno tetracíclico” denominado tigliano. Os diferentes pontos de hidroxilação do tigliano determinam as diferentes isoformas de EF e suas diferentes toxicidades (GOEL et al., 2007).

Os EF e seus diferentes derivados são conhecidos pela sua atividade de indução de tumor. Eles ativam a proteína quinase C (PKC) que desempenha um papel crítico em vias de transdução de sinal e regulam a proliferação celular (CLEMENS et al., 1992). Em contraste, foi relatado que alguns tipos de EF poderiam induzir a morte celular programada (apoptose) (BRODIE; BLUMBERG, 2003).

Vários processos de destoxificação utilizados para eliminar EF de torta de pinhão-manso foram previamente descritos (DEUS-DE-OLIVEIRA; MACHADO, 2011b), e alguns dos métodos de detecção existentes foram utilizados para confirmar a eficácia destes processos.

Métodos de detecção de ésteres de forbol (EF)

Muitos dos métodos de detecção de ésteres de forbol, diferente da ricina, são empregados visando à utilização da torta de pinhão-manso como matéria-prima na alimentação animal, e não para investigar possíveis ataques bioterroristas. Existem poucas técnicas para detecção de EF em comparação com os métodos de detecção de ricina.

A determinação da atividade irritante causada por ésteres de forbol foi demonstrada pela primeira vez por Adolf e colaboradores (1984). Essa atividade foi avaliada em orelhas de rato, sendo a dose irritante de 0,02 μg EF/orelha. Mais de duas décadas depois, estudos *in vivo* da toxicidade de EF continuam a ser realizados

em ratos e camundongos (RAKSHIT et al., 2008; LI et al., 2010). Vários aspectos clínicos, assim como a taxa de mortalidade de ratos alimentados com torta bruta de pinhão-manso e com tortas submetidas a tratamentos alcalinos e ao calor, para reduzir o nível de EF, foram avaliados (RAKSHIT et al., 2008). Baixos níveis de EF (8,1 mg %) causaram mortalidade de ratos 11 dias após a alimentação. A toxicidade aguda dos EF foi determinada em camundongos suíços Hauschika pela administração intragástrica (LI et al., 2010). A dose letal (LD) LD₅ e LD₉₅ foram 18,87 e 39,62 mg de massa corporal/kg, respectivamente. Estes ensaios de toxicidade são eficientes para detectar a toxicidade de EF, contudo, eles são problemáticos, em função da manutenção e sacrifício de muitos animais.

Detecção de ésteres de forbol por RP-HPLC

O método mais comumente usado para detectar e quantificar EF é a cromatografia líquida de alta eficiência com separação em fase reversa (RP-HPLC). Esse método foi padronizado para detectar EF em diferentes acessos de pinhão-manso. Foi através deste método que a ausência dos ésteres de forbol foi detectada em um acesso não tóxico, em sementes do acesso mexicano, Papantla (MAKKAR et al., 1997; MAKKAR et al., 1998).

O limite de detecção de EF por RP-HPLC é de aproximadamente 4 µg, como descrito por Devappa e colaboradores (2012a). A detecção de EF por RP-HPLC tem sido utilizada por pesquisadores para determinar a eficácia dos processos de destoxificação da torta de pinhão-manso, incluindo técnicas de processamento hidrotérmico, extração com solvente, extração com solvente mais tratamento com NaHCO₃, radiação ionizante, aquecimento, bio-destoxificação e extrações com solução de surfactante (MARTÍNEZ-HERRERA et al., 2006; DEVAPPA; SWAMYLINGAPPA, 2008; JOSHI et al., 2011; BARROS et al., 2011; PHASUKARRATCHAI et al., 2012).

A técnica de detecção de EF por RP-HPLC pode também ser utilizada para identificar as diferentes espécies de EF presentes em *J. curcas*, assim como a diferença na composição de EF entre as sementes de pinhão-manso de diferentes regiões (HAAS et al., 2002; BASHA et al., 2009; HE et al., 2011; DEVAPPA et al., 2012a). Esse método pode também ser empregado para determinar o teor de EF no óleo extraído das sementes (MAKKAR et al., 2009; DEVAPPA et al., 2010; ICHIHASHI et al., 2011).

Avaliação da toxicidade contra seres vivos

Semelhante aos métodos de detecção de ricina, a atividade biológica de ésteres de forbol deve ser testada para garantir a eficiência dos processos de destoxificação da torta de pinhão-manso. A avaliação dos processos de destoxificação tem sido feita frequentemente em animais vivos, tais como ratos (ADOLF et al., 1984; LI et al., 2010), ovinos (KATOLE et al., 2011), porcos (WANG et al., 2011) e peixes (BECKER; MAKKAR., 1998; KUMAR et al., 2012). Com poucas exceções, esse tipo de controle da atividade biológica é geralmente precedido da detecção e quantificação de EF por RP-HPLC. Portanto, animais continuam sendo sacrificados.

Liu e coautores (1997) estabeleceram ensaios moluscicida usando caramujos. A dose letal contra 100% dos moluscos (LC_{100}) foi de 10 mg de EF/mL. Uma desvantagem deste método é a exigência de um elevado volume de substâncias teste, porque este ensaio deve ser realizado em placas de Petri de 100 mL. Além do teste de atividade tóxica dos EF contra lesmas hospedeiras, a susceptibilidade do parasita *Schistosoma mansoni* foi também ensaiada (RUG; RUPPEL, 2000). Esse teste tem a vantagem de requerer um pequeno volume de extrato metanólico rico em EF. Um extrato de sementes foi capaz de matar todas as larvas adultas, cercárias, do *Schistosoma mansoni* (LC_{100}), a uma concentração de 25 mg/mL.

A eficácia dos EF contra insetos foi também demonstrada. Cupins (*Odontotermes obesus*) foram utilizados como um alvo para testar a toxicidade de EF (VERMA et al., 2011). Esses autores testaram diferentes concentrações de EF (500-5 mg/mL) ao longo de um período de 1 a 72 horas. A LC_{100} foi determinada após 72 horas de tratamento com 5 mg/ml de EF. No entanto, para reduzir o tempo de ensaio, foi necessária a utilização de concentrações mais elevadas de EF. Para obter a LC_{100} , após 12 horas de tratamento, utilizaram 500 mg/mL de EF. Devappa e colaboradores (2012b) testaram a susceptibilidade dos insetos. Eles alimentaram os insetos com uma fração enriquecida em EF (Fração Enriquecida com Ésteres de Forbol - FEEF) e avaliaram a mortalidade após 24 horas. A mortalidade mínima (20%) foi obtida utilizando 0,5 mg FEEF/mL e um máximo de 80% de mortalidade foi observada com 2 mg FEEF/mL. A sensibilidade de ambas as espécies de insetos avaliados *O. obesus* e *S. frugiperda* aos EF não foi muito diferente. Os autores demonstraram que os EF podem ser utilizados como um insecticida e que estes insetos são bons modelos para detectar a atividade tóxica de EF.

Os crustáceos *Artemia salina* e *Daphnia magna* são também utilizados como indicadores de toxicidade aos EF (DEVAPPA et al., 2012a). A melhor taxa de mortalidade em *A. salina* induzida pelos EF (72%) foi observada com uma concentração de 47 μ g/mL (DEVAPPA et al., 2012a). O aumento da concentração não melhorou efetivamente a taxa de mortalidade. Para atingir 100% de mortalidade 6000 μ g/mL de EF foram necessários. Diferentes tipos de EF foram previamente testados contra *A. salina* (KINGHOM et al., 1977) e houve variação nas taxas de mortalidade para cada EF. Isto reforça o papel da estrutura química e pureza dos EF no que diz respeito à toxicidade.

O primeiro ensaio toxicológico de EF utilizando *Daphnia magna* mostrou que esses crustáceos são mais sensíveis do que *A. salina* (DEVAPPA et al., 2012a). A LC_{100} foi de apenas 3 mg/mL, e a menor concentração eficaz, o que induziu a mortalidade de 26%, foi de

0,5 mg/mL. As vantagens da utilização de *A. salina* em ensaios toxicológicos foram demonstradas por Ruebhart e coautores (2008). Essas vantagens incluem a disponibilidade comercial dos cistos, o fácil armazenamento e manutenção de eclosão dos cistos. O ensaio é de baixo custo, simples, rápido e sensível. São necessárias menores quantidades de amostra e os ensaios podem ser realizados em microplacas de 96 poços. O uso de crustáceos satisfaz as diretrizes éticas de tratamento de animais de muitos países.

Semelhante à atividade moluscicida, inseticida e antiparasitária, a toxicidade dos EF contra microrganismos também foi relatada. Chumkaew e colaboradores (2003) demonstraram que os ésteres de forbol tinham atividade antibacteriana. Seis gêneros de bactérias foram recentemente utilizados para avaliar esta toxicidade. A concentração máxima de extrato rico em EF para cada bactéria testada foi 537 $\mu\text{g/mL}$ para o *Bacillus subtilis*, 250,7 $\mu\text{g/mL}$ para *Pseudomonas putida*, 215 $\mu\text{g/mL}$ de *Proteus mirabilis*, 394 $\mu\text{g/mL}$ de *Staphylococcus aureus*, 215 $\mu\text{g/mL}$ de *Streptococcus pyogenes* e 465,7 $\mu\text{g/mL}$ de *Escherichia coli* (DEVAPPA et al., 2012a). Em comparação com os outros ensaios biológicos aqui apresentados, a utilização de bactérias para detectar a atividade tóxica do EF não é muito eficaz, porque a sensibilidade é muito menor do que o relatado, por exemplo, para *D. magna*. A atividade antifúngica de EF extraído da torta também foi avaliada (SAETAE; SANTORNSUK, 2010; DEVAPPA et al., 2012a). Os ésteres de forbol foram tóxicos para os fungos *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium semitectum*, *Colletotrichum capsici* e *Colletotrichum gloeosporioides*. As concentrações que inibiram 100% do crescimento micelial foram de 6, 3, 6, 5, 3, 4 e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Testes antimicrobianos utilizando bactérias e fungos podem, dentro dos limites apresentados, serem utilizados para acompanhar processos de destoxificação de tortas.

Avaliação da atividade proteína quinase C (PKC)

Como descrito anteriormente, os ésteres de forbol são ativadores da proteína quinase C (PKC). Wink e coautores (2000) propuseram um ensaio bioquímico para detectar a atividade dos ésteres de forbol (EF) com base nessa propriedade. Neste ensaio, a PKC é incubada com Mg-ATP e um peptídeo sintético é marcado com uma substância fluorescente. Quando um ativador da PKC está presente, na presença de ésteres de forbol, a enzima ativa é capaz de fosforilar o peptídeo. Quando a mistura da reação é separada por eletroforese, o peptídeo fosforilado torna-se carregado negativamente e migra para o polo positivo. O peptídeo marcado por fluorescência pode então ser quantificado por análise densitométrica.

Alérgenos de mamona e de pinhão-manso

Sementes e pólen de mamoneira e de pinhão-manso apresentam proteínas alergênicas pertencentes à classe das albuminas 2S. Os principais alérgenos de *Ricinus communis* são denominados Ric c 1 e Ric c 3 (SHARIEF; LI, 1982; SILVA JUNIOR et al., 1996), e o único isolado, até o momento, de *Jatropha curcas* é denominado Jat c 1 (MACIEL et al., 2009). Todos estes alérgenos são proteínas heterodiméricas com massa molecular entre 10 e 14 kDa. Possuem duas cadeias polipeptídicas, unidas por pontes de enxofre. A atividade alergênica destas albuminas 2S é resistente à desnaturação térmica e química, podendo, mesmo após alguns tratamentos de destoxificação, desencadear alergia por contato bem como por inalação (MACHADO; SILVA, 1992; SILVA JUNIOR et al., 1996). Estas proteínas possuem como característica a presença de um esqueleto conservado de oito resíduos de cisteínas, além de apresentarem baixo peso molecular e estruturas tridimensionais semelhantes e ricas em α -hélice.

Devido ao crescente interesse na produção de biodiesel é de se esperar que o plantio e o processamento de oleaginosas cresçam de forma exponencial, aumentando enormemente o risco de sensibilização da população exposta às substâncias alergênicas de mamona e de pinhão-manso. Sabe-se que para cada tonelada de semente processada, aproximadamente 12 quilos de proteínas alergênicas são produzidos (FORNAZIERI JÚNIOR, 1986).

Alergia desencadeada por albumina 2S

A alergia desencadeada pelas albuminas 2S é classificada como do tipo I ou imediata. O tipo I de hipersensibilidade, também conhecida como hipersensibilidade anafilática, depende da reação entre um antígeno com o anticorpo específico IgE ligado na superfície dos mastócitos e/ou basófilos e da posterior liberação do conteúdo dos grânulos (histamina, leucotrienos e fator de ativação de plaquetas, fatores quimiotáticos de eosinófilos e neutrófilos) (MAINTZ; NOVAK, 2007). As manifestações das respostas alérgicas acontecem de maneira diferente de um indivíduo para outro, porém, todas estas respostas se iniciam por um processo silencioso, conhecido como sensibilização (LICHTENSTEIN, 1993).

A sensibilização de um organismo se inicia com um primeiro contato com um antígeno, normalmente uma proteína, que induz a alergia, sendo denominado alérgeno. Essa substância, ao penetrar no organismo por vias respiratórias ou por outros tecidos como a pele, entra em contato com as células apresentadoras de antígenos (APCs = Antigen Presenting Cells), como macrófagos e/ou células dendríticas, que internalizam essa substância estranha e a hidrolisam. Os peptídeos gerados são expostos para o exterior da célula em associação a moléculas do MHC de classe II (Complexo Principal de Histocompatibilidade) podendo ser reconhecidos por linfócitos T CD4⁺ (auxiliares) que estimulam a síntese de anticorpos específicos (imunoglobulinas E - IgE) pelos linfócitos B. As IgEs específicas se associam aos mastócitos que

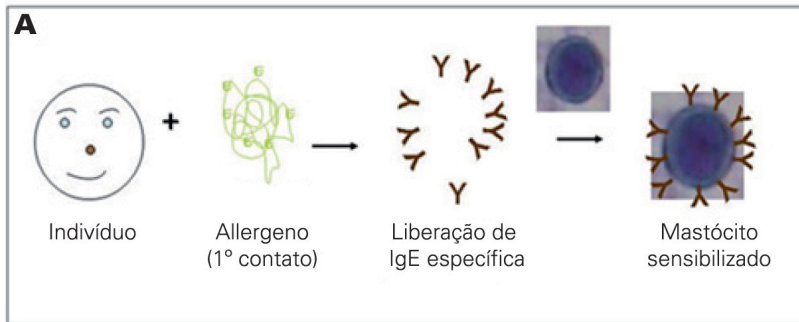
se tonam “sensibilizados” ou “armados” contra este alérgeno. (Figura 9 – parte A – sensibilização dos mastócitos).

Numa subsequente exposição ao mesmo antígeno, conhecida como segunda sensibilização, expressiva resposta alérgica é observada. Após a interação do alérgeno com o tecido humano, ocorrerá ligação cruzada entre os segmentos específicos do antígeno (epitopo de IgE) e as IgEs anteriormente ligadas aos mastócitos e/ou basófilos (mastócitos armados), promovendo a liberação de mediadores celulares, como histaminas e prostaglandinas. Estes, por sua vez, induzirão mudanças fisiológicas e anatômicas que desencadearão os sintomas alérgicos da hipersensibilidade imediata (KAMBAYASHI; KORETZKY, 2007; ABBAS et al., 2002). Um esquema do processo de sensibilização e deflagração da alergia é apresentado na Figura 9- parte B.

A alergia desencadeada por albumina 2S de mamona ou de pinhão-manso é causada principalmente pela inalação da poeira da torta, representando um problema tanto para os trabalhadores das usinas de extração quanto para a população que habita as proximidades da fábrica (GARCÍA-GONZÁLEZ, et al., 1999). Cabe salientar também que Thorpe e colaboradores (1988) demonstraram que os alérgenos de mamona poderiam estar presentes também no pólen, uma vez que as pessoas que moravam próximo às áreas de plantio, mas, que não tinham contato com as sementes de mamona apresentavam anticorpos específicos contra estas proteínas.

Entendendo os riscos de exposição à poeira destas oleaginosas, a proposta desta revisão é apresentar metodologias para avaliar a atividade alérgênica em tortas, antes e após processos de inativação/destoxificação, para que este importante coproduto possa ser manipulado com segurança pelos diversos membros que atuam na cadeia produtiva destas oleaginosas.

Sensibilização pelo primeiro contato com a substância que provoca alergia (alérgeno)



Desencadeamento da alergia - Liberação de Histamina

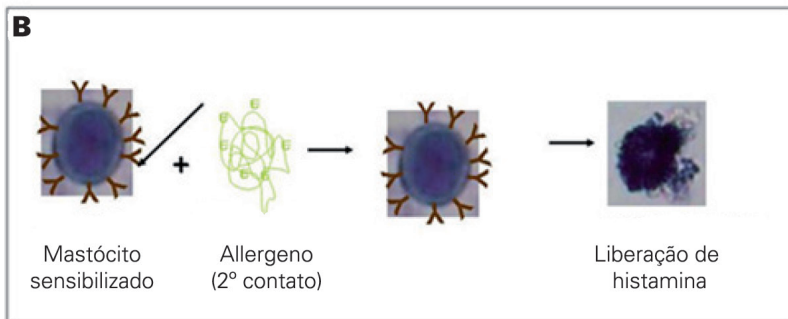


Figura 9. Esquema de reação alérgica. A - Sensibilização de mastócitos: o indivíduo entra em contato com o alérgeno. Após processamento do alérgeno, as imunoglobulinas E (IgE) são produzidas. As IgE se ligam aos mastócitos sensibilizando-os. B - Desencadeamento da alergia. Após um segundo contato com os alérgenos, os mastócitos armados sofrem desgranulação e liberam conteúdo de seus grânulos como a histamina.

Existem diversos ensaios para a detecção dos alérgenos que avaliam somente a interação destes com IgE específica, usando ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Esses ensaios não avaliam a desgranulação celular mediada por IgE e, desse modo, podem demonstrar resultados

falso positivos, ou seja, avalia-se somente a ligação entre o alérgeno e a IgE, sendo caracterizado como ensaio de reconhecimento antígeno-anticorpo, não correspondendo aos eventos biológicos de transdução de sinal e, conseqüente liberação dos grânulos observados nos mastócitos ou basófilos. O ensaio descrito abaixo foi testado para alérgenos de mamona purificados e para torta bruta ou submetida a processos de destoxificação. O teste proposto por Deus-de-Oliveira e colaboradores (2011a) avalia a desgranulação de mastócitos, mediada por IgE, e a subseqüente liberação de histamina dos grânulos destas células. É importante lembrar que os ensaios propostos são baseados na interação dos alérgenos com IgE produzida em animais previamente sensibilizados pelos alérgenos Ric 1, Ric c 3 ou Jat c 1.

Métodos de avaliação da alergenicidade - Ensaio de desgranulação de mastócitos de rato

Para avaliação da alergenicidade é necessário a obtenção de extratos ricos nas proteínas alergênicas e a obtenção de soros, contendo IgE anti-albuminas 2S.

As albuminas 2S podem ser extraídas de sementes ou de tortas de mamona ou de pinhão-manso empregando a metodologia descrita por Thorpe e coautores (1988), com adaptações propostas por Maciel e colaboradores (2009). O soro policlonal de rato anti-albumina 2S visando condições que favoreçam a produção de IgE podem ser obtidos em ratos RA-Thor, segundo metodologia descrita por Maciel e colaboradores (2009).

Mastócitos da cavidade peritoneal de ratos são obtidos para avaliação da alergenicidade das albuminas 2S presentes nas amostras a serem testadas. Ratos da linhagem wistar, de aproximadamente 250 g cada, podem ser utilizados como fonte de mastócitos após lavagem peritoneal utilizando meio de cultura (DMEM), segundo técnica descrita por Félix e colaboradores (2008) e Deus-de-Oliveira et al. (2011a).

Para avaliar a resposta biológica dos mastócitos frente aos alérgenos, suspensões de células obtidas do lavado peritoneal de rato (100 μ L) devem ser incubadas/armadas com 5 μ L de soro anti-albumina 2S contendo IgEs específicas, durante 60 minutos em estufa a 37°C. A seguir, alíquotas de 10 μ L do volume celular submetido à prévia incubação devem ser incubadas durante 15 minutos com 10 μ L de solução aquosa contendo 0,1% de azul de toluidina, 10% de formaldeído e 1% de ácido acético, pH 2,8 para evidenciar a desgranulação. A contagem diferencial das células íntegras e desgranuladas é feita em câmara de Neubauer utilizando um aumento de 400X por meio da observação em microscópio óptico Zeiss Axioplan, com alíquotas de 10 μ L de cada tubo. A Figura 10 ilustra mastócitos íntegros e mastócitos desgranulados observados após o contato com alérgenos de mamona.

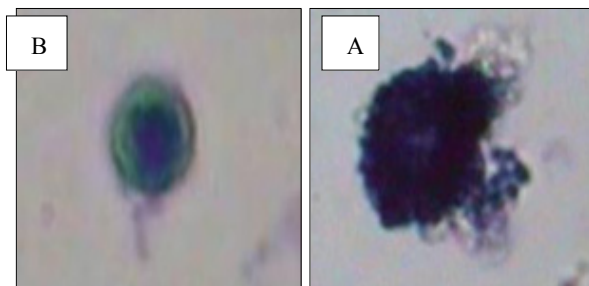


Figura 10. A – Fotos obtidas por Microscopia óptica: A - Mastócitos íntegros; B- Mastócitos desgranulados. Ambos corados com azul de toluidina. (DEUS-DE-OLIVEIRA et al., 2011a).

Conclusões

Nesta revisão diversos métodos de detecção de compostos tóxicos e alergênicos foram apresentados. As necessidades do uso de ensaios biológicos para a detecção de ricina e de ésteres de forbol foram enfatizadas, assim como, os principais componentes limitantes das tortas de mamona e de pinhão-manso, para a liberação destes coprodutos para uso em alimentação animal. Foram apresentados ensaios biológicos para avaliar a alergenicidade

de tortas antes e após a inativação dos alérgenos nas tortas, mostrando que é possível obter tortas seguras para a manipulação por diferentes profissionais da cadeia produtiva de oleaginosas.

Embora muitos métodos tenham sido descritos para a detecção da atividade tóxica de pinhão-manso, os testes biológicos não são específicos para ésteres de forbol. Em contraste com os ensaios de detecção de ricina, nos quais podem ser combinados os ensaios biológicos com o reconhecimento pelo anticorpo específico, os ésteres de forbol não podem ser testados com esta metodologia. Até o presente momento, o melhor método para avaliar esses compostos é por meio da combinação de dosagens realizadas por RP-HPLC com um ensaio biológico, sendo que o ensaio biológico melhor estabelecido é o ensaio que emprega caramujos.

Devido à elevada sensibilidade e à disponibilidade de kits de ensaio comerciais para a atividade de PKC, acredita-se que a adequação desse ensaio em extratos de torta de pinhão-manso possa tornar-se uma forma de detecção rápida e eficiente para avaliar processos de destoxificação.

Referências

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. *Imunologia celular e molecular*. 4 ed. [S.l.]: Revinter, 2002. 544 p.

ABDU-AGUYE, I.; SANNUSI, A.; ALAFIYA-TAYO, R. A.; BRUSNURMATH, S. R. Acute toxicity studies with *Jatropha curcas* L. **Human Toxicology**, Hampshire, v. 5, n. 4, p. 269-274, 1986.

ADOLF, H. J.; OPFERKUCH, J.; HECKER E. Irritant phorbol derivatives from four *Jatropha* species. **Phytochemistry**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 129-132, 1984.

AHMED, O. M. M.; ADAM, S. E. I. Toxicity of *Jatropha curcas* in sheeps and goats. **Research in Veterinary Science**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 89-96, 1979.

ALEKSEEVA, L.; NEKRASOV, A.; MARCHENKO, A.; SHEVCHENKO, M.; BENEVOLENSKII, S.; SAPOZHNIKOV, A.; KURUP, V. P.; SVIRSHCHEVSKAYA, E. Cryptic B-cell epitope identification through informational analysis of protein sequences. **Vaccine**, Surrey, v. 25, n. 14, p. 2688-2697, 2007.

ANANDAN, S.; KUMAR, G. K. A.; GHOSH, J.; RAMACHANDRA, K. S. Effect of different physical and chemical treatments on detoxification of ricin in castor cake. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 120, n. 1-2, p. 159-168, 2005.

ANTOINE, M. D.; HAGAN, N. A.; LIN, J. S.; FELDMAN, A. B.; DEMIREV, P. A. Rapid detection of ribosome inactivating protein toxins by mass-spectrometry-based functional assays. **International Journal of Mass Spectrometry**, Amsterdam, v. 312, special issue, p. 41-44, 2011.

ATLAS, R. M. Bioterrorism: from threat to reality. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 56, p. 167-185, 2002.

AUDI, J.; BELSON, M.; PATEL, M.; SCHIER, J.; OSTERLOH, J. Ricin poisoning: a comprehensive review. **JAMA**, Chicago, v. 294, n. 18, p. 2342-2351, 2005.

BARBIERI L.; BOLOGNESI, A.; CENINI, P.; FALASCA, A. I.; MINGHETTI, A.; GAROFANO, L.; GUICCIARDI, A.; LAPPI, D.; MILLER, S. P.; STIRPE, F. Ribosome-inactivating proteins from plant-cells in culture. **Biochemical Journal**, London, v. 257, n. 3, p. 801-807, 1989.

BARROS, C. R. M.; FERREIRA, L. M. M.; NUNES, F. M.; BEZERRA, R. M. F.; DIAS, A. A.; GUEDES, C. V.; CONE, J. W.; MARQUES, G. S. M.; RODRIGUES, M. A. M. The potential of white-rot fungi to degrade phorbol esters of *Jatropha curcas* L. seed cake. **Engineering in Life Sciences**, v. 11, n. 1, p. 107-110, 2011.

BASHA, S. D.; FRANCIS, G.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SUJATHA, M. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, Clare, v. 176, n. 6, p. 812-823, 2009.

BECHER, F.; DURIEZ, E.; VOLLAND, H.; TABET, J. C.; EZAN, E. Detection of functional ricin by immunoaffinity and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 79, n. 2, p. 659-665, 2007.

BECKER, K.; MAKAR, H. P. S. Effects of phorbol esters in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 40, n. 2, p. 82-86, 1998.

BEUTLER, J. A.; ADA, A. B.; MCCLOUD, T. G.; CRAGG, G. M. Distribution of phorbol ester bioactivity in the euphorbiaceae. **Phytoterapeutic Response**, Sussex, v. 3, n. 5, p. 188-192, 1989.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology of development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994.

BRADBERRY, S. M.; DICKERS, K. J.; RICE, P.; GRIFFITHS, G. D.; VALE, J. A. Ricin poisoning. **Toxicological Reviews**. *Auckland*, v. 22, n. 1, p. 65-70, 2003.

BRANDT, N. N.; CHIKISHEV, A. Y.; SOTNIKOV, A. I.; SAVOCHKINA, Y. A.; AGAPOV, I. I.; TONEVITSKII, A. G.; KIRPICHNIKOV, M. P. Conformational difference between ricin and ricin agglutinin in solution and crystal. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, Moscow, v. 376, p. 26-28, 2001.

BRINKWORTH, C. S.; PIGOTT, E. J.; BOURNE, D. J. Detection of intact ricin in crude and purified extracts from castor bean using matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 81, n. 4, p. 1529-1535, 2009.

BRODIE, C.; BLUMBERG, P. M. Regulation of cell apoptosis by protein kinase C δ . **Apoptosis**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 19-27, 2003.

BRZEZINSKI, J. L.; CRAFT, D. L. Evaluation of an *in vitro* bioassay for the detection of purified ricin and castor bean in beverages and liquid food matrices. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 70, n. 10, p. 2377-2382, 2007.

CHIERICE, G. O.; NETO, S. C. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D. M. P. de; BELTRÃO, N. E. de M. (Ed.). **O Agronegócio da mamona no Brasil**. 2 ed. rev. amp. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2007. p. 419-447, cap. 18.

- CHUMKAEW, P.; KARALAI, C.; PONGLIMANON, C.; CHANTRAPROMMAT, C. Antimycobacterial Activity of phorbol esters from the fruits of *Sapium indicum*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 66, n. 4, p. 540-543, 2003.
- CLEMENS, M. J.; TRYNER, I.; MENAYA, J. The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. **Journal of Cell Science**, Cambs, v. 103, parte 4, p. 881-887, 1992.
- DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; FELIX, S. P.; CARRIELO-GAMA, C.; FERNANDES, K. V.; DAMATTA, R. A.; MACHADO, O. L. T. Identification of critical amino acids in the IgE epitopes of Ric c 1 and Ric c 3 and the application of glutamic acids as an IgE blocker. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 6, n. artigo e21455, 2011a.
- DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; MACHADO, O. L. T. Allergens and toxins of oleaginous plants: problems and solutions. In: BERNARDES, M. A. S. (Ed.). **Environmental impact of biofuels**. Rijeka: InTech, 2011b. p. 41-66.
- DEVAPPA, R. K.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Potential of using phorbol esters as an insecticide against *Spodoptera frugiperda*. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 38, p. 50-53, 2012b.
- DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Optimization of conditions for the extraction of phorbol esters from *Jatropha* oil. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 34, n. 8, p. 1125-1133, 2010.
- DEVAPPA, R. K.; RAJESH, S. K.; KUMAR, V.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Activities of *Jatropha curcas* phorbol esters in various bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, San Diego, v. 78, p. 57-62, 2012a.
- DEVAPPA, R. K.; SWAMYLINGAPPA, B. Biochemical and nutritional evaluation of *Jatropha* protein isolate prepared by steam injection heating for reduction of toxic and antinutritional factors. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 88, n. 5, p. 911-919, 2008.
- DURIEZ, E.; FENAILLE, F.; TABEL, J. C.; LAMOURETTE, P.; HILAIRE, D.; BECHER, F.; EZAN, E. Detection of ricin in complex samples by immunocapture and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 7, n. 9, p. 4154-4163, 2008.

EL BADWI, S. M. A.; ADAM, S. E. I.; HAPKE, H. J. Comparative toxicity of *Ricinus communis* and *Jatropha curcas* in Brown Hissex chicks. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, Hannover, v. 102, n. 2, p. 75-77, 1995.

EL BADWI, S. M. A.; MOUSA, H. M.; ADAM, S. E. I.; HAPKE, H. J. Response of Brown Hissex chicks to low levels of *Jatropha curcas*, *Ricinus communis* or their mixture. **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 34, n. 4, p. 304-306, 1992.

FELIX, S. P.; MAYERHOFFER, R. O.; DAMATTA, R. A.; VERICIMO, M. A.; NASCIMENTO, V. V.; MACHADO, O. L. T. Mapping IgE-binding epitopes of Ric c 1 and Ric c 3, allergens from *Ricinus communis*, by mast cell degranulation assay. **Peptides** v. 29, n. 4, p. 497-504, 2008.

FERNANDES, K. V. **Análise dos níveis de albumina 2S e ricina em sementes de diferentes cultivares de mamona (*Ricinus communis* L.)**. 2008. **Monografia**. Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

FERNANDES, K. V. **Desenvolvimento de um bioensaio para detecção de ricina e utilização da fermentação em estado sólido para destoxificação da torta de mamona e produção de lipase**. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, RJ.

FERNANDES, K. V.; DEUS-DE-OLIVEIRA, N.; GODOY, M. G.; GUIMARÃES, Z. A. S.; NASCIMENTO, V. V.; MELO, E. J. T.; FREIRE, D. M. G.; DANSA-PETRETSKI, M.; MACHADO, O. L. T. Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds and solid-state fermentation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 45, n. 11, p. 1002-1010, 2012.

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

FREDRIKSSON, S. A.; HULST, A. G.; ARTURSSON, E.; JONG, A. L.; NILSSON, C.; BAAR, B. L. M. Forensic identification of neat ricin and of ricin from crude castor bean extracts by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 77, n. 6, p. 1545-1555, 2005.

GARCÍA-GONZÁLEZ, J. J.; BARTOLOMÉ -ZAVALA, B.; DEL MAR TRIGO-PÉREZ, M.; BARCELÓ-MUÑOZ, J. M.; FERNÁNDEZ-MELÉNDEZ, S.; NEGRO-CARRASCO, M. A.; CARMONA-BUENO, M. J.; VEGA-CHICOTE, J. M.; MUÑOZ-ROMÁN, C.; PALACIOS-PELÁEZ, R.; CABEZUDO-ARTERO, B.; MARTÍNEZ-QUESADA, J. Pollinosis to *Ricinus communis* (castor bean): an aerobiological, clinical and immunochemical study. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, v. 29, n. 9, p. 1265-1275, 1999.

GODAL, A.; OLSNES, S.; PIHL, A. J. Radioimmunoassays of ricin and abrin in blood. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, Bristol, v. 8, n. 3, p. 409-417, 1981.

GODOY, M. G.; FERNANDES, K. V.; GUTARRA, M. L. E.; MELO, E. J. T.; CASTRO, A. M.; MACHADO, O. L. T.; FREIRE, D. M. G. Use of Vero cell line to verify the biot detoxification efficiency of castor bean waste. **Process Biochemistry**, Oxon, v. 47, n. 4, p. 578-584, 2012.

GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, Philadelphia, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.

HAAS, W.; STERK, H.; MITTELBACH, M. Novel 12-deoxy-16-hydroxiphorbol diester isolated from the seed oil of *Jatropha curcas*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 65, n. 10, p. 1434-1440, 2002.

HAES, A. J.; GIORDANO, B. C.; COLLINS, G. E. Aptamer-based detection and quantitative analysis of ricin using affinity probe capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 78, n. 11, p. 3758-3764, 2006.

HE, W.; KING, A. J.; KHAN, M. A.; CUEVAS, J. A.; RAMIARAMANANA, D.; GRAHAM, I. A. Analysis of seed phorbol-ester and curcin content together with genetic diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 49, n. 10, p. 1183-1190, 2011.

HEISLER, I.; KELLER, J.; TAUBER, R.; SUTHERLAND, M.; FUCHS, H. A colorimetric assay to quantitation of free adenine applied to determine the enzymatic activity of ribosome inactivating proteins. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 302, n. 1, p. 114-122, 2002.

HINES, H. B.; BRUEGGEMANN, E. E.; HALE, M. L. High-performance liquid chromatography-mass selective detection assay for adenine released from a synthetic RNA substrate by ricin A chain. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 330, n. 1, p. 119-122, 2004.

ICHIHASHI, K.; YUKI, D.; KUROKAWA, H.; IGARASHI, A.; YAJIMA, T.; FUJIWARA, M.; MAENO, K.; SEKIGUCHI, S.; IWATA, M.; NISHINO, H. Dynamic analysis of phorbol esters in the manufacturing process of fatty acid methyl esters from *Jatropha curcas* seed oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, New York, v. 88, n. 6, p. 851-861, 2011.

JOSHI, C.; MATHUR, P.; KHARE, S. K. Degradation of phorbol esters by *Pseudomonas aeruginosa* PseA during solid-state fermentation of deoiled *Jatropha curcas* seed cake. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 102, n. 7, p. 4815-4819, 2011.

KAMBAYASHI, T.; KORETZKY, G. A. Proximal signaling events in FcεRI-mediated mast cell activation. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 119, n. 3, p. 544- 552, 2007.

KATOLE, S.; SAHA, S. K.; SASTRY, V. R. B.; LADE, M. H.; PRAKASH, B. Intake, blood metabolites and hormonal profile in sheep fed processed *Jatropha (Jatropha curcas)* meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 170, n. 1-2, p. 21-26, 2011.

KINGHOM, A. D.; HARJES, K. K.; DOORENBOS, N. J. Screening procedure for phorbol ester using brine shrimp (*Artemia salina*) larvae. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Washington, DC, v. 66, n. 9, p. 1362-1363, 1977.

KOJA, N.; SHIBATA T.; MOCHIDA, K. Enzyme-linked immunoassay of ricin. **Toxicion**, Oxford, v. 18, n. 5-6, p. 611-618, 1980.

KONNUR, R.; SUBBARAO, E. C. Biogas form de-oiled castor cake. In: INTERNATIONAL SEMINAR ON CASTOR OIL AND ITS VALUE ADDED PRODUCTS. **Proceedings...** Ahmedabad: The Solvent Extractors Association of India, 2004. p. 31-35.

KULL, S.; PAULY, D.; STÖRMANN, B.; KIRCHNER, S.; STÄMMLER, M.; DORNER, M. B.; LASCH, P.; NAUMANN, D.; DORNER, B. G. Multiplex detection of microbial and plant toxins by immunoaffinity enrichment and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 82, n. 7, p. 2916-2924, 2010.

KUMAR, V.; AKINLEYE, A. O.; MAKKAR, H. P. S.; ANGULO-ESCALANTE, M. A.; BECKER, K. Growth performance and metabolic efficiency in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed on a diet containing *Jatropha platyphylla* kernel meal as a protein source. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 96, n. 1, p. 37-46, 2012.

LANGER, M.; ROTHE, M.; ECK, J.; MÖCKEL, B.; ZINKE, H. A nonradioactive assay for ribosome-inactivating proteins. **Analytical Biochemistry**, v. 243, n. 1, p. 150-153, 1996.

LI, C. Y.; DEVAPPA, R. K.; LIU, J. X.; LV, J. M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Toxicity of *Jatropha curcas* phorbol esters in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 2, p. 620-625, 2010.

LI, X. P.; BERICEVIC, M.; SAIDASAN, H.; TUMER, N. E. Ribosome depurination is not sufficient for ricin-mediated cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. **Infection and Immunity**, Washington, DC, v. 75, n. 1, p. 417-428, 2007.

LICHTENSTEIN, L. M. Allergy and the immune system. **Scientific American**, v. 269, n. 3, p. 116-124, 1993.

LIN, J.; CHEN, Y.; XU, Y.; YAN, F.; TANG, L.; CHEN, F. Cloning and expression of curcin, a ribosome-inactivating proteing from the sseeds of *Jatropha curcas*. **Acta Botânica Sinica**, Peiping, v. 45, n. 7, p. 858-863, 2003.

LIU, S. Y.; SPORER, F.; WINK, M.; JOURDANE, J.; HENNING, R.; LI, Y. L.; RUPPEL, A. Anthraquinones in *Rheum palmatum* and *Rumex dentatus* (Polygonaceae), and phorbol esters in *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) with molluscicidal activity against the schistosome vector snails *Oncomelania*, *Biomphalaria* and *Bulinus*. **Tropical Medicine and International Health**, Oxon, v. 2, n. 2, p. 179-188, 1997.

LUBELLI, C.; CHATGIGLIALOGLU, A.; BOLOGNESI, A.; STROCCHI, P.; COLOMBATTI, M.; STIRPE, F. Detection of ricin and other ribosome-inactivating proteins by an immunopolymerase chain reaction assay. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 355, n. 1, p. 102-109, 2006.

LUGNIER, A. A. J.; LE MEUR, M. A.; GERLINGER, P.; DIRHEIMER, G. Inhibition of *in vitro* protein synthesis in a rabbit reticulocyte cell-free system by toxic trypsic peptides from ricin. **Biochimie**, Paris, v. 56, n. 9, p. 1287-1289, 1974.

MACHADO, O. L. T.; SILVA, J. G. An allergenic 2S storage protein from *Ricinus communis* seeds which is part of the albumin precursor predict by c-DNA data. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 25, n. 6, p. 567-582, 1992.

MACIEL, F. M.; LABERTY, M. A.; OLIVEIRA, N. D.; FELIX, S. P.; SOARES, A. M.; VERÍCIMO, M. A.; MACHADO, O. L. T. A new 2S albumin from *Jatropha curcas* L. seeds and assessment of its allergenic properties. **Peptides**, New York, v. 30, n. 12, p. 2103-2107, 2009.

MAINTZ, L.; NOVAK, N. Histamine and histamine intolerance. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 85, n. 5, p. 1185-96, 2007.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies of nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; MAES, J.; GREYT, W. D. Removal and degradation of phorbol esters during pre-treatment and transesterification of *Jatropha curcas* oil. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, New York, v. 86, n. 2, p. 173-181, 2009.

MAKKAR, H. P. S.; ODERIBIGBE, 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**, Amsterdam, v. 62, n. 2, p. 207-215, 1998.

MARTÍNEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DÁVILA-ORTÍZ, G.; BECKER, K. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food Chemistry**, Oxon, v. 96, n. 1, p. 80-89, 2006.

MEI, Q.; FREDRICKSON, C. K.; LIAN, W.; JIN, S.; FAN, Z. H. Ricin detection by biological signal amplification in a well-in-a-well device. **Analytical Chemistry**, Washington, DC, v. 78, n. 22, p. 7659-7664, 2006.

MOSHKIN, V. A. **Castor**. New Delhi: Indian Amerind Publishing, 1986.

NA, D. H.; YOUN, Y. S.; LEE, K. C. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for monitoring and optimization of site-specific PEGylation of ricin A-chain. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, Sussex, v. 18, n. 18, p. 2185–2189, 2004.

NARANG, U.; ANDERSON, G. P.; LIGLER, F. S.; BURANST, J. Fiber optic-based biosensor for ricin. **Biosensors and Bioelectronics**, Washington, DC, v. 12, n. 9-10, p. 937-945, 1997.

OGERT, R. A.; BROWN, J. E.; SINGH, B. R.; SHRIVER-LAKE, L. C.; LIGLER, F. S. Detection of *Clostridium botulinum* toxin A using a fiber optic-based biosensor. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 205, n. 2, p. 306-312, 1992.

OGERT, R. A.; SHRIVER-LAKE, L. C.; LIGLER, F. S. Toxin detection using a fiber optic-based biosensor. In: LAKOWICZ, J. R.; THOMPSON, R. B. (Ed.). **Proceedings of advances in fluorescence sensing technology**. Bellingham: Int. Soc. Optical Engineering, 1993. p. 11-17. (Proceedings of the Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers, v. 1885).

OLSNES, S.; FERNANDEZ-PUENTES, C.; CARRASCO, L.; VAZQUEZ, D. Ribosome inactivation by the toxic lectins abrin and ricin. Kinetics of the enzymatic activity of the toxin A-chains. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 60, n. 1, p. 281-288, 1975.

PHASUKARRATCHAI, N.; TONTAYAKOM, V.; TONGCUMPOU, C. Reduction of phorbol esters in *Jatropha curcas* L. pressed meal by surfactant solutions extraction. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 45, p. 48-56, 2012.

POLI, M. A.; RIVERA, V. R.; HEWETSON, J. F.; MERRILL, G. A. Detection of ricin by colorimetric and chemiluminescence ELISA. **Toxicon**, Oxford, v. 32, n. 11, p. 1371-1377, 1994.

QIN, W.; MING-XING, H.; YING, X.; XIN-SHEN, Z.; FANG, C. Expression of a ribosome inactivating protein (curcin 2) in *Jatropha curcas* is induced by stress. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 30, n. 3, p. 351-357, 2005.

RAKSHIT, K. D.; DARUKESHWARA, J.; RATHINA RAJ, K.; NARASIMHAMURTHY, K.; SAIBABA, P.; BHAGYA, S. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 3621-3625, 2008.

RUEBHART, D. R.; COCK, I. E.; SHAW, G. R. Brine shrimp bioassay: importance of correct taxonomic identification of *Artemia* (Anostraca) species. **Environmental Toxicology**, Hoboken, v. 23, n. 4, p. 555-560, 2008.

RUG, M.; RUPPEL, A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snail hosts and larvae of schistosomes. **Tropical Medicine and International Health**, Oxon, v. 5, n. 6, p. 423-430, 2000.

SAETAE, D.; SANTORNSUK, W. Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Seoul, v. 20, n. 2, p. 319-324, 2010.

SANO, T.; SMITH, C. L.; CANTOR, C. R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. **Science**, Washington, DC, v. 258, n. 5079, p. 120-122, 1992.

SEHGAL, P.; KHAN, M.; KUMAR, O.; VIJAYARAGHAVAN, R. Purification, characterization and toxicity profile of ricin isoforms from castor beans. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 11, p. 3171-3176, 2010.

SHARIEF, F. S.; LI, S. S. Amino acid sequence of small and large subunits of seed storage protein from *Ricinus communis*. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 257, n. 24, p. 4753-4759, 1982.

SILVA JUNIOR, J. R. da; MACHADO, O. L.; IZUMI, C.; PADOVAN, J. C.; CHAIT, B. T.; MIRZA, U. A.; GREENE, L. J. Amino acid sequence of new 2S albumin from *Ricinus communis* which is part of 29-Kda precursor protein. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 336, n. 1, p. 10-18, 1996.

SPIES, J. R.; COULSON, E. J. The Chemistry of Allergens. VIII. Isolation and Properties of an Active Protein-polysaccharidic Fraction, CB-1A, from Castor Beans. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v. 65, n. 9, p. 1720-1725, 1943.

STIRPE, F.; BATELLI, M. G. Review: Ribosome-inactivating proteins: progress and problems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Boston, v. 63, n. 16, p. 1850-1866, 2006.

STIRPE, F.; PESSION-BRIZZI, A.; LORENZONI, E.; STROCCHI, P.; MOTANATO, L.; SPERTI, S. Studies on the proteins of the seeds of *Croton tiglium* and *Jatropha curcas*. **Biochemical Journal**, London, v. 156, n. 1, p. 1-6, 1976.

THORPE, S. C.; KEMEDY, D. M.; PANZANI, R. C.; MC GULR, B.; LORD, M. Allergy to castor bean. II. Identification of the major allergens in castor bean seeds. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v. 82, n. 1, p. 67-72, 1988.

VERMA, M.; PRADHAN, S.; SHARMA, S.; NAIK, S. N.; PRASAD, R. Efficacy of karanjin and phorbol ester against termites (*Odontotermes obesus*). **International Biodeterioration & Biodegradation**, Oxon, v. 65, n. 6, p. 877-882, 2011.

WANG, H.; CHEN, Y.; ZHAO, Y.; LIU, H.; LIU, J.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Effects of replacing soybean meal by detoxified *Jatropha curcas* kernel meal in the diet of growing pigs on their growths, serum biochemical parameter and visceral organs. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 170, n. 1-2, p. 141-146, 2011.

WINK, M.; GRIMM, C.; KOSCHMIEDES, C.; SPORER, F.; BERGEOT, O. Sequestration of phorbol esters by the aposematically coloured bug *Pachycoris klugii* (Heteroptera: Scutelleridae) feeding on *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae). **Chemoecology**, Stuttgart, v. 10, n. 4, p. 179-184, 2000.

YOULE, R. J.; MURRAY, G. J.; NEVILLE, D. M. Studies on the galactose binding site of ricin and the hybrid toxin man6p-ricin. **Cell**, Cambridge, v. 23, n. 2, p. 551-559, 1981.

Opportunities for Utilization of *Jatropha curcas* Products as Livestock Feed and Other Value-Added Products

Harinder P.S. Makkar

Introduction

A comparison of 75 non-edible oilseed plants revealed *Jatropha curcas* L. to outmatch all the others as a source of biodiesel (AZAN et al., 2005). This plant has the capacity to survive and grow in a large variety of soil conditions. A temperature range of 25–35 °C is optimum for its growth, but can tolerate elevated temperatures to far above 40 °C. Its drought tolerance and adaption to long, severe dry seasons is well developed, to a degree that established plants have been reported to grow even where there is no rain for 2–3 years (MÜNCH; KIEFER, 1989). *Jatropha* on the other hand, appears to tolerate humid conditions equally well, showing good growth with high rainfall. It is not grazed by animals. It is a plant having multiple uses and yields high quality oil that is easily converted into biodiesel by the conventional, proven processes.

Jatropha products as animal feed

The demand for dietary products of animal origin is increasing at a high pace, mainly due to the increase in purchasing power in the emerging countries and urbanisation. The assurance of availability of high quality protein, minerals and vitamins through animal products is the most important way to reduce malnutrition in many areas of the developing world. Today's global production of *J. curcas* seeds from plantations is still negligible. However, its cultivation as an energy plant is increasing in many countries. One ton of seeds (35% shell mass and 58% oil in kernel) yields 270 kg *Jatropha* kernel meal containing roughly 60% crude protein in dry matter (MAKKAR et al., 2008). The protein rich kernel meal is, however, toxic due to presence of phorbol esters (tetracyclic diterpenes). The kernel meal, if detoxified, could be a good substitute for soybean meal in diets of farm animals and aquaculture species.

Comparative evaluation of toxic and non-toxic jatropha genotypes

There was no significant difference in the contents of oil and protein in the seeds of the toxic and non-toxic genotypes (MAKKAR et al., 1997, 1998a, b; MARTINEZ-HERRERA et al., 2006). The *Jatropha* kernels (kernels being inner white material left after removal of shells) from toxic and non-toxic genotypes contain almost similar oil content of approx. 57.1 and 56.7%, respectively.

Chemical composition and digestibility of *Jatropha* kernel meal

The contents of crude protein, ash, gross energy and neutral detergent fibre of kernel meal for both the genotypes are similar. Sugar and starch contents and the amino acid composition of toxic and non-toxic genotypes are almost similar. The levels of all essential amino acids except lysine are comparable with the FAO reference protein for a growing child of 2 to 5 years of age. A comparison between the amino acid composition of *Jatropha* meal and soybeans (VASCONCELOS et al., 1997) showed an almost similar pattern for all essential amino acids, except lysine and sulphur amino acids; lysine is lower and sulphur amino acids higher in the *Jatropha* meals. The high protein efficiency in rats and the rapid growth observed in fish fed non-toxic *Jatropha* meal (MAKKAR; BECKER, 1999) suggested that the protein quality of *Jatropha* kernel meal is very high.

Digestibility and metabolizable energy of heat treated (121°C, 66% moisture, 30 min) kernel meal, using the *in vitro* gas method (MENKE et al., 1979), were similar for the toxic and non-toxic genotypes, but were lower compared to those for soybean meal by 10% units and by 2.5 MJ/kg dry matter. Digestibility of the *Jatropha* kernel meal protein determined by treatment with pepsin followed by trypsin was similar to that of toasted soybean meal, whereas *in vitro* rumen digestibility of nitrogen was lower by approx. 50% (MAKKAR et al., 1998a). This suggests that *Jatropha* kernel meal has a high level of rumen undegradable protein which might be available post-ruminally in the intestine. These results imply that *Jatropha* kernel meal from the non-toxic genotype could be an excellent protein source for high-yielding animals. This would also be expected for the *Jatropha* kernel meal from the toxic genotype once it has been detoxified.

Antinutritional and toxic factors in kernel meal

Trypsin inhibitor activity and lectin activity have been found to be similar in the toxic and non-toxic genotypes. Phytate is present

at high level (approximately 9%) in both the genotypes. Phytate is known to decrease absorption of minerals, particularly calcium, zinc and iron. Therefore, the addition of phytase enzyme should be considered for feeds containing kernel meal from the non-toxic *Jatropha* genotype to mitigate adverse effects of phytate. Tannins, cyanogens, glucosinolates and amylase inhibitors have not been detected in any of the *Jatropha* meals. Saponins were present in kernel meal of both the genotypes (2.6 to 3.4%), however these saponins did not possess haemolytic activity. The level of non-starch polysaccharides was also similar in both the genotypes.

Phorbol esters were absent in kernel meal from the non-toxic genotype but were present in high concentration in the kernel meal from the toxic genotype. Phorbol esters cause severe toxic symptoms in livestock. At least six phorbol esters are present in *Jatropha* seeds and oil. Trypsin inhibitor and lectins are heat labile and can be destroyed by moist heating. However, phorbol esters are heat stable and hence heat treatment is not effective to detoxify kernel meal from the toxic genotype. For detailed discussion on this topic, readers are directed to Devappa and coauthors (2012).

Heated non-toxic *Jatropha* kernel meal as fish feed

The common carp (*Cyprinus carpio*) when fed heat treated kernel meal at a level of 75% replacement of fish meal protein in diet containing 500 IU of phytase grew at the same level as the fish fed fish meal. These results suggest that the kernel meal obtained from the non-toxic genotype is an excellent fish feed, and is also expected to be an excellent protein source for other high yielding farm animal species.

Detoxification of kernel meal and protein isolate from toxic genotype and use as feed

Carp (*C. carpio*) is highly sensitive to toxins and can detect phorbol esters at a level of 15 ppm (BECKER; MAKKAR, 1998). Therefore, we have been using carp as an animal model for development of

detoxification conditions. Recently, kernel meal from the toxic genotype has been detoxified and fed to carp, poultry, shrimp and turkey with excellent growth response and no toxicity (MAKKAR et al., 2012).

Bioactive compounds for industrial, agricultural and pharmaceutical applications

Phorbol esters present in *Jatropha* seeds and oil could form potent bio-compounds against many plant diseases and probably against disease vectors in animals as well. *Jatropha* kernels contain these esters ranging from less than 1 mg to more than 7 mg per gram. On average, 70% of all phorbol esters are retained in the oil, the rest are found in the deoiled kernel meal (MAKKAR et al., 2008).

Jatropha oil or methanol extract of *Jatropha* oil containing phorbol esters has been shown to have strong insecticidal effects (MENGUAL, 1997; LI et al., 2004) and pesticidal effects (SOLSOLOY; SOLSOLOY, 1997). Extracts from *J. curcas* were found to be toxic to snails transmitting *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* (RUG; RUPPEL, 2002). Phorbol esters at a level of 1 ppm in water also killed all snails of *Physa* specie, which are also known to be intermediary hosts of schistosomes responsible for causing deadly disease schistosomiasis. Phorbol esters when extracted from oil could have applications as biopesticides in organic as well as conventional agriculture. In addition, they could also be used to control diseases such as schistosomiasis (GOEL et al., 2007; MAKKAR et al., 2007). Studies on the fate of phorbol esters in the environment show that these are degraded completely in soil within 9 to 12 days depending on the temperature and humidity. The extracted phorbol esters in methanol are also stable

at minus 20°C and at 4°C. However storage at room temperature requires addition of reducing agents (DEVAPPA et al., 2013).

Anti-inflammatory compounds such as flavonoids apigenin and its glycosides vitexin and isovitexin, the sterols stigmasterol, beta-D-sitosterol and its beta-D-glucoside (CHHABRA et al., 1990) are known to be present in *Jatropha* leaves. The *Jatropha* latex has a proteolytic enzyme, curcain which has been demonstrated to have wound healing properties (NATH; DUTTA, 1997). A novel cyclic octapeptide, curcacycline (Gly-Leu-Leu-Gly-Thr-Val-Leu-Leu-Gly), present in *Jatropha* latex has been shown to inhibit classical pathway activity of human complement, and proliferation of human T-cells (VAN DEN BERG et al., 1995). *Jatropha* seeds are good sources of phytate. Several beneficial effects of phytate including cancer prevention, reduction in iron-induced oxidative injury and reversal of initiation of colorectal tumorigenesis, and prevention of lipid peroxidation have been reported (SINGH et al., 2003).

The oil has been used for decades for production of high-valued soaps. Antimicrobial activity has been reported in oil, leaves, and roots. Enzymes such as lipase and proteases have been produced using solid state fermentation (MAHANTA et al., 2008).

Jatropha products for energy generation

Besides substituting biofuels for fossil fuel, seed shell of *Jatropha* has, approximately, 45% lignin and has a high energy value (~19.5 MJ/kg). Related to the gross energy content, 2.1 kg of shells are equivalent to 1 kg of fossil oil. Husk (dried fruit encapsulate) of

Jatropha also has a high energy content (15.6 MJ/kg) and hence both these materials could be used for generating energy through burning.

References

- AZAN, M. M.; WARIS, A.; NAHAR, N. M. Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. **Biomass and Bioenergy**, Oxford, v. 29, n. 4, p. 293-302, 2005.
- BECKER, K.; MAKKAR, H. P. S. Toxic effects of phorbol esters in carp (*Cyprinus carpio* L.). **Veterinary and Human Toxicology**, Manhattan, v. 40, n. 2, p. 82-86, 1998.
- CHHABRA, S. C.; MAHUNNAH, R. L. A.; MSHIU, E. N. Plants used in traditional medicine in eastern Tanzania 3. Angiosperms (Euphorbiaceae to menispermaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 28, n. 3, p. 255-283, 1990.
- DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Phytochemicals in *Jatropha* seeds and potential agro-pharmaceutical applications of *Jatropha curcas* phorbol esters. In: CARELS, N.; SUJATHA, M.; BAHADUR, B. (Ed.). **Jatropha, challenges for a new energy crop: farming, economics and biofuel**. [S.l]: Springer, 2012. v. 1.
- DEVAPPA, R. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Shelf-life of isolated phorbol esters from *Jatropha curcas* oil. **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 49, p. 454-461, 2013.
- GOEL, G.; MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, Philadelphia, v. 26, n. 4, p. 279-288, 2007.
- KIEFER, J. **Die Purgiernuss (*Jatropha curcas* L.). Teil II: Ernteprodukt, Verwendungsalternativen, Wirtschaftliche Überlegungen**. 1989. Thesis (M.Sc.) - University of Hohenheim, Stuttgart, Germany.

LI, J.; YAN, F.; WU, F.-H.; YUE, B.-S.; CHEN, F. Insecticidal activity of extracts from *Jatropha curcas* seed against *Lipaphis erynsi*. **Journal of Plant Protection**, v. 31, p. 276-282, 2004.

MAHANTA, N.; GUPTA, A.; KHARE, S. K. Production of protease and lipase by solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* PseA in solid state fermentation using *Jatropha curcas* seed cake as substrate. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 99, n. 6, p. 1729-1735, 2008.

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

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Nutritional studies on rats and fish (carp *Cyprinus carpio*) fed diets containing unheated and heated *Jatropha curcas* meal of a non-toxic provenance. **Plant Foods Human Nutrition**, Dordrecht, v. 53, n. 3, p. 183-192, 1999.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; LIU, J. Role of *Jatropha curcas* in sustainable land management and towards energy and food security – a joint BMBF-MOST effort. In: ERSEC INTERNATIONAL CONFERENCE, 2008a, Beijing, China. **Sustainable land use and water management: proceeding**. [S.l.]: UNESCO, 2009. p. 53-61.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SCHMOOK, B. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintna Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 52, n. 1, p. 31-36, 1998b.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SPORER, F.; WINK, M. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, Washington, DC, v. 45, n. 8, p. 3152-3157, 1997.

MAKKAR, H. P. S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Bioactivity of phytochemicals in some lesser-known plants and their effects and potential applications in livestock and aquaculture production systems. **Animal**, Cambridge, v. 1, n. 9, p. 1371-1391, 2007.

MAKKAR, H. P. S.; KUMAR, V.; BECKER, K. Use of detoxified *Jatropha* kernel meal and protein isolate in diets of farm animals. In: MAKKAR, H. P. S. (Ed.). **Biofuel co-products as livestock feed: opportunities and challenges**. Rome: FAO, 2012. p. 351-378.

MAKKAR, H. P. S.; MARTÍNEZ-HERRERA, J.; BECKER, K. Variation in seed number per fruit, seed physical parameters and contents of oil, protein and phorbol esters in toxic and non-toxic genotypes of *Jatropha curcas*. **Journal of Plant Sciences**, New York, v. 3, n. 3, p. 260-265, 2008.

MARTINEZ-HERRERA, J.; SIDDHURAJU, P.; FRANCIS, G.; DAVILA-ORTIZ, G.; BECKER, K. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effect of different treatments on their levels, in four provenances of *Jatropha curcas* L. from Mexico. **Food Chemistry**, Oxon, v. 96, n. 1, p. 80-89, 2006.

MENGUAL, L. Extraction of bioactive substances from *Jatropha curcas* L. and bioassays on *Zonocerus variegatus*, *Sesamia calamistis* and *Brusseola fusca* for characterisation of insecticidal properties. In: GÜBITZ, G. M.; MITTELBACH, M.; TRABI, M. (Ed.). **Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas***. Graz: Sucher & Holzer, 1997.

MENKE, K. H.; RAAB, L.; SALEWSKI, A.; STEINGASS, H.; FRITZ, D.; SCHNEIDER, W. The estimation of the digestibility and metabolizable energy content of ruminant feedstuffs from the gas production when they are incubated with rumen liquor. **The Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 93, n. 1, p. 217-222, 1979.

MÜNCH, E.; **Die Purgiernuss (*Jathropha curcas* L.). Teil I: Botanik, Ökologie, Anbau.** 1989. Thesis (M.Sc.) - University of Hohenheim, Stuttgart , Germany.

NATH, L. K.; DUTTA, S. K. Acute toxicity studies and wound healing response of curcain, a proteolytic enzyme extracted from latex of *Jatropha curcas* Linn. In: GÜBITZ, G. M.; MITTELBACH, M.; TRABI, M. (Ed.). **Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas***. Graz: Sucher & Holzer, 1997. p. 82-86.

RUG, M.; RUPPEL, A. Toxic activities of the plant *Jatropha curcas* against intermediate snails and larvae of schistosomes. **Tropical Medicine and International Health**, Oxon, v. 5, n. 6, p. 423-430, 2000.

SINGH, B.; BHAT, T. K.; SINGH, B. Potential therapeutic applications of some antinutritional plant secondary metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 51, n. 19, p. 5579-5597, 2003.

SOLSOLOY, A. D.; SOLSOLOY, T. S. **Pesticidal efficacy of formulated *Jatropha curcas* oil on pests of selected field crops.** In: GÜBITZ, G. M.; MITTELBACH, M.; TRABI, M. (Ed.). **Biofuels and industrial products from *Jatropha curcas*.** Graz: Sucher & Holzer, 1997. p. 216-226.

VAN DEN BERG, A. J.; HORSTEN, S. F.; KETTENES-VAN DEN BOSCH, J. J., KROES, B. H.; BEUKELMAN, C. J.; LEEFLANG, B. R.; LABADIE, R. P. Curcacycline A – a novel cyclic octapeptide isolated from the latex of *Jatropha curcas* L. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 358, n. 3, p. 215-218, 1995.

VASCONCELOS, I. M.; SIEBRA, E. A.; MAIA, A. A. B.; MOREIRA, R. A.; NETO, A. F.; CAMPELO, G. J. A.; OLIVEIRA, J. T. A. Composition, toxic and antinutritional factors of newly developed cultivars of Brazilian soybean (*Glycine max*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Fortaleza, v. 75, n. 4, p. 419-426, 1997.

Fracionamento de tortas de pinhão-manso e mamona visando à obtenção de compostos de alto valor agregado

Roseli Aparecida Ferrari

Introdução

O cultivo de plantas oleaginosas tem sido preconizado nos últimos anos, em virtude da necessidade de mudança na matriz energética, principalmente no que concerne à substituição dos combustíveis fósseis e seus derivados por produtos de fontes renováveis. No Brasil, existe uma grande variedade de plantas cujas sementes possuem óleo com potencial para emprego industrial, inclusive como matéria-prima para produção de biodiesel. Dentre estas, destacamos o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e a mamona (*Ricinus communis* L.), que apresentam elevado teor de óleo não comestível com excelente qualidade físico-química para fins industriais, incluindo a produção de biocombustíveis (SUJATHA; PRABAKARAN, 2003; MARQUES, 2007).

As espécies *Jatropha curcas* e *Ricinus communis* pertencem à família Euphorbiaceae e se apresentam amplamente distribuídas em áreas tropicais e subtropicais (MARQUES, 2007). Outras espécies desta mesma família são o tungue, a seringueira e a mandioca,

que também apresentam compostos relacionados à toxicidade, quando utilizadas na alimentação animal. Contudo, para algumas culturas como a mandioca foram desenvolvidas estratégias de segurança alimentar, sendo atualmente um dos alimentos mais consumidos na América Latina e África (TELES, 1995).

A expansão dos plantios, tanto da mamona como do pinhão-manso, para extração de óleo traz como consequência o aumento na geração de coprodutos. Pesquisas da década de 70 e 80, bem como estudos mais recentes têm demonstrado resultados promissores no uso de coprodutos da mamona na agricultura e na alimentação animal. Este documento foi elaborado com o objetivo de discorrer sobre algumas possibilidades de aproveitamento integral de sementes de pinhão-manso e mamona visando à obtenção de compostos de maior valor agregado, com dados presentes na literatura.

Mamona

De origem discutida, já que existem relatos de épocas longínquas sobre o cultivo na Ásia e na África, pode-se afirmar que a mamona já era utilizada pelos egípcios há pelo menos 4.000 anos. Na Grécia antiga, alguns filósofos mencionaram em seus escritos o emprego do óleo de mamona no Egito para iluminação e na produção de unguentos. No Brasil, a planta foi trazida pelos portugueses com a finalidade de utilizar o óleo para iluminação e lubrificação de eixos de carroça (CHIERICE; CLARO NETO, 2001).

A facilidade de adaptação da mamona ao clima tropical facilitou a disseminação por todo território brasileiro, sendo considerada uma oleaginosa de grande importância social e econômica (KOURI et al., 2004; FREIRE, 2001). O Brasil foi durante décadas o

maior produtor mundial de sementes de mamona, e ainda detém a posição de maior exportador do óleo. Nos últimos anos o país apresentou declínio da produção, perdendo a condição de líder mundial para a Índia e a China, que atualmente são responsáveis por aproximadamente 90% da produção mundial (TIRITAN et al., 2010).

O derivado mais importante da mamona é o óleo, rico em ácido ricinoleico, com características peculiares conferidas pela sua estrutura química, com a presença de grupo hidroxila no carbono 12 e ligação dupla. O grupo hidroxila confere ao óleo estabilidade e elevada viscosidade, que é mantida em ampla faixa de temperatura, ao contrário de outros óleos vegetais, que perdem viscosidade em temperaturas elevadas e solidificam em temperaturas baixas. Outra característica em que difere dos demais óleos é a solubilidade em etanol, o que possibilita o uso como matéria-prima para várias aplicações: química, têxtil, papéis, plásticos, borracha, perfumaria, cosméticos, farmacêutica, eletroeletrônica, telecomunicações, tintas, adesivos, lubrificantes, próteses, e outras. O óleo de sementes de mamona é utilizado na indústria oleoquímica, num setor específico chamado ricinoquímica. Por muitos autores é considerado um dos óleos mais versáteis encontrados na natureza (WEISS, 1983).

Em relação ao rendimento industrial do processamento das sementes de mamona, segundo Loureiro (1962), para cada tonelada de óleo extraído é gerado como coproduto aproximadamente 1,28 tonelada de torta. De acordo com Azevedo e Lima (2001), a torta apresenta elevado teor proteico, dependendo das condições de cultivo e da semente, mas é tóxica, devido à presença da proteína ricina, que é uma das mais potentes fitotoxinas, com dose letal para coelhos de 0,5 mg/kg e se encontra concentrada no endosperma das sementes. Apresenta também o alcaloide ricinina, encontrado na concentração de 87 a 150 mg por 100 g de sementes, sendo considerado de baixa toxicidade, e também é encontrado o complexo alergênico CB-1A que é uma mistura de proteínas de baixo peso molecular e polissacarídeos (WEISS, 1983).

A torta de mamona natural, sem ser destoxificada, tem sido utilizada para o controle de nematoides no solo em diversas culturas. Entre diversos produtos testados no controle de nematoides, Akhtar e Mohmood (1996) utilizaram a torta de mamona 15 dias antes do plantio de guandu, na quantidade de 2.700 kg/ha, ou equivalente a 110 kg N/ha. A torta promoveu o aumento do *Meloïdogyne aquaticus*, um predador de várias espécies de nematoides causadores de doenças em plantas. Tem sido observado que a adição de torta de mamona ao solo, com dosagens variáveis de acordo com a cultura, tipo de solo e da composição em nutrientes, além de suprir as necessidades nutricionais das plantas, aumenta o pH do solo, eleva o conteúdo de carbono e promove a melhoria geral das características físicas do solo (LEAR, 1959).

A torta de mamona destoxificada e sem o alergogênico pode ser utilizada como complemento em rações animais devido ao seu elevado valor proteico, já que possui 42,5% de proteína bruta. No Brasil, a torta vem sendo mais utilizada como adubo orgânico sem nenhum tipo de tratamento, por ser excelente fonte de nitrogênio, fósforo, potássio e cálcio quando comparada a outros adubos orgânicos, além do já mencionado controle de nematoides de solo (CANGEMI et al., 2010).

A alergenicidade da torta de mamona é um risco ocupacional para as pessoas que trabalham nas indústrias de extração de óleo e para os moradores dos arredores da indústria, os quais estão expostos à poeira da torta levada pelo vento; até mesmo o uso da torta como adubo pode causar reações alérgicas nos trabalhadores de campo submetidos à poeira (ICOA, 1989).

Os processos de destoxificação da mamona foram muito estudados no Brasil nas décadas de 70 e 80. Viotto (1987) no trabalho de estudo da destoxificação do farelo de mamona e seu controle analítico, concluiu que a autoclavagem a 125°C por 10 min foi suficiente para inativar a ricina. Verificou também que o teor de arginina na

proteína solúvel do farelo de mamona aumenta com a intensidade do tratamento térmico. Quanto ao método analítico de controle de processo de destoxificação, relatou que a relação dos resultados obtidos pelos métodos de Sakaguchi/10 Biureto ($S/10B$) ≥ 13 parece indicar que o farelo está plenamente destoxificado, quando comparando estes resultados com os testes realizados com cobaias.

O melhoramento genético, que é normalmente um processo de longo prazo, tem sido uma ferramenta para a obtenção de cultivares de mamona isenta ou com baixo teor de ricina (PINKERTON et al., 1999). Neste sentido, o trabalho desenvolvido por Baldoni (2010) visou avaliar a existência de variáveis genéticas para o teor de ricina em sementes de mamona de 20 acessos do banco de germoplasma da Embrapa. Nesse trabalho foi acompanhada a distribuição e o acúmulo de ricina durante o desenvolvimento da semente de mamona na cultivar BRS Energia; e a partir desse conhecimento a modificação genética visando o silenciamento dos genes que codificam para a ricina em sementes de mamona geneticamente modificadas.

Pinhão-manso

O pinhão-manso, embora seja uma planta conhecida e cultivada na América desde tempos remotos, disseminada em áreas tropicais e algumas áreas temperadas, é uma cultura que ainda se encontra em processo de domesticação no Brasil. Somente nas últimas três décadas, o pinhão-manso passou a ser estudado agronomicamente (SATURNINO et al., 2005). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Instrução Normativa nº. 4, de 14 de janeiro de 2008, autorizou a inscrição no Registro Nacional de Cultivares da espécie *Jatropha curcas* L. (pinhão-manso), o que abriu caminho para a respectiva exploração comercial no Brasil (MAPA, 2013).

Historicamente, essa oleaginosa tem sido utilizada em cultivo, tanto para proteção do solo contra erosão, como para estabelecimento de cercas vivas, e as folhas, o látex, a casca e o óleo são bem conhecidos da medicina tradicional de outros países. Na atualidade, o óleo vem sendo considerado matéria-prima potencial para substituição dos combustíveis fósseis (OPENSHAW, 2000). O pinhão-manso é um arbusto de ciclo perene com elevada produção anual de óleo e cultura com potencial para a agricultura familiar. Essa espécie representa matéria-prima alternativa para compor a matriz de produção de óleo para biodiesel.

As sementes de pinhão-manso, embora sejam usadas na medicina popular, são altamente tóxicas. A ingestão destas e/ou o uso do óleo como purgativo pode causar graves irritações e envenenamentos. Por muito tempo se pensou que a atividade tóxica da planta era causada pela ação da lectina curcina, abundante nas sementes. Contudo, vários trabalhos vêm contribuindo para demonstrar que a atividade tóxica das sementes, bem como do óleo deve-se, na verdade, à presença de ésteres de forbol, com atividade cocarcinogênica e inflamatória (EVANS; EDWARDS, 1987).

Grande parte dos ésteres de forbol é extraída juntamente com o óleo, devido às características lipossolúveis. No entanto, essas substâncias permanecem residualmente na torta, devido ao fato da extração mecânica não retirar totalmente o óleo dos grãos (residual de aproximadamente 6 - 14%). Considerando que a DL50, que é o indicador de letalidade mais comumente utilizado e correspondente à dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população em teste, para o óleo de pinhão-manso em ratos foi de apenas 6 mL/kg de peso do animal (GANDHI et al., 1995), o óleo deve ser manipulado com os cuidados de proteção recomendados por Gonçalves e colaboradores (2009).

Pelas características tóxicas acima mencionadas, a torta, coproduto da extração do óleo, é utilizada com restrições. Os melhores resultados encontrados em escala de laboratório para a redução do teor de ésteres de forbol na torta, foram obtidos por meio de lavagem com metanol (AREGHEORE et al., 1998) que é considerado um solvente não adequado para aplicação em alimentos. Outro processo testado foi a extração da torta com etanol / extrusão / extração com hexano / autoclavagem em um complexo processo testado por Chivandi e colaboradores (2004). Mesmo neste sistema complexo, a eliminação dos ésteres de forbol não foi completa, como verificado em trabalho de validação posterior (CHIVANDI et al., 2005) e em experimentação animal, na qual se verificou que a torta tratada foi prejudicial em diversos parâmetros quando adicionada à ração de suínos. Assim, a questão parece não ser apenas o teor de óleo remanescente na torta, mas o tipo de solvente empregado no processo de destoxificação da mesma.

A torta resultante da extração do óleo dos frutos de pinhão-manso constitui excelente adubo orgânico, rico em nitrogênio, fósforo e potássio. No entanto, poder-se-ia dar esta destinação às cascas dos frutos e das sementes, aproveitando a torta rica em proteína (53-63%) para uma aplicação de maior valor agregado (MENDONÇA; LAVIOLA, 2009). O alto teor de proteína da torta a torna útil como um potencial suplemento proteico, altamente nutritivo para ração animal (ruminantes e monogástricos). A proteína é rica em aminoácidos sulfurados e, exceto pela lisina, os teores de todos outros aminoácidos essenciais atendem ao padrão sugerido pela FAO. No entanto, para viabilizar o uso desse coproduto para a nutrição animal é imprescindível que os componentes tóxicos sejam removidos (ADERIBIGBE et al., 1997; MAKKAR et al., 1998).

Makkar e coautores (1998) relataram a existência de sementes não tóxicas de pinhão-manso oriundas do México e levando em consideração esse fato, muitos pesquisadores estão buscando introduzir

tal característica nas plantas de pinhão-manso a serem cultivadas comercialmente no Brasil (FERRARI et al., 2009; MARQUES, 2007).

Composição centesimal de sementes de mamona e pinhão-manso

A composição média de 27 amostras de sementes de pinhão-manso de diferentes procedências (Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Pernambuco) mostrou que o teor médio de óleo das amostras foi de 31,51% (FERRARI et al., 2009). A composição centesimal das sementes de pinhão-manso e mamona pode ser verificada na Tabela 1, onde se observa que o óleo é o principal componente das sementes. O teor de óleo é ligeiramente maior na mamona quando comparada com o pinhão-manso, que apresenta teor de carboidratos ligeiramente menor. Os demais componentes aparecem em ambas as sementes com proporções aproximadas.

Tabela 1. Características físico-químicas das sementes de pinhão-manso e mamona.

Característica (%)	Pinhão-manso*	Mamona**
Umidade	7,63	5,14
Óleo	31,51	46,65
Proteína	16,11	17,88
Cinzas	4,56	2,73
Fibra	16,00	14,99
Carboidrato	23,83	12,61

* Fonte: Ferrari et al. (2009). ** Fonte Viotto (1987)

Processamento convencional de mamona e pinhão-manso

No processamento convencional de sementes oleaginosas, incluindo a mamona e o pinhão-manso, normalmente as sementes inteiras são enviadas diretamente para prensas contínuas, e as tortas obtidas após a extração mecânica para retirada do óleo. Posteriormente, após a extração com solvente do óleo remanescente na torta, são obtidos os farelos, sendo hexano o solvente mais usado pelas indústrias extratoras. Na extração por prensagem, o teor de óleo observado nas tortas depende da espécie processada e das especificações das prensas, tendo sido encontrado teores que variam de 15 a 27% para grãos como: algodão, girassol, pinhão-manso e nabo-forrageiro (NEIVA JÚNIOR, 2007; VAN CLEEF, 2008).

Deve-se salientar que o processo por prensagem com obtenção de torta, apesar de ser menos eficiente na extração do óleo, é o sistema mais adequado para processamento em pequena escala, por não depender das exigências de segurança e instalações inerentes ao processamento para extração de óleo com uso de solvente. Os farelos, obtidos após extração com solvente, apresentam teor bastante inferior de óleo, da ordem de 1,5%, o que resulta consequentemente em maior teor de proteína bruta no farelo em relação à torta (ANDERSON et al., 2000; RAKSHIT et al., 2008).

Com a extração do óleo de mamona e de pinhão-manso pelo processamento convencional, por meio da prensagem contínua de sementes inteiras, são gerados cerca de 50 a 70% de torta, de aspecto escuro e oleoso, conforme pode ser visualizado na Figura 1. Esse coproduto apresenta baixo valor comercial pelo fato de conter compostos tóxicos, ter elevado teor de fibras e minerais. As tortas têm sido predominantemente usadas como fertilizantes para adubação de solos, mas mesmo quando usadas como adubo, é aconselhável que recebam tratamento de destoxificação e desalergenização, pois a



Figura 1. Aspecto da torta obtida após prensagem contínua de sementes inteiras.

aplicação desse produto pode causar alergia aos trabalhadores e aos moradores do local bem como dos animais domésticos (ICOA, 1989).

A composição físico-química parcial dos farelos de mamona e pinhão-manso pode ser observada na Tabela 2. A proteína é o componente que aparece em maior proporção no farelo de mamona, sendo que no farelo de pinhão-manso as proporções entre carboidratos, proteínas e fibras são aproximadas.

Tabela 2. Características físico-químicas de farelo de pinhão-manso e mamona.

Característica (%)	Farelo Pinhão-manso*	Farelo Mamona**
Umidade	8,06	8,72
Óleo	2,78	1,60
Proteína	25,91	43,30
Cinzas	6,36	13,55
Fibra	22,80	16,93
Carboidrato	34,10	15,90

* Fonte: Casarini et al. (2009) ** Fonte: Viotto (1987)

Com relação à fração proteica de ambos os farelos, podemos destacar a presença de aminoácidos essenciais, que em alguns casos chega a ser superior ao padrão recomendado pela FAO, conforme mostrado na Tabela 3. O farelo de pinhão-manso, obtido por meio do processamento convencional utilizando-se as sementes inteiras, foi analisado por Casarini e colaboradores (2009) quanto ao perfil de minerais e apresentou os resultados indicados na Tabela 4. Observa-se elevado teor de potássio, fósforo e magnésio e reduzido teor de contaminantes inorgânicos, como crômio, níquel e zinco, o que é um aspecto favorável para sua utilização como ingrediente de ração animal.

Tabela 3. Perfil de aminoácidos do farelo de pinhão manso e mamona.

Aminoácido	Pinhão-manso*	Mamona**	Padrão FAO
Ác. Aspártico	10,80	7,75	-
Treonina	3,80	3,13	3,59
Serina	4,96	5,81	-
Ác. Glutâmico	20,44	25,67	-
Prolina	6,34	3,15	-
Glicina	4,63	4,37	-
Alanina	5,01	4,02	-
Cistina	0,61	3,34	1,58
Valina	4,96	4,24	5,30
Metionina	0,99	1,54	1,76
Isoleucina	4,30	4,97	4,85
Leucina	8,15	6,73	7,50
Tirosina	2,75	3,27	3,78
Fenilalanina	5,12	3,45	4,89
Lisina	4,90	4,04	3,40
Histidina	2,42	1,47	3,08
Arginina	7,05	12,98	12,90

* Fonte: Casarini et al. (2009). ** Fonte: Viotto (1987)

Tabela 4. Perfil de minerais do farelo de pinhão-manso.

Elemento	Teor* (mg/100g)	Elemento	Teor* (mg/100g)
Chumbo	< 0,002	Níquel	0,12 (0,00)
Cálcio	526,00 (17,00)	Cádmio	< 0,002
Cobre	2,08 (0,03)	Cobalto	0,01 (0,00)
Ferro	4,65 (0,16)	Crômio	0,04 (0,00)
Fósforo	996,00 (35,00)	Sódio	1,76 (0,14)
Potássio	1493,00 (28,00)	Zinco	3,93 (0,11)
Magnésio	721,00 (11,00)	Manganês	4,42 (0,08)

*Média e estimativa de desvio padrão. Fonte: Casarini et al. (2009)

Fracionamento de pinhão-manso e mamona

Visando a agregar valor aos derivados obtidos por meio do processamento tecnológico das sementes de mamona e de pinhão-manso, o processo de fracionamento proposto neste trabalho abrange o aproveitamento integral de todos os componentes das sementes. Consiste basicamente em processos de separação de frações com diferentes características para destinações apropriadas, conforme descrito a seguir.

A primeira etapa do processo de fracionamento, a qual visa a melhorar as características dos produtos obtidos, consiste no descascamento das sementes antes da extração do óleo, com a remoção e separação de cascas e amêndoas. As cascas de mamona representam em média 25% do peso e as amêndoas os 75% restantes (CÂNDIDO et al., 2008), enquanto as sementes de pinhão-manso contêm aproximadamente 40% do peso como cascas e menor proporção (60%) de amêndoas (FERRARI et al., 2009).

A composição centesimal das amêndoas e cascas de mamona e pinhão-manso é apresentada na Tabela 5, demonstrando a grande diferença de composição destas partes. O principal componente das amêndoas é o óleo, e o componente predominante das cascas, tanto da mamona quanto do pinhão-manso são as fibras, onde predominam celulose, hemicelulose e lignina, correspondendo aproximadamente a 38%, 20% e 8% respectivamente da matéria seca das cascas (CÂNDIDO et al., 2008).

Tabela 5. Composição centesimal das amêndoas e cascas de sementes de mamona e pinhão-manso.

Característica (%)	Mamona*		Pinhão-manso	
	Amêndoa	Casca	Amêndoa	Casca
Umidade	3,60	8,76	3,40	10,30
Óleo	66,02	0,98	57,80	0,81
Proteína	23,43	4,76	25,21	4,31
Cinzas	2,24	3,89	3,61	5,80
Fibra	0,70	48,69	3,01	75,80
Carboidrato	4,01	32,92	6,97	2,98

* Fonte: Viotto (1987)

Após a separação das cascas, uma possibilidade para o aproveitamento das mesmas juntamente com as cápsulas que envolvem as sementes, tanto do pinhão-manso como da mamona, seria destinar esse material na forma de briquetes, ou não, para a geração de energia pelo processo de pirólise, por exemplo. A palavra pirólise possui origem grega e significa "decomposição pelo calor", ou seja, a degradação de um material por energia térmica na ausência de oxigênio (UDEN, 1993). A pirólise é o processo onde os resíduos são convertidos em carvão, bio-óleo, extrato aquoso e gases. Dessa forma o carvão obtido poderá ser utilizado na agricultura como condicionador de solos e fertilizante de liberação lenta ou ter aplicação na indústria siderúrgica, assim como o extrato aquoso poderá ter aplicação agrônômica, pois possui, na sua composição, uma variedade de compostos de valor. O óleo é

um componente renovável e poderá, de acordo com o processo de beneficiamento, ser convertido em produtos químicos e biodiesel. Os gases não condensáveis normalmente são queimados no processo e fornecem o calor necessário para outros processos tecnológicos.

Sendo o óleo o principal componente das amêndoas, tanto de mamona quanto de pinhão-manso, a segunda etapa tecnológica do processo de fracionamento a ser considerada após o descascamento consiste na prensagem das amêndoas, com obtenção de óleo e torta.

A torta obtida desta forma apresenta as características apresentadas na Figura 2. A etapa seguinte do processo é a remoção do residual de óleo pelo processo de extração por solvente, com conseqüente obtenção de farelo. O farelo resultante do processo apresenta elevado teor de proteínas, e pode ser aproveitado, como ingrediente em ração animal, desde que devidamente destoxificado.

O farelo de amêndoas destoxificado pode ser usado como matéria-prima em diferentes processos de concentração e isolamento das proteínas. O processo de obtenção de isolados proteicos a partir de farelo de mamona foi realizado por Politi Corral (1975). A ricina foi obtida pela primeira vez na forma cristalina em 1948, por Kunitz e McDonald, a partir de uma suspensão aquosa de farelo de mamona. Devidamente

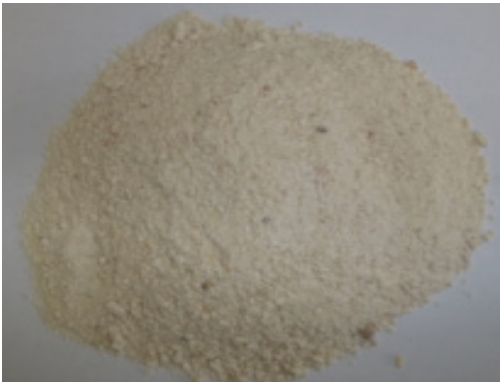


Figura 2. Aspecto da torta de prensagem de amêndoas.

destoxificadas, as tortas de mamona e pinhão-manso podem ser destinadas para diferentes aplicações nutricionais, principalmente como fonte de aminoácidos (BOSE; WANDERLEY, 1988).

No trabalho realizado por WIPO em 2010 há informações que o farelo obtido de amêndoas de pinhão-manso apresentou teor de 66% de proteínas, e que o isolado proteico de pinhão-manso destoxificado foi utilizado como substituto de 75% da fonte proteica em ração para carpas, sem nenhum comprometimento. Os mesmos autores possuem uma patente do processo de destoxificação de farelo de amêndoas de pinhão-manso e obtenção de isolado proteico, com várias empresas interessadas e em fase de licenciamento destes processos (WIPO, 2010).

Outra possibilidade para o uso das proteínas extraídas de farelos de oleaginosas está na formulação de filmes de biopolímeros. Para isso, o processo mais utilizado com tortas de oleaginosas envolve a solubilização das proteínas, normalmente em meios alcalinos, e separação das mesmas por centrifugação. Evidentemente que o tipo de base utilizada e o valor do pH pode afetar as frações proteicas extraídas. Proteínas extraídas de torta de mamona têm apresentado boas propriedades filmogênicas. Dessa forma, uma alternativa para a valorização desse produto pode ser sua utilização como matéria prima na tecnologia de filmes biodegradáveis (LACERDA et al., 2011). As proteínas da torta de mamona são compostas principalmente por globulinas e albuminas (SEVERINO, 2005), frações peptídicas que são amplamente utilizadas em estudos sobre desenvolvimento de material biodegradável (THARANATHAN, 2003). Além disso, segundo Beltrão (2002), a proteína da torta de mamona é relativamente rica nos aminoácidos arginina, histidina, lisina e metionina, o que a torna interessante para modificação química, como a reticulação com aldeídos bifuncionais (MARQUIÉ et al., 1997; MARQUIÉ, 2001). O reticulante mais usado na

tecnologia de filmes à base de proteínas é o glutaraldeído, devido à disponibilidade comercial, baixo custo e reatividade (COSTA, 2011).

Na área médica, a ricina da mamona tem se mostrado promissora, pois estudos tem destacado a atividade da mesma entre um grupo de proteínas tóxicas, que vêm sendo usadas com o objetivo de matar células doentes, tais como as cancerígenas (WOO et al., 1998; LORD et al., 1994).

Considerações finais

Embora o principal produto comercial da exploração dos frutos de mamona e do pinhão-manso seja o óleo, o aproveitamento e a agregação de valor dos coprodutos gerados durante o processamento são de fundamental importância para viabilidade financeira de todos os integrantes dessas cadeias produtivas. O aproveitamento integral das sementes de mamona e pinhão-manso pode gerar melhor remuneração, com conseqüente desenvolvimento social, econômico e ambiental promovendo, dessa forma, a sustentabilidade.

A remoção e separação das cascas das sementes de mamona e pinhão-manso, com potencial aproveitamento na geração de energia, leva como conseqüência, à obtenção de derivados com melhores características e composição e amplia as possibilidades de aproveitamento tecnológico dos mesmos.

Os farelos destoxificados obtidos a partir das amêndoas poderão ser utilizados como ingredientes de ração animal, para obtenção de isolados, concentrados proteicos, aminoácidos, compostos bioativos destinados a inúmeras finalidades, bem como ser ingrediente na formulação de filmes de biopolímeros.

Referências

- ADERIBIGBE, A. O.; JOHNSON, C. O. L. E.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; FOIDL, N. Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 67, n. 2-3, p. 223-243, 1997.
- AKHTAR, M.; MAHMOOD, I. Control of plant parasitic nematodes with organic and inorganic amendments in agricultural soil. **Applied soil Ecology**, Amsterdam, v. 4, n. 3, p. 243-247, 1996.
- ANDERSON, V. L.; CATON, J. S.; KIRSCH, J. D.; REDMER, D. A. Effect of crambe meal on performance, reproduction, and thyroid hormone levels in gestating and lactating beef cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.78, n. 9, p.2269-2274, 2000.
- AREGHEORE, E. M.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Assessment of lectin activity in a toxic and a non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and haemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Sussex, v. 77, n. 3, p. 349-352, 1998.
- AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnologia, 2001. 350 p.
- BALDONI, A. B. **Acúmulo de ricina em sementes de mamona e silenciamento do gene em plantas geneticamente modificadas**. 2010 71 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- BELTRÃO, N. E. de M. **Torta de mamona (*Ricinus Communis L.*): fertilizante e alimento**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2002. 6 p. (Comunicado Técnico, 171). Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/275867/1/COMTEC171.pdf>>. Acesso em: 13 jul. 2011.
- BOSE, M. L. V.; WANDERLEY, R. C. Digestibilidade e balanço metabólico da fração nitrogenada do farelo de mamona desintoxicado e de feno de alfafa em ovinos. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, Brasília, DF, v. 17, n. 5, p. 456-464, 1988.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 4**, de 14 de janeiro de 2008. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em: 22 fev. 2013.

CÂNDIDO, M. J. D.; BOMFIM, M. A. D.; SEVERINO, L. S.; OLIVEIRA, S. Z. R. de. Utilização de coprodutos da mamona na alimentação animal. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 3., 2008, Salvador. **Energia e ricinoquímica: [anais...]**. Salvador: SEAGRI: Embrapa Algodão, 2008.

CANGEMI, J. M.; SANTOS, A. M.; CLARO NETO, S. A revolução verde da mamona. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 3-8, 2010.

CASARINI, M. B.; FERRARI, R. A.; MARQUES, D. A. Rendimento e qualidade do óleo de pinhão manso (*Jatropha curcas*), avaliação dos fatores antinutricionais do farelo. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA –CII, 3., 2009, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: ITAL, 2009.

CHIERICE, G. O.; CLARO NETO, S. Aplicação industrial do óleo. In: AZEVEDO, D.M.P. de; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnologia, 2001. p. 89-120.

CHIVANDI, E.; KACHIGUNDA, B.; FUSHAI, F. A comparison of the nutrient and antinutrient composition of industrially processed zimbabwean *Jatropha curcas* and Glycine max meals. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Islamabad, v. 8, n.1, p. 49-53, 2005.

CHIVANDI, E.; MTIMUNI, J. S.; READ, J. S.; MAKUSA, S. M. Effect of processing method on phorbol ester concentration, total phenolics, trypsin inhibitor activity and the proximate composition of the zimbabwean *Jatropha curcas* provenance: a potential livestock feed. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, Islamabad, v. 7, n. 6, p. 1001-1005, 2004.

COSTA, P. A.; APARECIDA-MAKISHI, G. L.; BITTANTE, A. M. Q. B., LACERDA, R. S.; CHAMBI, H. N. M.; CARVALHO, R. A.; SOBRAL, P. J. A. Filmes biodegradáveis à base de proteína de torta de mamona extraída em diferentes pH. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE INGENIERIA DE ALIMENTOS - CIBIA, 8., 2011, Lima, Peru. **[Anais...]**. [S.l.: s.n], 2011.

EVANS, F. J.; EDWARDS, M. C. Activity correlations in the phorbol ester series. In: JURY, S. L.; REYNOLDS, T.; CUTLER, D. F.; EVANS, F. J. (Ed.). **The euphorbiales: chemistry, taxonomy and economic botany**. London: Academic Press, 1987.

FERRARI, R. A.; CASARINI, M. B.; MARQUES, D. A.; SIQUEIRA, W. J. Avaliação da composição química e de constituinte tóxico em acessos de pinhão-manso de diferentes origens. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 12, n. 4, p. 309-314, 2009.

FREIRE, R. M. M. Ricinoquímica. In: AZEVEDO, D. M. P. de; LIMA, E. F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnologia, 2001.

GANDHI, V. M.; CHERIAN, K. M.; MULKY, M. J. Toxicological studies on ratanjyot oil. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 39-42, 1995.

GONCALVES, S. B.; MENDONCA, S.; LAVIOLA, B. G. **Substâncias tóxicas, alergênicas e antinutricionais presentes no pinhão-manso e seus derivados e procedimentos adequados ao manuseio**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2009. 5 p. (Embrapa Agroenergia. Circular técnica, 001).

ICOA. **The processing of castor meal for detoxification and deallergenation**. Ridgewood, 1989. 75 p. (Technical bulletin, 1).

KOURI, J.; SANTOS, R. F.; SANTOS, J. W. Evolução da cultura da mamona no Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA, 1., 2004, Campina Grande. **Energia e sustentabilidade: palestras**. [Campina Grande: Embrapa Algodão, 2004].

KUNITZ, M.; MCDONALD, M. R. Isolation of crystalline ricin. **Journal of General Physiology**, New York, v. 32, n. 1, p. 25-31, 1948.

LACERDA, R. S.; BITTANTE, A. M. O. B. CHAMBI, H.; GOMIDE, C. A. MORAES, I. C. F.; CARVALHO, R. A. SOBRAL, P. J. A. Castor Bean Cake as Raw Material for Biodegradable Material. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ENGINEERING AND FOOD, 11., 2011, Athens. **Food process engineering in a changing world: proceedings**. Athens: International Association for Engineering and Food, 2011. p. 1179-1180.

LEAR, B. Application of castor pomace and cropping of castor beans to soil to reduce nematode populations. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 43, p. 459-460, 1959.

LORD, J. M.; ROBERTS, L. M.; ROBERTUS, J. D. Ricin: structure, mode of action and some current applications. **FASEB Journal**, Bethesda, v. 8, n. 2, p. 201-208, 1994.

LOUREIRO, M. C. Torta de semente da mamoneira na alimentação animal. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 11, n. 66, p. 290-294, 1962.

MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K.; SCHMOOK, B. Edible provenances of *Jatropha curcas* from Quintana Roo state of Mexico and effect of roasting on antinutrient and toxic factors in seeds. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht, v. 52, n. 1, p. 31-36, 1998.

MARQUES, D. de A. **Pinhão manso para produção de biodiesel: um promissor negócio ou um grande desastre**. 09.08.2007. Disponível em: <<http://www.apta.sp.gov.br/print.php?id=2709>>. Acesso em: 22 fev. 2008.

MARQUIÉ, C. Chemical reactions in cottonseed protein cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal for the formation of protein films with enhanced mechanical properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 49, n. 10, p. 4676-4681, 2001.

MARQUIÉ, C.; TESSIER, A. M.; AYMARD, C.; GUILBERT, S. HPLC determination of the reactive lysine content of cottonseed protein films to monitor the extent of cross-linking by formaldehyde, glutaraldehyde, and glyoxal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 45, n. 3, p. 922-926, 1997.

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

NEIVA JÚNIOR, A. P.; VAN CLEEF, E. H. C. B.; PARDO, R. M. P.; SILVA FILHO, J. C.; CASTRO NETO, P.; FRAGA, A. C. Subprodutos agroindustriais do biodiesel na alimentação de ruminantes. In: CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL, 2., 2007, Brasília, DF. **Anais...** Brasília, DF: MCT/ABIPTI, 2007.

OPENSHAW, K. A review of *Jatropha curcas*: an oil plant of unfulfilled promise. **Biomass and Bioenergy**, Alderdee, Oxford, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 28 jan. 2010.

PINKERTON, S. D.; ROLFE, R.; AULD, D. L.; GHETIE, V.; LAUTERBACH, B. F. Selection of Castor with divergent concentration of ricin and *Ricinus communis* agglutinin. **Crop Science**, Madison, v. 39, n. 2, p. 353-357, 1999.

POLITI CORRAL, P. F. **Obtenção de isolados proteicos a partir de Farelo desengodurado de mamona (*Ricinus Communis*)**. 1975. 77 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

RAKSHIT, K. D.; DARUKESHWARA, J.; RATHINA RAJ, K.; NARASIMHAMURTHY, K.; SAIBABA, P.; BHAGYA, S. Toxicity studies of detoxified *Jatropha* meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 12, p. 3621-3625, 2008.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N. P. Cultura do pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, p. 44-78, 2005.

SEVERINO, L. S. **O que sabemos sobre a torta da mamona**. Campina Grande, PB: Embrapa Algodão, 2005. 31 p. (Embrapa Algodão. Documentos, 134).

SUJATHA, M.; PRABAKARAN, A. J. New ornamental *Jatropha* hybrids through interspecific hybridization. **Genetic Resources and Crop Evolution**, Dordrecht, v. 50, n. 1, p. 75-82, 2003.

TELES, F. F. F. Toxicidade crônica da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) na África e América Latina. **Revista Brasileira de Mandioca**, Cruz das Almas, v. 14, n. 1-2, p. 107-116, 1995.

THARANATHAN, R. N. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**, London, v. 14, n. 3, p. 71-78, 2003.

TIRITAN, C. S.; CALONEGO, J. C.; SANTOS, D. H. Efeito da calagem e adubação potássica no crescimento e nutrição da cultura da mamona (*Ricinus communis* L.). **Colloquium Agrariae**, Presidente Prudente, v. 6, n. 2, p. 27-32, 2010.

UDEN, P. C. Nomenclature and terminology for analytical pyrolysis (IUPAC Recommendations 1993). **Pure And Applied Chemistry**, Oxon, v. 65, n. 11, p. 2405-2409, 1993.

VAN CLEEF, E. H. C. B. **Tortas de nabo forrageiro (*Raphanus sativus*) e pinhão manso (*Jatropha curcas*):** caracterização e utilização como aditivos na ensilagem de capim elefante. 2008. 77 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

VIOTTO, W. H. **Estudo da destoxificação do farelo de mamona e seu controle analítico.** 1987. 123 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

WEISS, E. A. Castor. In: WEISS, E.A. **Oilseed crops.** London: Longman, 1983. p. 31-99.

WIPO. H. P. S. Makkar; K. Becker. **Method for detoxifying plant constituents.** WO/2010/092143, 12 fev. 2010. Patent Application.

WOO, B.H.; LEE, J.T.; LEE, K.C. Purification of Sepharose-unbinding ricin from Castor Beans (*Ricinus communis*) by hydroxyapatite chromatography. *Protein Expression and Purification*, v.13, p.150-154, 1998.

Potencial Energético do Epicarpo e da Torta de Pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.)

Ailton Teixeira do Vale

Frederico de Souza

Marcela Regina Siqueira Amorim

Rejane Marques Mendes

Introdução

A matriz energética brasileira apresenta mais de 255.000.000 tep de energéticos primários consumidos em 2010, dos quais 44% são originários de fontes renováveis, que por sua vez são provenientes dos recursos hídricos (energia hidráulica) e dos produtos da biomassa (cana-de-açúcar e da lenha) (BRASIL, 2012). Do total de combustíveis renováveis, 62% são originários da biomassa composta por lenha, bagaço de cana e lixívia, principalmente, sem considerar os resíduos contidos em outras energias primárias, como resíduos madeireiros e casca de arroz.

De acordo com o Balanço Energético Nacional, a biomassa é utilizada na produção de energia, na forma *in natura* para a queima direta, como ocorre com parte da lenha e praticamente todo bagaço de cana-de-açúcar e a lixívia ou licor negro do processo

de produção de pasta celulósica; ou transformada em álcool, como ocorre com o caldo da cana-de-açúcar e melaço; ou ainda transformada em carvão vegetal, como ocorre com parte da lenha.

A geração de energia de combustíveis fósseis pode tornar-se insustentável no futuro. Assim, a utilização da biomassa para a geração de energia servirá como base para a adoção de um modelo energético sustentável, principalmente no Brasil, país com grande biodiversidade (ALVES JUNIOR et al., 2004).

Além de energia elétrica a biomassa é utilizada para a produção de energia mecânica e calor de processo nas indústrias. Neste contexto, o bagaço de cana-de-açúcar é o principal resíduo presente no balanço energético nacional, seguido da lixívia e de outros resíduos com menor participação, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1. Produção de termelétricidade a partir de resíduos de biomassa.

Combustível	Número de termelétricas	Potência (MW)
Bagaço de cana-de-açúcar	252	4.000
Lixívia	13	944
Resíduo de madeira	27	232
Casca de arroz	4	21
Biogás	3	45
Total	287	5.242

Fonte: Agência Nacional de Energia Elétrica (2008)

Uma cultura que caminha no sentido de ocupar lugar de destaque no cenário da produção de energia no Brasil é *Jatropha curcas*, conhecida como pinhão-manso. Para viabilizar a utilização da cultura, esforços estão sendo feitos no sentido de domesticá-la e de levantar parâmetros técnicos necessários para um cultivo em escala comercial.

O pinhão-manso vem se tornando uma opção interessante pela sua rusticidade e por não ser destinada à alimentação humana.

A produção de pinhão-manso apresenta outra limitação, que é a grande geração de coprodutos. Na Tabela 2 estão listadas todas as partes constituintes do pinhão-manso. Durante o processamento são gerados resíduos na forma de epicarpo, com a liberação das amêndoas; de casca, com a liberação do albúmen e da torta ou farelo após a prensagem e liberação do óleo bruto, em um total aproximado de 70% em relação à massa total em base seca.

Tabela 2. Massa e valores percentuais dos componentes do fruto do pinhão-manso.

Itens	Massa Total (g) *	Teor de Umidade (%)*	Massa Seca (g)
Fruto *	86,7	11,0	78,11
1.Epicarpo *	22,7	14,8	19,77
2.Semente *	64,0	9,5	58,45
2.1.Casca *	24,1	16,2	20,74
2.2.Albúmen	39,9	5,6	37,78
2.2.1.Óleo* *			22,66
2.1.1.Torta			15,12

*CETEC, 1983 Obs.: Valores obtidos a partir de 100 unidades

**Considerando um teor de óleo de 60,8% Penha et al. (2013).

Esses coprodutos podem ser utilizados diretamente como insumo energético ou transformados em combustíveis líquidos, sólidos ou gasosos ou ainda, como insumo não energético e nesse caso, Pinheiro e colaboradores (2006) citam alguns usos para carvão vegetal, tais como, refino do açúcar, ingrediente em ração de gado e aves, desodorizante e na indústria química, como ingrediente básico na produção e síntese de compostos orgânicos e inorgânicos.

O biodiesel, a cultura do pinhão-manso e o uso energético dos coprodutos

Segundo Staisse Pereira (2001), a biomassa pode ser transformada, pelas diferentes tecnologias de conversão, em biocombustíveis sólidos, líquidos ou gasosos, que são posteriormente transformados em energia térmica, mecânica e elétrica. O processo é cíclico, pois a biomassa é composta da combinação de dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O), e queima produz esses mesmos compostos químicos, sendo por isso considerada um recurso renovável.

Nesse contexto, o biodiesel surge como uma fonte alternativa, constituindo-se em um combustível de queima limpa, quando comparado à queima do óleo diesel mineral e o aumento na produção e uso contribui para a redução da importação de óleo diesel mineral. No entanto, a principal contribuição da participação do pinhão-manso no balanço energético nacional está na redução da emissão de poluentes na atmosfera e consequentemente do aquecimento global; e na abertura de oportunidades de desenvolvimento econômico para diversas regiões do país, com a inclusão da agricultura familiar no processo. Nesse sentido, a produção e o uso do biodiesel vêm sendo incentivado pelo Governo Federal através do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) e o Plano Nacional de Agroenergia.

Devido à dimensão continental e à diversidade de climas e de solos, estima-se que o Brasil tenha mais de 200 espécies de oleaginosas com potencial para produzir óleo para ser fonte de matéria-prima para a produção de biodiesel (BELTRÃO, 2006). Dentre as oleaginosas, uma opção agrícola viável é o pinhão-manso, uma espécie da família das Euforbiaceae (SANTOS et al., 2007) com produção aproximada de duas toneladas de óleo por hectare/ano (CARNIELLI, 2003; PEREIRA et al., 2010).

O pinhão-manso tem sido destacado como uma planta rústica, perene, adaptável a uma vasta gama de ambientes e condições edafoclimáticas. É considerado tolerante à seca e pouco atacado por pragas e doenças (SATURNINO et al., 2005). Por conta dessas características, o cultivo do pinhão-manso é interessante nas pequenas propriedades, que fazem uso da mão-de-obra familiar (PURCINO; DRUMOND, 1986).

Swamy e Singh, (2004) afirmam que o pinhão-manso, além de sobreviver sob condições de seca extrema, pode adicionar grande quantidade de matéria orgânica ao solo no período de desfolhamento que ocorre no inverno e pelo extenso sistema radicular. Dessa forma, segundo Saleme (2005), melhora o microclima, diminui a erosão, fertiliza o solo com a queda de suas folhas, além de poder ser plantado em consorciação com outras oleaginosas.

Peixoto (1973) afirma ainda que o fruto do pinhão-manso é composto de 53 a 62% de sementes (endocarpo + albúmen) e de 38 a 47% de epicarpo (casca), sendo que as sementes apresentam na composição do albúmen teor de até 60,8% em óleo.

Na extração do óleo a partir da prensagem das amêndoas da semente é gerada a torta que, segundo Arruda e colaboradores (2004), ainda contém aproximadamente 8% de óleo remanescente. A torta é utilizada como fertilizante natural, em virtude do seu elevado teor de nitrogênio, fósforo e potássio. Entretanto, ela não pode ser utilizada na alimentação animal devido às suas propriedades tóxicas, referentes à presença de curcina, ésteres de forbol, antinutrientes e alergênicos, mas existem pesquisas que visam estabelecer métodos para destoxificar a torta.

Uma alternativa que se apresenta para a utilização dos coprodutos do pinhão-manso, como por exemplo, o epicarpo e a torta, é a geração de energia. Para isso, há a necessidade de caracterizar os materiais, em particular calculando a densidade energética, que é a relação entre a densidade e o poder calorífico. Algumas características da

matéria-prima, como o teor de umidade e composição química (celulose, lignina, hemiceluloses e extrativos), influenciam o poder calorífico.

O poder calorífico é definido como a quantidade de energia na forma de calor liberada pela combustão de uma unidade de massa (JARA, 1989). Divide-se em poder calorífico superior (PCS) e inferior (PCI), sendo que o PCS pode ser definido quando a combustão se efetua a volume constante e a água formada durante a combustão é condensada e o calor que é derivado desta condensação é recuperado (BRIANE; DOAT, 1985). Por sua vez, o poder calorífico inferior (PCI) é a energia efetivamente disponível por unidade de massa de combustível após deduzir as perdas com a evaporação de água (JARA, 1989).

Assim como o poder calorífico é importante, o conhecimento do teor de umidade é fundamental para a utilização energética da biomassa. É necessário que o teor de umidade seja reduzido ao máximo possível para facilitar o manejo, reduzir o custo de transporte e agregar valor ao produto final. Segundo Cunha e coautores (1989), quanto maior o teor de umidade da madeira, menor é o poder de combustão devido ao processo de evaporação da umidade durante a queima, o qual absorve energia da combustão. A quantidade máxima de água que a biomassa pode conter para entrar em combustão é de aproximadamente 65%, em base úmida. Biomassa com umidade acima desse limite necessita de energia externa para secar e entrar em combustão.

A biomassa pode ser utilizada na forma *in natura* ou transformada, por exemplo, em briquetes e carvão vegetal, para produção de energia. Segundo Andrade e Carvalho (1998), durante a conversão de biomassa a carvão vegetal, além da concentração de carbono, ocorre uma série de fenômenos físicos e químicos, que resultam em um resíduo sólido carbonoso (carvão) e em uma fração gasosa. Parte dessa fração gasosa pode ser condensada, permitindo a obtenção do chamado licor pirolenhoso, e a outra parte resulta em gases não-condensáveis em parte inflamáveis (CO , H_2 , CH_4 , C_2H_6 e outros).

O licor pirolenhoso é constituído por água e outros compostos químicos, como ácido acético, ácido fórmico, éter, metanol, etanol, acetona, alcatrão e outros. Quando diluído em água e/ou urina bovina, o licor pirolenhoso encontra uma ampla aplicação no campo dos cultivos orgânicos e convencionais (INFOTEC, 2000). O alcatrão, em virtude da composição, que apresenta compostos fenólicos, pode ser utilizado como combustível e também como preservativo de madeira.

A briquetagem de biomassa é um processo de adensamento no qual se produz um biocombustível para utilização em caldeiras, fornos de restaurantes, lareiras, entre outros. As matérias-primas para a fabricação de briquete são encontradas nos vários níveis de processamento da biomassa, tais como, maravalhas, serragem e pedaços de madeiras do processamento de toras em serrarias; cascas provenientes do beneficiamento do arroz, café e de frutas em geral; biomassa residual gerada na indústria de chás; epicarpo, casca da amêndoa, torta e glicerina da fabricação do biodiesel. As vantagens na utilização do briquete são aumento da densidade energética, diminuição de custo de transporte e melhor armazenamento.

Neste capítulo serão discutidos os resultados da caracterização energética do epicarpo e da torta do pinhão-manso na forma *in natura*, ambos transformados em carvão vegetal e do estudo das variáveis envolvidas no processo de briquetagem da torta.

Biomassa e carvão vegetal de epicarpo e torta de pinhão-manso

A carbonização foi realizada em forno elétrico de laboratório à temperatura máxima de $450^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$, durante 3,5 horas, com uma taxa de aquecimento de $2,14^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Foram feitas 5

repetições, sendo cada uma constituída de 0,5 kg de material, na forma que chegou ao laboratório, ou seja, o epicarpo inteiro e a torta de pinhão-manso em pequenos pedaços. As determinações do teor de umidade, segundo Vital (1997), da análise imediata, segundo a norma ABNT NBR 8112/1986 e do poder calorífico pela norma ABNT NBR 8633/1984; foram realizadas em base seca.

Teor de umidade e carbonização do epicarpo e da torta

O teor de umidade, em base seca, encontrado para a casca do pinhão-manso em condição *in natura* foi de 18,9% e para a torta 2,41% (Figura 1). Vale e colaboradores (2007), trabalhando com resíduos de grão de café e de madeira encontraram umidades de 22,33% para a casca de café (*Coffea arabica*, L) e de 15,66% para resíduos de madeira (*Cedre lingacatenaeformis*).

O carvão da casca do pinhão-manso apresentou rendimento de 38,1%, em base seca, enquanto para o carvão de torta o rendimento foi de 32,01% (Figura 1). Vale e coautores (2004), carbonizando coco-da-baía (*Cocos nucifera* L.), encontraram valor de 39,6% para a casca do coco verde em contraste ao coco maduro, cujo rendimento foi de 36,1%, quando foi utilizado apenas o endocarpo para a carbonização.

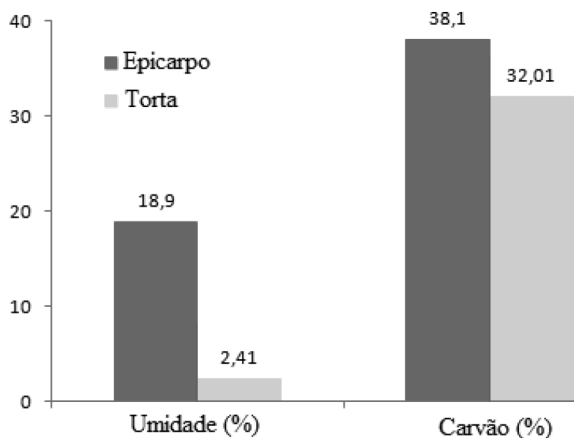


Figura 1. Umidade e rendimento da carbonização de epicarpo e torta de pinhão-manso.

Análise Imediata

Os dados da análise imediata do epicarpo e da torta do pinhão-manso *in natura* e carbonizada são apresentados na Figura 2. Para que haja combustão da biomassa é necessário que o material passe inicialmente por um processo de secagem e, em seguida, pela pirólise, que é quando ocorre a degradação térmica e a formação de novos compostos. Durante a pirólise são formados os gases combustíveis que compõem os materiais voláteis. Em geral, os teores de materiais voláteis da biomassa *in natura* são elevados e ficam entre 65 e 83% (CORTEZ; LORA, 1997). Por sua vez, Vale e colaboradores (2007) encontraram 83,19% para maravalha de *Cedrelga catenaeformis* e 75,7% para casca de café.

Para produzir carvão vegetal é necessário interromper o processo de pirólise antes da combustão, eliminando-se o suprimento de oxigênio. Como isto ocorre em um estágio de pirólise avançada, a maior parte dos materiais voláteis já foi produzida, o que justifica o baixo teor destes materiais no carvão vegetal remanescente, como pode ser observado tanto para o epicarpo quanto para a torta. O carvão vegetal do epicarpo e da torta apresentou

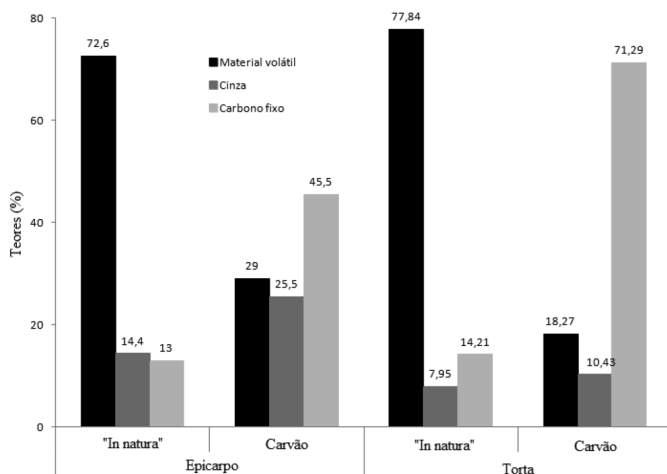


Figura 2. Valores médios de material volátil, cinzas e carbono fixo do epicarpo e da torta de pinhão-manso *in natura* e carbonizada.

teores de materiais voláteis de 29,0 e 18,3%, respectivamente. Andrade e coautores (2004), trabalhando com madeira de *Eucalyptus urophylla*, encontraram 18% de materiais voláteis.

Tanto o epicarpo quanto a torta de pinhão-mansó apresentaram elevados teores de cinzas, para o material *in natura* e para o carvão vegetal. Oliveira Junior e colaboradores (2007), trabalhando com pinhão-mansó coletado em três locais distintos; Cássia, Varginha e Crisolita, encontraram para o epicarpo, teores de cinzas, respectivamente de 13,8%; 16,8% e 17,1%, com média de 15,9% e valor médio de 7,4% de cinzas para a torta.

Em trabalho desenvolvido no Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, Rettore e Martins (1983) encontraram teores de cinzas para a semente, a casca da amêndoa e o albúmem de 8,40%, 6,73% e 7,36%, respectivamente. Sousa e colaboradores (2009) encontraram para a semente e a torta de pinhão-mansó, respectivamente, 4,95% e 5,94%. Vale e colaboradores (2007) encontraram para casca de café 13,96% de cinzas, contra 0,34% para maravalha de *Cedrelingacatenaeformis* (espécies lenhosas têm elevada capacidade de produção de biomassa).

Os teores de cinzas de espécies lenhosas, em geral, são baixos quando comparados com resíduos agrícolas, assim como a produção de biomassa. A madeira de espécies de eucalipto, que raramente chega a 1% de cinzas, produz 20 t ha⁻¹ ano⁻¹, contra uma produção de epicarpo de pinhão-mansó que pode ser estimada em 3 t ha⁻¹ ano⁻¹, cujo teor de cinzas, como visto anteriormente, está muito acima de 1%. Este fato sugere que a alta produção de biomassa nas espécies lenhosas torna a distribuição da cinza, que está predominantemente localizada na lamela média, mais diluída, tornando a concentração por unidade de massa menor.

O teor de cinzas está relacionado com a quantidade de minerais presente na biomassa. Neste sentido, minerais como cálcio, potássio, fósforo, magnésio, ferro, sódio, entre outros aumentam a presença de cinzas. Rettore e Martins (1983) encontraram para torta de pinhão-manso com 44,2% de P_2O_5 , 0,2% de SiO_2 , 0,4% de N_2O , 32,5% de K_2O , 9,3% de CaO e 6,6% de MgO . Por sua vez, Oliveira Junior (2007) encontrou 60,2 g kg^{-1} de potássio para o epicarpo e de 11,4 g kg^{-1} para a torta.

Tienne e coautores (2004), ao carbonizarem casca de laranja e casca com bagaço de laranja, associaram os altos valores de cinzas encontrados (9,50 e 10,25%, respectivamente) à presença de ferro, zinco, cobre, potássio, cálcio, fósforo, sódio e magnésio. O elevado teor de cinzas nestes resíduos não seria um empecilho para uso como fonte de energia, uma vez que atualmente, com a tecnologia de caldeiras autolimpantes, o excesso de cinzas pode ser removido de forma adequada (VALE et al., 2007).

O teor de carbono fixo está indiretamente relacionado com os teores de material volátil e cinzas, o que explica os baixos valores para o epicarpo e a torta na condição *in natura*. Combustíveis com elevado teor de carbono fixo têm queima mais lenta, implicando em maior tempo de residência dentro dos aparelhos de queima, em comparação com outros que tenham menor teor de carbono fixo (BRITO; BARRICHELLO, 1982). A queima mais lenta pode ser vantajosa para o cozimento, por exemplo, em fogões no meio rural, que têm baixa eficiência energética, a taxa de conversão é de aproximadamente 10% da energia disponibilizada em energia útil para a cocção (GOLDEMBERG, 1998).

O teor de carbono fixo do carvão obtido a partir da torta foi de 71,29%, valor semelhante aos valores encontrados por Santiago e Andrade (2005) para lenha de *Eucalyptus urophylla*, 79,4% e por Andrade e Carvalho (1998) para *Eucalyptus grandis*, que foi

de 77,89% o que pode ser associado a altos teores de lignina, componente complexo, resistente à decomposição química.

Poder calorífico

Na Figura 3 estão apresentados os poderes caloríficos superiores do epicarpo e da torta do pinhão-manso *in natura* e na forma de carvão vegetal.

O epicarpo e a torta de pinhão-manso, na condição *in natura*, produzem maior quantidade de calor por unidade de massa em base seca quando comparados com casca de semente de algodão; palha de arroz e sabugo de milho, cujos poderes caloríficos superiores são, de 2.800 kcal kg⁻¹, 3.500 kcal kg⁻¹ e 2.900 kcal kg⁻¹, respectivamente (REDE ENERGIA, 2010A) a torta também é superior ao bagaço de cana-de-açúcar que apresenta poder calorífico superior de 3.700 kcal kg⁻¹ (QUIRINO et al., 2005), à casca de café com 3.933 kcal kg⁻¹ (VALE et al., 2007) e à casca de coco de babaçu com 4.500 kcal kg⁻¹ (REDE

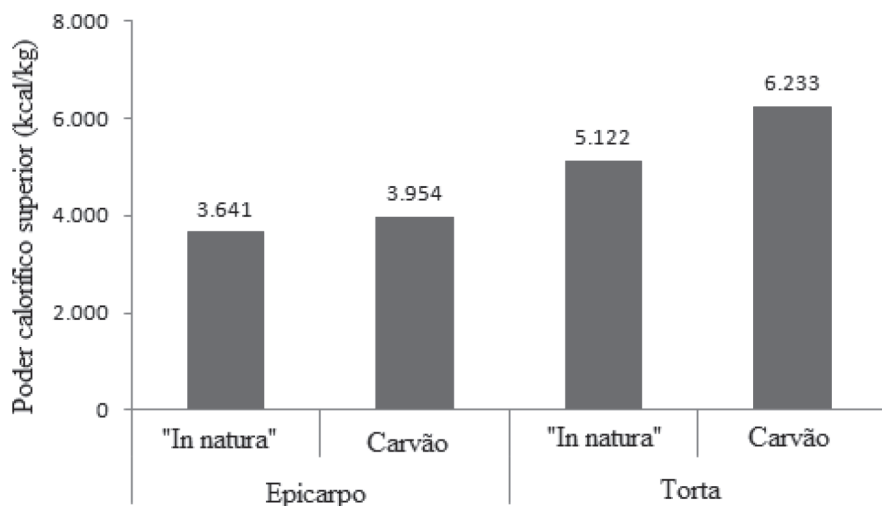


Figura 3. Poderes caloríficos superiores de epicarpo e torta de pinhão-manso na condição *in natura* e transformada em carvão vegetal.

ENERGIA, 2010) e apresenta valores próximos à casca de coco-da-baía verde (*Cocos nucifera*) com $5.636 \text{ kcal kg}^{-1}$ (VALE et al., 2004) e borra de café com $5.500 \text{ kcal kg}^{-1}$ (REDE ENERGIA, 2010).

Observa-se maior PCS para a torta em relação ao epicarpo. Na condição *in natura* o maior poder calorífico da torta se deve principalmente à presença de óleo residual do processo de prensagem e na condição de carvão vegetal se deve principalmente ao reduzido teor de cinzas em relação ao epicarpo.

Segundo Arruda e colaboradores (2004), a torta de pinhão-manso é utilizada como fertilizante natural em virtude do seu elevado teor de nitrogênio, fósforo e potássio. Os níveis desses minerais, segundo Oliveira e coautores (2007), são de $34,6 \text{ g kg}^{-1}$ de nitrogênio, $7,2 \text{ g kg}^{-1}$ de fósforo e $11,4 \text{ g kg}^{-1}$ de potássio. Os autores defendem, além da torta de pinhão-manso, o uso da casca como fertilizante, para ciclagem de nutrientes, uma vez que a casca apresenta elevada quantidade de potássio enquanto a torta apresenta altos níveis de nitrogênio. Por outro lado, a utilização do epicarpo pode atender à geração de vapor nas caldeiras e, conseqüentemente, a necessidade energética na fase industrial de processamento das sementes.

O epicarpo pode ser utilizado como combustível, no entanto, apresenta baixa densidade a granel 100 kg m^{-3} que, associada ao baixo poder calorífico útil de $2.612 \text{ kcal kg}^{-1}$, produz a baixa densidade energética de $261.200 \text{ kcal m}^{-3}$, além de elevado teor de cinzas de 14,4%, quando comparado com a madeira. Uma solução para a baixa densidade energética, principalmente para grandes distâncias de transporte até o centro consumidor, é o adensamento na forma de briquetes ou de pellets. O outro ponto desfavorável do epicarpo para uso energético é o teor de cinzas, que indica a necessidade de utilização de equipamentos adequados para limpeza eficiente do sistema de queima.

Assim a torta de pinhão-manso também pode ser utilizada para fins energéticos com melhores características em relação ao epicarpo, ou seja, densidade a granel igual a 600 kg m^{-3} e o poder calorífico útil igual a $4.671 \text{ kcal kg}^{-1}$, proporcionando a densidade energética de $2.802.600 \text{ kcal m}^{-3}$, além de possuir baixo teor de cinzas, quando comparado com a madeira. A sugestão de briquetagem ou adensamento também pode ser proposta para a torta, melhorando ainda mais a densidade energética desse material.

Com rendimentos gravimétricos em carvão vegetal de 38,1% para a casca e 32% para a torta, ambos os resíduos podem ser utilizados para a carbonização. A torta leva vantagem em relação ao epicarpo por apresentar maior rendimento em carbono fixo e maior poder calorífico.

O carvão de epicarpo e da torta do pinhão-manso possui estrutura leve, baixa resistência mecânica e elevado teor de cinzas, características que inviabilizam a sua utilização como insumo em siderurgia, que exige carvões de boa densidade e resistência mecânica e teor de cinzas entre 1 e 3% (PIMENTA et al., 2012).

Uma opção de uso está na fabricação de cimento, onde uma das principais características é a produção de calor, e o carvão vegetal de epicarpo e de torta com poder calorífico de $6.000 \text{ kcal kg}^{-1}$ leva vantagem sobre o carvão mineral comumente utilizado e que possui poder calorífico em torno de $3.500 \text{ kcal kg}^{-1}$.

Briquetagem da torta de pinhão-manso: análise das variáveis do processo

A análise a seguir baseia-se em resultados da briquetagem da torta de pinhão-manso em laboratório, tendo como variáveis a granulometria das partículas, a pressão e a temperatura de compactação.

O resíduo coletado foi moído em um moinho de facas tipo Willey e em sequência realizou-se uma classificação do pó obtido do moinho quanto à granulometria. Para isso foi utilizada uma peneira com abertura da malha de 0,500 mm em mesa vibratória, resultando em dois diferentes materiais moídos: 1- partículas com granulometria acima de 0,500 mm (denominadas partículas grossas); 2- partículas com granulometria abaixo de 0,500 mm (denominadas partículas finas). Determinou-se o teor de umidade dos materiais moídos pela TAPPI T 257 om – 85/96 (TAPPI, 1996).

Produção dos briquetes

Os briquetes foram produzidos em prensa briquetadeira da marca Irmãos Lippel modelo LB-32 (Figura 4), no Setor de Energia da Biomassa do Laboratório de Produtos Florestais (LPF) do Serviço Florestal Brasileiro (SFB). A prensa é composta por dois pistões hidráulicos e controladores de pressão e temperatura. O pistão superior é responsável pela manutenção da contrapressão, enquanto que o pistão inferior é responsável pela compactação da biomassa, a qual foi acomodada dentro da matriz de compactação, que é um cilindro de aço maciço com diâmetro de 3,2 cm.

Toda a matriz é envolta por uma camisa refratária para a manutenção do calor dentro da matriz de compactação. Este calor é fornecido por uma resistência elétrica com temperatura máxima de 250°C.



Figura 4. Prensa briquetadeira da marca Irmãos Lippel, modelo LB-32 onde se confeccionaram os briquetes. À direita em destaque o sistema de ventilação forçada para resfriamento (Fotos: Frederico Souza).

Para cada briquete produzido, foram utilizados 40 g da biomassa previamente moída e com teor de umidade, em base seca, aproximado de 13%. Os briquetes foram produzidos separadamente considerando duas temperaturas, $130 \pm 10^\circ\text{C}$ e $200 \pm 10^\circ\text{C}$, duas pressões, 80 kgf cm^{-2} e 120 kgf cm^{-2} e um tempo de compactação de 5 min, contados a partir do momento em que se atingiu a pressão estabelecida.

Dessa forma, para a análise dos parâmetros de densificação dos resíduos, o delineamento experimental estabelecido (Tabela 3) foi de 6 repetições/briquetes produzidos para duas temperaturas (130 e 200°C), duas pressões (80 e 120 kgf cm^{-2}), duas granulometrias (partículas grossa e fina); resultando em 8 tratamentos e 48 briquetes produzidos.

Após a compactação, os briquetes foram expulsos da matriz, com o auxílio de uma leve contrapressão para que houvesse uma mínima dilatação em diâmetro provocada pela liberação

do vapor de água, o que poderia ocasionar rachaduras na superfície e inviabilizar a utilização das mesmas.

Utilizou-se uma máquina sopradora (ventilador) da marca Makita e modelo MUB 101 com 500 W de potência e velocidade 2, com o intuito de acelerar o resfriamento dos briquetes produzidos. O tempo de resfriamento variou entre os tratamentos, pois foi ajustado para que se obtivessem todos os briquetes com suas superfícies íntegras, ou seja, sem rachaduras ou trincas.

Tabela 3. Delineamento experimental para a avaliação dos parâmetros de briquetagem para a biomassa de pinhão-manso

Tratamento	Granulometria	Temperatura (°C)	Pressão (kgf cm ⁻²)
1	Grossa	130	80
2			120
3		200	80
4			120
5	Fina	130	80
6			120
7		200	80
8			120

A torta de pinhão-manso estava inicialmente com um teor de umidade aproximado de 18% em base seca, e dessa forma inviável para a briquetagem, pois nessas condições, pode haver a formação de grande quantidade de vapor de água durante a compactação. Isso prejudica a aderência entre as partículas e provoca um aumento da pressão interna do briquete que, após a expulsão da máquina, provocaria trincas e rachaduras na superfície e por fim, redução na dimensão do briquete. Então foi feita uma secagem do material sobre lona e em ambiente aberto, o que possibilitou a redução do teor de umidade para 13% e assim o resíduo foi briquetado.

Na briquetagem a 130°C conseguiu-se produzir todos os 12 briquetes dos tratamentos 1 e 2 sem qualquer dificuldade, utilizando-se as partículas grossas e alterando-se a pressão de compactação de 80 para 120 kgf cm⁻². O tempo de resfriamento utilizado foi de 5 min com a ventilação acionada diretamente sobre o briquete, onde não foram observadas quaisquer rachaduras ou trincas nas superfícies dos briquetes.

Entretanto, alterando-se a temperatura de 130°C para 200°C, para os briquetes produzidos com as partículas grossas (tratamentos 3 e 4), foram observadas trincas e rachaduras profundas na superfície. Tais deformações podem ser visualizadas na Figura 5.

A primeira alteração no processo de briquetagem para que pudessem ser produzidos os briquetes dos tratamentos 3 e 4 foi no tempo de resfriamento. Iniciou-se a produção destes briquetes utilizando-se 5 min de resfriamento com a ventilação acionada diretamente sobre os briquetes, entretanto rachaduras e trincas foram observadas. Adaptou-se o resfriamento para um processo lento: 5 min sem a ventilação e mais 5 min com a ventilação acionada. Entretanto, após a produção de cada briquete, as rachaduras e trincas estavam presentes.



Figura 5. Briquete produzido com partículas grossas (acima de 0,500 mm) da torta de pinhão-manso a 200°C, apresentando rachaduras na superfície (Foto: Frederico Souza, 2012).

Diminuiu-se o tempo de compactação, pois foi observado um ligeiro aumento de pressão após o primeiro minuto de compactação que pode ser explicado por uma possível formação de gases dentro da câmara de compactação. Também, os briquetes quando expulsos da máquina apresentavam aspecto de queimado com a superfície escurecida e estrutura relativamente quebradiça.

Em função da presença de óleo residual na torta, levantou-se a hipótese de que este óleo residual associado ao teor de umidade de 13% estaria influenciando o aparecimento das rachaduras e a deformação do briquete, inviabilizando a produção nessas condições. Então, a torta foi colocada em estufa a $103 \pm 2^\circ\text{C}$ até atingir massa constante, possibilitando um teor de umidade próximo de 0%, em base seca. No entanto, esta secagem da torta não surtiu o efeito desejado e os briquetes produzidos apresentaram-se com defeitos.

Por fim, fez-se a redução do tempo de compactação de minuto a minuto, e desta forma foi possível produzir os briquetes com o tempo de apenas 1 minuto de compactação, para os tratamentos 3 e 4 (Figura 6).

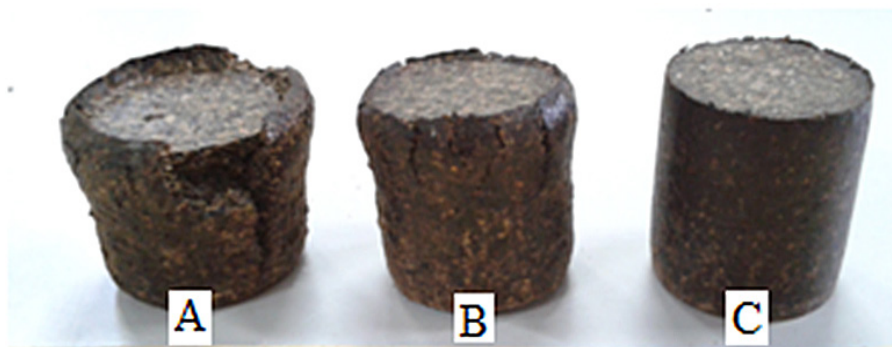


Figura 6. Briquetes produzidos com partículas grossas (acima de 0,500 mm) da torta de pinhão-manso a 200°C com 3 minutos de compactação (A), 2 minutos (B) e 1 minuto (C) (Foto: Frederico Souza, 2012).

Para as partículas finas dos tratamentos 5 e 6, a redução do teor de umidade de 13% para valores próximos de 0% de umidade em base seca foi eficiente, mesmo para o tempo de compactação de 5 min, onde os briquetes não apresentaram nenhuma trinca ou rachadura. Adaptou-se o tempo de resfriamento para 5 min sem ventilação e mais 5 minutos com a ventilação acionada.

Por outro lado, aumentando-se a temperatura para 200°C (tratamentos 7 e 8) não foi possível a produção dos briquetes, pois estes eram esmagados na máquina quando expulsos (Figura 7). Acreditava-se que devido à dimensão da partícula (abaixo de 0,500 mm) associada ao alto teor de umidade e presença elevada de óleo, além da alta temperatura, a formação dos briquetes não foi possível.

A utilização de partículas finas da torta de pinhão-manso na fabricação de briquetes, combinada à temperatura de 200°C, teve por consequência, a adesão de grande quantidade de partículas dentro da matriz de briquetagem, o que prejudicou a perfeita movimentação do pistão hidráulico, comprometendo o uso da prensa briquetadeira.



Figura 7. Briquete produzido com partículas abaixo de 0,500 mm da torta de pinhão-manso a 200°C, apresentando o esmagamento após expulsão do briquete na máquina briquetadeira (Foto: Frederico Souza, 2012).

Para uma posterior utilização do equipamento, fez-se necessário, paradas constantes na produção de briquetes, ainda que em escala laboratorial, para a limpeza e manutenção. Projetando-se a produção de briquetes para a escala industrial com essa biomassa e a partir dos parâmetros mencionados a viabilidade técnica fica comprometida.

Conclusões

O epicarpo e a torta de pinhão-manso na condição *in natura* e transformada em carvão vegetal possuem potencial para serem utilizados como insumos energéticos, pois apresentam características favoráveis para esse fim. Em alguns casos, foram semelhantes às características da madeira, considerada o insumo padrão para a produção de energia.

O epicarpo na forma *in natura* apresenta, assim como outros resíduos agrícolas, baixa densidade energética, necessitando ser adensado para viabilizar a logística de transporte e aplicações em áreas remotas.

A torta e principalmente o epicarpo, tanto na forma *in natura* quanto transformados em carvão vegetal, apresentam elevado teor de cinzas, em relação à madeira, o que, em geral, ocorre com outros resíduos agrícolas, sugerindo cuidados em relação a retirada das cinzas, com a utilização de grelhas apropriadas.

A torta de pinhão-manso mostrou-se briquetável com o uso de temperaturas de 80°C, para ambas as granulometrias e para partículas grossas (acima de 0,500 mm) com temperaturas de 120°C. Para o uso de altas temperaturas são necessárias alterações nos parâmetros de briquetagem, como a redução do tempo de compactação ou redução no teor de umidade inicial da biomassa.

O uso de partículas finas de torta de pinhão-manso provoca um emplastamento na câmara de briquetagem e nos pistões ocasionando maior tempo para manutenção da briquetadeira.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE ENERGIA ELÉTRICA (Brasil). **Atlas de energia elétrica do Brasil**. 3ª ed. Brasília, DF, 2008.

ALVES JUNIOR, F. T.; GUIMARÃES, J. L. da S.; SANTOS, G. A. dos. Setores consumidores de biomassa florestal para fins energéticos na região do Triângulo CRAJUBAR, sul do Ceará: o caso do setor de panificação. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO - ENEGEP, 24., 2004, Florianópolis, SC. **Anais...** 2004. Rio de Janeiro, RJ: ABEPRO, 2004.

ANDRADE, A. M. de; CARVALHO, L. M. de. Potencialidades energéticas de oito espécies florestais do estado do Rio de Janeiro. **Floresta e Ambiente**, Rio de Janeiro, v.5, n.1, p.24-42, 1998.

ANDRADE, M. de A.; PASSOS, P. R. de A.; MARQUES, L. G. da C.; OLIVEIRA, L. B.; VIDAURRE, G. B.; ROCHA, J. das D. de S. Pirólise de resíduos do Coco-da-Baía (*Cocos nucifera* L.) e análise do carvão vegetal. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, n.5, p.707-714. 2004.

ARRUDA, F. P. de; BELTRÃO, N. E. de M.; ANDRADE, A. P. de; PEREIRA, W. E.; SEVERINO, L. S. Cultivo de pinhão manso (*Jatropha curcas* L.) como alternativa para o Semi-Árido Nordeste. **Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas**, Campina Grande, v. 8, n.1, p.789-799, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 8112**: carvão vegetal: análise imediata: método de ensaio. Rio de Janeiro, 1986. 5 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 8633**: carvão vegetal: determinação do poder calorífico: método de ensaio. Rio de Janeiro, 1984. 12 p.

BELTRÃO, N. E. M.; CARTAXO, W. V. Considerações gerais sobre o pinhão-manso (*Jatropha curcas* L.) e a necessidade urgente de pesquisas desenvolvimento e inovações tecnológicas para esta planta nas condições brasileiras. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 3., 2006, Varginha. Artigos. Lavras: UFLA, 2006.

BRASIL. Empresa de Pesquisa Energética. **Balanco energético nacional 2012**: ano base 2011. Rio de Janeiro, 2012. 282 p.

BRIANE, D.; DOAT, J. **Guide technique de lacarbonisation**: lafabrication du charbon de bois. Saint-Remy-de-Provence: ÉDISUD, 1985. 180p.

BRITO, J. O.; BARRICHELLO, L. E. G. **Carvão vegetal de madeira de desbaste de Pinus**. Piracicaba: Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais, 1982. (IPEF. Circular técnica, v. 146).

CARNIELLI, F. O combustível do futuro. **Boletim UFMG**, Belo Horizonte, n. 1413, ano 29, 2003. Disponível em: <<http://www.ufmg.br/boletim/bol1413/quarta.shtml>>. Acesso em: mar. 2009.

CETEC - FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais. Belo Horizonte: CETEC, 1983. 2V. (Relatório Final).

CORTEZ, L. A. B.; LORA, E. S. (Coord.). **Tecnologias de conversão energética da biomassa**. Manaus: EDUA/EFEI, 1997. 527 p. (Série: Sistemas Energéticos, 2).

CUNHA, M. P. S. C.; PONTES, C. L. F.; CRUZ, I. A.; CABRAL, M. T. F. D.; CUNHANETO, Z.B.; BARBOSA, A.P.R. Estudo químico de 55 espécies lenhosas para geração de energia em caldeiras. In: ENCONTRO BRASILEIRO EM MADEIRAS E ESTRUTURAS DE MADEIRA, 3., 1989, São Carlos. **Anais...** São Carlos: USP, Escola de Engenharia de São Carlos, 1989. v. 2, p. 93-121.

GOLDEMBERG, J. **Energia, meio ambiente e desenvolvimento**. São Paulo: Edusp, 1998. 235 p.

INFOTEC. Carbonização da madeira e produtos obtidos. **Informativo Técnico do Programa de Qualificação da Cadeia Produtiva do Carvão Vegetal do Estado de São Paulo**, Piracicaba, ano 1, n. 1, 2000.

JARA, E.R.P. **O poder calorífico de algumas madeiras que ocorrem no Brasil**. São Paulo: IPT, 1989.(Comunicação técnica, 1.797).

OLIVEIRA JUNIOR, J. B.; MARCELO, D. N.; FRAGA, A. C.; NETO, P. C. Determinação dos nutrientes presentes na casca e torta de pinhão manso. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 4., 2007, Varginha, MG. **Biodiesel: Combustível Ecológico: anais...** Lavras: UFLA, 2007. p. 1763-1770.

PEIXOTO, A.R. **Plantas oleaginosas arbóreas**. São Paulo: Nobel, 1973. 284p.

PENHA, M. da N. C.; MACIEL, A. P.; MENDONÇA, K. K. M.; FERREIRA, A. M.; MOUCHREK FILHO, V. E.; SILVA, M. D. P.; SILVA, F. C. **Características Físico-Químicas do Pinhão Manso (*Jatropha curcas* L.) cultivado no Maranhão**. Disponível em: <<http://www.cpamn.embrapa.br/agrobioenergia/trabalhos/146.PDF>>. Acesso em: fev. 2013.

PEREIRA, P.; RODRIGUES, W. N.; MARTINS, L. D.; TOMAZ, M.A.; NICOLINE,H.O. Pinhão manso: viabilidade da implantação para produção de biocombustível em áreas de fomento florestal. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer. Goiânia, v. 6, n. 11, p.1-11, 2010.

PIMENTA, A. S.; BARCELOS, D. C.; OLIVEIRA, E. **Produção de carvão vegetal. Laboratório de Painéis e Energia da Madeira**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/72140922/49/O-Carvao-Vegetal-na-Siderurgia-e-Metalurgia>>. Acesso em julho de 2012.

PINHEIRO, P. C. C.; SAMPAIO, R. S.; REZENDE, M. E. A.; VIANA, E. **A produção de carvão vegetal: teoria e prática**. 1. ed. Belo Horizonte: edição do autor, 2006. 120p.

PURCINO, A. A. C.; DRUMMOND, O. A. **Pinhão manso**. Belo Horizonte: EPAMIG, 1986. 7 p. Publicação não convencional.

QUIRINO, W. F.; VALE, A. T. do; ANDRADE, A. P. A. de; ABREU, V. L. S.; AZEVEDO, A. C. dos S. Poder calorífico da madeira e de materiais lignocelulósicos. **Revista da Madeira**, n. 89, p.100-106, 2005.

REDE ENERGIA. **Energias alternativas**. 2010. Disponível em: <<http://redenergia.com.br/infotec.asp>>. Acesso em: 11 abr. 2010.

RETTORE, R. P.; MARTINS, H. (Coord.). **Produção de combustíveis líquidos a partir de óleos vegetais**: estudo das oleaginosas nativas de Minas Gerais. Belo Horizonte: CETEC, 1983. v. 1. Relatório final de projeto Convênio STI- MIC / CETEC.

SALEME, W. J. L. Potencial do pinhão-mansô para o Programa Nacional de Biodiesel. Brasília, DF: Instituto Fênix de Pesquisa e Desenvolvimento Sustentável, 2005. 11p. In: FUNDAÇÃO DE ESTUDOS E PESQUISA EM ADMINISTRAÇÃO E DESENVOLVIMENTO. **Potencial do pinhão-mansô para o Programa Nacional de Biodiesel**. Disponível em: <<http://www.fepad.org.br/NovoSite/%5Fdinamico/?Link=seminario>>. Acesso em: 27 abr.2006.

SANTIAGO, A. R.; ANDRADE, A. M. Carbonização de resíduos do processamento mecânico da madeira de Eucalipto. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v.15, n.1, p. 1-7, 2005.

SANTOS, S.; FERREIRA JUNIOR, E. J.; PIRES, B.; COSTA NETO, A. P. **Efeito de diferentes adubações no desenvolvimento inicial de mudas de pinhão mansô (*Jatropha curcas* L.)**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 4., 2007, Varginha, MG. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2007. p. 547-554.

SATURNINO, H. M.; PACHECO, D. D.; KAKIDA, J.; TOMINAGA, N.; GONÇALVES, N.P. Cultura do pinhão-mansô (*Jatropha curcas*L.). **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 26, n. 229, 2005.

SOUZA, A. D. V.; FÁVARO, S. P.; ÍTAVO, L. C. V.; ROSCOE, R. Caracterização química de sementes e tortas de pinhão-mansô, nabo forrageiro e crambe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 44, n. 10, p. 1328-1335, 2009.

STAISS, C.; PEREIRA, H. **Biomassa**: energia renovável na agricultura e no sector florestal. Lisboa: Agros, 2001. Disponível em: <<http://aewww.isa.utl.pt/agros/pdf/biomassa.pdf>>. Acesso em: jun. 2009.

SWAMY, S. L.; SINGH, L. *Jatropha curcas* for biofuel plantations. In: BIODIESEL

CONFERENCE TOWARDS ENERGY INDEPENDENCE - Focus on *Jatropha*, India, 2006, Hyderabad. **Papers presented...** New Delhi: Rashtrapati Bhawan, 2006. p. 143-157.

TAPPI (TECHNICAL ASSOCIATION OF THE PULP AND PAPER INDUSTRY). 1996. **Sampling and Preparing Wood for Analysis**. T-257 cm-85. TAPPI Test Methods. TAPPI Pres, Atlanta.

TIENNE, L.; DESCHAMPS, M. C.; ANDRADE, A. M. Produção de carvão e subprodutos da pirólise da casca e do bagaço da laranja (*Citrus sinensis*). **Biomassa & Energia**, Viçosa, MG, v. 1, n. 2, p. 191-197, 2004.

UNGARO, M. R. G.; MORAIS, L. K.; REGITANO NETO, A.; GODOY, I. J. Espaçamento e poda na cultura do pinhão manso (*Jatropha curcas* L.). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 4., 2007, Varginha, MG. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2007. p. 726-729.

UNGARO, M. R. G.; REGITANO NETO, A. Métodos de propagação e germinação de sementes de *Jatropha curcas* L. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PLANTAS OLEAGINOSAS, ÓLEOS, GORDURAS E BIODIESEL, 4., 2007, Varginha, MG. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2007. p. 721-725.

VALE, A. T. do; GENTIL, L. V.; GONÇALEZ, J. C.; COSTA, A. F. da. Caracterização energética e rendimento da carbonização de resíduos de grãos de café (*Coffea arabica* L) e de madeira (*Cedrelinga catenaeformis*), Duke. **Cerne**, Lavras, v. 13, n. 4, p. 416-420, 2007.

VALE, A. T.; BARROSO, R. A.; QUIRINO, W. J. Caracterização da biomassa e do carvão vegetal do coco-da-bahia (*Cocos nucifera* L.) para uso energético. **Biomassa & Energia**, Viçosa, MG, v. 1, n. 4, p. 365-370, 2004.

VITAL, B. R. **Métodos para determinação do teor de umidade da madeira**. Viçosa, MG: Sociedade de Investigações Florestais, 1997. 33 p. (Boletim técnico Sociedade de Investigações Florestais, 13)

Embrapa

Agroenergia

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PAÍS RICO É PAÍS SEM POBREZA